

სსიპ-სოხუმის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა და

ჯანდაცვის ფაკულტეტი

ხელნაწერის უფლებით

სოფიო გუნია

ბრუცელოზური ბაქტერიოფაგების გამოყენება ბრუცელების
დიფერენცირებისა და ფაგოტიპირებისათვის

ბიოლოგიის დოქტორის აკადემიური ხარისხის

მოსაპოვებლად წარმოდგენილი

დ ი ს ე რ ტ ა ც ი ი ს მ ა ც ნ ე

თბილისი

2015

სსიპ-სოხუმის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა და

ჯანდაცვის ფაკულტეტი

ხელნაწერის უფლებით

სოფიო გუნია

ბრუცელოზური ბაქტერიოფაგების გამოყენება ბრუცელების
დიფერენცირებისა და ფაგოტიპირებისათვის

ბიოლოგიის დოქტორის აკადემიური ხარისხის

მოსაპოვებლად წარმოდგენილი

დ ი ს ე რ ტ ა ც ი ი ს მ ა ც ნ ე

თბილისი

2015

სადისერტაციო ნაშრომი შესრულებულია გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიის და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტში და სსიპ-სოხუმის სახელმწიფო უნივერსიტეტის საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა და ჯანდაცვის ფაკულტეტზე

სამეცნიერო ხელმძღვანელები:

ზაურ ლომთათიძე

ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,

სსიპ- სოხუმის სახელმწიფო უნივერსიტეტის პროფესორი.

მზია ქუთათელაძე

ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი.

ექსპერტები:

ნონა მიქაია

ბიოლოგიის აკადემიური დოქტორი, სსიპ-სოხუმის

სახელმწიფო უნივერსიტეტის ასოცირებული პროფესორი.

მარინე დარსაველიძე

ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი.

ოფიციალური რეცენზენტები:

ილია გოროზია

ბიოლოგიის აკადემიური დოქტორი, სსიპ-სოხუმის

სახელმწიფო უნივერსიტეტის ასოცირებული პროფესორი.

სერგო რიგვავა

ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,

დისერტაციის დაცვა შედგება 2016 წლის თებერვალს საათზე სსიპ-სოხუმის სახელმწიფო უნივერსიტეტის საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა და ჯანდაცვის ფაკულტეტის სადისერტაციო კომისიის სხდომაზე.

მისამართი: ანა პოლიტკოვსკაიას ქ. #9 , საპრეზენტაციო ოთახი

სადისერტაციო საბჭოს მდივანი,

ბიოლოგიის აკადემიური დოქტორი,

სსუ ასოცირებული პროფესორი

ნონა მიქაია

ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

თემის აქტუალურობა. ბრუცელოზი გლობალური ზოონოზია და წარმოადგენს ერთ-ერთ ყველაზე გავრცელებულ ინფექციურ დაავადებას ადამიანებსა და ცხოველებში, რომელსაც ახასიათებს ორგანიზმის მრავალი სასიცოცხლო სისტემის დარღვევა. დაავადება ბრუცელოზს იწვევს *Brucella*-ს გვარის მიკროორგანიზმები. თანამედროვე კლასიფიკაციით, ცნობილია ბრუცელების ათი სახეობა, რომლებიც იყოფა სხვადასხვა ბიოვარებად. სახეობების და ბიოვარების განსაზღვრას დიდი მნიშვნელობა აქვს ეპიდემიოლოგიური და ეპიზოოტური პროცესების დასადგენად, კერძოდ ინფექციის აგენტის გავრცელების გზებისა და მკურნალობის ტაქტიკის შესამუშავებლად. ბრუცელოზის მიმდინარეობისას ზიანდება შარდსასქესო (საშვილოსნო, სარძევე, სათესლე და ლიმფური ჯირკვლები), საჭმლის მომნელებელი (ღვიძლი, ელენთა) და საყრდენ-მამოძრავებელი (სახსრები) სისტემების ორგანოები. ბრუცელოზი თავისი სიმპტომებით ჰგავს მალარიას, რევმატიზმს, ენდოკარდიტს, ტუბერკულოზს, ლეიშმანიოზს, მუცლის ტიფს და ტულარემიას. ამის გამო, ხშირად მათი დიაგნოსტიკა მცდარი ხდება.

XXI-ე საუკუნის დასაწყისისათვის ბრუცელოზი კვლავ რჩება პრობლემად ადამიანებისათვის. შექმნილია ერთობლივი კომისიები - სოფლის მეურნეობის, ცხოველთა დაცვის მსოფლიო ორგანიზაციებისა (OIE) და მსოფლიო ჯანდაცვის ორგანიზაციების მონაწილეობით.

ბოლო 50 წლის განმავლობაში საქართველოში რეგისტრირებულია 20000-ზე მეტი ადამიანი, რომელიც ბრუცელოზით დაავადდა. საქართველოში ძირითადად ბრუცელოზის ორი ფორმა ვლინდება: ცხვარისა და თხის (ეპიდემიური ფორმა) და ბანგის დაავადება (სპორადული ფორმა), გამოწვეული *Brucella melitensis* ბიოტიპი III და *Brucella abortus* ბიოტიპი I. მათ სხვადასხვა ეპიდემიური პროცესი ახასიათებთ. ეს გარემოება ძირითადად განპირობებულია დაავადების გამომწვევების ეკოლოგიური პირობებისადმი გარკვეული მომთხოვნელობით, ვირულენტობით და ინფექციის წყაროს განსხვავებული სახეობებით.

საქართველოში ბრუცელოზის შემთხვევათა უმეტესობა (96,68%) რეგისტრირდება აღმოსავლეთ რეგიონებში, უმეტესად კახეთსა და მთა-თუშეთში, ეს დაავადება შედარებით ნაკლებადაა გავრცელებული მესხეთში, ჯავახეთსა და ქვემო ქართლში, კიდევ უფრო ნაკლები რაოდენობით აღირიცხება ხევში, მთიულეთში, ფშავში, ხევსურეთსა და თრიალეთზე. დაავადება ძირითადად ვრცელდება იმ რეგიონებში, სადაც მისდევენ მეცხოველეობას, კერძოდ მეცხვარეობას. დასავლეთ საქართველოში ბრუცელოზი იშვიათად გვხვდება. აღმოსავლეთ საქართველოში ძირითადად გავრცელებულია *Brucella melitensis*-ით გამოწვეული ცხვარისა და თხის ბრუცელოზი, დასავლეთ საქართველოში კი *Brucella abortus*-ით გამოწვეული სპორადული შემთხვევები – ბანგის დაავადება.

ბრუცელოზის სპეციფიური დიაგნოსტიკისთვის გამოიყენება როგორც იმუნოლოგიური, ისე მორფოლოგიური კვლევები, ბიოლოგიური და ბაქტერიოლოგიური მეთოდები. დაავადების დიაგნოსტიკისათვის ერთ-ერთ მნიშვნელოვან, დამატებით მეთოდს წარმოადგენს ბრუცელოზური

ბაქტერიოფაგის გამოყენება. სწრაფ და სარწმუნო ეპიდემიოლოგიური ანალიზის მეთოდებს შორის, მნიშვნელოვანი ადგილი უკავია ფაგოტიპირებას, რომლის საშუალებითაც შესაძლებელია ბაქტერიების შიდა სახეობრივი ან სეროტიპების დადგენა.

ბრუცელოზის წინააღმდეგ ბრძოლა და მისი პროფილაქტიკა რაციონალურად რომ წარიმართოს, აუცილებელია ბრუცელების სახეობის დადგენა, რადგანაც ამ ბაქტერიის თითოეულ სახეობას გავრცელების სხვადასხვა არეალი აქვს. *Brucella*-ს სახეობები და ასევე, ერთი და იგივე სახეობის სხვადასხვა შტამები, გამოირჩევიან განსხვავებული პათოგენობით და ვირულენტობით. ბრუცელები წარმოადგენენ ერთ-ერთ საშიშ ობიექტს ბიოლოგიური იარაღის შესაქმნელად და ბიოტერიზმის დროს. იმის გამო, რომ ბრუცელებით გამოწვეული დაავადება პოლიმორფული ხასიათისაა, ძნელად განკურნებადია და ეპიდემიოლოგიურად და ეპიზოოტურად გავრცელებადია, ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის ლაბორატორიული ბიოუსაფრთხოების სახელმძღვანელოში (2004) ბრუცელოზი შეფასებულია, როგორც მაღალი ინდივიდუალური და ზომიერი საზოგადოებრივი რისკის ჯგუფი და ამიტომ, ბრუცელები მიეკუთვნებიან ბიოუსაფრთხოების მე-3 დონეს. საქართველოში ხორციელდება განსაკუთრებით საშიში ინფექციების შესწავლასთან დაკავშირებული სხვადასხვა სამეცნიერო პროექტები, ამერიკისა და ევროკავშირის სხვადასხვა ქვეყნების კოლაბორატორებთან ერთად.

ნაშრომი შესრულებულია ამერიკის თავდაცვის საფრთხის შემცირების პროგრამის მხარდაჭერით, პროექტ GG-17-ის ფარგლებში „საქართველოში ბრუცელოზის კლინიკური, ეპიდემიოლოგიური და ლაბორატორიული შეფასება“.

კვლევის მიზანი და ამოცანები: კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ბრუცელოზური ბაქტერიოფაგების პრაქტიკული გამოყენება ბრუცელოზის სადიაგნოსტიკოდ და სადიფერენციაციოდ. აღნიშნული კვლევისათვის დასახული იქნა შემდეგი ამოცანები:

1. გ.ელიავას სახ. ინსტიტუტში არსებული ბრუცელოზური შტამების შესწავლა (მორფო-კულტურალური თვისებები, ანტიბიოტიკომგრძობელობა და ფაგომგრძობელობა).
2. ბრუცელოზით დაავადებული ადამიანებიდან და ცხოველებიდან გამოყოფილი შტამების იდენტიფიცირება გ.ელიავას ინსტიტუტში არსებული ბრუცელოზური ბაქტერიოფაგების მეშვეობით.
3. ახალი ბრუცელოზური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და მათი ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა დიაგნოსტიკისათვის, მათი შემდგომი გამოყენების მიზნით.
4. გ.ელიავას სახ. ინსტიტუტში არსებული და ახლადგამოყოფილი ბრუცელოზური ბაქტერიოფაგების გამოყენება სამუზეუმო და ახლადგამოყოფილი შტამების შიდასახეობრივი და სახეობათშორისი დიფერენცირებისათვის.

კვლევის მეცნიერული სიახლე. ჩატარებული სამუშაოების შედეგად: გამოყოფილია ახალი ბრუცელოზური ბაქტერიოფაგები # 19, 9, 7sa, 141, 11sa; შესწავლილია მათი ბიოლოგიური თვისებები; ახლადგამოყოფილი ფაგებიდან და კოლექციიდან შერჩეული იქნა ბაქტერიოფაგები ## TB, 02, 1066, 11sa, V, 110, 141, 177, 281 და 544, რომელთა მეშვეობით შესაძლებელი გახდა ახლადგამოყოფილი ბრუცელოზური შტამების იდენტიფიკაცია და შიდასახეობრივი დიფერენცირება.

ნაშრომის პრაქტიკული მნიშვნელობა. საქართველოს დაავადებათა კონტროლის ცენტრსა და სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ბაქტერიოლოგიურ ლაბორატორიის მიერ ადამიანებიდან და ცხოველებიდან მიღებული პათოლოგიური მასალიდან და საკვები პროდუქტებიდან გამოყოფილი მიკრობები დიაგნოსტირებულ იქნა როგორც ბრუცელები, რაც დადასტურდა ჩვენს მიერ შერჩეული და საკოლექციო ფაგების ნაკრებით. ასევე, ამავე ფაგების ნაკრებით შემოწმდა აშშ-ს ლუიზიანას შტატის უნივერსიტეტის ბაქტერიოლოგიურ ლაბორატორიაში არსებული ბრუცელოზური შტამები.

დისერტაციის სტრუქტურა და მოცულობა. დისერტაცია წარმოდგენილია ნაბეჭდი ტექსტის 146 გვერდზე. შეიცავს შესავალს, ლიტერატურის მიმოხილვას, მასალებისა და მეთოდების აღწერას, საკუთარ გამოკვლევებს, მიღებული შედეგების განხილვას, დასკვნებს და გამოყენებული ლიტერატურის სიას. ნაშრომი ილუსტრირებულია 34 ცხრილით, 2 გრაფიკით და სურათებით. ლიტერატურის სია მოიცავს 212 დასახელებას და 17 ვებსაიტს.

კვლევის ობიექტები და მეთოდები:

ბაქტერიული შტამები. მუშაობის პროცესში გამოყენებული იყო 146 ბრუცელოზური შტამი, აქედან:

1) გელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის კოლექციაში არსებული 36 სამუხეუმო შტამი: *Brucella melitensis*: # 130 m/z; 254m/z; 238m/z; 70m/z; 71m/z; 238; 237; 63/9; 7; 110; 16M. *Brucella abortus*: # 19; 9; 141; 99; 64; 544; C68. *Brucella suis*: # 1s/z; 52s/z; 76s/z; 153s/z; 175s/z; 182s/z; 193s/z; 1330; 7s; 8s; 15s; 32s; 35s; 36s; 7sa; 11sa; 14sa.

2) სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ბაქტერიოლოგიის ლაბორატორიის მიერ 2009-2011 წლებში გამოყოფილი მსხვილფეხა და წვრილფეხა ცხოველების სისხლიდან და რძიდან – ბრუცელოზური შტამები, ასევე დაავადებული ცხოველების აბორტირებული ნაყოფებიდან. სულ 31 შტამი.

3) საქართველოს დაავადებათა კონტროლის ცენტრში 2009-2011წწ-ში დაავადებული პაციენტების სისხლიდან გამოყოფილი 42 ბრუცელოზური შტამი.

4) ლუიზიანას სახელმწიფო უნივერსიტეტში არსებული ბრუცელოზური შტამები, როგორც მსხვილფეხა და წვრილფეხა ცხოველებიდან (ძროხა, ცხვარი), ზღვის ძუძუმწოვრებიდან, ასევე დაავადებული ადამიანებიდან. 2010 წელს გამოკვლეულ იქნა 9 შტამი; 2011 წლის მაისში – 13, 2011 წლის ნოემბერში – 15 ბრუცელოზური შტამი, სულ 37.

ბაქტერიოფაგები. სამუშაოს მსვლელობაში გამოყენებული იყო ბრუცელოზური ფაგების ლაბორატორიაში სხვადასხვა წლებში გამოყოფილი ფაგები: ## TB, IV,V,VI,VII,VIII, IX, X,XII,12(b) და BA; 22 ფაგი - *B. melitensis* კულტურებიდან: ფაგები ## 214, 248, 2, 3, 5, 6, 27, 29, 43, 63, 81, 58, 90, 100, 147, 109, 110, 224, 177, 271, 273 და 239; *B. abortus*- კულტურებიდან: ფაგები ##544 და ახლადგამოყოფილი 19, 141-1, 141-2 და 9; *B. suis* -დან ##7 sa და 11 sa ; *B. canis* - დან #1066; *B. ovis* - დან: ## 281, 290, 02 და 64. სულ 45 ფაგი.

მეთოდები:

ბაქტერიების იდენტიფიკაცია და ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა ხდებოდა კლასიკური ბაქტერიოლოგიური მეთოდებით (Покровский В.Н. 1998.). ანტიბიოტიკების მიმართ მგრძობელობის განსაზღვრას ვაწარმოებდით ანტიბიოტიკების 8 ჯგუფის 14 დასახელების სტანდარტული დისკებით აგარში დიფუზიის მეთოდით (Навашин С.М., Фомина И.П. 1982). ბაქტერიოფაგების სელექცია და მათი ბიოლოგიური თვისებების (მორფოლოგია, სეროლოგიური, ფიზიკო-ქიმიური თვისებები, ლიზისური აქტივობა და მოქმედების დიაპაზონი) შესწავლისას ვხელმძღვანელობდით საყოველთაოდ ცნობილი მეთოდებით (Гольдфард А.М. 1961., Адамс М. 1961).

ფაგების ლიზისური სპექტრის განსაზღვრას ვაწარმოებდით მყარ საკვებ არეზე კრეიჯის მეთოდის (Макашвили Е.Г., Чанишвили Т.Г. 1949) მიხედვით.

პატრონ-უჯრედთან ურთიერთქმედების ფაზების შესწავლა ხდებოდა სტანდარტული მეთოდების (Адамс М. 1961., Габрилович И.М. 1973) გამოყენებით. თითოეული საკვლევი ფაგის შემთხვევაში ვსაზღვრავდით ადსორბციის სიჩქარეს, ლატენტურ პერიოდს და საშუალო გამოსავლის სიდიდეს.

ბაქტერიოფაგის მგრძობელობას სხვადასხვა ფიზიკო-ქიმიური ფაქტორების მიმართ ვსწავლობდით სტანდარტული მეთოდებით, კერძოდ: 1) ულტრაიისფერი სხივების მოქმედებას ვიკვლევდით ფოსფატურ ბუფერში სხვადასხვა ექსპოზიციის პირობებში; 2) ფაგზე ოსმოსური შოკის მოქმედებას ვსწავლობდით სტანდარტული მეთოდით (Андерсон Т. 1956., Чанишвили Т.Г. 1968) 3) თერმოინაქტივაციის ცდებს ვატარებდით სტანდარტული მეთოდებით (Габрилович И.М. 1973).

ბაქტერიოფაგების გამრავლებასა და კონცენტრირებას ვახდენდით მყარ არეზე ორშრიანი აგარის მეთოდით (Hershey A.D., Kalmanson G., Bronfenbrenner J. 1943). თხევად საკვებ არეში ბაქტერიოფაგების ტიტრს ვსაზღვრავდით აპელმანის მეთოდით, მყარ საკვებ არეზე - გრაციას მეთოდით.

ბაქტერიოფაგების ვირიონის მორფოლოგიის შესწავლა ხდებოდა ელექტრონული მიკროსკოპით JEM-EX-1200.

კვლევის შედეგების განხილვა

ინფექციურ დაავადებათა შორის ბრუცელოზს ერთერთი მნიშვნელოვანი ადგილი უკავია. აღნიშნული დაავადების გამომწვევებს – ბრუცელებს მაღალი ინვაზიურობა და აგრესიული თვისებები ახასიათებს. ჯანდაცვის მსოფლიო ორგანიზაციის მიერ მოწოდებული დაავადებათა საერთაშორისო კლასიფიკაციის მეათე რედაქციის მიხედვით („ზოგიერთი ინფექციური და პარაზიტარული დაავადებები“) ბრუცელოზი მიეკუთვნება ზოოანთროპონოზებს.

როგორც ცნობილია, ადამიანისათვის ზოოანთროპონოზური დაავადების დროს ინფექციის წყაროს ან რეზერვუარს წარმოადგენს უპირველესად დაავადებული, ან ინფექციის მატარებელი ცხოველები, რომლებთანაც ადამიანს აქვს ხშირი კონტაქტი, აგრეთვე დაბინძურებული გარემო და კვების პროდუქტები.

აღსანიშნავია, რომ ადამიანთა კოლექტივში ზოონოზური დაავადების აღმძვრელები არ ცირკულირებენ, ვინაიდან ადამიანი მათთვის ჩიხს წარმოადგენს, თუმცა გამონაკლისს წარმოადგენს შავი ჭირი და ყვითელი ცხელება. ცხოველთა შორის ეპიზოოტიების გავრცელება დაკავშირებულია ერთის მხრივ, გარეული და სასოფლო-სამეურნეო ცხოველების მიგრაციასთან, დაავადების მსვლელობის ლატენტურ ფორმასთან, მეორეს მხრივ, დაავადების მწვავე ფორმიდან ქრონიკულში გადასვლა და დაგვიანებული დიაგნოსტიკა-მკურნალობასთან.

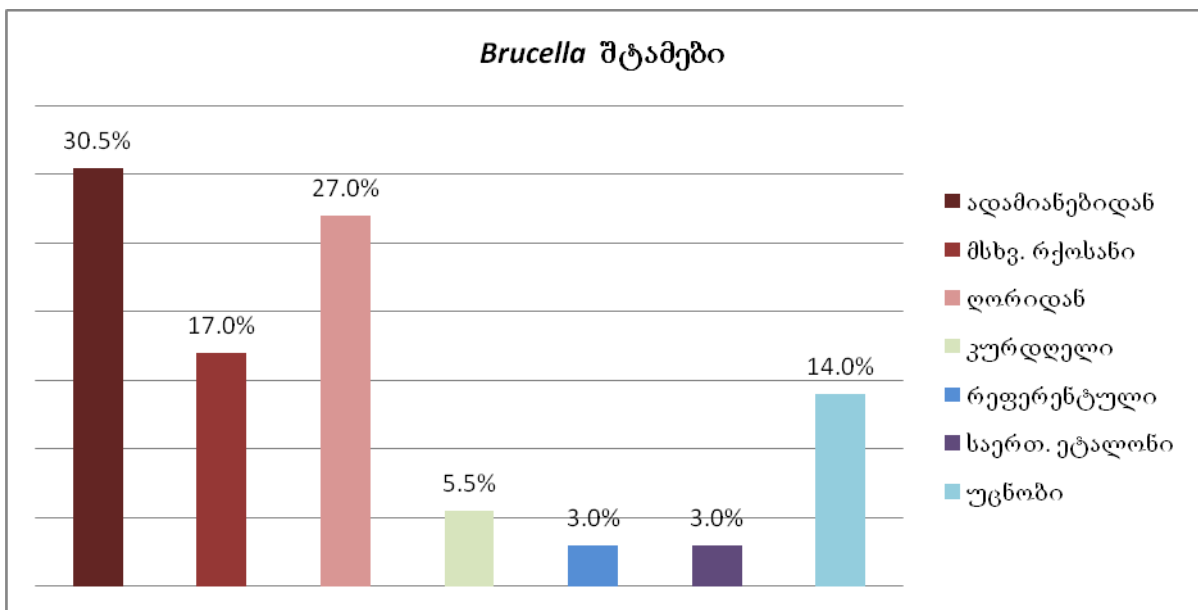
ბრუცელოზის სადიაგნოსტიკოდ კლინიკური მონაცემების და ანამნეზის გარდა აუცილებელია გამოკვლევები. თითოეული დაავადების შემთხვევა უნდა იქნეს დადასტურებული ლაბორატორიულად. ლაბორატორიული დიაგნოსტიკა მოიცავს შემდეგ მეთოდებს: 1. ბაქტერიოლოგიური - პათოგენის გამოყოფა და მისი იდენტიფიკაცია; 2. სეროლოგიური – დაავადებულის სისხლის შრატში იმუნური ანტისხეულების დადგენა რაიტის აგლუტინაციის რეაქციით ბრუცელოზური დიაგნოსტიკუმის გამოყენებით; 3. იმუნური ფლუორესენციის მეთოდი; 4. ალერგიული მეთოდი - ბიურნეს რეაქცია ბრუცელინის გამოყენებით, 5. ფაგოდიაგნოსტიკა (სახეობის დადგენა) და ფაგოტიპირება (შიდასახეობის დიფერენცირება).

წარმოდგენილ ნაშრომში შესწავლილი სხვადასხვა წლებში (1942–1963წწ) გამოყოფილი 36 სამუზეუმო შტამიდან 11 მიეკუთვნება *Brucella melitensis*, მათ შორის 4 შტამი გამოყოფილია თბილისში, დანარჩენი 7 შტამი გერმანიაში, ბულგარეთში, რუსეთში, ყაზახეთში. 7 *Brucella abortus*-დან 3 შტამი იზოლირებულია თბილისში, 2-2 შტამი რუსეთსა და ინგლისში და *Brucella suis* 18 შტამი გამოყოფილია სხვადასხვა ქვეყნებში როგორცაა: აშშ (2 შტამი), ჩეხეთი (2 შტამი), ინგლისი, ბულგარეთი, რუსეთი, იტალია, არგენტინა, პოლონეთი (9 შტამი). გამოყოფის წყაროს მიხედვით, ოთხივე *Brucella melitensis* (თბილისში გამოყოფილი) შტამი, ადამიანის სისხლიდან არის იზოლირებული, ისევე როგორც გერმანიასა და რუსეთში. ინგლისში გამოყოფილი შტამი მსხვილფეხა რქოსანიდანაა მიღებული, 3 შტამის წარმოშობა უცნობია. რაც

შეეხება *Brucella abortus* -ის შტამებს – 2 (თბილისში გამოყოფილი) შტამი ადამიანის სისხლიდანაა იზოლირებული, 1-სავაქცინოა, 1-საერთაშორისო ეტალონია, 2- მსხვილფეხა რქოსანიდანაა, 1 ინგლისისიდან მიღებული შტამის გამოყოფის წყარო უცნობია. *Brucella suis* -ის შტამების გამოყოფის წყარო ძირითადად ღორებია - 10 შტამი, ასევე კურდღლიდან (2), 3 შემთხვევაში - მსხვილფეხა რქოსანი, 2 შტამი -ადამიანის სისხლიდან. საქართველოში 2009-2011 წწ-ში ახლადგამოყოფილი 42 ბრუცელოზური შტამი ადამიანის სისხლიდანაა იზოლირებული, ხოლო 32 მსხვილფეხა და წვრილფეხა რქოსანთა სისხლიდან, რძიდან და აბორტირებული ნაყოფიდან.

ბრუცელოზის გავრცელების არეალი საკმაოდ ფართოა და მოიცავს მსოფლიოს ბევრ ქვეყანას და კონტინენტს, ხოლო დაავადებულთა შორის ჩვენს გამოკვლევებში, არიან როგორც ადამიანები, ასევე სხვადასხვა ცხოველები და კვების პროდუქტები. ბრუცელოზის როგორც დაავადების ზუსტი დიაგნოზის დასადგენად აუცილებელ პირობას წარმოადგენს ბაქტერიის გამოყოფა და მისი იდენტიფიცირება. შტამების შესწავლა მიმდინარეობდა ყველა იმ ტესტების განსაზღვრით, რომლებიც დამახასიათებელია ბრუცელებისთვის.

დიაგრამა #1. გელიავას ინსტიტუტის საკოლექციო *Brucella* - შტამები



ნაცხების ოპტიკური მიკროსკოპით შესწავლით დადგინდა, რომ არც ერთი სახეობის ბრუცელები არ განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან. ბაქტერიული უჯრედები მომრგვალო ან ოვოიდური ფორმისანი არიან, დაჯგუფების გარეშე, ზომით დაახლოებით 1 მკ. ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი ტესტია ბრუცელების მყარ ნიადაგზე კოლონიების ზრდის თავისებურების, ზომის, ფორმის და სტრუქტურის დადგენა. ცნობილია, რომ ბრუცელას შტამები ძირითადად S ან R ფორმაში არიან, ხოლო მედიკამენტებით ნამკურნალევი ქრონიკულ დაავადებულთაგან გამოყოფილი ჰემოკულტურები ხშირად L-ფორმაშია.

შესწავლილი შტამების ბაქტერიული კოლონიების ზომები მერყეობდა 1დან-5მმ დიამეტრში, ამობურცული, სწორი კიდეებით, მოთეთრო-მონაცისფრო, ზოგჯერ

ბაცი თაფლისფერის შეფერილობით. აკრიფლავინის ტესტით დადგინდა, რომ ყველა შესწავლილი შტამის კოლონიები S-ფორმაშია, რაც განპირობებულია ბაქტერიის ზრდის ოპტიმალური პირობებით. S ფორმის ბრუცელების უჯრედის კედელი შეიცავს ლიპოპოლისაქარიდულ კომპლექსს. ეს ლიპოპოლისაქარიდული კომპლექსი განაპირობებს გრამუარყოფითი უჯრედის ვირულენტობას და ანტიგენურ თვისებებს. ამავდროულად თავად ბაქტერიისათვის დაცვით ფაქტორს წარმოადგენს. ყველა სახეობის S ფორმის ბრუცელების ბაქტერიული კოლონიების ზომები ვარიაბელურია, აქვთ მსგავსი აგებულების ლიპოპოლისაქარიდული ჯაჭვები და უჯრედის ზედაპირზე A და M ცილები, რომელთა დიფერენცირება ჯვარედინა სეროლოგიური რეაქციებით პრაქტიკულად შეუძლებელი ხდება. თუმცა, უნდა აღინიშნოს, რომ რაიტისა და ჰედელსონის რეაქციებს დაავადების დიაგნოსტიკების შემთხვევაში განსაკუთრებული როლი ენიჭება. ამ შემთხვევაში გამოიყენება დიაგნოსტიკუმები S და R -ანტიგენებით. ბრუცელების ზოგიერთი სახეობა S -ფორმაშია, ასეთებია *B.melitensis*, *B. abortus*, *B.suis* შტამები. არახელსაყრელ პირობებში ან მათთვის უცხო ორგანიზმში პარაზიტობისას დისოციირებენ R-ფორმაში, თუმცა ხელსაყრელი პირობები რევერსიის საფუძველს იძლევა. *B.ovis* და *B.canis*, რომლებიც მუდმივად R-ფორმაში იმყოფებიან, თუმცა ლიტერატურაში აღწერილია S -ფორმაში გადასვლის შემთხვევები. კოლონიების სტრუქტურის ცოდნა ძალზედ მნიშვნელოვანია. S ან R – ფორმის დიფერენცირებისათვის გამოიყენება სპეციფიკურად მომქმედი ფაგები.

დამატებითი ტესტი, რომელიც გამოიყენება სახეობის დიფერენცირებისათვის ბაქტერიის მყარ ნიადაგზე ზრდის უნარის განსაზღვრა გარკვეული ქიმიური რეაგენტების დამატებით (ანილინის საღებავები – თიონინი და ფუქსინი). ცნობილია, რომ ორივე კომპონენტის (თიონინი და ფუქსინი) თანაობისას იზრდება მხოლოდ *B. melitensis*, ფუქსინის დამატებისას - *B.abortus*, თიონინის შემთხვევაში- *B.suis*. ამგვარი ტესტით დადასტურდა, რომ კოლექციაში არსებული ბრუცელას შტამები ხანგრძლივი შენახვის პირობებში ინარჩუნებდნენ საწყის სტრუქტურას – S ფორმას და შერჩევითად იზრდებიან განსხვავებულ ნიადაგებზე. ბიოქიმიური აქტივობის შესასწავლად ყურადღება ექცეოდა მიკროორგანიზმის მიერ ფერმენტების წარმოქმნის უნარს. ტრადიციულად შეისწავლება ბაქტერიის მიერ შაქრების ფერმენტაციის უნარი. ამ შემთხვევაში, კერძოდ ბრუცელები, იჩენენ საკმაოდ დაბალ აქტივობას. როგორც შედეგებიდან ჩანს, ყველა შტამი აქტიურად წარმოქმნის მათთვის დამახასიათებელ ფერმენტებს როგორცაა: ოქსიდაზა, კატალაზა, ურეაზა, ხოლო გოგირდწყალბადი შერჩევითად. ბრუცელების ბიოქიმიური აქტივობის შედეგები ნაჩვენებია ცხრილ #1-ში.

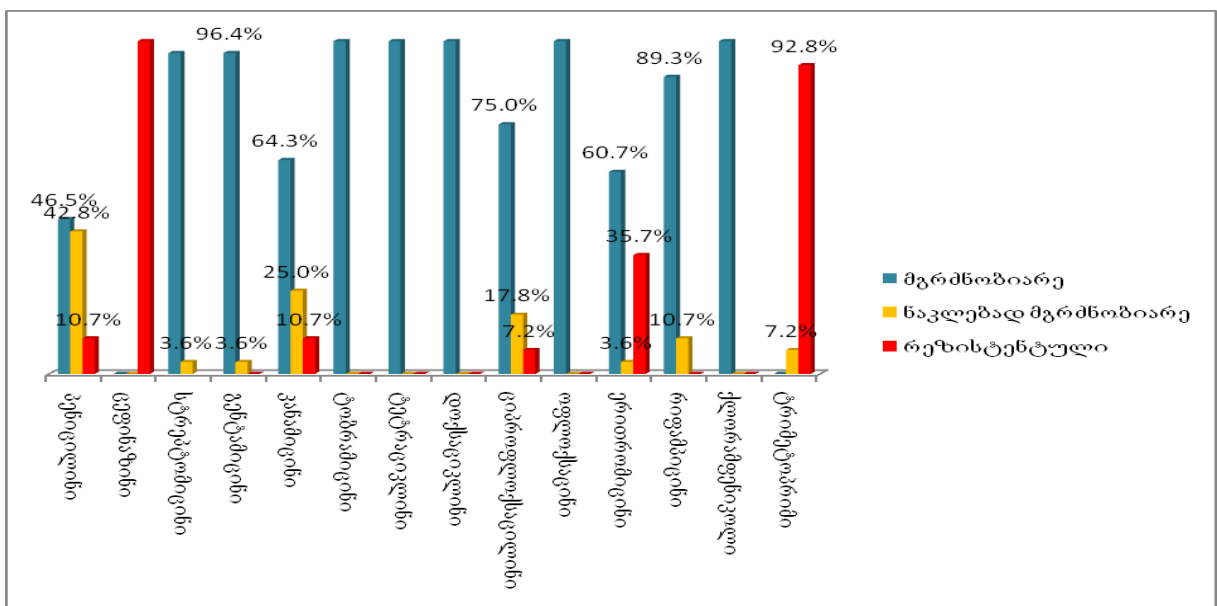
სამუზეუმო ბრუცელა შტამების (36) მორფო-კულტურალური, ბიოქიმიური და სეროლოგიური თვისებების შესწავლით დადასტურდა, რომ ისინი ამ სახეობებისათვის დამახასიათებელ ნიშან-თვისებებს ატარებენ და ამ გვარის ტიპიური წარმომადგენლები არიან.

ცხრილი #1. ბრუცელების სადიფერენციაციო ნიშნები

Brucella სახეობების რაოდენობა	ოქსიდაზა	კატალაზა	ურეაზა	აკრიფლავი ნი	აგლუტინაცია სპეციფიური შრატით	H2S წარმოქმნა	TSI ტესტი	საღებავების ბაქტერიოსტატუ-ლი მოქმედება	
								თიონინი	ფუძე ფუქსინი
<i>B.abortus</i> (7)	+	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>B.melitensis</i> (11)	+	+	+	-	+	-	-	+	+
<i>B.suis</i> (18)	+		+	-	+	+	-	+	-

დღეისათვის სამედიცინო პრაქტიკაში მწვავე ფორმის ბრუცელოზის სამკურნალოდ გამოიყენება ანტიბიოტიკების სხვადასხვა ჯგუფები იმუნომოდულატორებთან კომპლექსში (ინტერფერონი, ციკლოფერონი). ყველა კონკრეტულ შემთხვევებში გასათვალისწინებელია ბაქტერიის ანტიბიოტიკებისადმი მგრძობელობა, პრეპარატის მოქმედების მექანიზმი, ლოკალიზაცია, ტრანსპორტირების გზები. ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ სამკურნალოდ გამოიყენებენ ტეტრაციკლინის რიგის, ამინოგლიკოზიდებს, ცეფალოსპორინებს და სხვა პრეპარატებს. ბრუცელოზის მკურნალობა ხანგრძლივად მიმდინარეობს. მხოლოდ ერთი ანტიბიოტიკის გამოყენება ხშირად არაეფექტურია და იწვევს რეციდივებს, რეზისტენტული და L-ფორმის შტამების ჩამოყალიბებას, რომელთა იდენტიფიცირება დიდ სიძნელეს წარმოადგენს.

დიაგრამა #2. ბრუცელოზური შტამების ანტიბიოტიკოგრამა ანტიბაქტერიული პრეპარატების მიმართ



როგორც დიაგრამიდან ჩანს, მაღალი მგრძობელობა (96–100%) გამოავლინა შტამებმა ამინოგლიკოზიდების ჯგუფის პრეპარატებისადმი (სტრეპტომიცინი, გენტამიცინი, ტობრამიცინი); შტამების 100%–ზე მოქმედებდა ტეტრაციკლინის რიგის ანტიბიოტიკი და ქლორამფენიკოლი; ნაკლებად მგრძობიარე (46%, 61%, 75%) აღმოჩნდა პენიცილინის, ერითრომიცინის და ცეფალოსპორინების მიმართ. ხოლო სრული რეზისტენტობა გამოვლინდა ცეფალოსპორინების ჯგუფის (ცეფინაზინი) და სულფანილამიდების წარმომადგენლების მიმართ.

ბრუცელოზის დიაგნოსტიკა მსოფლიო ჯანდაცვის ორგანიზაციის რეკომენდაციებით გამოკვლევების რიგი მეთოდებითაა რეგლამენტირებული, მათ შორის იგულისხმება ბრუცელების TB რეფერენს ფაგისადმი მგრძობელობის განსაზღვრა. ჩვენს მიზანს წარმოადგენდა ახალი ბრუცელოზური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა, რომელთა მეშვეობით შესაძლებელი იქნებოდა ბრუცელების დიფერენცირება ფაგებისადმი მგრძობელობის მიხედვით. ფაგების გარემოდან (ჩამდინარე წყალი) და აგრეთვე, კულტურების „დაძველებით“, ფაგების სპონტანური გამოთავისუფლება უშედეგოდ დამთავრდა. შიდასახეობრივ ტიპირებისათვის, ძირითადად, ლიზოგენურ კულტურებიდან გამოყოფილი ზომიერი ფაგები გამოიყენება. ასეთი ფაგები ლითიური სპექტრის მაღალი სპეციფიურობით ხასიათდებიან. ზოგიერთი ბაქტერიული უჯრედის ერთ-ერთ თვისებას წარმოადგენს ბაქტერიოფაგის შემცველობა. ამისათვის შევისწავლეთ ბრუცელოზური შტამები, რათა გამოგვევლინა რომელი შტამი შეიცავს ფაგს. მიკრობთა დასხივების ოპტიმალური რეჟიმის დასადგენად, როდესაც მათი ინაქტივაციის პროცენტი არ აღემატება 90-100%-ს, შემოწმდა 3-3 შტამი: *B. abortus* ## 19, 141, 544 და *B. suis* # # 52s/z, 1s/z, 1330. კვლევებით დავადგინეთ, რომ ბრუცელოზური შტამები ფაგის მატარებლები ან ლიზოგენურები არიან. შტამების ულტრაიისფერი სხივებით დასხივების შედეგად გამოყვავით 6 ზომიერი ფაგი. დასხივებას ვახდენდით 10წმ–15წმ–60წმ – ექსპოზიციებით. ფაგები (## 141–1, 141–2, 19, 9) გამოვლინდა მე–8 დღეს, ფაგი #7sa მე–12 და ფაგი #11sa 30–ე დღეს. ფაგის გამოვლენაზე დაკვირვებას ვაგრძელებდით (60წმ–იანი დასხივების პირობებში) 30 დღის მანძილზე. დადგინდა ფაგების საწყისი ტიტრების და მათი სამუშაო განზავებების (RTD-Routine Test Dilution) მოქმედების სპექტრი, ინდიკატორულ *B. abortus* 141 შტამზე, კრეიჯისა და იენის მეთოდით.

ცხრილი #2. ახლადგამოყოფილი ფაგების ლითიური აქტივობა

ფაგის #	შტამი ინდიკატორი	ფაგის კონტროლი	განუზ. ფაგი	ფაგის განზავება					
				10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
19	<i>B. abortus</i> 141	2,2x10 ⁹	CL	CL	CL	CL	ზადე	ზადე	tv
9	<i>B. abortus</i> 141	1,4 x10 ¹⁰	CL	CL	CL	CL	ზადე	ზადე	tv
7sa	<i>B. abortus</i> 141	1,3 x10 ⁹	CL	CL	CL	CL	SCL	-	-
141–1	<i>B. abortus</i> 141	1 x10 ⁹	CL	CL	CL	SCL	SCL	ზადე	25tv
141–2	<i>B. abortus</i> 141	3,5 x10 ⁸	CL	CL	CL	CL	ზადე	ზადე	9tv
11 sa	<i>B. abortus</i> 141	1 x10 ⁹	CL	CL	CL	SCL	-	-	-

შენიშვნა: CL–სრული ლიზისი, SCL–ნაწილობრივი ლიზისი, tv –ფაგის ნეგატიური კოლონიები.

შედეგად, ბრუცელოზური ფაგების # 19, 9, 141-1, 141-2 და 7sa - ათასჯერადი განზავება ახდენს *B. abortus* 141- ის სრულ ლიზისს, ხოლო ფაგი -11sa - ასჯერადი განზავებისას. ცდების შედეგად დადგინდა ფაგების სამუშაო განზავება (RTD) ანუ მათი ის განზავება, რომლის დროსაც ფაგების მიერ შტამის სრული ლიზისი (CL) ვლინდება. # 19, 9, 141-2 და 7sa – ფაგების RTD 10^3 ტოლია, ხოლო 141-1 და 11 sa – ფაგისათვის 10^2 -ს. შესწავლილ იქნა ახლადგამოყოფილი (## 19, 9, 141-1, 141-2, 7 sa, 11 sa) ფაგების ლითიური აქტივობა და სპექტრი ინსტიტუტის კოლექციაში არსებულ *B.abortus* და *B.suis* შტამებზე. პარალელურად გამოვიყენეთ რეფერენს ფაგი TB (ტიტრით - 8×10^{10} და RTD - 10^3), რომელიც გამოირჩევა მაღალი ლითიური აქტივობით *B. abortus* შტამების მიმართ. თუმცა *B. suis* –ზე მოქმედებისას ფაგის საწყისი ტიტრი (10^3 RTD) იძლევა სრულ ლიზისს, ხოლო მათი RTD კი დაახლოებით 50%-ზე მეტ შტამებზე საერთოდ არ მოქმედებს.

ცხრილი #3. ბრუცელოზური შტამების ფაგომგრძობელობა ახლადგამოყოფილი ფაგებით

შტამის #	ფაგები													
	TB		141-1		141-2		9		19		7 sa		11 sa	
	10^3		10^2		10^3		10^3		10^3		10^3		10^2	
	RTD	RTD	RTD	RTD	RTD	RTD	RTD	RTD	RTD	RTD	RTD	RTD	RTD	RTD
B.abortus														
19	CL	CL	CI	SCI	CI	tv	CI	+	CI	CI	CI	CI	CL	SCL
141	CL	SCL	SCI	+	SCI	tv	SCI	SCI	CI	CI	CI	CI	SCL	SCL
544	CL	SCL	SCI	tv	SCI	tv	SCI	SCI	SCI	SCI	SCI	SCI	SCL	+
99	CL	CL	CI	tv	CI	tv	CI	SCI	CI	CI	CI	CI	CL	SCL
9	CL	SCL	SCI	+	SCI	tv	+	+	+	+	SCI	+	CL	SCL
64	CL	SCL	SCI	+	SCI	tv	SCI	SCI	SCI	SCI	SCI	SCI	CL	SCL
c68	CL	-	tv	-	+	-	SCI	-	SCI	-	SCI	-	SCL	-
B.suis														
1s/z	CL	SCI	-	-	SCI	-	CI	-	CI	-	CI	-	CL	-
52 s/z	CL	SCI	-	-	CI	-	CI	-	CI	-	CI	-	CL	-
76 s/z	CL	tv	-	-	+	-	SCI	-	CI	-	CI	-	CL	-
153 s/z	CL	-	-	-	+	-	SCI	-	CI	-	CI	-	CL	-
175 s/z	CL	+	-	-	+	-	SCI	-	CI	-	CI	-	CL	-
176 s/z	CL	-	-	-	+	-	SCI	-	SCI	-	SCI	-	CL	-
182 s/z	CL	-	-	-	+	-	SCI	-	SCI	-	SCI	-	CL	-
193 s/z	CL	+	-	-	+	-	CI	-	CI	-	SCI	-	CL	-
7s	CL	-	-	-	-	-	SCI	-	SCI	-	SCI	-	CL	-
8s	CL	-	-	-	SCI	-	SCI	-	SCI	-	SCI	-	CL	-
15s	CL	-	-	-	SCI	-	CI	-	SCI	-	SCI	-	CL	-
32s	CL	-	-	-	SCI	-	CI	-	CI	-	SCI	-	CL	-
35s	CL	-	-	-	-	-	CI	-	CI	-	SCI	-	CL	-
36s	CL	+	-	-	SCI	-	CI	-	CI	-	CI	-	CL	-
7sa	CL	-	tv	-	SCI	-	CI	-	CI	-	CI	-	CL	-
11sa	CL	SCI	-	-	SCI	-	CI	-	CI	-	CI	-	CL	-
14sa	CL	-	CI	-	-	-	SCI	-	SCI	-	CI	-	CL	-
1330	CL	SCI	SCI	-	SCI	-	CI	-	CI	-	CI	-	CL	-

ახლადგამოყოფილი ფაგების როგორც საწყისი ტიტრები ასევე RTD–ები, თითქმის ყველა *B.abortus*–ის შტამზე მოქმედებდა. რაც შეეხება *B.suis*–ის შტამებზე ფაგების საწყისი ტიტრების (10^3 RTD) მოქმედებას – ვრცელდებოდა უმეტეს შტამებზე, ხოლო ფაგების RTD–ის მიმართ ეს შტამები იყო რეზისტენტული.

ახლადგამოყოფილი ფაგების მოქმედების დიაპაზონის და მისი სპეციფიურობის დასადგენად გამოყენებულ იქნა *Enterobacteriaceae*–ს ოჯახის ზოგიერთი წარმომადგენელი: სხვადასხვა სეროტიპის *E. coli*, *Salmonella* და *Shigella* შტამები. სულ 54 შტამი. ცდაში აღებულ იქნა მაღალაქტიური ბრუცელოზური ფაგები.

ცხრილი # 4. საკოლექციო და ახლადგამოყოფილი ბრუცელოზური ფაგების მოქმედების სპეციფიურობა

კულტურის დასახელება	შტამების რაოდენობა	სხვადასხვა წყაროდან გამოყოფილი ფაგების მოქმედება					
		გარემოდან 10 ფაგი	B.melitensis- დან 22 ფაგი	B.abortus. დან 5ფაგი	B.suis.დან 2 ფაგი	B.canis.დან 1 ფაგი	B.ovis-დან 4 ფაგი
<i>E.coli</i>	17	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i>	22	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella</i>	15	-	-	-	-	-	-
სულ	54	-	-	-	-	-	-

ბრუცელოზური ფაგების აქტივობა არ ვრცელდება *Enterobacteriaceae*– ს ოჯახის ჰეტეროგენულ შტამებზე, რითაც გამოვლინდა ამ ბაქტერიოფაგების სპეციფიური მოქმედების დიაპაზონი.

ფაგების მოქმედების დიაპაზონი და ლითიური აქტივობა შესწავლილ იქნა ორშრიან აგარზე გრაციას მეთოდით. ამ მიზნისათვის გამოყენებულია გ. ელიავას ინსტიტუტის კოლექციაში არსებული 45 ბრუცელოზური ფაგი, რომლებიც სხვადასხვა წლებში იქნა გამოყოფილი სხვადასხვა წყაროდან. კერძოდ, 10 ფაგი იზოლირებულია საქონლის ფეკალური მასიდან (წუმწუმა): ## IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XII, 12(b) და BA; 22 ფაგი - *B. melitensis* კულტურებიდან: ფაგები ## 214, 248, 2, 3, 5, 6, 27, 29, 43, 63, 81, 58, 90, 100, 147, 109, 110, 224, 177, 271, 273 და 239; *B. abortus*–კულტურებიდან: ფაგები ##544 და ახლადგამოყოფილი 19, 141–1, 141–2 და 9; *B. suis* –დან ##7 sa და 11 sa ; *B. canis* - დან #1066; *B. ovis* - დან: ## 281, 290, 02 და 64. შესადარებლად გამოვიყენეთ რეფერენს ფაგი TB, რომელიც გამოყოფილ იქნა თბილისში 1955 წელს მ. ფოფხაძის და თ. აბაშიძის მიერ. შესწავლილ იქნა თითოეული ფაგის საწყისი ტიტრები და მათი სამუშაო განზავებები (RTD) ინდიკატორულ შტამზე. ამ ფაგების ლითიური აქტივობისა და დიაპაზონის შესამოწმებლად ცდაში აღებულ იქნა განსხვავებული სახეობების *B. abortus* და *B. suis* შტამები. როგორც დიაგრამებიდან (#3, #4, #5, #6) ჩანს, საწყისი ტიტრების შემთხვევაში აღინიშნებოდა სრული ლიზისი *B.abortus* 100% შტამებზე. RTD–ს შემთხვევაში 80% შტამებზე გამოვლინდა სრული ლიზისი, ხოლო შტამების 20%–ზე ნაწილობრივი ლიზისი. რაც შეეხება *B.suis*–ის შტამებს, იგივე ფაგები საწყისი ტიტრით მოქმედებდა შტამების 56%–ზე სრული ლიზისით, 29% შტამებზე –

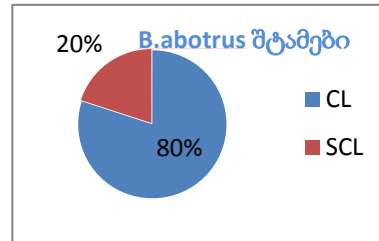
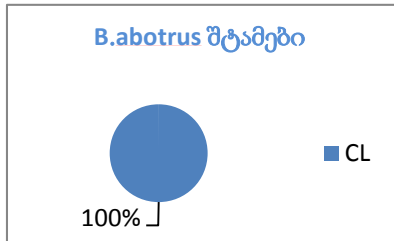
ნაწილობრივი ლიზისით, ფაგის ნეგატიური კოლონიები (TV) გამოვლინდა 9% შტამზე, ხოლო სრული რეზისტენტული იყო შტამების 7%. RTD-ს შემთხვევაში შტამების 84% -მა გამოავლინა სრული რეზისტენტობა, 16% შტამებზე გამოვლინდა ნეგატიური კოლონიები. დიაგრამა ## 3, 4, 5, 6 -ში ნაჩვენებია ბრუცელოზური ფაგების ლითიური აქტივობა და მოქმედების დიაპაზონი.

დიაგრამა # 3. *B.abortus* შტამებზე

დიაგრამა # 4. *B.abortus* შტამებზე

ფაგების 10³RTD -ის მოქმედება;

ფაგების RTD -ის მოქმედება

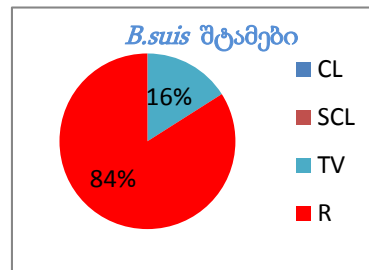
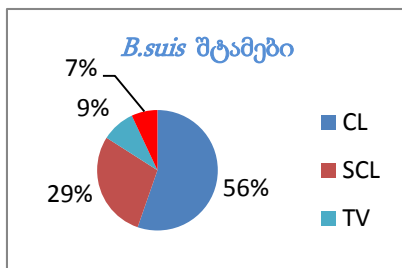


დიაგრამა # 5. *B.suis*-ის შტამებზე

დიაგრამა # 6. *B.suis*-ის შტამებზე

ფაგების 10³RTD -ის მოქმედება;

ფაგების RTD -ის მოქმედება



განუზავებელი ფაგები და მათი სამუშაო განზავებები – RTD მაღალ აქტიურობას იჩენენ *B. abortus*-ს მიმართ. რაც შეეხება ამ ფაგების მოქმედებას *B. suis*-ს შტამებზე, ისინი საწყის ტიტრებში არიან აქტიურები, გარდა მცირედენი გამონაკლისისა, სადაც მოქმედებს მათი RTD. RTD- ში ფაგების მიერ შტამების ლიზისი მათი მოქმედების დიფერენცირების საშუალებას იძლევა. მეორე მხრივ, ამ ცდებში გამოვლინდა შტამების მგრძობელობა ცდაში აღებული ფაგების მიმართ. როგორც ვხედავთ, *B. abortus*-ს შტამები ხასიათდებიან უფრო მაღალი ფაგომგრძობელობით, ვიდრე *B. suis* -ს სახეობის შტამები.

ფაგების ტექსონომიური თვისებების შესწავლისას ერთ-ერთ მნიშვნელოვან ტესტს ბაქტერიოფაგების სეროლოგიური დახასიათება წარმოადგენს. ახლადგამოყოფილი ფაგების ## 141-1, 141-2, 19, 9, 7sa და 11sa ნეიტრალიზაციის

რეაქციისათვის გამოვიყენეთ TB ანტიფაგური შრატის 1:100 განზავებით 30 წუთიანი ექსპოზიციით, 37°C-ზე. მიღებული მონაცემების მიხედვით გამოთვლილ იქნა ფაგების ნეიტრალიზაციის პროცენტული მაჩვენებელი და ნეიტრალიზაციის სიჩქარის კონსტანტა (K).

ცხრილი #5 . ახლადგამოყოფილი ფაგების ნეიტრალიზაციის რეაქცია *B.abortus* 141 პატრონ-უჯრედზე

ფაგის #	TB შრატის განზავება	
	1:100	
	ექსპოზიციის დრო 30წთ	
	ნეიტრ. %	ნეიტრ. K
141 –2	77,8	4,9
141–1	38,3	1,59
19	90,5	7,7
9	86,3	6,5
7 sa	90,9	5,1
11 sa	100	

ახლადგამოყოფილი # 19, 9, 141–2, 7sa და 11 sa- ფაგების ურთიერთქმედებამ TB ანტიფაგურ შრატთან გამოავლინა ნეიტრალიზაციის მაღალი პროცენტი (77-100%) და ნეიტრალიზაციის კონსტანტა (K) მერყეობდა 4,9-დან 7,7-მდე, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ ახლადგამოყოფილი ფაგები ინსტიტუტში არსებული ბრუცელოზური ფაგების ჰომოლოგიურია და მონათესავეა. ფაგმა #141–1 TB ანტიფაგურ შრატთან ურთიერთქმედებისას გამოავლინა ნეიტრალიზაციის შედარებით დაბალი (38%) მაჩვენებელი და შესაბამისად ნეიტრალიზაციის კონსტანტა (K) უდრიდა 1,59, რითაც დასტურდება მისი შორეული ნათესაობა ბრუცელოზურ TB ფაგთან.

ბაქტერიოფაგების სელექციის დროს აუცილებელია ფაგებისა და პატრონ-უჯრედის ურთიერთქმედების ფაზების შესწავლა, რომელიც ფაგების ვირულენტობის ერთ-ერთი განმსაზღვრელი ტესტია. ფაგების უჯრედშიდა რეპროდუქციის ზოგადი კანონზომიერების დადგენის მიზნით შესწავლილ იქნა *B. abortus*- ს სპეციფიური ფაგების პატრონ-უჯრედთან ურთიერთქმედების ცალკეული ფაზები: ადსორბცია, ლატენტური პერიოდი, ფაგების საშუალო გამოსავალი ერთ ინფიცირებულ ბაქტერიულ უჯრედზე.

კვლევების დროს, ბაქტერიულ უჯრედზე ფაგის ადსორბციის სიჩქარის განსაზღვრისათვის შევარჩიეთ გ.ელიავას ინსტიტუტის კოლექციაში არსებული რამდენიმე ბრუცელოზური ფაგი # TB, 02, 1066, 177, 544 , 281 პატრონ-უჯრედი *B.abortus* 141 და ასევე ფაგი TB - პატრონ-უჯრედი *B. abortus* 19. ცდაში გამოვიყენეთ ანტიფაგური შრატის TB განზავებით 1:100, დროის სხვადასხვა მონაკვეთებში. ბაქტერიულ უჯრედზე ფაგის ადსორბცია ხდება სიჩქარით, რომელიც ფაგის კონცენტრაციისა და ბაქტერიის პროპორციულია. ადსორბციის მაქსიმალური სიჩქარის კონსტანტა გამოვთვალეთ ფორმულით. ადსორბციის პერიოდი აღნიშნული ფაგებისათვის გრძელდებოდა 60 წუთიდან 3 საათამდე.

ლითიური სპექტრისა და დიაპაზონის შესწავლის შედეგად, შევარჩიეთ 45 ფაგიდან განსხვავებული აქტივობის და დიაპაზონის მქონე 10 ფაგი. შემდგომში შევისწავლეთ მათი ბიოლოგიური თვისებები, კერძოდ: ფაგისა და პატრონ-უჯრედის ურთიერთქმედების ფაზები; ფიზიკო-ქიმიური ფაქტორების მოქმედება; ფაგური ნაწილაკების მორფოლოგია.

ბაქტერიოფაგების გამრავლების ერთჯერადი ციკლის შესწავლისათვის შერჩეულ იქნა გ.ელიავას ინსტიტუტის კოლექციიდან *B. abortus* - ს მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგები: ## 02, 544, 1066, 281, 177, 110 და ასევე ახლადგამოყოფილი #141 და 11sa ფაგები გამრავლებული შტამ *B. abortus* 141-ზე. ბაქტერიოფაგის გამრავლების ერთჯერადი ციკლის მონაცემების მიხედვით დავადგინეთ, რომ ცხრილში აღნიშნული ბრუცელოზური ფაგების უჯრედშიდა გამრავლება პირობითად სამ პერიოდად შეიძლება დაიყოს: 1) 0-დან 3,5 სთ-მდე ბაქტერიოფაგების ნაწილაკების რაოდენობა სტაბილური იყო და არ აღინიშნებოდა მატება. 2) 3,5სთ-დან 6 სთ-მდე შეიმჩნეოდა ფაგის რაოდენობის ნაწილაკების ნელი ზრდა. 3) 6სთ-დან 8 სთ-მდე ნაწილაკების რაოდენობის მკვეთრი ზრდა. ფაგური ნაწილაკების საშუალო მოსავლიანობა ერთ ინფიცირებულ ბაქტერიულ უჯრედზე მერყეობდა 21-დან 68 ერთეულამდე.

ცხრილი # 6. ბაქტერიოფაგების გამრავლების ერთჯერადი ციკლი

ფაგის #	შტამის #	ფაგის მოსავლიანობა			
		1 ცდა	2 ცდა	3 ცდა	საშუალო მონაცემი
177	B.ab.141	46	39	41,7	42
544	B.ab.141	15	23,7	25	21
1066	B.ab.141	39	73	33	49
11sa	B.ab.141	40.6	46	29	38
141	B.ab.141	45	77	81	68
110	B.ab.141	45	42	55	47
02	B.ab.141	20	52	25	33
281	B.ab.141	55	43	72	57

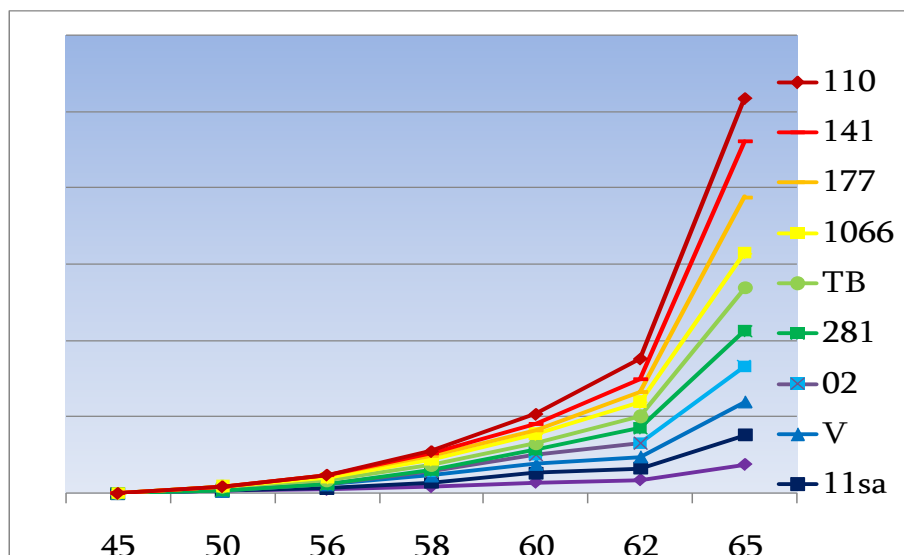
ბრუცელოზურ ბაქტერიოფაგებზე ფიზიკო-ქიმიური ფაქტორების ზემოქმედება შევისწავლეთ თერმონაქტივაციის, ქლოროფორმის, შარდოვანას, ოსმოსური შოკის და ულტრაიისფერი სხივების გამოყენებით. თერმონაქტივაციის ფაქტორის შესწავლისას ფაგებს ვათბობდით 5⁰-იანი ინტერვალით, 45⁰-დან 75⁰-მდე. წინასწარი შედეგებით დადგინდა, რომ 56⁰ -დან და 65⁰ -მდე ინტერვალის უნდა შემცირებულიყო 2-2⁰ -მდე. თერმონაქტივაციის შედეგად ბრუცელოზური ბაქტერიოფაგების ცხოველმყოფელი ნაწილაკების რაოდენობა, რომელიც გამოსახულია პროცენტებში ნაჩვენებია ცხრილ #7-ში.

ცხრილი #7. ბრუცელოზური ბაქტერიოფაგების თერმონაქტივაციის კინეტიკა

ფაგის #	ცხოველმყოფელი ფაგის ნაწილაკების რაოდენობა ტემპერატურის ზემოქმედების შედეგად (პროცენტებში)								
	45°	50°	56°	58°	60°	62°	65°	70°	75°
544	100	70	54	35,6	18,4	12,6	1,06	9X10 ⁻⁷	0
11sa	100	100	78	52,3	25,2	18	1,2	2X10 ⁻⁵	0
V	100	100	60	35,4	25	16,6	0,6	0	0
02	100	100	100	52,5	23,75	12,5	0,45	26X10 ⁻⁷	0
281	100	100	100	85,4	51,6	10,4	0,5	16X10 ⁻⁷	0
TB	100	93	56,5	43	35,8	17,4	0,15	0	0
1066	100	100	68,4	47,4	24	11,2	0,47	94X10 ⁻⁷	0
177	100	100	58,6	58	58	21	0,02	9 X10 ⁻⁷	0
141	100	100	100	68,3	36,5	14,6	0,024	22X10 ⁻⁷	0
110	100	100	100	67,4	23,2	4,65	0,14	3 X10 ⁻⁷	0

ფაგების #544 და TB –სთვის თერმონაქტივაციის ქვედა ზღვარი 50⁰-ია, რომელთა ნაწილაკების რაოდენობა 30% და 7% -ით ინაქტივირდა 56°-ზე, ხოლო ზედა ზღვარი - 65°. მაშინ როდესაც, ფაგები # 02, 281, 141 და 110 – აღმოჩნდნენ მდგრადები 56⁰-ზე. დანარჩენი ფაგები ინარჩუნებენ ცოცხალ უჯრედებს 54%-დან 78%-მდე. ფაგებს # 02, 281, 141 და 110 58°-დან 65°-მდე შენარჩუნებული ჰქონდათ ცხოველმყოფელი ნაწილაკები, რაც გამოიხატება მათი პროცენტული მაჩვენებლის კლებაში - 68,3%-დან 0,024%-მდე. # 544, 11sa, 02, 281, 1066, 177, 141 და 110 - ფაგები უძლებენ 70°-ს, ხოლო ფაგები V და TB აღნიშნულ ტემპერატურაზე სრულად ინაქტივირდნენ. უნდა აღინიშნოს, რომ ყველა შესწავლილი ფაგების სრული ინაქტივაცია აღინიშნებოდა 75°-ზე. შესწავლილი ფაგები (##TB, V, 544, 11sa, 02, 281, 1066, 177, 141, 110) თერმული დამუშავების შედეგად აღმოჩნდნენ მდგრადები. ცოცხალი ფაგური ნაწილაკების რაოდენობისა და ტემპერატურას შორის ლოგარითული დამოკიდებულება გამოსახულია #1 გრაფიკის სახით.

გრაფიკი #1. ბრუცელოზური ფაგების რაოდენობის და ტემპერატურის ლოგარითმი



ქიმიური ნივთიერებების რიგი მოქმედებს ვირუსის ცილის დენატურაციაზე. ვინაიდან მუშაობის პროცესში და ვირუსის საკონსერვაციოდ გამოიყენება ქლოროფორმი, ამისათვის გახდა საჭირო შეგვესწავლა მისი ზემოქმედება ბრუცელოზურ ფაგებზე. ქლოროფორმის ზემოქმედებისას შეიმჩნევა ბრუცელოზური ფაგების ცილების დენატურაცია, რის გამოც ეს ფაგები კარგავენ აქტოვობას გარკვეულ დროის მონაკვეთებში. ცდისათვის აღებულ იქნა საკვები ნიადაგი, რომელიც შეიცავდა ქლოროფორმს. ფაგისა და ქლოროფორმის ნარევი დავაყოვნეთ სხვადასხვა დროის მონაკვეთებში: 10 წთ, 1 სთ, 2 სთ, 3 სთ, 24 სთ, 48 სთ, 72 სთ და 25 დღე. ბრუცელოზური ბაქტერიოფაგებზე ქლოროფორმის ზემოქმედების შედეგად მიღებული ცხოველმყოფელი ფაგების პროცენტული მაჩვენებლები მოცემულია ცხრილ #8-ში.

ცხრილი # 8. ბრუცელოზური ფაგებზე ქლოროფორმის ზემოქმედება

ფაგის #	ფაგის კონტროლი	ცხოველმყოფელი ფაგების პროცენტი სხვადასხვა ექსპოზიციის დროს							
		10 წთ	1 სთ	2 სთ	3 სთ	24 სთ	48 სთ	72 სთ	25 დღე
TB	2,27 x10 ⁹	100	27,3	21	17,2	4,9	1,65	1,1	0
02	1,15x10 ⁹	94	40	25,2	15,1	3,74	1,3	0,43	0
1066	1,47 x10 ⁹	51,7	47,6	14,4	13,6	4,7	0,95	0,7	0
11sa	3,4 x10 ⁹	77	15,3	11,7	10,6	2,47	0,76	0,35	0
V	6,4 x10 ⁸	53	11	7	5,3	1,3	0,6	0,5	0
110	4,5 x10 ⁸	89	48	46,2	43,5	14,4	3,7	1,28	0
141	8,7 x10 ⁸	27,7	11	5,4	1,5	0,5	0,8	0,8	0
177	5,6 x10 ⁸	51,7	34	25	20,7	3,8	0,9	0,18	0
281	7,0 x10 ⁷	100	47	13,5	10,8	3,8	1,9	1	0
544	7.65 x10 ⁸	74	36,3	29,2	29	7,3	0,8	0,445	0

ფაგები# TB და 281 –10 წუთიანი ექსპოზიციის შედეგად აღოჩნდნენ გამძლენი ქლოროფორმის მიმართ, ხოლო დანარჩენი ფაგები ## 02, 1066, 11 sa, V, 110, 141, 177 და 544 ნაწილობრივ გამძლენი. შემდგომი ექსპოზიციის შედეგად მათი ცხოველმყოფელობა თანდათან იკლებდა. 25 დღის შემდეგ სრული ინაქტივაცია განიცადა ყველა ფაგმა.

შარდოვანას მოქმედება ბაქტერიოფაგებზე ცილის დენატურაციასა და ფერმენტების ინაქტივაციას იწვევს. იმის დასადგენად, თუ როგორ მოქმედებს შარდოვანა ბრუცელოზურ ფაგებზე, ჩატარებულ იქნა ექსპერიმენტები, დროის სხვადასხვა მინაკვეთებში, სადაც გამოყენებულია 8 მოლარული შარდოვანა. ბრუცელოზურ ბაქტერიოფაგებზე შარდოვანას მოქმედებისას შეიმჩნევა ფაგური ნაწილაკების ნაწილობრივი ინაქტივაცია. 20 წუთის შემდეგ ინაქტივირდება ფაგური ნაწილაკების 10%-დან – 45%-მდე; 40 წუთის შემდეგ 14%-დან - 57%; ხოლო 60 წუთის შემდეგ 17%-დან – 68%.

ცხრილი #9. შარდოვანას მოქმედება ბრუცელოზურ ფაგებზე

ფაგის #	ფაგის კონტროლი	ცხოველმყოფელი ფაგების პროცენტი სხვადასხვა ექსპოზიციის დროს		
		20წთ	40წთ	60წთ
TB	1,64 x10 ⁹	73,8	70,7	52,4
02	8,40 x10 ⁸	83,0	80,1	80,0
1066	1,59 x10 ⁹	63,0	63,0	62,0
11sa	2,80 x10 ⁸	86,0	84,0	83,0
V	2,56 x10 ⁸	90,0	86,0	82,0
110	4,82 x10 ⁹	76,0	76,0	49,0
141	1,44 x10 ⁹	81,0	80,0	57,0
177	6,0 x10 ⁸	55,0	50,0	45,0
281	1,75 x10 ⁹	78,0	43,0	32,0
544	4,20 x10 ⁸	78,0	76,0	76,0

ოსმოსური შოკის მოქმედება ბაქტერიოფაგებზე შევისწავლეთ ანდერსონის მიერ მოწოდებული კლასიკური მეთოდით. იმის გასარკვევად თუ რამდენად მოქმედებს ელექტროლიტები ფაგის მთლიანობაზე და მის აქტივობაზე, 4 მოლარულ ნატრიუმის ქლორიდის ხსნარში შევიტანეთ ფაგი, ამ სუსპენზიის 0,1 მლ–ს დავუმატეთ 10 მლ დისტილირებული წყალი და განვსაზღვრეთ ფაგის ტიტრი. პარალელურად დავდგით ფაგის კონტროლი. ოსმოსური შოკის მოქმედება ბრუცელოზურ ფაგებზე ნაჩვენებია ცხრილი #10–ში.

ცხრილი #10. ოსმოსური შოკის მოქმედება ბრუცელოზურ ფაგებზე

ფაგის	ფაგის კონტროლი	ცხოველმყოფელი ფაგების პროცენტი
TB	1,01 x10 ⁹	100
02	6,85 x10 ⁹	10,1
1066	4,87 x10 ⁸	100
11sa	8,0 x10 ⁸	100
V	1,27 x10 ⁹	7,8
110	2,2 x10 ⁸	100
141	9,6 x10 ⁸	100
177	3,0 x10 ⁸	66,6
281	2,0 x10 ⁸	100
544	6,2 x10 ⁸	100

შედეგებით ჩანს, რომ ბაქტერიოფაგები # TB, 1066, 11sa, 110, 141, 281 და 544 – ინარჩუნებენ აქტივობას ოსმოსური შოკის მოქმედების შედეგად, ხოლო ფაგი # 177 – 33,4%-ით ინაქტივირდება, ფაგი # V - 92,2%-ით და 02 – 89,9%. ცდებით დადგინდა, რომ ბრუცელოზური ბაქტერიოფაგები უძლებენ ოსმოსურ შოკს და ელექტროლიტების მოქმედებას.

ბუნებრივ პირობებში ფაგების პოპულაციის შენარჩუნებისათვის დიდი მნიშვნელობა აქვს ბაქტერიოფაგების ულტრაიისფერი სხივებისადმი გამძლეობას. შესწავლილ იქნა ბრუცელოზური ბაქტერიოფაგების ინაქტივაცია ულტრაიისფერი სხივების მოქმედებით. ბაქტერიოფაგების დასხივებისათვის გამოყენებულია

ულტრაიისფერი ნათურა (UVLS-28EL P/N 95-0201-02 CA USA) ტალღის სიგრძით 254ნმ, დაშორება ობიექტს შორის 18 სმ. ცდაში აღებულ იქნა ათი ფაგი: ## TB, 1066, 11sa, 110, 141, 281, 177, 02 , V და 544, დასხივების 10-10 წამიანი ინტერვალით. წინასწარი საორიენტაციო ცდებით შესწავლილ იქნა ფაგების დასხივება 5 წამის განმავლობაში, რის შედეგადაც ინაქტივირებული ფაგები არ დაფიქსირდა. ამის გამო ულტრაიისფერი სხივების ზემოქმედება შევისწავლეთ 10 წამიდან. ულტრაიისფერი ნათურის სიმძლავრის განსაზღვრისათვის და ექსპერიმენტის სტანდარტულ პირობებამდე მისაყვანად, საკონტროლოდ აღებულია T2 ფაგი. როგორც ჩანს, 10წმ ულტრაიისფერი სხივების ზემოქმედების შედეგად დიდი გამძლეობით გამოირჩევა TB ფაგი, შედარებით სუსტია #02 და #1066, ხოლო 4 ფაგი: ## V, 110, 141 და 177 მსგავსნი არიან გამძლეობით და მათი არაინაქტივირებული ფაგების შემცველობა 0,34-0,41% ფარგლებშია. ყველაზე მგრძობიარენი აღმოჩნდნენ ფაგები:## 281, 544 და 11sa. შემდგომი 20 წმ დასხივება გვიჩვენებს წრფივ ინაქტივაციას, ისევე როგორც 30წმ ინაქტივაციის დროს. ბრუცელოზური ფაგები უფრო გამძლენი აღმოჩნდნენ T2 ფაგთან შედარებით. მათ შორის ყველაზე მეტად ინარჩუნებს ცხოველყოფელობას ფაგი #02, რომლის ცოცხალი ნაწილაკების რაოდენობა ნახევარ წუთიანი დასხივების შედეგად უდრიდა 0,25%.

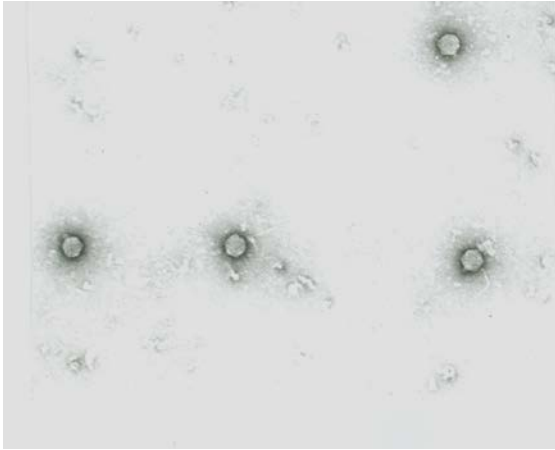
ფაგების ლიზისური მოქმედების პოტენციალისა და მათი ადსორბციული აპარატის რეცეპტორული სპეციფიურობის უფრო დეტალური გამოკვლევით ფაგების დიფერენცირებისათვის საჭირო გახდა მათი ბაქტერიულ უჯრედებზე ინფიცირების ეფექტურობის შესწავლა. ფაგების ბაქტერიულ შტამებზე ინფიცირების ეფექტურობა განისაზღვრება გამოსაკვლევ შტამებზე ფაგის ტიტრის შედარებით პატრონ-უჯრედზე გამოვლენილ ფაგის ტიტრთან. ჩვენს მიერ შესწავლილ იქნა ბრუცელოზური ბაქტერიოფაგების # TB, 02, 1066, 11sa, V, 110, 141, 177, 281 და 544 - ინფიცირების ეფექტურობა *B. abortus* 141 და *B. abortus* 19 შტამებზე. TB და #02 ფაგების გამრავლებისას *B.abortus* 141 შტამზე და შემდგომში ტიტრის დადგენით *B.abortus* 19 შტამზე, არ გამოვლინდა დიდი განსხვავება მათი ინფიცირების ეფექტურობის განსაზღვრით. ფაგების ნაწილაკების რაოდენობა ერთი და იგივე ხარისხის ფარგლებშია -10⁹, თუმცა ინფიცირების ეფექტურობის კოეფიციენტი 0,83 და 0,88 ტოლია. დანარჩენი 8 ფაგის ეფექტურობა დაეცა ერთი ხარისხით 10⁹დან 10⁸მდე, ხოლო კოეფიციენტი 0,4 დან 0,2-მდეა. ხოლო მეორე, მასპინძელ შტამზე გამრავლების შემთხვევაში, როდესაც ფაგი ჯერ მე-19 შტამზე იქნა გამრავლებული და შემდგომ 141 შტამზე გატიტრული, ჩანს რომ #110, 281, 544 ფაგების ინფიცირების ეფექტურობა 1-ს ტოლია. ## TB, 11sa, V, 141, და 177 ფაგების დათესვის ეფექტურობა 1-ზე მეტია, ხოლო #1066 ფაგისათვის მკვეთრად დიდია. შედეგებიდან გამომდინარე, შემდგომში ფაგების გასამრავლებლად გამოყენებულ იქნა *B.abortus* 141 შტამი. ფაგების ინფიცირების ეფექტურობის შედეგები ნაჩვენებია ცხრილ #11-ში.

ცხრილი #11. ფაგების ინფიცირების ეფექტურობა ბრუცელოზურ შტამებზე

ფაგის #	<i>B.abortus</i> 141 შტამზე გამრავლებული ფაგების ტიტრები		ინფიცირების ეფექტურობა <i>B.abortus</i> 19 შტამზე B/A	<i>B.abortus</i> 19 შტამზე გამრავლებული ფაგების ტიტრები		ინფიცირების ეფექტურობა <i>B.abortus</i> 141 შტამზე B/A
	<i>B.abortus</i> 141 (A)	<i>B.abortus</i> 19 (B)		<i>B.abortus</i> 19 (A)	<i>B.abortus</i> 141(B)	
	TB	5,6x10 ⁹		4,7x10 ⁹	0,83	
02	2,5x10 ⁹	2,2x10 ⁹	0,88	9x10 ⁷	4,5x10 ⁷	0,5
1066	2,8x10 ⁹	8,0x10 ⁸	0,28	1,0x10 ⁷	4,15x10 ⁹	0,415
11sa	4,4x10 ⁹	1,9x10 ⁹	0,43	3,45x10 ⁹	3,6x10 ⁹	1,04
V	2,0x10 ⁹	5x10 ⁸	0,25	4,6x10 ⁹	5,6x10 ⁹	1,2
110	5,0x10 ⁹	1,04x10 ⁹	0,20	3,4x10 ⁹	3,0x10 ⁹	1
141	2,8x10 ⁹	6,2x10 ⁸	0,22	1,83x10 ⁹	3,2x10 ⁹	1,75
177	4,1x10 ⁹	9x10 ⁸	0,21	2,9x10 ⁹	3,35x10 ⁹	1,15
281	1,8x10 ⁹	4,2x10 ⁸	0,23	9x10 ⁸	8,0x10 ⁸	1
544	2,6 x10 ⁹	1,03 x10 ⁹	0,4	1,2 x10 ¹⁰	1,2 x10 ¹⁰	1

ბრუცელოზური ფაგების მორფოლოგიის შესასწავლად მომზადდა 10 ფაგის კონცენტრატი, რომელთა ტიტრები მერყეობდა 10¹⁰ -10¹¹ ნაწ/მლ. ელექტრონულ-მიკროსკოპულმა გამოკვლევებმა გვაჩვენა, რომ ბრუცელოზურ ბაქტერიოფაგებს ახასიათებს სრული მორფოლოგიური იდენტურობა. შესასწავლად აღებულ იქნა შემდეგი ფაგები: #TB, 02, 1066, 11sa, V, 110, 141, 177, 281 და 544. მათ აქვთ ჰექსაგონალური ფორმის თავი, ზომით 600x 600Å დიამეტრში და მოკლე 150-200 Å სიგრძის წანაზარდი. აკერმანის კლასიფიკაციის მიხედვით, შესწავლილი ფაგები მიეკუთვნება Podoviridae-ს ოჯახს.

სურათი # 1. #TB ფაგური ნაწილაკების ელექტრონულ მიკროსკოპული ფოტო (გადიდება x100 000)



სურათი # 2. #11sa ფაგური ნაწილაკების ელექტრონულ მიკროსკოპული ფოტო (გადიდება x72 000)



მოქმედების სპექტრის მიხედვით შევარჩიეთ 2 ახალი და 8 საკოლექციო ფაგი. შეიქმნა კომპლექტი რომლის მეშვეობით წარმატებით ჩატარდა ბრუცელების იდენტიფიკაციის და დიფერენციაციის ცდები. ჩვენს მიერ შერჩეული და შესწავლილი 10 ბრუცელოზური ბაქტერიოფაგი: # TB, 02, 1066, 11sa, V, 110, 141, 177, 281 და 544 - შემოწმებულ იქნა გ. ელიავას სახ. ბაქტერიოფაგის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტში არსებული სამუზეუმო შტამებზე, ასევე საქართველოს სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ბაქტერიოლოგიურ ლაბორატორიაში (LMA), დაავადებათა კონტროლის ცენტრისა (NCDC) და აშშ-ს ლუიზიანას შტატის უნივერსიტეტის სასოფლო-სამეურნეო ცენტრსა და სამკურნალო ვეტერინარიის დეპარტამენტის (LSU) მიერ ახლადგამოყოფილ ბრუცელოზურ შტამებზე (სულ 146 შტამი). სამუზეუმო შტამების ფაგოტიპირებისათვის გამოყენებულ იქნა ათი ბრუცელოზური ფაგი (##TB,02,1066,11sa,V,110,141,177,281,544), რომელთა პატრონ-უჯრედია *B.abortus* 141. ფაგების ##TB, 02, 11sa, V, 544 – 10^3 RTD და RTD ერთმანეთის მსგავსი მოქმედება აქვთ *B.abortus*-ს შტამებზე. ფაგები #1066, 110, 177, 141 და 281-ს განსხვავებული მოქმედების დიაპაზონს და აქტივობას ავლენს ფაგების სამუშაო განზავებაში (RTD), ხოლო ამ ფაგების 10^3 RTD-ში მოქმედება TB ფაგის მსგავსია. რაც შეეხება *B.suis*-ის შტამებს ფაგების RTD-ს მიმართ ეს შტამები აღმოჩნდა რეზისტენტული, ხოლო 10^3 RTD-ს მიმართ განსხვავებულ სურათს იძლევა. ამ

ფაგების ნაკრებით შესაძლებელია ბრუცელების სახეობათშორისი და შიდასახეობრივი დიფერენცირება.

ჩვენს მიერ სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ბაქტერიოლოგიურ ლაბორატორიაში საკვლევი მასალიდან იდენტიფიცირებულია 31 ნიმუში. შტამები გამოყოფილია მსვილფეხარქოსანი ცხოველების რძიდან, სისხლიდან და აბორტირებული ნაყოფიდან. ბრუცელოზური ბაქტერიოფაგების 10³RTD და RTD-მოქმედების შედეგად ახლადგამოყოფილი შტამიდან 18 მგრძნობიარე აღმოჩნდა, დანარჩენი 13 ნიმუში რეზისტენტული აღმოჩნდა ბაქტერიოფაგების მოქმედების მიმართ. რითაც შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ ახლადგამოყოფილი კულტურები *B.abortus*-ს მიეკუთვნება, რაც ასევე დადასტურდა სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ბაქტერიოლოგიურ ლაბორატორიაში ჩატარებული გენეტიკური ანალიზის მიხედვით.

საქართველოს დაავადებათა კონტროლის ცენტრში დაავადებული ადამიანების სისხლის ნიმუშებიდან გამოყოფილი 42 კულტურა შევამოწმეთ 10 ბრუცელოზური ბაქტერიოფაგის 10³RTD და RTD მიმართ. აქედან 3 ნიმუშის კულტურა: FY0708-00041, FY0708-00079 და 10C001003/03/115 - მგრძნობიარე აღმოჩნდა ფაგების მოქმედების მიმართ. დანარჩენი ნიმუშების კულტურები რეზისტენტული იყვნენ ყველა ფაგის 10³RTD და RTD მიმართ, სავარაუდოდ ეს ნიმუშები *B.melitensis*-ს უნდა წარმოადგენდნენ.

აშშ-ს ლუიზიანას შტატის უნივერსიტეტის ვეტერინარიის დეპარტამენტში (LSU) ჩვენს მიერ ჩატარდა კვლევითი სამუშაოები ბრუცელოზური ფაგების პრაქტიკული გამოყენების თვალსაზრისით. ბრუცელოზური ფაგების კომპლექტით (##TB, 02, 1066, 281, 177, 544, 11sa, V, 141, 110 პატრონ–უჯრედი *B. abortus* 141 და იგივე ფაგები პატრონ–უჯრედი *B. abortus* 19). შემოწმდა როგორც სამუზეუმო, ასევე ახლადგამოყოფილ ბრუცელოზურ შტამები (სულ 15) *B.abortus* S19; *B.abortus* S19 (shiport); *B.abortus* RB51; BC-LSU; BC- SVM 2; *B. ovis*; *B.ovis*(shiport); CDC1-BO1; CDC2-BO2; CDC3-NF2653; *B.neotomae*; SDRL; BA.2308; BM. 16M; BS.1330. ფაგოტიპირების ცდებმა გვიჩვენა, რომ *B. abortus* 141 და *B. abortus* 19 შტამებზე გამრავლებული ფაგების ლითიური სპექტრი განსხვავდება ერთმანეთისაგან.

დასკვნები

1. შესწავლილ იქნა საკოლექციო ბრუცელოზური შტამების მორფო–კულტურალური, ბიოქიმიური და სეროლოგიური თვისებები. დადგინდა ამ სახეობებისათვის დამახასიათებელი ტიპიური ნიშან-თვისებები.
2. 28 ბრუცელოზური შტამი შემოწმდა განსხვავებული მექანიზმის მქონე 14 სხვადასხვა ანტიბიოტიკის მიმართ. ანტიბიოტიკომგრძნობელობის შესწავლის შედეგად, დადგინდა მათი მაღალი მგრძნობელობა ანტიბიოტიკებისადმი.
3. ბრუცელოზური შტამების ულტრაიისფერი დასხივების შედეგად გამოყოფილ იქნა ზომიერი ფაგები: ##19, 141, 9, 7sa და 11sa. შესწავლილ იქნა

სამუზეუმო და ახლადგამოყოფილი ფაგების ლითიური სპექტრი და მოქმედების დიაპაზონი. შედეგად შეირჩა ათი ფაგი ##TB, 02, 1066, 11sa, V, 110, 141, 177, 281 და 544 – ბრუცელოზური შტამების სადიფერენციაციოდ.

4. დადგინდა საკოლექციო და ახლადგამოყოფილი ბრუცელოზური ფაგების მკაცრი სპეციფიურობა *Enterobacteriaceae*-ს ოჯახის წარმომადგენლებზე.
5. შესწავლილ იქნა შერჩეული ფაგების ბიოლოგიური თვისებები (ნეგატიური კოლონიების მორფოლოგია, ადსორბცია, გამრავლების ერთჯერადი ციკლი, ფიზიკო-ქიმიური ფაქტორების ზემოქმედება).
6. ბაქტერიოფაგების სეროლოგიური თვისებების შესწავლით დადგინდა ნათესაური კავშირი TB ფაგთან, ვირუსული ნაწილაკების მორფოლოგიის მიხედვით შესწავლილი ფაგები მიეკუთვნებიან Podoviridae-ს ოჯახს.
7. შერჩეული ფაგების ნაკრების მეშვეობით შესაძლებელი გახდა დაავადებათა კონტროლის ცენტრში, სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ლაბორატორიაში, ასევე აშშ-ს ლუიზიანას შტატის ვეტერინარიის დეპარტამენტის ბაქტერიოლოგიურ ლაბორატორიაში არსებული (ადამიანებიდან, ცხოველებიდან და პათოლოგიური მასალიდან) და ახლადგამოყოფილი ბრუცელოზური შტამების სახეობების დადგენა და შიდასახეობრივი დიფერენცირება.

დისერტაციის თემაზე გამოქვეყნებულ ნაშრომთა სია

1. I.Antadze., T.Burbutashvili., **S.Gunia.**, M.Dadunashvili, M.Kutateladze. Phage-typing as a diagnostic tool for identification of infections caused by Brucella. Brucellosis International Research Conference. London, 2008, p .189.
2. I.Antadze., T.Burbutashvili., **S.Gunia.**, M.Dadunashvili., N.Balarjishvili., T.Pataridze., M.Kutateladze. Study of Bacteriophages active against Brucella spp. Biological Threat Reduction program (BTRP) science and disease surveillance review. 2009, Atlanta, USA.
3. **ს. გუნია.** ბრუცელები და ბრუცელოზური ფაგები. ახალგაზრდა მეცნიერთა კონფერენცია, გელიავას სახ. ბაქტერიოფაგის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტი, 2009. თბილისი.
4. M.Kutateladze, R.Obiso, I.Antadze, T.Burbutashvili, **S.Gunia**, M.Dadunashvili, N.Balarjishvili, T.Pataridze. Characterization of host-dependent modulation of bacteriophage in Brucella species. 62th Brucellosis Research Conference, 2009, Chicago, Illinois.
5. E.Tevdoradze, I.Antadze, **S.Gunia**, T.Burbutashvili, M.Dadunashvili, N.Balarjishvili, T.Pataridze, P.Elzer, R.Obiso, M.Kutateladze. Antibiotic-and Phage susceptibility of Brucella bacterial strains from the Eliava Institute Collection. ASM Conferences: Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacterial and Foodborne Pathogens in Animals, Humans and Environment. 2010, Toronto, Canada. p.78.

6. M.Kutateladze, I.Antadze, T.Burbutashvili, **S.Gunia**, M.Dadunashvili, N.Balarjishvili, T.Pataridze, R.Obiso.Characterization of bacteriophages against Brucella species. Viruses of Microbes, Institut Pasteur, 2010, Paris, France.
7. M.Kutateladze, I.Antadze, T.Burbutashvili, **S.Gunia**, M.Dadunashvili, N.Balarjishvili, T.Pataridze, R.Obiso.Characterization of bacteriophage specific to Brucella species. 63th Annual Brucellosis Research Conference, 2010, Chicago, USA. p.37.
8. I.Antadze, **S.Gunia**, T.Burbutashvili, M.Dadunashvili, N.Balarjishvili, . E.Tevdoradze and M.Kutateladze. Bacteriophages for the differentiation of Brucella species. “Bacteriophages and Probiotics – Alternatives to Antibiotics “,p.49. 2012, Tbilisi, Georgia.
9. M.Kutateladze, I.Antadze, T.Burbutashvili, **S.Gunia**, M.Dadunashvili, N.Balarjishvili, L.Kvachadze, E.Tevdoradze, R.Obiso, J.Farlow.Host specificity of Brucella bacteriophages from the Eliava Institute collection.65th Annual Brucellosis Research Conference, 2012, Chicago, USA. p.51
10. I.Antadze, M.Dadunashvili, **S.Gunia**, N.Balarjishvili, L.Kvachadze, N.Skhirtladze, E.Tevdotadze, A.Kotorashvili, J.Farlow, M.Kutateladze.Brucella Bacteriophages – phage host cell interaction peculiarities. ASM 113th General Meeting. 2013, Denver, USA. p.189.
11. E.Tevdoradze, I. Antadze, **S.Gunia**, N.Skhirtladze, N. Balarjishvili, L.Kvachadze, A.Kotorashvili, S. Hagijs, Ph.Elzer, J.Farlow, M.Kutateladze. Phage-host interaction peculiarities in Brucella bacteriophages. EMBO Conference on Viruses of Microbes III, 2014, Zurich, Switzerland.
12. E.Tevdoradze, I. Antadze, **S.Gunia**, N.Skhirtladze, N. Balarjishvili, L.Kvachadze, A.Kotorashvili, S. Hagijs, Ph.Elzer, J.Farlow, M.Kutateladze. Phage-host interaction peculiarities in Brucella bacteriophages. 67th Annual Brucellosis Research Conference. 2014, Berlin, Germany.
13. E.Tevdoradze, J.Farlow, A.KotoraSvili, N.Skhirtladze, I.Antadze, **S.Gunia**, N.Balarjishvili, L.Kvachadze and M.Kutateladze. Whole genome sequence comparison of ten diagnostic brucellaphages propagated on two Brucella abortus hosts. Virology Journal, 2015. DOI:10.1186/s12985-015-0287-3
14. **ს. გუნია**; ზ. ლომთათიძე. ბრუცელოზური ბაქტერიოფაგები. აფხაზეთის მეცნიერებათა ეროვნული აკადემია. შრომათა კრებული, ტ.3, გვ.62–74. 2014, თბილისი.
15. **S.Gunia**, T.Burbutashvili, M.Dadunashvili, M.Kutateladze, E.Tevdoradze, I.Antadze. Application of Bacteriophages For Differentiation of Brucella spp. Bacteriophages as tools for therapy, prophylaxis and diagnostics. Abstr.Book. p.46. 2015, Tbilisi, Georgia.

LEPL Sokhumi State University
Faculty of Natural Sciences and Health-care

With the right of manuscript

Sophio Gunia

Brucella Bacteriophages for Differentiation
And Phage typing of Brucella spp

Doctoral thesis

Submitted for Academic Degree of Biological Sciences

(Ph.D)

Tbilisi

2015

The work has been executed at G. Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology and at the Faculty of Natural Sciences and Health-care of the LEPL Sokhumi State University.

Research supervisor: **Zaur Lomtadze**
Ph.D in Biology, Professor of the LEPL
Sokhumi State University
 Mzia Kutateladze
Ph.D in Biology

Experts: **Nona Mikaia**
Ph.D in Biology, Associated Professor of the
LEPL Sokhumi State University
 Marine Darsavelidze
Ph.D in Biology

Official reviewers: **Ilia Gorozia**
Ph.D in Biology, Associated Professor of the
LEPL Sokhumi State University
 Sergo Rigvava
Ph.D in Biology

The dissertation will be defended on - February, 2016, at at the meeting of the Dissertation Board of the Faculty of Natural Sciences and Health-care of the LEPL Sokhumi State University.

Address: Tbilisi, Ana Politovskaia str. #9, presentation room.

Secretary of the Dissertation Board,
Ph.D in Biology, Associated Professor of the
LEPL Sokhumi State University

Nona Mikaia

General Characteristics of the dissertation

The actuality of the theme. Brucellosis is global zoonosis and is one of the most common infectious in humans and animals, which is characterized by the body's most vital system disorders. The disease Brucellosis is caused by *Brucella* spp. Microorganisms. Ten species of *Brucella* is known according to the modern classification, which are divided into different biovars. During the Brucellosis disease urogenital system (uterus, mammary, lymph glands and testis), digestive system (liver, spleen) and musculoskeletal system (joint) organs are damaged. Brucellosis is similar to malaria, rheumatism endocarditis, tuberculosis, leishmaniosis, typhoid fever and tularemia with its symptoms. For this reason, a diagnosis is often incorrect. At the beginning of the 21st century brucellosis still remains a problem for people. Joint committees are established – with participation of World Organizations for agricultural, Animal Health (OIE) and the World Health organizations.

During the last 50 years more than 20,000 people are registered infected with brucellosis. There are mainly two forms of brucellosis found in Georgia: Sheep-goat (an epidemic form) and Bang's disease (sporadic form), with their agents: *Brucella melitensis* Biotype III and *Brucella abortus* Biotype I. They are characterized by a variety of epidemic process. This circumstance was mainly due to the demand to the environmental conditions of a certain disease pathogens, the virulence and different species of infection sources. 96,68 % of cases of Brucellosis in Georgia are registered in eastern regions, mostly in Kakheti and Mtatusheti: Sagarejo, Gurjaani, Telavi, Akhmeta, Kvareli, Lagodekhi, Tsiteltskaro, Sighnaghi regions. Relatively common in meskheta, Javakheti and Kvemo Kartli (Gardabani, Marneuli and Bolnisi regions). Even fewer number is recorded in Khevi, Mtiuleti, Pshavi, Khevsureti, Trialeti (Kazbegi, Dusheti, Tianeti, Dmanisi, Tetrtskaro, Tsalka and some other regions). The disease is mainly distributed in the regions, where they run cattle-breeding, particularly sheep breeding. Brucellosis is rare in western Georgia. In East Georgia sheep-goat Brucellosis caused by *Brucella melitensis* is mainly spread, but in West Georgia – sporadic cases-Bang's disease caused by *Brucella abortus*.

For the specific diagnostics of Brucellosis all immunological reactions, morphological studies, also biological and bacteriological methods are used. One of the significant methods for diagnosis of the disease is the use of Brucellosis bacteriophage. Among the rapid and reliable epidemiological methods, an important part is phage typing, by means of which it is possible to identify inner specific and serotypes.

In order to conduct the fight against Brucellosis and its prevention rationally, it is necessary to determine *Brucella* species, because each species of this bacteria has a different distribution area. *Brucella* species and also different strains of the same species are distinguished for its pathogenicity and virulence. *Brucella* is one of the dangerous object for creating biological weapons and during bioterrorism. As the disease caused by *Brucella* is of polymorphic nature, hardly treatable and epizootic reproduced, Brucellosis is evaluated in the World Health Organization Laboratory Biosafety Manual (2004), as a high individual and moderate social risk group and therefore *Brucella* is attributed to the 3rd level of Biosafety. Various research projects are conducted in Georgia related to the

study of especially dangerous infections, with collaborators of the USA and various countries of EU.

The work is made by the support of the US Defense Threat Reduction Program, within the framework of Project GG-17 “Clinical, Epidemiological and Laboratory evaluation of Brucellosis in Georgia”.

The goals and objectives of the research: The goal of the research was the practical use of brucellosis bacteriophages for diagnosis of brucellosis and differentiation of *Brucella*. The following objectives were set for this research:

1. Study of brucellosis strains existed in G. Eliava Institute (Morpho-cultural features, antibiotic sensitivity and phage sensitivity).
2. Identification of strains isolated from people and animals suffering from brucellosis, through the existing brucellosis bacteriophages in G. Eliava Institute.
3. The isolation of the new brucellosis bacteriophages and study of their biological properties in order to further use them in diagnostics.
4. Use of Brucellosis bacteriophages existing at G. Eliava Institute and newly isolated ones for inner specific and interspecific differentiation of museum and newly isolated strains.

The scientific novelty. New Brucellosis bacteriophages # 19, 9 7sa, 141, 11 sa are isolated. Their biological properties are studied. Some brucellosis bacteriophages were selected form the newly isolated phages ## TB, 02, 1066, 11sa, V, 110, 141, 177, 281 and 544, which made it possible to identify brucellosis strains and interspecific differentiation.

The practical importance of the thesis. By the Disease Control Center of Georgia and the Bacteriological Laboratory of the Ministry of Agriculture, isolated microbes from the pathological material and food products got from humans and animals, have been diagnosed as *Brucella*, which was confirmed by the selected phages and collectible phage set. Also, by means of this phage set, the existing strains of Brucellosis in the US Louisiana University Bacteriological laboratory have been examined.

The volume and structure of the thesis. The thesis is submitted in printed version on 146 page. It contains an introduction, literature review, description of materials and methods, own studies, discussion of results, conclusions and the list of references. The work is illustrated with 35 tables, 2 graphics and images. The list of literature includes 212 names and 17 websites.

The objects and methods of the research

Bacterial strains: 146 brucellosis strains are used during the work, among them:

- 1) 36 museum strains existing in the collection of George Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology: *Brucella melitensis* : # 130 m/z; 254m/z; 238m/z; 70m/z; 71m/z; 238; 237; 63/9; 7; 110; 16M. *Brucella abortus*: # 19; 9; 141; 99; 64;

544; C68. *Brucella suis*: # 1s/z; 52s/z; 76s/z; 153s/z; 175s/z;182s/z;193s/z;1330;7s;8s;15s; 32s; 35s;36s; 7sa;11sa; 14sa.

2) Brucellosis strains isolated from blood and milk of cattle and sheep and goat, also from abortus fetus of diseased animals by the Bacteriology Laboratory of the Ministry of Agriculture, in 2009-2011. 31 strains in total.

3) 42 brucellosis strains isolated from the blood of patients in the Center of Disease Control in 2009-2011.

4) Brucellosis strains existing in Louisiana State University, from cattle as well as sheep and goat, marine mammals and diseased people. In 2010 9 strains were investigated; in May 2011-13 strains, in November 2011 – 15 brucellosis strains. 37 isolates in total.

Bacteriophages. During the work were used the isolated phages in Brucellosis phage Laboratory: ## TB, IV,V,VI,VII,VIII, IX, X,XII,12(b) and BA; 22 phages – from *B. melitensis* cultures: phages ## 214, 248, 2, 3, 5, 6, 27, 29, 43, 63, 81, 58, 90, 100, 147, 109, 110, 224, 177, 271, 273 and 239; from *B. abortus* cultures: phages ##544 and newly isolated 19, 141 bright, 141 turbid and 9; from *B. suis* ##7 and 11 sa; from *B. canis* #1066; from *B. ovis*: ##281, 290, 02 and 64. Total 45 phages.

Methods:

Identification of microbes and study of their biological properties were held by classical bacteriological methods (V.N. Pokrovsky 1998). Antibiotic susceptibility testing was conducted with standard discs of 14 kinds of 8 groups of antibiotics, by diffusion method in agar (S.M. Navashin, I.P. Fomina 1982). During the selection of bacteriophages and studying of their biological characteristics (morphology, serological, psycho-chemical properties, lytic activity and range of action) we guided by commonly known methods (A.M. Goldfarb, M Adams 1961).

The lytic spectrum of phages was conducted on solid food range according to Craigie method modified by Makashvili and Chanishvili (1949).

The study of host cell interaction phases was conducted by using standard methods (Adams M. 1961; Gabrilovich I.M. 1973). In each case of research phage we determined the speed of adsorption, latency period and average output value.

We studied bacteriophage sensitivity toward physical and chemical factors by standard methods, particularly: 1) we studied the action of ultraviolet rays in phosphate buffer in different exposure conditions (wavelength 254 nm, distance between the object and UV lamp 18cm, interval 2-60 sec.) 2) we studied the effect of osmotic shock on the phage by standard method (Anderson T. 1956; Chanishvili T.G. 1968) 3) Thermal inactivation experiments were held by standard methods (Gabrilovich I.M. 1973).

Phage multiplication and concentration was conducted on solid area by double layer agar method ((Hershey A.D., Kalmanson G., Bronfenbrenner J. 1943). Bacteriophage titer in liquid food area was determined on Appelmans solid food area, by Gracia method. The

study of virion morphology of phages was conducted by using electron microscope JEM-EX-1200.

The review of the results

Brucellosis takes one of the important places among the infectious diseases. Pathogens of the disease brucella are characterized by high invasion and aggressive properties. According to the tenth edition of international Classification of Diseases, submitted by the World Health Organization, “some infections and parasitic diseases” Brucellosis are referred zooantroponosis.

As it is known, the source and reservoir of zoonotic disease for people is first diseased and infected animals, with which people have frequent contact, as well as polluted environment and food products. It should be noted, that the agents of zoonotic disease do not circulate in the group of people, because human is dead-end for them, but black plague and yellow fever are exceptions. Spreading of epizootics among animals is connected to migration of wild and farm animals, and to latent form of the disease, on the one hand, and to transition of acute of the disease into chronic form and delayed diagnosis and treatment, on the other hand.

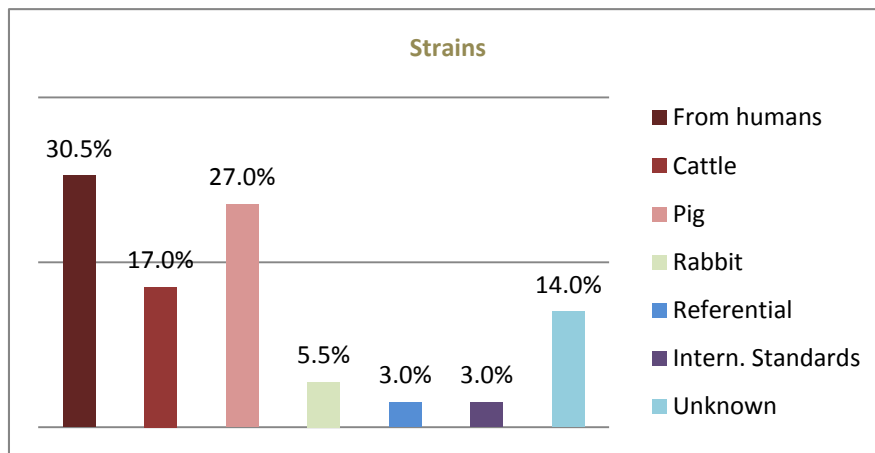
For Brucellosis diagnosis apart from clinical data and history, medical examinations are also necessary. Each case of the disease should be confirmed by laboratory tests. Laboratory diagnosis includes the following methods: 1. Bacteriological-isolation of pathogen and its identification; 2. Determination of immune antibody in serological sufferer blood serum by Wright agglutination reaction, using Brucellosis diagnostic. 3. Immunofluorescence method; 4. Allergic method-Burnet reaction by using brucellin; 5. Phage diagnostics (determine species) and phage typing (innerspecific differentiation).

In the presented work, 11 strains from 36 studies strains belong to *Brucella melitensis*, among them 4 strains are isolated in Georgia, other 7 strains in Germany, Bulgaria, Russia, Kazakhstan. From 7 *Brucella abortus* 3 strains are isolated in Tbilisi, Georgia, 2 strains in Russia, 2 strains in England and *Brucella suis* 18 strains are isolated in different countries, such as: USA (2 strains), Czech Republic (2 strains), England, Bulgaria, Russia, Italy, Argentina, Poland (9 strains). According to the source of isolation all four *Brucella melitensis* Tbilisi strains are isolated from human blood, as well as in Germany and Russia. In England, the isolated strain is obtained from cattle and the origin of 3 strains is unknown. As for the brucella abortus strains-2 Tbilisi strains are from human blood, 1 is for vaccine, 1 – international standard, 2-from cattle, the source of isolation of 1 strain from England is unknown. The source of isolation of *Brucella suis* strains are mainly pigs – 10 strains, also (2), in 3 cases – cattle, 2 strains – human blood. In Georgia, in 2009-2011 newly isolated 42 *Brucella* strains are isolated from human blood, and 32 from cattle and sheep and goats, milk and abortus fetus.

As we can see, the distribution area of brucellosis is quite wide and includes many countries and continents, and in our researches people, as well as animals and food products are infected. The essential condition for determination of brucellosis as exact

diagnosis is the isolation of bacterium and its identification. The study of strains was carried out by determination of all those tests, which are characteristic for Brucella.

Graph #1. G.Eliava Institute Collectible Brucella - strains



The examination of smears by optical microscope revealed that none of the brucella species differ from each other. Bacterial cells are rounded or oval shape, without grouping, about 1µm in size. One of the important tests is the determination of colony growth characteristics, size, shape and structure on brucella solid medium. It is known that brucella microbes are mainly is S or R shape, and the isolated hem cultures from chronically infected, who are treated by medicines, are often of L – shape.

The sizes of bacterial colonies of studied strains ranged from 1 to 5 mm diameter, with convex, straight edges, whitish-gray, sometimes pale honey color. Acryflavin test revealed that all the studied strain colonies are of S – shape, which was due to optimal conditions of microbe growth. S shaped colonies brucella contain lipopolysaccharide complex, which is located on cell wall and because of this the microorganism is painted Gram-negatively. The same lipopolysaccharide complex stipulates virulence of Gram-negative cell and antigenic properties, at the same time the defensive factor for the microbe, thus protecting it from destruction. For the sizes of bacterial colonies of all types of S shapes brucella are variable, have lipopolysaccharide chains of similar structure and A and M proteins, it is practically impossible to differentiate them by serological reaction. However, it should be noted that in case of disease diagnostics, Wright's and Huddleson's reactions have a special role. In these cases diagnostics with S and R antigens are used. Some brucella species are in S shape from the outset. These are *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*. In adverse conditions or during parasitizing in a strange body they dissociate by transition in R shape, but favorable conditions give reversal ground. *B. ovis* and *B. canis* are constantly in R-shape, however the cases of transition in S-shape are described in literature. It is important to know the structure of colonies, because specifically active phages are used for differentiation of S and R shapes. Additional test, which is used for differentiation, determination of grouping skill of species on the solid ground of microbe, by means of adding of certain

chemicals, such as aniline dyes thionine and fuchsine. It is known that when there are both components, only *B. melitensis* grows, by adding fuchsine – *B. abortus*, by adding thionine – *B. suis*. The test proved that brucella strains existing in the collection maintained their initial structure S shape in long storage conditions and selectively grow in different medium.

During the study of biochemical activity the attention was paid to the ability of microorganisms to produce enzymes. Traditionally sugar fermentation ability by microbes is studied. In this case, in particular brucella, show very low activity. As the results show, all the strains actively produce their specific enzymes such as: oxidase, catalase, urease, and hydrogen sulphide selectively. The results of Brucella biochemical activity are shown in Table #1.

Thus, the study of morphological, cultural, biochemical and serological properties of 36 museum brucella strains proved that they carry the characteristics typical for these species and are their typical representatives.

Table #1. Brucella differential signs

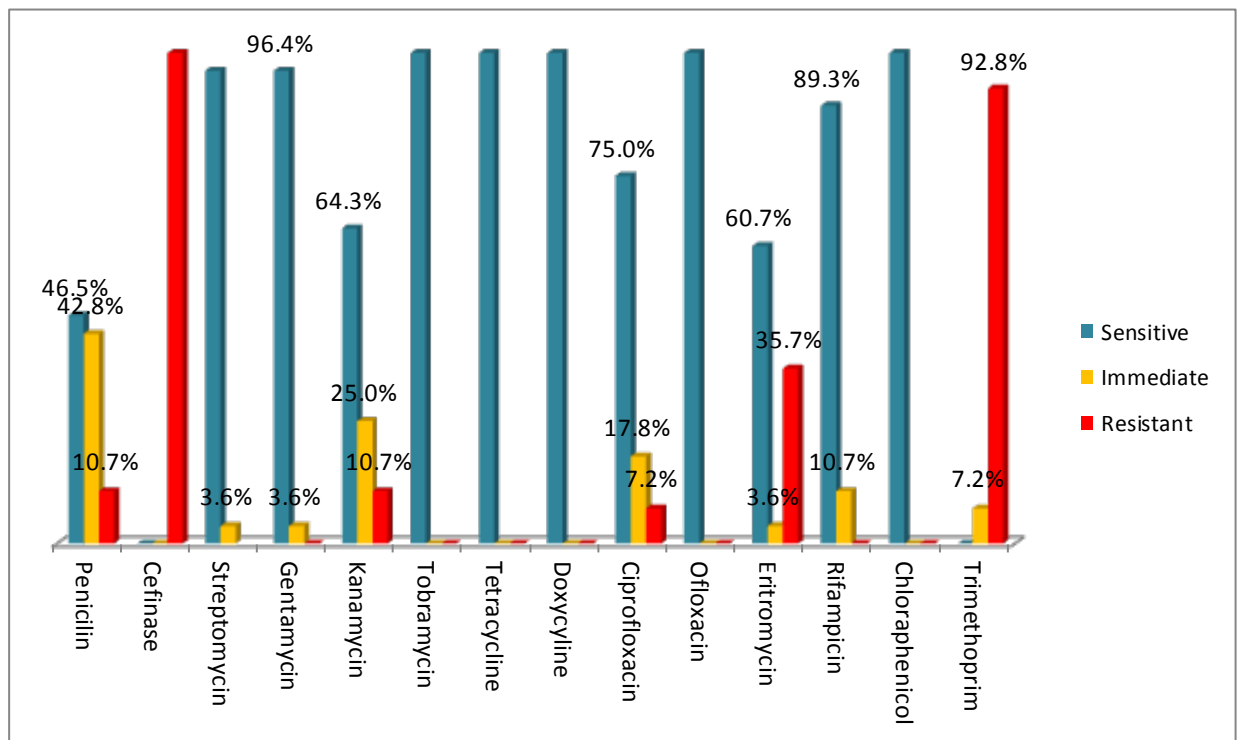
<i>Brucella spp.</i>	oxidase	catalase	urea	acryflavine	Agglutination with specific serum	H2S Formation	TSI test	Paint bacteriostatic action	
								Thionin	Base Magenta
<i>B.abortus</i> (7)	+	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>B.melitensis</i> (11)	+	+	+	-	+	-	-	+	+
<i>B.suis</i> (18)	+		+	-	+	+	-	+	-

Currently, in the medical practice for treatment of the acute of brucellosis various groups of antibiotics are used with complex of immunomodulators (interferon, cycloferon). The use of interferon revealed side effects, cycloferon is now undergoing a clinical test. In all specific cases the sensitivity of microbes to antibiotics, the drug action mechanism, localization and ways of transportation should be taken into account. It is known from the literature, that the series of tetracycline –aminoglycosides, cephalosporins and other drugs would be used for treatment. In recent years, pregnant women and young children are treated with trimethoprim. As the experiments conducted by us show, all the studied strains, except one, turned out to be resistant to this drug as well as towards Cefinase B. The treatment of brucellosis takes a long time. The use of only one antibiotic is often ineffective and causes relapses, formation of resistant and L –shaped strains, the identification of which is very difficult. In specific cases any kind of correlation of

different species and the impact of antibiotics have not been mentioned, so their differentiation on this ground is impossible.

The diagnostics of brucellosis is regulated by a number of research methods from World Health Organization recommendations, including the determination of sensitivity towards TB reference phage. Later Wb (Weybridge), Fi (Firenze), Bk2 (Berkley) and R phages were added. This phage-related problems and their serviceability are noted in the International Committee report (Manchester) of *Brucella* sustematization. They also recommend to review the existing scheme of phagotyping. Concerning this we set a task to select and isolate new phages from the collection, so we could differentiate brucella according to their sensitivity towards undiluted and diluted phages. TB reference phage reveals some specificity and does not affect the *Brucella melitensis* species. This phage is non-specific towards any other species.

Diagram #2. *Brucella* strains antibiogram towards antibacterial drugs



As the diagram shows, the high sensitivity (96-100%) was identified by the strains to aminoglycoside group preparation (Streptomycin, Gentamicin, Tobramycin); On more than 100% of strains acted Tetracycline series antibiotic and chloramphenicol; Less sensitive (46%, 61%, 75%) occurred towards Penicillin, Erythromycin and Cephalosporin. The complete resistance was revealed towards cephalosporin group (Cefinase B) and representatives of sulfonamides.

The diagnosis of Brucellosis, by the recommendations of the World Health Organization is regulated with a number of methods, including the determination of sensitivity towards

Brucella TB reference phage. Our goal was to isolate the new Brucella bacteriophage, by means of which it would be possible to differentiate Brucella according their sensitivity towards phages. From phage environment (waste water) and also by crops “aging”, the spontaneous release of phages was unsuccessful. For inner specific tapping, mainly moderate phages isolated from lytic cultures are used. Such phages are characterized by high specificity of lytic range. One of the features of some bacterial cells is bacteriophage content. To do this, we studied brucellosis strains, in order to identify which strain contains phages, including virulent or moderate. In order to determine the optimal regime of microbe radiation, when their inactivation percentage is not more than 90-100%, 3-3 strains were tested: *B. abortus* # 19, 141, 544 and *B. suis* # 52s / z, 1s / z, 1330. The studies showed that brucellosis strains are phage carriers or lysogenic, as a result it became possible to isolate 6 phages. Their lytic activity and spectrum has been studied on *B. abortus* and *B. Sui* strains existing in collection of Institute. At the same time, the action spectrum of initial titer of phages and their working dilution (RTD-Routine Test Dilution), on indicative *B. abortus* 141 strains, by Greigie and Yen modified method.

Table #2. Lytic activity of newly isolated strains

Phage #	Strain Indicator	Phage control	Undiluted phage	phage dilution					
				10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
19	B.abortus 141	2,2x10 ⁹	CL	CL	CL	CL	net	net	tv
9	B.abortus 141	1,4 x10 ¹⁰	CL	CL	CL	CL	net	net	tv
7sa	B.abortus 141	1,3 x10 ⁹	CL	CL	CL	CL	SCL	-	-
141-1	B.abortus 141	1 x10 ⁹	CL	CL	CL	SCL	SCL	net	25tv
141-2	B.abortus 141	3,5 x10 ⁸	CL	CL	CL	CL	net	net	9tv
11 sa	B.abortus 141	1 x10 ⁹	CL	CL	CL	SCL	-	-	-

Note: CL-total lysis; SCL-partial lysis; tv – negative colonies of phage

As a result, Brucellosis phage # 19, 9, 141–1, 141–2 and 7sa – thousand fold dilution makes the complete lysis of *B. abortus* 141, and the phage – 11sa –during hundredfold dilution. The experiments revealed working dilution of phages (RTD) i.e. the dilution at which the complete lysis (CL) of strains by phages is revealed. # 19, 9, 141–2 and 7sa phages RTD is equal to 10³, and for 141-1 and 11 SA phages – 10². We have studied the newly isolated ((## 19, 9, 141–1, 141–2, 7 sa, 11 sa) phages’ lithic activity and the range on the existivity towards *B.abortus* and *B. suis* strains in the collection of the Institute. At the same time we used reference phage TB (titer – 8x10¹⁰ and RTD-10³), which is characterized by high lithic activity towards *B.abortus* strains. However, during the action on *B. suis* the initial titer of the phage (10³RTD) gives complete lysis, while their RTD is not valid on more than 50 % of strains.

Table #3. Phage sensitivity of brucellosis strains with newly isolated phages

Strain #	Phages													
	TB		141 -1		141 -2		9		19		7 sa		11 sa	
	10 ³	RTD	10 ²	RTD	10 ³	RTD	10 ³	RTD	10 ³	RTD	10 ³	RTD	10 ²	RTD
B.abortus														
19	CL	CL	Cl	SCL	Cl	Tv	Cl	+	Cl	Cl	Cl	Cl	CL	SCL
141	CL	SCL	SCL	+	SCL	Tv	SCL	SCL	Cl	Cl	Cl	Cl	SCL	SCL
544	CL	SCL	SCL	tv	SCL	Tv	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	+
99	CL	CL	Cl	tv	Cl	Tv	Cl	SCL	Cl	Cl	Cl	Cl	CL	SCL
9	CL	SCL	SCL	+	SCL	Tv	+	+	+	+	SCL	+	CL	SCL
64	CL	SCL	SCL	+	SCL	Tv	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	SCL	CL	SCL
c68	CL	-	tv	-	+	-	SCL	-	SCL	-	SCL	-	SCL	-
B.suis														
1s/z	CL	SCL	-	-	SCL	-	Cl	-	Cl	-	Cl	-	CL	-
52 s/z	CL	SCL	-	-	Cl	-	Cl	-	Cl	-	Cl	-	CL	-
76 s/z	CL	tv	-	-	+	-	SCL	-	Cl	-	Cl	-	CL	-
153 s/z	CL	-	-	-	+	-	SCL	-	Cl	-	Cl	-	CL	-
175 s/z	CL	+	-	-	+	-	SCL	-	Cl	-	Cl	-	CL	-
176 s/z	CL	-	-	-	+	-	SCL	-	SCL	-	SCL	-	CL	-
182 s/z	CL	-	-	-	+	-	SCL	-	SCL	-	SCL	-	CL	-
193 s/z	CL	+	-	-	+	-	Cl	-	Cl	-	SCL	-	CL	-
7s	CL	-	-	-	-	-	SCL	-	SCL	-	SCL	-	CL	-
8s	CL	-	-	-	SCL	-	SCL	-	SCL	-	SCL	-	CL	-
15s	CL	-	-	-	SCL	-	Cl	-	SCL	-	SCL	-	CL	-
32s	CL	-	-	-	SCL	-	Cl	-	Cl	-	SCL	-	CL	-
35s	CL	-	-	-	-	-	Cl	-	Cl	-	SCL	-	CL	-
36s	CL	+	-	-	SCL	-	Cl	-	Cl	-	Cl	-	CL	-
7sa	CL	-	tv	-	SCL	-	Cl	-	Cl	-	Cl	-	CL	-
11sa	CL	SCL	-	-	SCL	-	Cl	-	Cl	-	Cl	-	CL	-
14sa	CL	-	Cl	-	-	-	SCL	-	SCL	-	Cl	-	CL	-
1330	CL	SCL	SCL	-	SCL	-	Cl	-	Cl	-	Cl	-	CL	-

The initial titers of newly isolated phages as well as RTD-s almost all acted on B. t strains. As for action of initial titers of phages (10³ RTD) on B.suis strains – was distributed on most strains, and towards phage RTD these strains were resistant.

For determination of activity range and specification of newly isolated phages, some representatives of Enterobacteriaceae family were used: Strains of different serotypes *E. coli*, *Salmonella* and *Shigella*. Total 54 strains. Highly active Brucellosis strains were taken for the experiment.

The activity of Brucellosis phages does not apply to Enterobacteriaceae family heterogeneous strains, which revealed specific activity range of these phages.

Table # 4. Specificity of action of collection and newly isolated Brucellosis phages

Name of culture	Number of strains	The action of phages isolated from different sources					
		from the environment 10 phages	From B.melitensis 22 phages	From B.abortus 5 phages	From B.suis 2 phages	From B.canis 1 phage	From B.ovis 4 phages
<i>E.coli</i>	17	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i>	22	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella</i>	15	-	-	-	-	-	-
Total	54	-	-	-	-	-	-

The activity range of phages and lytic activity has been studied of two-layer agar by Grace method. For this purpose 45 brucellosis phages existing at G. Eliava Institute are used, which were isolated in various years and are different from each other by the source of isolation. In particular, 10 phages are isolated from cattle excrement (tsumtsuma-sulphur): ## IV,V,VI,VII,VIII, IX, X,XII,12(b) and BA; 22 phages - B. melitensis cultures: ## 214, 248, 2, 3, 5, 6, 27, 29, 43, 63, 81, 58, 90, 100, 147, 109, 110, 224, 177, 271, 273 and 239; From B. abortus- cultures phages: ##544 and newly isolated 19, 141 clear, 141 turbid and 9; From B. suis ##7 sa and 11 sa; From B. canis #1066; From B. ovis ## 281, 290, 02 and 64. We used reference phage TB for comparison, which was isolated in Tbilisi, in 1955 by M. Popkhadze and T. Abashidze. The initial titers of each reproduces phage and their RTD on indicative strains have been studied. To check lytic activity and range of these phages, we used different species of B. Abortus and B.suis. As it is shown in the charts (#3, #4, #5, #6), in case of initial titers the complete lysis was shown on B.abortus 100% strains. In case of RTD the complete lysis was revealed on 80% strains, and on 20% of strains partial lysis. As for B. suis strains, the same phages acted with initial titer on 56% strains with complete lysis, on 29% strains- partial lysis, negative colonies of phages (TV) were revealed on 9% strains, and fully resistant were 7% of strains. In case of RTD 84% of strains showed complete resistance, on 16% strains negative colonies were revealed. Diagrams ##3, 4, 5, 6 show lithic activity and range of Brucellosis phages.

Figure # 3 on *B.abortus* strains

10³RTD phage activity;

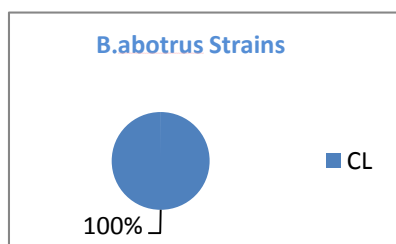


Figure # 4. On *B.abortus* strains

RTD phage activity

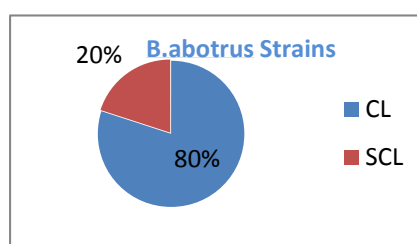


Figure # 5. On *B.suis* strains

10³RTD phage activity;

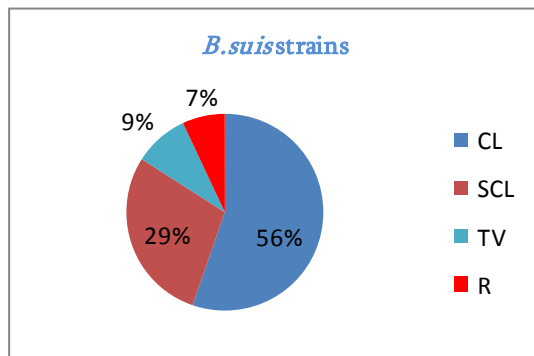
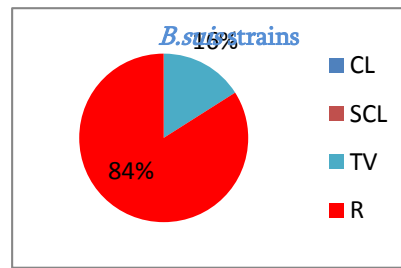


Figure # 6. On *B.suis* strains

RTD phage activity



Undiluted phages and their working dilution – RTD show high activity towards *B. abortus*. As for the action of these phages on *B. Sui* strains, they are active in initial titers, except for minor exception, where their RTD acts. Strain lysis in RTD by phages allows us to differentiate their action. On the other hand, these experiments revealed sensitivity of strains towards the phages used in the experiment. As we can see, *B. abortus* strains are characterized by higher phage sensitivity than *B.suis* strains.

During the study of taxonomic features of phages, one of the important tests is serological characterization of bacteriophages. For neutralization reaction of newly isolated phages ## 141-1, 141-2, 19, 9, 7sa and 11sa we used TB antiphage serum 1:100 dilution with 30-minute exposition, on 37° C. According to the results a percentage of the phage neutralization and neutralization speed constant (K) was calculated.

Table #5. Neutralization reaction of newly isolated phages

Phage #	Host-cell <i>B.abortus</i>	Dilution of TB serum	
		1:100	
		Time of exposition 30 minutes	
		Neutralization %	Neutralization. K
141-2	141	77,8	4,9
141-1	141	38,3	1,59
19	141	90,5	7,7
9	141	86,3	6,5
7 sa	141	90,9	5,1
11 sa	141	100	

The interaction of newly isolated #19, 9, 141 turbid, 7sa and 11 SA phages with TB antiphage serum revealed a high percentage of neutralization (77-100%), neutralization constant (K) ranged from 4, 9 to 7, 7, which indicates that newly isolated phages are homologous and related to the brucellosis phages existing in the institute. Phage #141

clear showed relatively low neutralization rate (38%) in interaction with TB antiphage and thus neutralization constant (K) was equal to 1.59, which confirms distant relation to TB brucellosis phage.

During bacteriophage selection it is important to study the interaction phases of phages and host cells, which is one of the determinant test of phage virulence. In order to determine general appropriateness of intracellular reproduction of phages, we studied phases of interaction of specific phages with host cells: adsorption, latency period, average yield of phages on one infected bacterial cell.

During studies, for determination of phage adsorption speed on bacterial cell we selected some brucellosis phages existing in G. Eliava Institute #TB, 02, 1066, 177, 544,281 host cells B. Abortus 141 and also phage TB* -host cell B. Abortus 19. In the experiment we used antiphage serum in dilution 1:100 in different time periods.

Phage adsorption on bacterial cell occurs in speed, which is proportional to the phage concentration and bacteria. We calculated the maximum speed of adsorption by the formula. Adsorption period for these phages lasted from 60 minutes to 3 hours.

As a result of study lytic range, we selected 10 phages from 45 phages which were different in activity and range. Subsequently we studied their biological properties, namely: interaction phases of phages and host cells; physical and chemical factors; morphology of phage particles.

To study single-cycle of bacteriophage reproduction we selected active phage towards B. Abortus from G. Eliava Institute: #02, 544, 1066,281,177,110 and also newly isolated #141 and 11sa phages reproduced on B. abortus 141 strain. According to the data of single-cycle reproduction of bacteriophages, we identified that intracellular reproduction of brucellosis phages given in the list can be conditionally divided: 1) from 0 to 3, 5 hours the number of bacteriophage particles were stable and did not increase. 2) From 3, 5 to 6 hours slow growth of phage was observed. 3) From 6 to 8 hours sharp growth of particles. An average yield of phage particles on one infected bacterial cell varied from 21 to 68 units.

Table # 6. Single cycle of bacteriophage reproduction

Phage #	Strain #	Phage productivity			
		1 test	2 test	3 test	Average Data
177	B.ab.141	46	39	41,7	42
544	B.ab.141	15	23,7	25	21
1066	B.ab.141	39	73	33	49
11sa	B.ab.141	40.6	46	29	38
141	B.ab.141	45	77	81	68
110	B.ab.141	45	42	55	47
02	B.ab.141	20	52	25	33
281	B.ab.141	55	43	72	57

The impact of Physical and chemical factors on brucellosis bacteriophages was studied by using thermal inactivation, chloroform, urea, osmotic shock and UV rays. During the study of

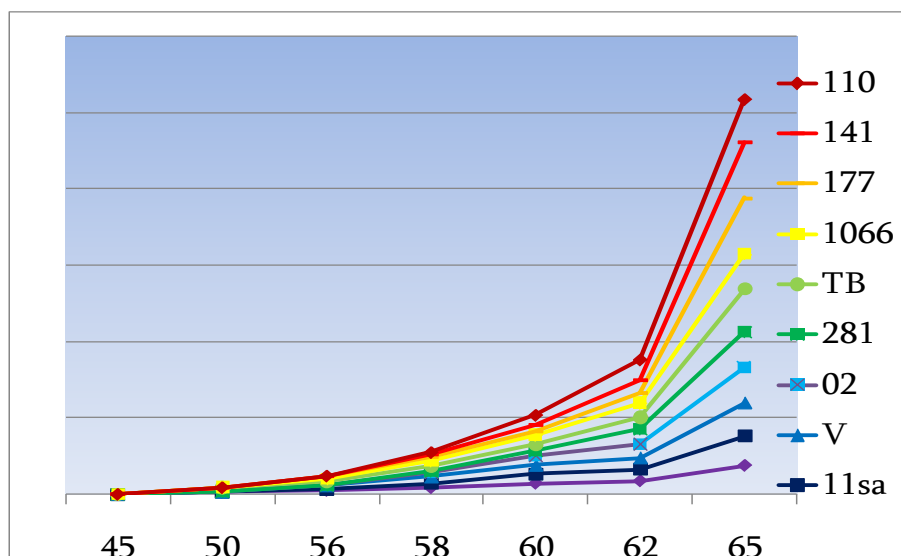
of thermal inactivation factors, we heated phages in 5° intervals, from 45° to 75°. According to the preliminary results, it was clear that the interval from 56° to 65° should be reduced up to 2-2°. As a result of thermal inactivation the number of life-giving particles of Brucellosis bacteriophages, which is shown in percentage is represented in Table #7.

Table #7. Thermal inactivation kinetics of brucellosis bacteriophages

phage #	The number of vital phage particles in consequence of temperature impact (%)								
	45°	50°	56°	58°	60°	62°	65°	70°	75°
544	100	70	54	35,6	18,4	12,6	1,06	9X10 ⁻⁷	0
11sa	100	100	78	52,3	25,2	18	1,2	2X10 ⁻⁵	0
V	100	100	60	35,4	25	16,6	0,6	0	0
02	100	100	100	52,5	23,75	12,5	0,45	26X10 ⁻⁷	0
281	100	100	100	85,4	51,6	10,4	0,5	16X10 ⁻⁷	0
TB	100	93	56,5	43	35,8	17,4	0,15	0	0
1066	100	100	68,4	47,4	24	11,2	0,47	94X10 ⁻⁷	0
177	100	100	58,6	58	58	21	0,02	9 X10 ⁻⁷	0
141	100	100	100	68,3	36,5	14,6	0,024	22X10 ⁻⁷	0
110	100	100	100	67,4	23,2	4,65	0,14	3 X10 ⁻⁷	0

For phage #544 and TB the lower limit of thermal inactivation is 500, the number of their particle was inactivated in 30% and 7% at 56° C, while upper limit – at 65°C. While phages #02,281,141 and 110 occurred resistant at 56° C. Other phages retain living cells from 54% to 78%. Phages #02,281,141 and 110 retained their vital particles from 58°C to 65°C, which is reflected in the decline of their percentage rate –from 68,3% to 0,024%. #544, 11sa, 02, 281, 1066,177 and 110 phages cab endure 70°C, and phages V and TB were fully inactivated on this temperature. It should be noted that complete inactivation of all studied phages occurred at 75°C. The studied phages (##TB, V, 544, 11sa, 02, 281, 1066, 177, 141, 110) occurred stable as a result of thermal treatment. Logarithmic relation between live phage particles and the temperature is shown in Diagram #1.

Diagram #1. Logarithm of the number of phages and temperature



Series of chemicals act on denaturation of virus protein. Since in the process of work and virus conservation chloroform is used, it became necessary to study the impact on brucellosis phages. During the chloroform impact denaturation of brucellosis phage proteins is observed, thus phages lose their activity in certain periods of time. For the experiment we used feed medium which contained chloroform. The mixture of phage and chloroform we detained in different period of time: 10 min, 1h, 2h, 3 h, 24 h, 48 h, 72 h and 25 days. As a result of chloroform influence on Brucellosis bacteriophages the percentage of life-giving phages is given in Table #8.

Table # 8. The impact of chloroform on brucellosis phages

Phage N	Phage control	Percentage of life-giving phages during different exposition							
		10 minutes	1 hr	2 hr	3 hr	24 hr	48 hr	72 hr	25 days
TB	2,27 x10 ⁹	100	27,3	21	17,2	4,9	1,65	1,1	0
02	1,15x10 ⁹	94	40	25,2	15,1	3,74	1,3	0,43	0
1066	1,47 x10 ⁹	51,7	47,6	14,4	13,6	4,7	0,95	0,7	0
11sa	3,4 x10 ⁹	77	15,3	11,7	10,6	2,47	0,76	0,35	0
V	6,4 x10 ⁸	53	11	7	5,3	1,3	0,6	0,5	0
110	4,5 x10 ⁸	89	48	46,2	43,5	14,4	3,7	1,28	0
141	8,7 x10 ⁸	27,7	11	5,4	1,5	0,5	0,8	0,8	0
177	5,6 x10 ⁸	51,7	34	25	20,7	3,8	0,9	0,18	0
281	7,0 x10 ⁷	100	47	13,5	10,8	3,8	1,9	1	0
544	7.65 x10 ⁸	74	36,3	29,2	29	7,3	0,8	0,445	0

Phages #TB and 281 – as a result of 10 minute exposure occurred resistant towards chloroform, while the rest of the phages ## 02, 1066, 11 sa, V, 110, 141, 177 and 544 partially resistant. As a result of further exposure their vitality was gradually decreasing. After 25 days all the phages suffered the complete inactivation.

The action of urea on bacteriophages causes denaturation of protein and inactivation of enzymes. In order to determine how urea acts on brucellosis phages, several experiments were conducted in different periods of time, where 8 molar urea were used.

ბრუცელოზურ Partial inactivation of phage particles can be observed during the acting of urea on bacteriophages. After 20 minutes from 10% to 45% of phage particles inactivate; after 40 minutes from 14% to 57 %; and after 60 minutes from 17% to 68%.

Table #9. The action of the urea on brucellosis phages

Phage #	Phage control	Percentage of life-giving phages during different exposition		
		20 minutes	40 minutes	60 minutes
TB	1,64 x10 ⁹	73,8	70,7	52,4
02	8,40 x10 ⁸	83,0	80,1	80,0
1066	1,59 x10 ⁹	63,0	63,0	62,0
11sa	2,80 x10 ⁸	86,0	84,0	83,0
V	2,56 x10 ⁸	90,0	86,0	82,0
110	4,82 x10 ⁹	76,0	76,0	49,0
141	1,44 x10 ⁹	81,0	80,0	57,0
177	6,0 x10 ⁸	55,0	50,0	45,0
281	1,75 x10 ⁹	78,0	43,0	32,0
544	4,20 x10 ⁸	78,0	76,0	76,0

The action of osmotic shock was studied by classical method provided by Anderson. In order to determine how electrolytes effect on the integrity and activity of phages, we applied phage to 4 molar sodium chloride solution. We added to 0.1ml of this suspension 10 ml distilled water and defined phage titer. At the same time we made phage control. The action of osmotic shock on Brucellosis phages is shown in Table #10.

Table #10. The action of osmotic shock on brucellosis phages

Phage	Phage control	% of vital phages
TB	1,01 x10 ⁹	100
02	6,85 x10 ⁹	10,1
1066	4,87 x10 ⁸	100
11sa	8,0 x10 ⁸	100
V	1,27 x10 ⁹	7,8
110	2,2 x10 ⁸	100
141	9,6 x10 ⁸	100
177	3,0 x10 ⁸	66,6
281	2,0 x10 ⁸	100
544	6,2 x10 ⁸	100

The results show that bacteriophages #TB, 1066,11sa,110,141,281 and 544 retain their activity in consequence of osmotic shock affect, while phage #177 inactivates at 33,4%, phage #V –at 92,2% and 02- at 89,9%. Experiments revealed that brucellosis phages resist osmotic shock and electrolyte affect.

To maintain the population of phages in natural conditions, bacteriophage resistance to UV is very important. In the test phage: ## TB, 1066, 11sa, 110, 141, 281, 177, 025, V and 544 were taken, with 10-10 second irradiation intervals.

By detailed examination of phage lytic action potential and their adsorption apparatus receptor specificity, for phage differentiation, it became necessary to study the effectiveness of their infection on bacterial cells. The effectiveness of phage infection on

bacterial strains is determined by definition comparison of phage titers on investigated strains to the phage titer detected on host-cell. We studied the infection efficiency of brucellosis bacteriophages #TB, 02, 1066, 11sa, V, 110,141,177,281 and 544 on B. abortus 141 and B.abortus 19 strains.

During the reproduction of TB and #02 phages on B. abortus 141 strains and then determination of titer on B.abortus 19 strains, has not revealed any great difference by definition of their infection effectiveness. The number of phage particles are within the same degree – 10^9 , though infection efficiency ratio is equal to 0,83 and 0,88. The efficiency of the rest 8 phages fell in 1 degree from 10^9 to 10^8 , and the ratio is from 0, 4 to 0, and 2. As for other version, when phage first was reproduced on strain 19 and then titrated on strain 141, it is obvious that planting efficiency of #110,281,544 phages is equal to 1. Planting efficiency of phages TB, 11sa, V, 141 and 177 is more than 1, and for phage 1066 it is dramatically increased 400 times. Based on the results for further reproduction of phages we used B. abortus 141 strain. The result of phage infection efficiency is shown in Table #11.

Electron-microscopic research showed that brucellosis bacteriophage is characterized by a complete morphological identity. The following phages were taken for study: #TB, 02, 1066, 11sa, V, 10, 141, 177, 281 and 544. . They have hexagonal shape head, the size 600x600A in diameter and a short prominence 150-200 A in length. According to Ackermann classification, the studied phages belong to Podoviridae family.

Photo # 1. #TB phage particle electron microscopic photo (magnification x100 000)

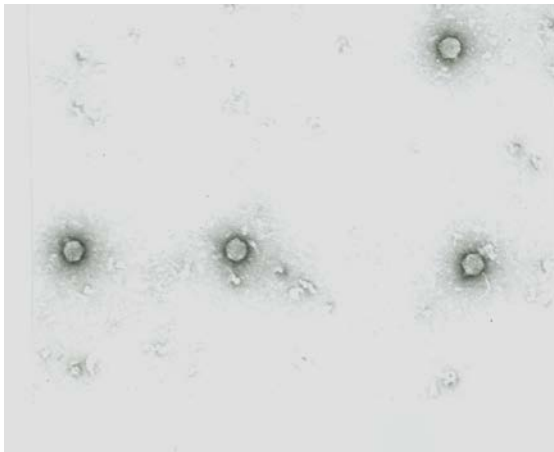


Photo # 2. #11sa phage particle electron microscopic photo (magnification x72 000)

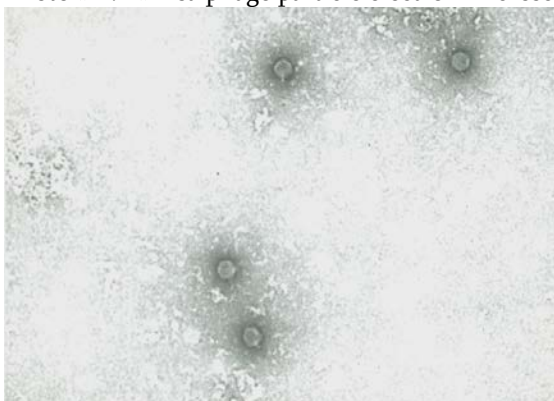


Table #11. Phage infection efficiency on Brucellosis strains

Phage #	Reproduced Phage titers on <i>B.abortus</i> 141 strain		Infection efficiency On <i>B.abortus</i> 19 strain B/A	Reproduced phage titers on <i>B.abortus</i> 19 strain		Infection efficiency On <i>B.abortus</i> 141 strain B/A
	<i>B.abortus</i> 141 (A)	<i>B.abortus</i> 19 (B)		<i>B.abortus</i> 19 (A)	<i>B.abortus</i> 141(B)	
TB	5,6x10 ⁹	4,7x10 ⁹	0,83	3,8x10 ⁹	4,9x10 ⁹	1,28
02	2,5x10 ⁹	2,2x10 ⁹	0,88	9x10 ⁷	4,5x10 ⁷	0,5
1066	2,8x10 ⁹	8,0x10 ⁸	0,28	1,0x10 ⁷	4,15x10 ⁹	0,415
11sa	4,4x10 ⁹	1,9x10 ⁹	0,43	3,45x10 ⁹	3,6x10 ⁹	1,04
V	2,0x10 ⁹	5x10 ⁸	0,25	4,6x10 ⁹	5,6x10 ⁹	1,2
110	5,0x10 ⁹	1,04x10 ⁹	0,20	3,4x10 ⁹	3,0x10 ⁹	1
141	2,8x10 ⁹	6,2x10 ⁸	0,22	1,83x10 ⁹	3,2x10 ⁹	1,75
177	4,1x10 ⁹	9x10 ⁸	0,21	2,9x10 ⁹	3,35x10 ⁹	1,15
281	1,8x10 ⁹	4,2x10 ⁸	0,23	9x10 ⁸	8,0x10 ⁸	1
544	2,6 x10 ⁹	1,03 x10 ⁹	0,4	1,2 x10 ¹⁰	1,2 x10 ¹⁰	1

From phages isolated by using UV rays, according to the action spectrum we selected 2 new and 8 collection phage. A set was created, through which brucella identification and differentiation experiments were successfully conducted and was confirmed by genetic analysis of microbe.

10 brucellosis bacteriophages selected by us: #TB, 02, 1066, 11sa, V, 110, 141, 177, 281 and 544 were tested on museum strains existing at George Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology, also at the bacteriological laboratory of the Ministry of Agriculture (LMA), on newly isolated brucella strains by National Center for Disease Control and Public Health (NCDC) and US Louisiana State University Agricultural Center and the Veterinary Department (LSU), total 146 isolates.

For phage typing of museum strains we used ten brucellosis phages (##TB,02,1066,11sa,V,110,141,177,281,544), the patron cell of which is B. Abortus 141. Phages ##TB, 02, 11sa, V, 544 – 103 RTD and RTD have the similar action on B. abortus strains. Phages #1066, 110,177, 141 and 281 show different range of action and activity in phage working dilution (RTD), and the action of these phages in 10^3 RTD is similar to TB phage. As for B. suis strains towards phage RTD these strains occurred resistant, and towards 10^3 RTD it gives different result. By means of the set of these phages innerspecific and interspecific differentiation is possible.

For identification of isolated cultures from pathological research material (31 samples) at bacteriological laboratory of the Ministry of Agriculture we tested and identified by means of bacteriophages from cattle, including milk, blood and 3 abortus fetus, newly isolated 31 strains. By action of brucellosis bacteriophages 10^3 RTD and RTD (host cell B. Abortus 141) 18 strains from 31 occurred resistant to phages, so we can assume that these cultures belong to B. abortus, which is also confirmed by the results of genetic analysis at the Bacteriological Laboratory of the Ministry of Agriculture. Other 13 strains occurred resistant to bacteriophage action.

We checked 42 cultures isolated from people's blood at the National Center for disease Control and Public Health on reproduced strain B. abortus 141 of 10 brucellosis bacteriophages, by action of 10^3 RTD and RTD, from these 3 sample cultures: FY0708-00041, FY0708-00079 and 10C001003/03/115 – occurred sensitive to phages, which is characteristic for B. abortus strains. Other sample cultures are resistant to 10^3 RTD and RTD of all phages and likely represented B. melitensis.

At US Louisiana State University Veterinary Department (LSU) we conducted research works in point of view of practical use of Brucellosis phages. With the set of Brucellosis phages (##TB, 02, 1066, 281, 177, 544, 11sa, V, 141, 110 patron-cell B. abortus 141 and the same phages patron-cell B. abortus 19). A museum and as well as newly isolated Brucellosis strains were checked (total 15) B.abortus S19; B.abortus S19 (shipport); B.abortus RB51; BC-LSU; BC- SVM 2; B. ovis; B.ovis(shipport); CDC1-BO1; CDC2-BO2; CDC3-NF2653; B.neotomae; SDRL; BA.2308; BM. 16M; BS.1330. Phage typing test showed that lithic range of reproduced phages on B. abortus 141 and B. abortus 19 strains are different.

Conclusions:

1. Morpho-cultural, biochemical and serologic properties of collection Brucellosis strains have been studied. Typical properties of characteristic for these species have been established.
2. 28 Brucellosis strain have been tested towards 14 different antibiotics. As a result of studying antibiotic sensitivity their high sensitivity towards antibiotics has been established.
3. As a result of UV irradiation of brucellosis strains moderate phages have been isolated: 19,141, 9, 7sa and 11sa. Lithic range and performance range of museum

and newly isolated phages have been studied. Ten phages ##TB, 02, 1066, 11sa, V, 110, 141, 177, 281 and 544 have been selected for strain differentiation.

4. A strict specificity of collection and newly isolated Brucellosis phages on Enterobacteriaceae family representatives have been established. .
5. Biological properties of the selected phages (morphology of negative colonies, adsorption, single-cycle reproduction, physical and chemical factors) have been studied.
6. By studying of serological properties of bacteriophages the relation with TB phage have been established, according to the viral particle morphology the studied phages are related to Podoviridae family.
7. By means of set of selected phages the establishment of existing strains (from humans, animals and pathological material) in Disease Control Center, in the laboratory of the Ministry of Agriculture and US Louisiana State University Veterinary Department (LSU) and newly isolated brucellosis stains and inner specific differentiation was possible.

The basic results of the dissertation are published in the following works:

1. I.Antadze., T.Burbutashvili., **S.Gunia.**, M.Dadunashvili, M.Kutateladze. Phage-typing as a diagnostic tool for identification of infections caused by Brucella. Brucellosis International Research Conference. London, 2008, p .189.
2. I.Antadze., T.Burbutashvili., **S.Gunia.**, M.Dadunashvili., N.Balarjishvili., T.Pataridze., M.Kutateladze. Study of Bacteriophages active against Brucella spp. Biological Threat Reduction program (BTRP) science and disease surveillance review. 2009, Atlanta, USA.
3. **S. Gunia** Brucella and Brucellosis phages. Conference of Young Scientists, G. Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology, Tbilisi, 2009.
4. M.Kutateladze, R.Obiso, I.Antadze, T.Burbutashvili, **S.Gunia**, M.Dadunashvili, N.Balarjishvili, T.Pataridze. Characterization of host-dependent modulation of bacteriophage in Brucella species. 62th Brucellosis Research Conference, 2009, Chicago, Illinois.
5. E.Tevdoradze, I.Antadze, **S.Gunia**, T.Burbutashvili, M.Dadunashvili, N.Balarjishvili, T.Pataridze, P.Elzer, R.Obiso, M.Kutateladze. Antibiotic-and Phage susceptibility of Brucella bacterial strains from the Eliava Institute Collection. ASM Conferences: Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacterial and Foodborne Pathogens in Animals, Humans and Environment. 2010, Toronto, Canada. p.78.
6. M.Kutateladze, I.Antadze, T.Burbutashvili, **S.Gunia**, M.Dadunashvili, N.Balarjishvili, T.Pataridze, R.Obiso.Characterization of bacteriophages against Brucella species. Viruses of Microbes, Institute Pasteur, 2010, Paris, France.
7. M.Kutateladze, I.Antadze, T.Burbutashvili, **S.Gunia**, M.Dadunashvili, N.Balarjishvili, T.Pataridze, R.Obiso.Characterization of bacteriophage specific to Brucella species. 63th Annual Brucellosis Research Conference, 2010, Chicago, USA. p.37.

8. I.Antadze, **S.Gunia**, T.Burbutashvili, M.Dadunashvili, N.Balarjishvili, E.Tevdoradze and M.Kutateladze. Bacteriophages for the differentiation of Brucella species. “Bacteriophages and Probiotics – Alternatives to Antibiotics“, p.49. 2012, Tbilisi, Georgia.
9. M.Kutateladze, I.Antadze, T.Burbutashvili, **S.Gunia**, M.Dadunashvili, N.Balarjishvili, L.Kvachadze, E.Tevdoradze, R.Obiso, J.Farlow.Host specificity of Brucella bacteriophages from the Eliava Institute collection.65th Annual Brucellosis Research Conference, 2012, Chicago, USA. p.51
10. I.Antadze, M.Dadunashvili, **S.Gunia**, N.Balarjishvili, L.Kvachadze, N.Skhirtladze, E.Tevdotadze, A.Kotorashvili, J.Farlow, M.Kutateladze.Brucella Bacteriophages – phage host cell interaction peculiarities. ASM 113th General Meeting. 2013, Denver, USA. p.189.
11. E.Tevdoradze, I. Antadze, **S.Gunia**, N.Skhirtladze, N. Balarjishvili, L.Kvachadze, A.Kotorashvili, S. Hagijs, Ph.Elzer, J.Farlow, M.Kutateladze. Phage-host interaction peculiarities in Brucella bacteriophages. EMBO Conference on Viruses of Microbes III, 2014, Zurich, Switzerland.
12. E.Tevdoradze, I. Antadze, **S.Gunia**, N.Skhirtladze, N. Balarjishvili, L.Kvachadze, A.Kotorashvili, S. Hagijs, Ph.Elzer, J.Farlow, M.Kutateladze. Phage-host interaction peculiarities in Brucella bacteriophages. 67th Annual Brucellosis Research Conference. 2014, Berlin, Germany.
13. E.Tevdoradze, J.Farlow, A.KotoraSvili, N.Skhirtladze, I.Antadze, **S.Gunia**, N.Balarjishvili, L.Kvachadze and M.Kutateladze. Whole genome sequence comparison of ten diagnostic brucellaphages propagated on two Brucella abortus hosts. Virology Journal, 2015.
14. **S. Gunia**; Z. Lomtadze Brucellosis bacteriophages. National Academy of Science of Abkhazia. Proceedings, vol. 3, page 62-74. 2014. Tbilisi.
15. **S.Gunia**, T.Burbutashvili, M.Dadunashvili, M.Kutateladze, E.Tevdoradze, I.Antadze. Application of Bacteriophages for Differentiation of Brucella spp. Bacteriophages as tools for therapy, prophylaxis and diagnostics. Abstr.Book. p.46. 2015, Tbilisi, Georgia.