ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის
სახელმწიფო უნივერსიტეტის ზუსტ და
საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი

ფიქრია ქათამაძე

ენტეროპათოგენური E.coli-ს მიმართ მოქმედების ფართო სპექტრის ბაქტერიოფაგის გამოყოფა და სურსათის დეკონტამინაციური ეფექტის შესწავლა სამოდელო ცდებში

სამაგისტრო პროგრამა: ბიოლოგია

ნაშრომი შესრულებულია მიკრობიოლოგიის მაგისტრის
აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

ხელმძღვანელები:
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი **ნინა ჭანიშვილი**
ასოცირებული პროფესორი **ნინო გაჩეჩილაძე**

თბილისი
2019

აბსტრაქტი

ენტეროპათოგენური Escherichia coli-ს მიერ გამოწვეულ დაავადებათა ხვედრითი წილი საგრძნობლად გაიზარდა. გარდა ამისა, მსოფლიოს მასშტაბით ანტიბიოტიკორეზისტენტული შტამების გაჩენა და გავრცელება კაცობრიობის უმნიშვნელოვანეს პრობლემად იქცა. აქედან გამომდინარე ახალი ალტერნატიული სამკურნალო საშუალებების ძიება გარდაუვალი, აქტუალური და აუცილებელია.

მიკროორგანიზმებით გამოწვეული ინფექციური პროცესების საწინააღმდეგო ყველაზე ოპტიმალურ და უვნებელ საშუალებად ბაქტერიოფაგები ანუ ბაქტერიის ვირუსები მოიაზრებიან. გარდა ამისა, ფაგოთერაპიას ანტიბიოტიკოთერაპიასთან შედარებით მრავალი უპირატესობა გააჩნია. აქედან ყველაზე მნიშვნელოვანია ეფექტურობა ანტიბიოტიკორეზისტენტული პათოგენების მიმართ, მკაცრი სპეციფიურობა სამიზნე ბაქტერიის მიმართ ისე, რომ ზიანი არ მიაყენოს ორგანიზმის ნორმალურ მიკროფლორას, და სხვა.

ბაქტერიოფაგებს თერაპიული დანიშნულების გარდა, ფართო მოხმარება აქვს, როგორც ბიოსანიტარულ საშუალებას. მაგალითად, იგი გამოიყენება ხორცის და ზღვის პროდუქტების, ნედლი ხილ-ბოსტნეულის და სხვა სურსათის დეკონტამინაციისთვის, ასევე სურსათთან შეხებაში მყოფი ზედაპირების, მოწყობილობის დეზინფიცირებისთვის.

2006 წ. 18 აგვისტოს FDA-ს მიერ პირველი ფაგური პრეპარატის (ListShield) დამტკიცების შემდეგ სულ უფრო და უფრო იზრდება ინტერესი სურსათის უვნებლობის უზრუნველსაყოფად ახალი ბაქტერიოფაგური პრეპარატების შესაქმნელად. შესაბამისად, აქტიურად მიმდინარეობს კვლევები ახალი ფაგების გამოყოფასა და სხვადასხვა დანიშნულებით გამოყენებასთან დაკავშირებით, როგორცაა თერაპიული, ბიომაკონტროლებელი, სანიტარიული მიმართულება.

ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენს ენტეროპათოგენური E.coli-ს მიმართ ფართო სპექტრის ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და დეკონტამინაციური ეფექტის შესწავლა სამოდელო ცდებში. ამ მიზნის მისაღწევად შესრულდა შემდეგი ამოცანები:1) საქართველოს ბაზარზე არსებული პროდუქტების (ყველი, მაწონი, ძეხვი, ფარში და სხვ.) დაბინძურების ხარისხის შეფასება; 2) ახალი E.coli-ის შტამების გამოყოფა, იდენტიფიკაცია და ანტიბიოტიკო მგრძნობელობის შეფასება; 3) გამოყოფილი შტამების მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და დახასიათება; 4) გამოყოფილი

ბაქტერიოფაგები გამოყენებულ იქნა ზედაპირების დაბინძურების ბიომაკონტროლებელ საშუალებად სამოდელო ცდებში.

ექსპერიმენტის შედეგად 25 სინჯიდან გამოიყო 20 ბაქტერიული იზოლატი. აქედან, ტრადიციული ბაქტერიოლოგიური (სელექტიურ ნიადაგებზე გათესვა) მეთოდებისა და მოლეკულური იდენტიფიკაციის საშუალებიების (პჯრ, გელ-ელექტროფორეზი) გამოყენებით მოხდა 10 შტამის იდენტიფიციკაცია და მათი Escherichia coli სახეობისადმი მიკუთნება.

ანტიბიოტიკებისადმი მდგრადობის თვასაზრისით დადგინდა, რომ E.coli-ის რომ E.coli-ის 10 შტამიდან 1 (10%) რეზისტენტული იყო სპექტინომიცინის მიმართ, 5 (50%) - ტეტრაციკლინის, 4 (40%) - ამოქსაცილინის, 2 (20%) - კანამიცინის, 6 (60%) - ამპიცილინის, 1 (10%) - ამიკაცინის, 1 (10%) - გენტამიცინის, 4 (40%) - ქლორამფენიკოლის, 4 (40%) - ოფლოქსაცინის, 4 (40%) - ერითრომიცინის, 3 (30%) - ციპროფლოქსაცინის მიმართ.

ამგვარად, E.coli-ის 10 შტამიდან ყველა მრავლობითად რეზისტენტული აღმოჩნდა წამლებისადმი და მხოლოდ ნაწილობრივ მგრძნობიარე იყო ერთი ან/და ერთზე მეტი ანტიბიოტიკის მიმართ.

კვლევის მიმდინარეობისას გამოვყავით სამი E.coli-ის სპეციფიკური ბაქტერიოფაგი, აქედან 2 მორფოლოგიურად მიეკუთვნა Myoviridae ოჯახს, ხოლო ერთი კი - Podoviridae-ს. ფაგების ბაქტერიების მიმართ აქტივობის სპექტრი შტრიხების მეთოდის გამოყენებით შეფასდა. მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე, შერჩეული ფაგები გამოვიყენეთ სამოდელო ცდაში, როგორც ზედაპირების სისუფთავის ბიომაკონტროლებელი საშუალება.

ამრიგად, შეგვიძლია დავასკვანთ, რომ კვლევის ფარგლებში გამოყოფილი E.coli შტამები ხასიათდება მრავლობითი რეზისტენტულობით ანტიბიოტიკების მიმართ. ამავე დროს ჩვენს მიერ გამოყოფილმა ფაგებმა ანტიბიოტიკორეზისტენტული შტამების მიმართ მაღალი აქტივობა აჩვენა. შესაბამისად, მათი საფუძველზე შესაძლებელია კომერციული პრეპარატის პროტოტიპის შესაქმნა, რომელიც განკუთვნილი იქნება კვებითი პროდუქტების დაბინძურებასთან ასოცირებული E.coli-ს ელიმინაციისათვის, კერძოდ საკვები პროდუქტის, შესაფუთი მასალის და/ან ზედაპირების ბიოკონტროლისთვის.

მოცემული ნაშრომი შესრულდა გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიის და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის კვლევისა და განვითარების დეპარტამენტში.

Abstract

The incidence of diseases caused by enteropathogenic Escherichia coli has significantly increased. In addition, the emergence and worldwide spread of antibiotic-resistant strains has become the most important problem for mankind. Therefore, the search for new alternative drugs is inevitable, timely and unavoidable.

Bacteriophages - bacterial viruses are the most optimal and harmless means against infectious processes caused by microorganisms. Besides, phage therapy has many advantages compared to antibiotics. For example, the effectiveness against antibiotric resistant pathogens, strict specificity to target bacteria, so that they do not to damage the normal microflora, etc.

Along with the therapeutic use of bacteriophages, they are widely used as for bio-sanitary purposes. For example, they are used for the decontamination of meat and seafood, raw fruit-vegetable and other foods, as well as for disinfection of the surfaces, which are in contact with contaminated food.

After the FDA approval the first phage-based product (ListShield) on August 18, 2006, the interest towards development of new bacteriophages preparations which insure food safety has gradually increased. Consequently, the research has been actively ongoing which is aiming isolation of the new phages and their uses for different purposes, such as therapeutic, biocontrolling and decontaminating means.

The aim of our study was isolation of the broad spectrum phages against enteropathogenic E.coli and evaluation of their decontaminating effect in the model experiments. For this purpose the following tasks have been accomplished: 1) Contamination level of the products (cheese, matsoni, sausages, minced meat, etc.) existing on the Georgian market has been assessed; 2) The new E.coli- strains have been isolated, identified and their antibiotic resistance profiles was determined; 3) The new bacteriophages specific to these strains have been isolated and characterized; 4) The newly isolated bacteriophages have been used in the model surface biocontrol studies.

As a result these experiments out of 25 samples we have isolated 20 bacterial isolates among which due to traditional bacteriology (growth on selective media) and molecular identification methods (PCR, gel electrophoresis) 10 strains have been identified as E.coli.

According to antibiotic susceptibility tests, it was determined that out of 10 strains 1 (10%) appeared to be resistant to spectinomycin, 5 (50%) – to tetracycline, 4 (40%) – amoxicillin, 2 (20%) – kanamycin, 6 (60%) - ampicillin, 1 (10%) - amikacin, 1 (10%) – gentamicin, 4 (40%) - chloramphenicol, 4 (40%) – ofloxacin, 4 (40%) – erythromycin, 3 (30%) – ciprofloxacin.

Thus, it was revealed that all 10 E.coli strains showed multiple drug resistance and were only partly susceptible in one or more antibiotics.

In course of research we have isolated three E,.coli specific phages, two oyt of them appeared to belong to Myoviridae morphological family, and one to - Podoviridae-ն. Phage host range activity was evaluated using streak method. Based on the obtained results the selected phages have been used in the model experiments to evaluate their bio-controlling effectiveness against contaminated surface and packaging materials.

Thus, we can conclude that the E.coli strains isolated in the scope of this research are characterized with multiple drug-resistance. At the same time the newly isolated phages demonstrated broad activity against these antibiotic resistant strains. Consequently, it is possible to develop a commercial product prototype, which would be directed to elimination of E.coli associated contamination and biocontrol of the food products, packaging materials and/or surfaces.

The presented study was performed at the R & D Department of the George Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology.

სარჩევი

აბსტრაქტი..... Error! Bookmark not defined.

Abstract..... Error! Bookmark not defined.

შესავალი ..... Error! Bookmark not defined.

ლიტერატურის მიმოხილვა ..... Error! Bookmark not defined.

Escherichia coli-ის ზოგადი დახასიათება..... Error! Bookmark not defined.

E.coli-ის ეპიდემიოლოგია და დაავადების პრევენცია..... Error! Bookmark not defined.

E.coli-ის ანტიბიოტიკორეზისტენტობა..... Error! Bookmark not defined.

ბაქტერიოფაგი..... Error! Bookmark not defined.

ბაქტერიოფაგების ზოგადი დახასიათება ..... Error! Bookmark not defined.

ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია ..... Error! Bookmark not defined.

ბაქტერიოფაგის ლითიური ციკლი..... Error! Bookmark not defined.

ბაქტერიოფაგების გამოყენება..... Error! Bookmark not defined.

საკვლევი მასალები და მეთოდები ..... Error! Bookmark not defined.

ნიმუშის აღება..... Error! Bookmark not defined.

E.coli-ის სელექტიურ არეებზე გამოვლენა ..... Error! Bookmark not defined.

გრამის წესით შეღებვა..... Error! Bookmark not defined.

კვლევის მოლეკულური მეთოდები ..... Error! Bookmark not defined.

დნმ-ის ექსტრაქცია (დაწვრილებითი პროტოკოლი)..... Error! Bookmark not defined.

პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის (პჯრ) მეთოდი..... Error! Bookmark not defined.

გელ-ელექტროფორეზი..... Error! Bookmark not defined.

ანტიბიოტიკო-რეზისტენტობის სპექტრის დადგენა..... Error! Bookmark not defined.

ბაქტერიოფაგების შესასწავლად გამოყენებული მეთოდები..... Error! Bookmark not defined.

E.coli-ს სპეციფიური ფაგების გამოყოფა გამდიდრების მეთოდით და გამოვლენა შტრიხების (სკრინინგი) მეთოდით Error! Bookmark not defined.

ფაგების ბუნებრივი ნარევების გასუფთავება და კლონირება ..... Error! Bookmark not defined.

ბაქტერიოფაგების ტიტრის დადგენა ორშრიანი აგარის ანუ გრაციას მეთოდითError! Bookmark not defi

ბაქტერიოფაგების გამრავლება კონცენტრირების მეთოდით..... Error! Bookmark not defined.

ბაქტერიოფაგების შესწავლა ელექტრონული მიკროსკოპით..... Error! Bookmark not defined.

ბაქტერიოფაგის ლიზისური აქტივობის და სპექტრის განსაზღვრაError! Bookmark not defined.

ზედაპირების დეკონტამინაცია..... Error! Bookmark not defined.

საკუთარი კვლევის შედეგები და განხილვა..... Error! Bookmark not defined.

E.coli-ის გამოყოფა და შესწავლა..... Error! Bookmark not defined.

საკვებიდან გამოყოფილი ბაქტერიების მოლეკულური იდენტიფიკაციის შედეგებიError! Bookmark not de
გამოყოფილი E.coli-ის ანტიბიოტიკებისადმი რეზისტენტობის შესწავლაError! Bookmark not defined.
E.coli-ის სპეციფიური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და დახასიათებაError! Bookmark not defined.
ბაქტერიოფაგების აქტივობის სპექტრის შესწავლა ..... Error! Bookmark not defined.
E.coli-ით დაბინძურებული ზედეპირის დეკონტამინაცია სპეციფიკური ფაგის მეშვეობით..... Error! Bookmark not defined.
დასკვნები..... 58
გამოყენებული ლიტერატურა ..... Error! Bookmark not defined.

შესავალი

თემის აქტუალობა. საკვები პროდუქტების უსაფრთხოება მნიშვნელოვან პრობლემას წარმოადგენს მთელ მსოფლიოში. საკვებისმიერი მოწამვლები გამოწვეული მიკროორგანიზმების მიერ ასევე სერიოზული პრობლემაა მოსახლეობისთვის. უკანასკნელ წლებში მსოფლიო მასშტაბით გახშირებულია კვებითი ჯაჭვით გავრცელებული E.coli-ით გამოწვეული ეპიდემიური აფეთქებები. თუმცა, რთულია საკვებისმიერი ბაქტერიული დაავადებების შემთხვევების ზუსტი განსაზღვრა. აშშ-ში, რომელსაც საკვები პროდუქტებით მომარაგების ერთ-ერთი ყველაზე უსაფრთხო სისტემა აქვს, ყოველწლიურად ფიქსირდება საკვებისმიერი დაავადებების 48 მილიონი შემთხვევა, აქედან 325 000 საჭიროებს ჰოსპიტალიზაციას, ხოლო 5000 მთავრდება ფატალური შედეგით. აღნიშნული შემთხვევების მხოლოდ 9.4 მლნ (20%) არის გამოწვეული დადგენილი პათოგენური აგენტის მიერ. დანარჩენ შემთხვევებში კი გამომწვევი აგენტი უცნობია [1].

E.coli-ის მიერ გამოწვეული კვებითი ინფექციები უმეტეს შემთხვევაში დამოკიდებიულია სასმელი წყლისა და საკვები პროდუქტების დაბინძურებასთან.

როგორც აღვნიშნე, ბოლო ათწლეულში გაიზარდა კვებითი ინტოქსიკაციები, რაც გამოწვეულია ახალი, ანტიბიოტიკორეზისტენტული შტამების გამოვლენით. სწორედ, ანტიბიოტიკებისადმი რეზისტენტული ფორმებით გამოწვეული დაავადებების სიმრავლემ აუცილებელი გახადა ალტერნატიული საშუალებების ძიება.

1917 წლიდან იწყება ბაქტერიოფაგის პრაქტიკული გამოყენების ერა. აღმოჩენისთანავე ბაქტერიოფაგი, როგორც ბაქტერიის ვირუსი, მიჩნეულ იქნა მიკრობთა მიერ გამოწვეული ინფექციური დაავადებების სამკურნალო საშუალებად, მაგრამ ანტიბიოტიკების აღმოჩენამ და მათი გამოყენებით მიღებულმა სწრაფმა ეფექტმა შეზღუდა ბაქტერიოფაგების გამოყენება ამ დანიშნულებით. ბაქტერიოფაგებს ანტიბიოტიკებთან შედარებით მრავალი უპირატესობა გააჩნიათ, რომელთაგან განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია ანტიბიოტიკორეზისტენტული ბაქტერიების ლიზისის უნარი. ბაქტერიოფაგებისათვის დამახასიათებელია მაღალი სპეციფიკურობა, რომელიც

განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია პათოგენური ბაქტერიული შტამებით ინფიცირების შემთხვევაში.

თერაპიული დანიშნულების გარდა დღესდღეობით პერსპექტიულ საკითხს წარმოადგენს ბაქტერიოფაგების გამოყენება კვების უსაფრთხოებაში საკვები პროდუქტების შეხების ზედაპირებისა და საწარმოების აღჭურვილობის დეკონტამინაციის მიზნით. საკვები პროდუქტების, საწარმოების და სხვა ზედაპირების ფაგებით დამუშავებით შემცირდება ინფექციური დაავადებების გამომწვევი მიკროორგანიზმების გავრცელება. ექსპერიმენტული მონაცემები აჩვენებს, რომ სპეციფიკური ფაგების ნაზავი 90%-ით ამცირებს გარეგან ინფექციურ დაბინძურებას დამუშავებიდან 15 წუთში, რაც სტაბილური რჩება მომდევნო 18 სთ-ის განმავლობაში [2]

კვლევის ძირითადი მიზანი და ამოცანები. სამაგისტრო ნაშრომის ძირითად მიზანს წარმოადგენდა საქართველოს ბაზარზე არსებული სხვადასხვა საკვები პროდუქტების (რძე, ყველი, მაწონი, ქათმის ხორცი, ღორის ხორცი, ძეხვეული) E.coli-ით დაბინძურების ხარისხის შესწავლა. გავრცელებული ბაქტერიული შტამების მოლეკულური იდენტიფიკაცია; ამ შტამების მიმართ აქტიური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა - დახასიათება და სურსათის დეკონტამინაციური ეფექტის შესწავლა სამოდელო ცდებში.

კვლევის მიზნის მისაღწევად დავისახეთ შემდეგი ამოცანები: საკვები პროდუქტებიდან E.coli-ის გამოყოფა და მათი მოლეკულურ-ბიოლოგიური დახასიათება. გამოყოფილი ბაქტერიული კულტურების ანტიბიოტიკორეზისტენტობის სპექტრის დადგენა. საკვებისმიერი E.coli-ის საწინააღმდეგო ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და შესწავლა. E.coli-ით დაბინძურებული ზედეპირის დეკონტამინაცია სპეციფიკური ფაგის მეშვეობით.

1. ლიტერატურული მიმოხილვა

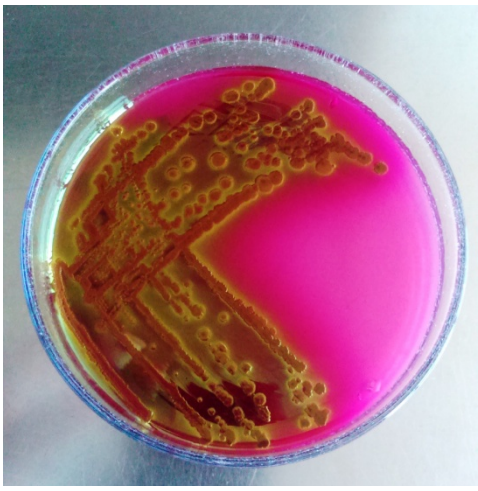
1.1 *Escherichia coli*-ის ზოგადი დახასიათება

Escherichia coli (E.coli) პირველად გამოყოფილ იქნა 1885 წელს ადამიანის მსხვილი ნაწლავიდან გერმანელი ბაქტერიოლოგის თეოდორ ეშერიხიას მიერ, რომელსაც მან *Bacterium coli* უწოდა, შემდგომ კი მისი აღმომჩენის პატივსაცემად სახელწოდება *Escherichia coli* -ით ჩაანაცვლეს [3]. E.coli მიეკუთვნება *Enterobacteriaceae*-ს ოჯახს, Escherichia-ს გვარს. იგი გრამ-უარყოფითი, 1,1-1,5X2,0-6,0 მკმ ზომის სწორ ჩხირებს წარმოადგენენ, რომლებიც ლაგდებიან ცალ-ცალკე ან წყვილებად (სურ 1).

სურ. 1. *E.coli*-ს მიკროსკოპული გამოსახულება სინათლის მიკროსკოპში (X1500)

შტამთა უმრავლესობას გააჩნია კაფსულა ან მიკროკაფსულა. სპორებს არ წარმოქმნიან. გვხვდება მოძრავი და უძრავი შტამები; მოძრავი ფორმებისათვსი დამახასიათებელია შოლტების არსებობა. აერობები ან ფაკულტატური ანაერობებია. ტემპერატურული ოპტიმუმია 37^0 C. *E.coli* -ის წარმომადგენლებს ყოფენ ლაქტოზის მაფერმენტირებელ და არამაფერმენტირებელ ბაქტერიებად. E.coli ოქსიდაზა-უარყოფითია; კატალაზა-დადებითი. ეშერიხიები გამოყოფენ ბაქტერიცინებს – კოლიცინებს [4].

E.coli მყარ ნიადაგებზე წარმოქმნის ამობურცულ, შემღვრეულ, სწორკიდეებიან ან ოდნავ ტალღისებრკიდეებიან S-კოლონიებს (S – smooth (ინგლ)-გლუვი) ან ბრტყელ, მშრალ, არასწორკიდეებიან R-კოლონიებს (R –rough (ინგლ) - უხეში). ზოგჯერ წარმოიქმნება ლორწოვანი M კოლონიები (M- mucous (ინგლ) -ლორწოვანი). თხიერ ნიადაგზე დიფუზიურად იზრდება. ჰისის ნიადაგებზე შეუძლია აირის წარმოქმნა. ENDO -ს ნიადაგზე ლაქტოზის მაფერმენტებელი ეშერიხიები წარმოქმნიან ჟოლოსფერ-წითელ კოლონიებს მეტალური ელფერით (ან მის გარეშე), ლაქტოზის არამაფერმენტებელი ეშერიხიები წარმოქმნიან ბაც-ვარდისფერ ან უფერულ მუქცენტრიან კოლონიებს; მაკ-კონკის ნიადაგზე – წითელ და უფერულ კოლონიებს [5] (სურ . 2).



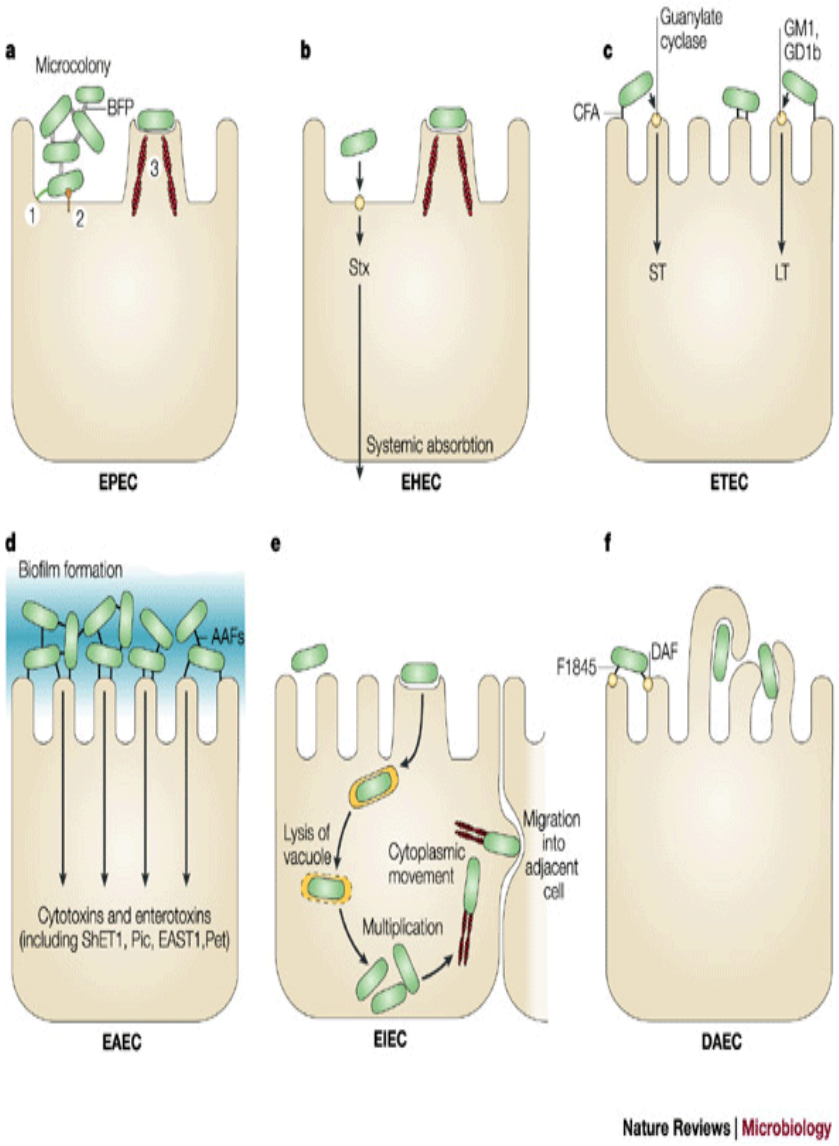
სურ. 2. *E.coli*-ს ზრდა ENDO-ს ნიადაგაზე.

გვარი *Escherichia* ენტერობაქტერიების ოჯახის ტიპიური წარმომადგენელია. განასხვავებენ პირობით-პათოგენურ და პათოგენურ ეშერიხიებს. პირობით-პათოგენური ეშერიხიები ადამიანისა და სხვა ძუძუმწოვრების, ფრინველების, რეპტილიების, თევზების ნაწლავების მიკროფლორას შეადგენენ. ნაწლავის ჩხირების არსებობა წყალში,ნიადაგში, პროდუქტებში, საყოფაცხოვრებო საგნებზე ფეკალური დაბინძურების მაჩვენებელს წარმოადგენს.

პათოგენური *E.coli* ექვს ძირითად ჯგუფად არის დაყოფილი (სურ. 3):

- ენტეროპათოგენური ნაწლავის ჩხირები (Enteropathogenic E.coli - EPEC)
- ენტეროჰემორაგიული ნაწლავის ჩხირები (Enterohemoragic E.coli - EHEC)

- ენტეროტოქსიგენური ნაწლავის ჩხირები (Enterotoxigenic E.coli - ETEC)
- ენტეროაგრეგაციული ნაწლავის ჩხირები (Enteroaggregative E.coli - EAEC)
- ენტეროინვაზიური ნაწლავის ჩხირები (Enteroinvasive E.coli - EIEC)
- დიფუზურად დაკავშირებული ნაწლავის ჩხირი (Difuusely adherent E,coli DAEC)



სურ.3. სხვადასხვა პათოგენური ტიპის ნაწლავის ჩხირის მოქმედება ნაწლავის ეპითელიუმზე.

1. EPEC ერთი წლის ასაკამდე ბავშვებში იწვევს დიარეას. დაავადება ძირითადად კონტაქტურ-საყოფაცხოვრებო გზით გადაეცემა. EPEC-ს წვრილი ნაწლავის ეპითელიუმის ზედაპირზე გამრავლება, მიკროხაოების დაშლა და ეპითელიუმის აპიკალური ზედაპირის დაზიანება შეუძლია.

2. EHEC-ს შეუძლია ადამიანში სისხლიანი ფაღარათის (ჰემორაგიული კოლიტის) გამოწვევა, შემდგომში კი ჰემორაგიული ურემიული სინდრომის. ეპიდემიური მნიშვნელობა O157:H7 და O157:HNM სეროვარის EHEC-ს აქვთ. ინფექციის წყაროს მსხვილი რქოსანი ცხოველები წარმოადგენენ. გადაცემის ძირითადი გზაა ალიმენტარული, ხორცით, რომელმაც არასაკმარისი თერმული დამუშავება განიცადა. ბაქტერია ბრმა, აღმავალ და განივ მსხვილ ნაწლავს აზიანებს. ჰემორაგიული კოლიტის განვითარება დაკავშირებულია EHEC-ს მიერ შიგას მსგავსი ტოქსინის გამოყოფასთან.

3. ETEC ბავშვებსა და მოზრდილებში ქოლერის მსგავსი დაავადების გამომწვევია. ენტეროტოქსიგენური ნაწლავის ჩხირების წვრილი ნაწლავის ლორწოვანის ზედაპირზე კოლონიზაცია უზრუნველყოფს დიდი რაოდენობით ენტეროტოქსინების გამომუშავებას, რაც თავის მხრივ ნაწლავებში წყალ-მარილოვან ცვლას არღვევს და წყლიანი დიარეის განვითარებას იწვევს. ETEC-ით დასნებოვნება წყლით და ალიმენტარული გზით ხდება.

4. EAEC ლორწოვან ეპითელიუმთან ასოცირებული ავტოგლუტინინინი, რომელსაც პათოგენი გამოყოფს, ხელს უწყობს ბაქტერიების აგრეგაციას უჯრედულ ზედაპირზე და იწვევს ლორწოვანი ბიოფილმის ფორმირებას. ბაქტერიები ნაწლავის კედელს ემაგრებიან პილის მეშვეობით და გამოყოფენ ETEC -ის მსგავს ციტოტოქსინს. სიმპტომები ვლიდება წყლულოვანი დიარეის, ღებინების, დეჰიდრატაციისა და ზოგჯერ მუცლის ტკივილის სახით.

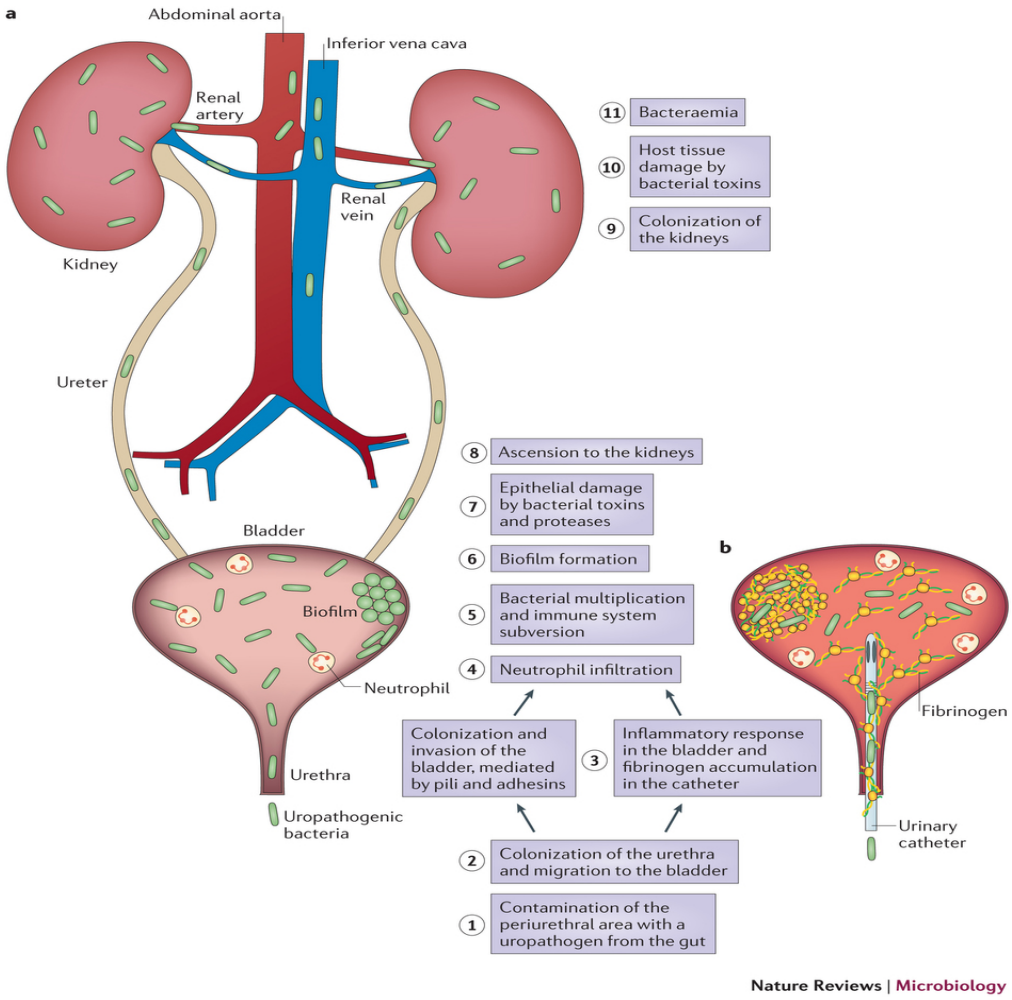
5. EIEC-ს მსხვილი ნაწლავების კედლებში ჩანერგვა, გამრავლება და დესტრუქციის გამოწვევა შეუძლიათ. ვითარდება დიზენტერიის მსგავსი დაავადება.დასნებოვნება წყლით და ალიმენტარული გზების ხარჯზე ხდება.

6. DAEC-ის შესახებ შედარებით ცოტა რამ არის ცნობილი. იგი იწვევს ხანგრძლივ მაპერსისტირებელ დიარეას. გადაცემა ხორციელდება დაბინძურებული წყლითა და საკვებით, თუმცა ინფექციური დოზა ძალიან მაღალია. ადამიანები ამ დაავადების ერთადერთ რეზერვუარს წამოადგენენ. სიმპტომები პერსისტირებული წლიანი დიარეის სახით ვლინდება [6].

ხშირ შემთხვევებში *E.coli* -ით გამოწვეული დაავადება თვითგანკურნებადია 5-10 დღეში, თუმცა, იმუნოდეფიციტისა და სხვა თანმხლები დაავადებების შემთხვევაში ინფექციას შეიძლება სერიოზული გართულებები ახლდეს, როგრორიცაა ურემიული სინდრომი და სხვა, რაც ტოქსინის მოქმედებას უკავშირდება. შესაბამისად, ანტიბიოტიკო-თერაპია ეფექტური არ არის და რიგ შემთხვევებში სიტუაცია შეიძლება გაართულოს კიდევაც.

გარდა წყლისა და სურსათისმიერი დაავადებებისა *E.coli* იწვევს საშარდე გზების (ურინარულ) ინფექციასაც (Urinary Tract Infection – UTI), რომელიც განსაკუთრებით ხშირია ქალებში. ინფექცია, ძირითადად, ქვედა საშარდე გზებში (შარდის ბუშტსა და შარდსაწვეთში ანუ ურეტრაში) ვითარდება, როდესაც ნაწლავში არსებული EPEC ტიპის *E.coli* ურეტრაში ხვდება. ამ შემთხვევაში მას UPEC-ს უწოდებენ. შემდგომში იგი აღმავალი გზით ვრცელდება და თირკმლის ინფიცირებას იწვევს (სურ.4). ასეთი ინფექციების მკურნალობა გართულებულია, რადგან *E.coli* შტამების უმრავლესობა მულტირეზისტენტულია ფართე სპექტრის ბეტა-ლაქტამაზური (Extended Spectrum of Bata Lactamase (ESBL) antibiotics) ანტიბიოტიკების მიმართ, რაც მათში CTX-M-15 გენის არსებობით არის განპირობებული. დენიელმა მეცნიერებმა აღმოაჩინეს, რომ ასეთი ინფექციის მკურნალობა ორი ანტიბიოტიკის მეტიცილინისა და ცეფოტაქსიმის კომბინაციით არის შესაძლებელი.

E.coli -ით გამოწვეული ურინარული ინფექციები (80-90%) საზოგადოებრივად და ნოზოკომიალურად (30-50%) შეძენილია ხოლმე. ურინარული ინფექციის გავრცელების ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი ფაქტორია ჰოსპიტალური გარემო, სამედიცინო მანიპულაციები და კეტეტერიზაცია [7].



სურ.4. ურინარული ტრაქტის ინფექციის გავრცელება აღმავალი გზებით

1.2 *E.coli*-ის ეპიდემიოლოგია და დაავადების პრევენცია

უკანასკნელ წლებში მსოფლიო მასშტაბით გახშირებულია კვებითი ჯაჭვით გავრცელებული *E.coli*-ით გამოწვეული ეპიდემიური აფეთქებები.რთულია საკვებისმიერი ბაქტერიული დაავადებების შემთხვევების ზუსტი განსაზღვრა. აშშ-ში, რომელსაც საკვები პროდუქტებით მომარაგების ერთ-ერთი ყველაზე უსაფრთხო სისტემა აქვს, ყოველწლიურად ფიქსირდება საკვებისმიერი დაავადებების 48 მილიონი შემთხვევა, აქედან 325 000 საჭიროებს ჰოსპიტალიზაციას, ხოლო 5000 ფატალური შედეგით მთავრდება. აღნიშნული შემთხვევების მხოლოდ 9.4 მლნ (20%) დადგენილი პათოგენური აგენტის მიერ არის გამოწვეული. დანარჩენ შემთხვევებში გამომწვევი აგენტი უცნობია [1].

უკანასკნელი ათწლეულის განმავლობაში საკვებისმიერი დაავადებების რამდენიმე სერიოზული აფეთქება მოხდა თითქმის ყველა კონტინენტზე. 2012 წელს აშშ-ში 831

საკვებისმიერი დაავადების აფეთქება დაფიქსირდა. 14 972 დაავადდა, აქედან 794-ს გაეწია ჰოსპიტალიზაცია, ხოლო 23 გარდაიცვალა. 2013 წელს დაფიქსირდა 818 საკვებისმიერი დაავადების აფეთქება, 13 360 დაავადდა, 1062 ჰოსპიტალიზაცია, 16 ფატალური შედეგი. 239 აფეთქება (54%) გამოწვეული იყო ბაქტერიული აგენტით, 160 (36%) - ვირუსული, 33.8% - ქიმიური, ხოლო 7.2% - პარაზიტული [8].

წყლისა და საკვებისმიერი დაავადებები წამყვან ადგილს იკავებენ დაავადებებსა და სიკვდილიანობაში ნაკლებად განვითარებულ ქვეყნებში, რის შედეგადაც დაახლოებით 2.1 მლნ ადამიანი იღუპება ყოველწლიურად, მათ შორის უმეტესად ბავშვები [9]. აღსანიშნავია, რომ საკვებისმიერი დაავადებების მზარდი ეპიდემიების და მოწამვლის რისკები ძალზე მაღალია განვითარებულ ქვეყნებშიც.ბოლო დროის ყველაზე ფართო მასშტაბიან შემთხვევებს შორის ცნობილია 2011 წლის მაისში ჩრდილოეთ გერმანიაში E.coli O104:H4 გამოწვეული ეპიდემია. კვლევის შედეგად გამოვლინდა ენტეროჰემორაგიული ნაწლავის ჩხირი (EHEC), რომელსაც აღმოაჩნდა შიგას მსგავსი ტოქსინის პროდუცირების უნარი. ინფექციის წყარო ბოსტნეული და მარცვლოვანი კულტურები წარმოადგენდა. შემთხვევის შედეგად სულ დაავადდა 3950 ადამიანი და 53 გარდაიცვალა [10]. მოგვიანებით, 2016 წლის მაისში, ინგლისში დაფიქსირდა *E.coli*-ს (O157) ეპიდემიური აფეთქება; ინფიცირების 165 შემთხვევით. სავარაუდო ინფექციის წყაროდ კი სალათის ფურცლები დასახელდა. აღნიშნული სეროვარით გამოწვეული ეპიდემია ევროპის სხვა ქვეყნებში არ დაფიქსირებულა [11]. აღსანიშნავია, რომ მსგავსი კვლევების და მონაცემების შეგროვება ხდება მხოლოდ ფართო მასშტაბიანი, დამძიმებული სურათის მქონე ეპიდემიების დროს, რეალურად კი კვებითი მოწამვლების და ინტოქსიკაციების რიცხვი, მათ შორის *E.coli*-ით გამოწვეული ბევრად დიდია.

რაც შეეხება საქართველოს, საქართველოს დაავადებათა კონტროლისა და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის ეროვნული ცენტრის (NCDC) მონაცემების მიხედვით, საქართველოში ინფექციური დიარეის მაჩვენებელი საკმაოდ მაღალია (100000 მოსახლეზე 170-226). 2009 წელს აღინიშნა ჰემორაგიული კოლიტებისა და HUS-ის გართულებულ შემთხვევათა განსაკუთრებული ზრდა, რომელსაც ეპიდემიოლოგიური აფეთქების სახე ჰქონდა. დაფიქსირდა 7 ლეტალური შემთხვევა. ამ ეპიდაფეთქების ორ შემთხვევაში გამოიყო E.coli O104:H4 შტამი - 2009EL-2050, 2009EL-2071 (დადასტურებულია ატლანტის რეფერალური ლაბორატორიის მიერ) [12].

საინტერესოა, რომ 2011 წელს მომხდარი O104:H4 -ს მიერ გამოწვეული აფერთქების პარალელურად, საქართველოში STEC ინფექციაზე საეჭვო STEC-ის ტოქსიგენობის სხვადასხვა მარკერზე. 157 გამოკვლეული პაციენტიდან 76 დადებითი აღმოჩნდა.

ბოლო სტატისტიკური მონაცემებით საქართველოში ძალზე მაღალია დაუდგენელი ეტიოლოგიის შემთხვევათა ხვედრითი წილი, რაც ძირითადად მოდის სავარაუდო საკვებისმიერ მოშხამვებზე; ამასთან ასეთ შემთხვევათა რაოდენობა წლიდან წლამდე მატულობს. 2012 წელს საქართველოში აღირიცხა სავარაუდო საკვებისმიერი მოშხამვის 6460 შემთხვევა. 2013 წელს – 10550 შემთხვევა, 2014 წელს – 21400 შემთხვევა, 2015 წელს – 32192 შემთხვევა, 2016 წელს – 34288 შემთხვევა, რაც 2015 წელთან შედარებით 7% -ით არის გაზრდილი [13].

საკვებისმიერი დაავადებების მიზეზი შეიძლება იყოს ბაქტერიული, ვირუსული ან პარაზიტული. დღეისათვის საზოგადოებრივი ჯანდაცვის ერთ-ერთ მნიშვნელოვან პრობლემად რჩება მიკრობიოლოგიური საფრთხეები, რომლებიც სურსათში სხვადასხვა გზით ხვდება. წარმოებაში მომსახურე პერსონალი, ნედლეული, წყალი, ნიადაგი, ჰაერი არასრული ჩამონათვალია სურსათის წარმოების ტექნოლოგიური საწარმოო ციკლის ცალკეული ეტაპისა, რომელზედაც კონტროლის გამოყენებით შესაძლებელია თავიდან იქნას აცილებული, აღმოფხვრილი და მისაღებ დონემდე შემცირებული სურსათისაგან გამოწვეული რისკები.

ხშირ შემთხვევებში საკვებისმიერი დაავადებების შემთხვევების ზუსტი აღრიცხვა ვერ ხდება, რის გამოც შეუძლებელია დაავადებების გავრცელების სიზუსტის დადგენა. ასევე ხშირ შემთხვევებში შეუძლებელია დაავადების გამომწვევის ზუსტი განსაზღვრა, რადგანაც განვითარებად ქვეყნებში არ არსებობს ან სუსტად არის განვითარებული პათოგენების ლაბორატორიული კვლევის სისტემები, ხოლო თვით განვითარებულ ქვეყნებშიც კი არ არის მაღალ დონეზე. ნაწლავური ინფექციების გამომწვევი აგენტების 50-60%-ის იდენტიფიცირება ვერ ხდება შესაბამისი დიაგნოსტიკური საშუალებების არ არსებობის გამო [14 , 15]

პათოგენური მიკროორგანიზმები სასურსათო ნედლეულსა და სასურსათო პროდუქტებში, ისევე როგორც ჰაერში, წყალსა და ნიადაგში, დაავადებული ადამიანებისა და ცხოველების, ასევე ბაქტერიამატარებელი ორგანიზმებიდან ხვდება. საკვებისმიერი დაავადებები შესაძლებელია გავრცელდეს არა მარტო საკვებით, არამედ წყლით, ჰაერით ან უშუალოდ კონტაქტით. დაავადების გამოწვევისათვის საკმარისია სურსათში

უმნიშვნელო რაოდენობით ცოცხალი მიკრობული უჯრედების არსებობა, რომლებიც ადამიანის ორგანიზმში მოხვედრისთანავე იწყებენ გამრავლებას და იწვევენ პათოლოგიურ პროცესებს. ისინი ძირითადად ნაწლავებში ლოკალიზდებიან, ამიტომაც ასეთი სახის დაავადებებს ნაწლავურ ინფექციებს უწოდებენ.

საკვებისმიერი დაავადებების რისკ-ფაქტორს წარმოადგენს ხორცი და ხორცპროდუქტები. ხორცის დაბინძურება შეიძლება მოხდეს როგორც ცხოველის სიცოცხლეში, ისე დაკვლის შემდეგაც, ხორცის დანაწევრებისას, ტრანსპორტირებისა და შენახვის დროს. განსაკუთრებით საყურადღებოა გატარებული ხორცი, რომლისთვის დამახასიათებელი კონსისტენცია ხელს უწყობს მიკროორგანიზმთა ინტენსიურად გამრავლებას.

საკვებისმიერი დაავადებების განვითარებაში მნიშვნელოვანი ადგილი უკავია რძის პროდუქტებს. რძე და რძის პროდუქტები მრავალი ადამიანის ყოველდღიური რაციონის შემადგენელი ნაწილია. რძე მაღალი საკვები ღირებულების პროდუქტია და იდეალური საკვები არეა პათოგენური მიკროორგანიზმებისათვის. ადამიანის ჯანმრთელობისათვის პოტენციურ საფრთხეს წარმოადგენს ცუდად პასტერიზებული ან ნედლი რძის პროდუქტები, რომლებიც კონტამინირებულია თერმოფილური მიკროორგანიზმებით, ანტიმიკრობულ საშუალებათა მიმართ მდგრადი მიკრობებით. ამგვარად, რძის პროდუქტების უსაფრთხოება მსოფლიოს მნიშვნელოვანი პრობლემაა [16].

აღსანიშნავია, რომ წყლისა და საკვებისმიერი დაავადების შემთხვევათა მატება იწყება თბილი პერიოდის დადგომისთანავე, რაც დამახასიათებელია დიარეით მიმდინარე დაავადებებისათვის. ზაფხულის სეზონზე მოდის შემთხვევათა 60% და პიკს აღწევს აგვისტოს თვეში.

პირველადი პრევენციის საფუძველს *Escherichia coli*-ით ინფიცირების თვალსაზრისით წარმოადგენს რისკ ფაქტორების თავიდან არიდება, რაც პირველ რიგში სანიტარული წესებისა და სურსათის შენახვისა და დამუშავების მკაცრ დაცვას გულისხმობს. ინფექციის პროფილაქტიკა მოითხოვს საკვების კონტროლს წარმოების ყველა ეტაპზე, სასოფლო-სამეურნეო სავარგულებიდან და ფერმიდან დაწყებული, გადასამუშავებელი კომერციული საწარმოებითა, კვების ობიექტებითა და საყოფაცხოვრებო სამზარეულოთი დამთავრებული.

ევროპის სურსათის უვნებლობის სააგენტო (EFSA) მოითხოვს სურსათის უვნებლობის წესების გამკაცრებას და სურსათის უვნებლობაზე ტესტირების ჩატარებას

წარმოების მთელ ეტაპზე, რათა უზრუნველყოფილი იქნას საკვების დამაბინძურებლების მინიმუმამდე დაყვანა და აღიკვეთოს ჯანმრთელობისათვის საშიში ნებისმიერი პოტენციური დამაბინძურებლის მოხვედრა მომხმარებლის საკვებში.

2. E.coli-ის ანტიბიოტიკორეზისტენტობა

კაცობრიობისთვის განსაკუთრებულ საფრთხეს წარმოადგენს ანტიბიოტიკორეზისტენტობის წარმოქმნისა და მიკრობების რეზისტენტული ფორმების განვითარების მზარდი ტენდენცია.

ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტობა მსოფლიო პრობლემაა, რადგანაც მისი ახალი ფორმები სცდება ქვეყანათაშორის საზღვრებს და ადვილად ვრცელდება კონტინენტთა შორის. ჯანმოს (ჯანდაცვის მსოფლიო ორგანიზაცია) ევროპის რეგიონის წევრ 29 ქვეყანაში სავარაუდოდ 25000 ადამიანი, ხოლო მსოფლიოში 700 000 ადამიანი იღუპება ყოველწლიურად ანტიბიოტიკორეზისტენტული შტამებით გამოწვეული ინფექციების შედეგად [8].

ანტიბიოტიკების არარაციონალური გამოყენება მსოფლიოში უდიდეს პრობლემად იქცა. ცხოველებსა და ადამიანებში გამოიყენება პრაქტიკულად ერთიდაიგივე ანტიბიოტიკები. საკვებში მათი ნარჩენი რაოდენობა ხდება ადამიანებში რეზისტენტული შტამების წარმოქმნის ძირითადი მიზეზი. ხშირია ასევე ანტიბიოტიკების გამოყოფა დედის რძესთან ერთად, რაც გენეტიკურ ფაქტორთან ერთად ბავშვებში იწვევს ანტიბიოტიკურ რეზისტენტობას.

კავშირი ანტიბიოტიკების გამოყენებასა და რეზისტენტობას შორის აღინიშნა განსაკუთრებით *Esherichia coli*-ის და შედარებით ნაკლებად *Salmonella*-სა და *Campilobacter*-ში.

ანტიმიკრობული პრეპარატებისადმი მიკროორგანიზმების რეზისტენტობის ფართო გავრცელებამ განაპირობა სხვადასხვა ინფექციურ დაავადებათა მკვეთრი ზრდა. ანტიმიკრობული პრეპარატების არასწორმა გამოყენებამ ადამიანების, ცხოველების მკურნალობისა და სოფლის მეურნეობის სხვადასხვა სფეროში, გამოიწვია მიკროორგანიზმების ანტიბიოტიკებისადმი გამძლეობის მატება და ამ პრეპარატების ეფექტიურობის შემცირება [17].

ანტიბიოტიკებისადმი ექსპოზიცია არის ანტიმიკრობული რეზისტენტობის შერჩევის ყველაზე მნიშვნელოვანი ფაქტორი. აღწერილია, რომ ფლუოროკინოლონების / ცეფალოსპორინების გაზრდილმა მოხმარებამ გააძლიერა ბაქტერიის მდგრადობა ფლუოროკინოლონის / ცეფალოსპორინების მიმართ [18, 19]

მიუხედავად იმისა, რომ სრულად არ არის ნათელი, თუ როგორ ვითარდება ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტობა მიკროორგანიზმებზე ანტიბიოტიკების ზემოქმედების შემდეგ, ბაკერომ [20] აღნიშნა, რომ ანტიბიოტიკების ძალიან დაბალი კონცენტრაციების ზემოქმედებამ შეიძლება მოახდინოს დაბალი დონის რეზისტენტული მუტანტების შერჩევა, რომლებიც „საფეხურებს“ წარმოადგენენ შემდგომში უფრო მაღალი ხარისხის ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული შტამების წარმოქმნისათის.

Esherichia coli-ის ანტიბიოტიკო-რეზისტენტული ფორმების გავრცელების ერთ-ერთი რისკ ფაქტორია კოლონიზაცია. კლინიკური ფაქტორების უმრავლესობა, რომელიც ESBL მიკროორგანიზმებით კოლონიზაციას და ინფექციას უკავშირდება - ასოცირებულია ჯანმრთელობაზე ისეთ ზემოქმედებას, როგორიცაა ჰოსპიტალიზაცია, მოვლის დაწესებულებებში გრძელვადიანი ყოფნა (მაგ. მოხუცებულთა თავშესაფარში), ჰემოდიალიზის და ინტრავასკულარული კათეტერის გამოყენება [21, 22].

რეზისტენტული ბაქტერიების თანმიმდევრული შემოჭრის კიდევ ერთი მნიშვნელოვანი გზაა ეკოსისტემებში ანტიბიოტიკების განაწილება. ჰარისონმა და სხვებმა. აჩვენეს, რომ ადამიანის მიერ ანტიბიოტიკებით გაჯერებული ცხოველური და მცენარეული საკვები პროდუქტების მიღება აძლიერებს ანტიბიოტო-რეზისტენტული გენების გავრცელებას [23]. ავტორებმა დაასკვნეს, რომ მეცხოველეობაში ან სხვა სასოფლო-სამეურნეო საქმიანობაში ანტიბიოტიკების გამოყენებამ სულ მალე შეიძლება ეს პრეპარატები არაეფექტური გახადოს ადამიანის თერაპიული გამოყენებისათვის.

ამდენად, ცხადი ხდება რომ ანტიბიოტიკო-რეზისტენტობის გავცელების შესაჩერებლად საჭიროა ანტიბიოტიკების მოხმარების შეზღუდვა და მათი ეფექტური ანტიბაქტერიული საშუალებით ჩანაცვლება. ასეთ ალტერნატივად სწორედ ბაქტერიოფაგები გვევლინება.

3. ბაქტერიოფაგი

3.1 ბაქტერიოფაგების ზოგადი დახასიათება

მიკრობთა ანტიბიოტიკორეზისტენტობის ზრდამ, რეზისტენტული მიკრობებით გამოწვეული ინფექციების სიმრავლემ და თანამედროვე მეთოდებით მათთან ბრძოლის სირთულემ მსოფლიო მედიკოსთა ინტერესი განაახლა ბიოლოგიური სამკურნალო-პროფილაქტიკური საშუალების, ბაქტერიოფაგის პრეპარატის მიმართ.

ბაქტერიოფაგი (ბერძ. bacterio ჩხირი, phagos-მშთანთქმელი) ბაქტერიული ვირუსია, რომელიც მრავლდება ბაქტერიების უჯრედებში და იწვევს მათ დაშლას – ლიზისს. ბაქტერიოფაგის ფენომენის ძირითადი კანონზომიერებები 1915 წ. აღწერა ინგლისელმა ფრედერიკ ტუორტმა. მაგრამ ბაქტრიოფაგიის ფენომენი აღწერა, შეისწავლა და მეცნიერულად ახსნა ფრანგმა მეცნიერმა ფელიქს დერელმა (1873-1949 წ.). ფ. დერელმა 1917 წ. გამოაქვეყნა შრომები განსაკუთრებული აგენტის აღმოჩენის შესახებ, რომლიც იწვევდა ბაქტერიათა დაშლას.ბაქტერიოფაგის მოძღვრების ფუძემდებელად სწორედ ფელიქს დერელი ითვლება.

ბაქტერიოფაგების კვლევაში დიდი წვლილი შეიტანა ქართველმა მეცნიერმა გიორგი ელიავამ, რომელმაც 1915 წელს შენიშნა *Vibrio cholerae*-ს თვითლიზისის მოვლენა და შეისწავლა ბაქტერიოფაგის ფენომენი.

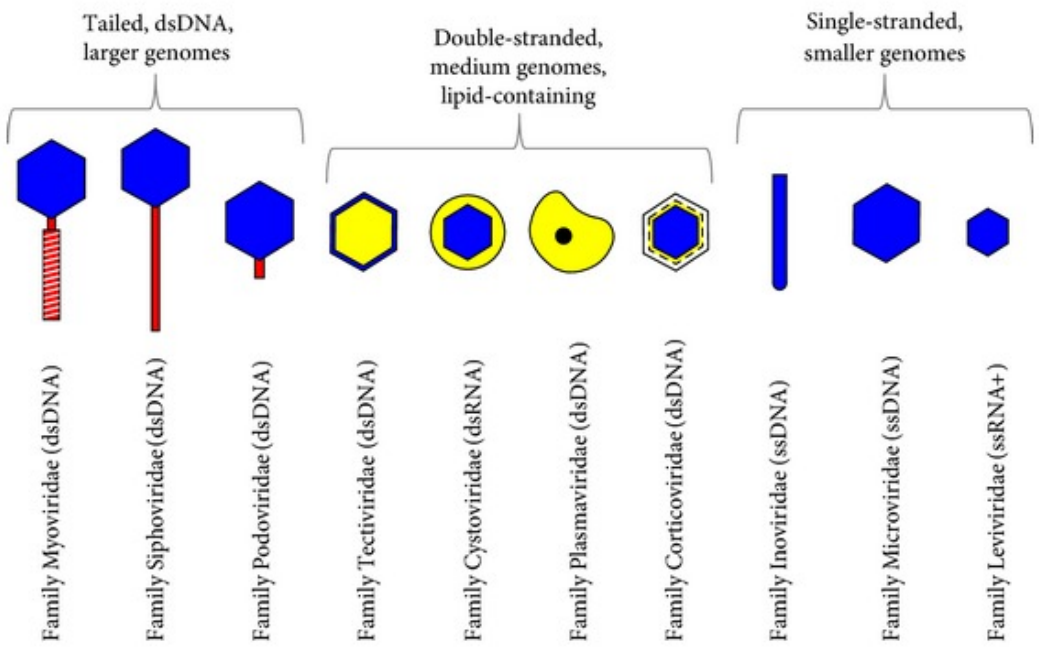
ბაქტერიოფაგები, სხვა ვირუსების მსგავსად ობლიგატური პარაზიტები არიან. ისინი ყველგან არის გავრცელებული ბუნებაში ჰაერში, ნიადაგში, წყლში, განსაკუთრებით საკანალიზაციო წყლებში, სხეულის ზედაპირებზე, კუჭ-ნაწლავში და სხვ. სუფთა წყლის 1 მლ შეიცავს $2X10^8$ ფაგურ ნაწილაკს. ისინი წარმოადგენენ რაოდენობრივად ყველაზე უხვ ბიოლოგიურ ობიექტებს დედამიწაზე, მათი რაოდენობა დაახლოებით 10^{30} - 10^3 ფაგური ნაწილაკია. სწორედ ამის გამო ისინი დამსახურებულად იწოდებიან, როგორც მიკრობული ბალანსის მთავარი მარეგულირებლები ეკოსისტემებში [24].

მორფოლოგიურად ფაგები შესაძლოა იყოს კუდის მქონე, კუბური, ფილამენტური ან პლეომორფული. ბაქტერიოფაგების უმეტესობა შედგება თავისგან - კაფსიდისგან და კუდისგან. მათ შეიძლება გააჩნდეთ, აგრეთვე, დამატებითი სტრუქტურებიც, როგორებიცაა საყელო, ბაზალური ფირფიტა, ფიბრილები. დღესდღეობით ყველაზე უკეთ არის შესწავლილი T4 ბაქტერიოფაგი [25].

ბაქტერიოფაგები, მათი სასიცოცხლო ციკლიდან გამომდინარე, იყოფა ორ ძირითად კლასად: ლითიური და ზომიერ ფაგებად. ვირულენტურ (ლითიურ) ფაგებს გამრავლება მხოლოდ ლითიური ციკლის მეშვეობით შეუძლია, რაც იწვევს მასპინძელი ბაქტერიული უჯრედის ლიზისს და ახალი ფაგური ნაწილაკების გამოთავისუფლებას. მეორის მხრივ, ზომიერი ფაგების ინფექცია შესაძლებელია განხორციელდეს ორგვარი გზით: ლიზოგენური ან ლითიური გზით გზით. პირველ შემთხვევაში ფაგის გენომი ჩართულია მასპინძელი უჯრედის გენომში და მასთან ერთად თანაარსებობს როგორც პროფაგი. შესაძლებელია აგრეთვე, რომ იგი ქრომოსომაში არ იყოს ინტეგრირებული და არსებობდეს მისგან იზოლირებულად, პლაზმიდის მსგავსად და ხანგრძლივი დროის განმავლობაში პასიურ მდგომარეობაში იარსებოს. პროფაგები რეპლიცირდება და გადაეცემა შვილეულ უჯრედებს გაყოფის შედეგად. მასპინძელი უჯრედებს, რომლებიც პროფაგების თაფშესაფარს წარმოადგენს, შესწევთ უნარი გამოიყვანონ პროფაგები პასიური მდგომარეობიდან და გადართონ ლითიურ ციკლზე, რომელიც ისევე ხორციელდება, როგორც ზემოთ იყო აღწერილი ანუ ბაქტერიული უჯრედის ლიზისით სრულდება [25, 26].

3.2. ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია

ფაგები თავიანთი სტრუქტურული, ფიზიკო-ქიმიური და ბიოლოგიური მახასიათებლების მიხედვით, ჰეტეროგენულები არიან. მათი უმეტესობა ორჯაჭვიან დნმ-ს შეიცავს, თუმცა გვხვდება ისეთებიც, რომელთაც ერთჯაჭვიანი დნმ ან ერთ და ორ ჯაჭვიანი რნმ გააჩნია. ყველა დნმ შემცველი ფაგი შეიცავს დნმ-ის მხოლოდ ერთ მოლეკულას. ზოგიერთ ფაგს გააჩნია ლიპიდების შემცველი კაპსულა ან შიდა ვეზიკულები. ელექტრონული მიკროსკოპიის მეშვეობით 5000 ბაქტერიოფაგზე მეტია შესწავლილი. ბაქტერიოფაგები კლასიფიცირდება ერთ კლასად, 13 ოჯახად და 31 გვარად (სურ.5) . ოჯახები უმთავრესად განისაზღვრება ნუკლეინის მჟავის ბუნებისა და ვირიონის მორფოლოგიის მიხედვით [25].

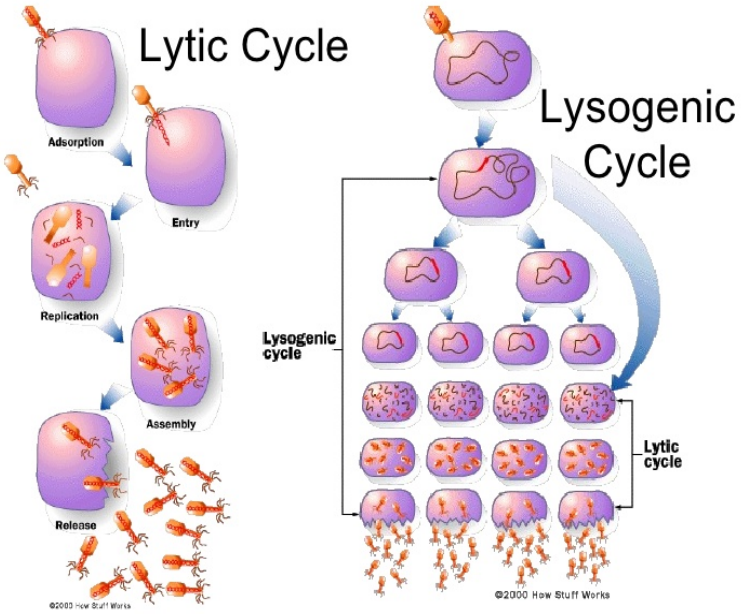


სურ.5. ბაქტეროფაგების კლასიფიკაცია მორფოლოიური ნიშნისა და ნუკლეინის მჟავების შემცველობის მიხედვით.

ბაქტერიული ვირუსების ძირითად და ყველაზე გავრცელებულ ნაწილს წარმოადგენს კუდის მქონე ბაქტერიოფაგები (Caudovirales - ლათინურად cauda, კუდი), რომელთაგან მინიმუმ 4950 არის შესწავლილი. ვირიონები შეიცავს ცილოვან გარსსა და ხაზოვანი ორჯაჭვიანი დნმ მოლეკულას. ფაგური ნაწილაკები არ არის კაფსულირებული და მათ გააჩნია ბინარული სიმეტრია, ვინაიდან მათი თავი კუბური და კუდი სპირალური სიმეტრიის მქონეა; მათი კაპსიდი იკოსაედრული. კაპსიდი აგებულია კაპსომერებისგან (5-6 ცილოვანი ერთეული). ფაგის კუდი სპირალურია ან შედგება ერთმანეთზე დაწყობილი დისკებისგან და როგორც წესი, ის შეიცავს ტერმინალურ ადსორბციის სტრუქტურებს, როგორებიცაა ბაზალური ფირფიტა, წვერები ან ფიბრილები [25].

კუდის მქონე ფაგები, შესაძლოა, იყოს ვირულენტური (ლითიური) ან ზომიერი. ვირულენტური ფაგები მრავლდებიან და ანადგურებენ მასპინძელ უჯრედებს, რაც შვილეული ბაქტერიოფაგების გამოთავისუფლებას უწყობს ხელს. ზომიერი ფაგები ლატენტურ ან პროფაგურ მდგომარეობაში გადასვლით აყალიბებენ მდგომარეობას, რასაც ლიზოგენია ეწოდება და თავიანთი მასპინძელი უჯრედის სინქრონულად მრავლდებიან.. მხოლოდ გარკვეულ შემთხვევებში არის შესაძლებელი, რომ მათ წარმოქმნან ინფექციური ფაგური შთამომავლობა. ზომიერ ფაგებს აქვთ უნარი დაინფიცირებულ ბაქტერიებს მიანიჭონ ახალი, დამატებითი თვისებები და ამ ფენომენს ეწოდება ლიზოგენური

კონვერსია. ლატენტური ფაგის გენომი ან პროფაგი რჩება მასპინძელი უჯრედის გენომში ინტეგრირებული ან პლაზმიდის სახით [25].

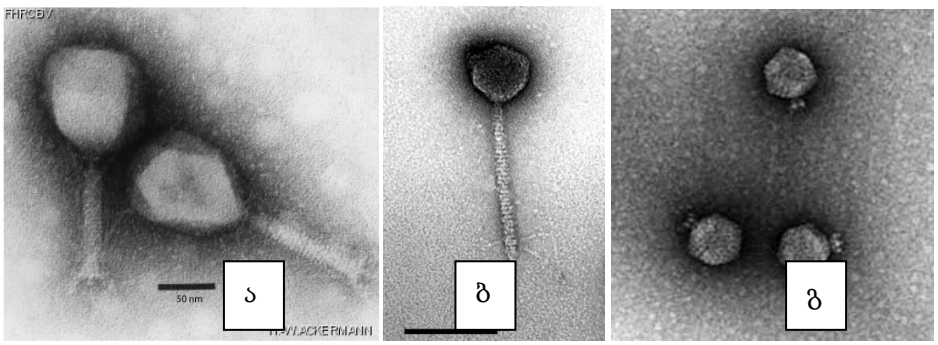


სურ.6. ფაგების ლითიური და ლიზოგენური ციკლების სქემა.

მრავალფეროვანია კუდიანი ფაგების თვისებები, მაგალითად, მათი ზომები, სტრუქტურა, დნმ მოლეკულის შემადგენლობა, ძირითადი ცილების ბუნება, სეროლოგია, ლიზისური სპექტრი და ფიზიოლოგია. მაშასადამე, კუდის მქონე ფაგები წარმოადგენენ ვირუსების ყველაზე მრავალფეროვან, ფართოდ გავრცელებულ და მრავალრიცხოვან ჯგუფს. კუდის სტრუქტურის მიხედვით, რომელიც ელექტრონული მიკროსკოპიისას ადვილად დეტექციის მნიშვნელოვან კრიტერიუმს წარმოადგენს და აგრეთვე, აწყობის მექანიზმის მიხედვით კუდის მქონე ფაგები იყოფა 3 ოჯახად (სურ.7):

- Myoviridae -კუმშვადი კუდის მქონე, რომელიც შეიცავს გარსსა და ცენტრალურ მილს

  კუდიანი ფაგების 25%).
- Syphoviridae - გრძელი, არაკუმშვადი კუდის მქონე (61%).
- Podoviridae - მოკლე, არაკუმშვადი კუდის მქონე (14%).



სურ. 7. ფაგების მორფოლოგიური გვარები: ა) Myoviridae; ბ) Syphoviridae, და გ) Podoviridae.

აღნიშნული სამი ოჯახის ფიზიკო-ქიმიური მახასიათებლები მნიშვნელოვნად ემთხვევა ერთმანეთს, რის გამოც, მათი დიფერენცირება ამ კუთხით ვერ ხერხდება [25].

3.3 ბაქტერიოფაგის ლითიური ციკლი

ლითიური ციკლის პირველ ეტაპს წარმოადგენს ბაქტერიოფაგსა და ბაქტერიის უჯრედის ზედაპირზე არსებულ სპეციფიკურ რეცეპტორს შორის ურთიერთკავშირი. დასაკავშირებელი სტრუქტურების არსებობა ან არარსებობა წარმოადგენს ფაგის ლიზისური სპექტრის დეტერმინანტს. გრამ-უარყოფითი ბაქტერიების ფაგები შესაძლოა ურთიერთქმედებდნენ ლიპოპოლისაქარიდულ კომპონენტებთან (LPS, ენდოტოქსინთან), გარეთა მემბრანის ცილებთან (OMP) ან შესაძლებელია გააჩნდეთ ადჰეზინების კომპლექსი, რომელსაც მრავალ რეცეპტორის ამოცნობის უნარი აქვს. გრამ-დადებითი ბაქტერიების ფაგები ამოიცნობენ ერთ ან რამდენიმე მოლეკულას, მაგალითად, თეიხოის მჟავას, რომელიც პეპტიდოგლიკანის შრეშია განლაგებული [25].

ყოველ ბატერიოფაგს გააჩნია მასპინძელ უჯრედში საკუთარი გენომის გადაცემის უნიკალური მექანიზმი, თუმცა, ზოგად სქემაში ჩართულია ფაგის კუდის წვერი, რომელსაც გააჩნია შესაბამისი ფერმენტი პეპტიდოგლიკანურ შრეში შეღწევისთვის, რათა ჩაუშვას დნმ მოლეკულა ბაქტერიულ უჯრედში. ზოგიერთი ფაგის შემთხვევაში, დნმ-ის ჩაშვება უჯრედში დამოკიდებულია მასპინძელი უჯრედის ბიოქიმიაზე.

ბაქტერიოფაგებს შეუძლია ეგზონუკლეაზებისა და რესტრიქციული ფერმენტების მიმართ მგრძნობელობის დაძლევა საკუთარი წრიული ფორმის გენომით, ბაქტერიული

ნუკლეაზების ინჰიბირებით ან დნმ მოლეკულაში მოდიფიცირებული ნუკლეოტიდების ჩართვით. ფაგური პრომოტორების ამოცნობა ბაქტერიული რნმ პოლიმერაზას საშუალებით იწვევს ადრეული გენების ტრანსკრიპციას, რომელთა პროდუქტებიც მონაწილეობას ღებულობს ფაგური გენომის დაცვაში და მასპინძელი უჯრედის გარემოს შეცვლას ბაქტერიოფაგის საჭიროების მიხედვით.

მორფოგენეზი მოიცავს ფაგური გენომის შეფუთვას და ახალი ფაგების აწყობას. მასპინძელი ბაქტერიული უჯრედის ლიზისის ქრონომეტრაჟი გაკონტროლებულია უმეტესობა კუდიანი ბაქტერიოფაგების ლიზინ-ჰოლინის ორკომპონენტიანი სისტემის საშუალებით. ლიზინი არის ფერმენტი, რომელიც პეპტიდოგლიკანის ძირითად კავშირებს შლის, ხოლო ჰოლინი არის ცილა, რომელიც შიგნითა მემბრანაში წარმოქმნის ფორებს, იმისათვის რომ პეპტიდოგლიკანის შრე დროულად იყოს ლიზინისთვის ხელმისაწვდომი. ლითიური ციკლის საბოლოო საფეხურს წარმოადგენს მასპინძელი უჯრედის ლიზისი და შთამომავალი ბაქტერიოფაგების გამოთავისუფლება [25].

3.4 ბაქტერიოფაგების გამოყენება

უკანასკნელ წლებში მკვეთრად გაიზარდა ბაქტერიების რეზისტენტობა ანტიმიკრობულ საშუალებათა მიმართ, რომელსაც მზარდი ხასიათი აქვს. ალტერნატიული ანტიმიკრობული საშუალებების შექმნა წარმოადგენს პრიორიტეტს თანამედროვე მედიცინასა და ბიოტექნოლოგიაში. ასეთ ალტერნატიულ საშუალებას წარმოადგენს პოლივალენტური სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების პრეპარატები, რომელთა გამოყენება იძლევა მაღალ სამკურნალო ეფექტს. მნიშვნელოვანია, რომ ისინი აბსოლუტურად უვნებელნი არიან ცოცხალი მაკროორგანიზმებისათვის, ადამიანის, ცხოველისა და მცენარეული უჯრედებისათვის.

ბაქტერიოფაგის პრეპარატები დიდიხანია გამოიყენება როგორც სამკურნალო საშუალება ანთებითი პროცესებისა და ნაწლავური ინფექციების საწინააღმდეგოდ. პირველად ბაქტერიოფაგებს იყენებდნენ ეტიოლოგიურად განსხვავებული ინფექციური დაავადებების სამკურნალოდ. ისინი გამოყოფილი იყო თითქმის ყველა არსებული ბაქტერიული სახეობის მიმართ. ბაქტერიოფაგების გამოყენება გარკვეულწილად

შეიზღუდა სულფანილამიდური პრეპარატების და ანტიბიოტიკების გამოჩენისთანავე. თუმცა, ფაგების გამოყენება სამკურნალო მიზნით მიმდინარეობდა აღმოსავლეთ ევროპაში და ყოფილ საბჭოთა კავშირის ქვეყნებში. მათ შორის იყო გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტში საქართველოში [27, 28].

ბაქტერიების ანტიმიკრობულ საშუალებათა მიმართ მკვეთრად გაზრდილი რეზისტენტობის ფონზე, მნიშვნელოვანია ბაქტერიოფაგების გამოყენება კვების უსაფრთხოებაში საკვები პროდუქტების შეხების ზედაპირებისა და საწარმოების აღჭურვილობის დეკონტამინაციის მიზნით. საკვები პროდუქტების, საწარმოების და სხვა ზედაპირების ფაგებით დამუშავებით შემცირდება ინფექციური დაავადებების გამომწვევი მიკროორგანიზმების გავრცელება. საკვები პროდუქტების დეკონტამინაციის ფიზიკური და ქიმიური მეთოდებისაგან განსხვავებით, როგორიც არის პასტერიზაცია, ორთქლის ვაკუუმით, მაღალი წნევით, ქიმიური ნაერთებით დამუშავება, რომლებსაც დადებით ეფექტთან ერთად ახასიათებთ არასასურველი შედეგები, ბაქტერიოფაგები წარმოადგენენ ბუნებრივ, არატოქსიკურ ალტერნატიულ საშუალებას საკვებისმიერი დაავადებების გამომწვევი პათოგენური მიკროორგანიზმების ელიმინაციისათვის [29, 30].

ექსპერიმენტული მონაცემები აჩვენებს, რომ სპეციფიკური ფაგების ნაზავი 90%-ით ამცირებს გარეგან ინფექციურ დაბინძურებას დამუშავებიდან 15 წუთში, რაც სტაბილური რჩება მომდევნო 18 სთ-ის განმავლობაში [2]

ფაგები მიეკუთვნებიან მაღალეფექტურ და უვნებელ პრეპარატებს, რომელთა პრაქტიკული გამოყენების მნიშვნელობა იზრდება როგორც მედიცინაში, ასევე ვეტერინარიაში. ვირულენტური ბაქტერიოფაგური პრეპარატების ანტიბაქტერიული ეფექტი გამოწვეულია ფაგის შეღწევადობით ბაქტერიულ უჯრედში, შემდგომი გამრავლებით და საბოლოოდ ინფიცირებული უჯრედის ლიზისით. ლიზისის პროცესის შედეგად გარემო არეში გამოყოფილი ფაგი, თავის მხრივ, აინფიცირებს სხვა ბაქტერიულ უჯრედს და იწვევს მის ლიზისს, რასაც მივყავართ ანთების გამომწვევი პათოგენური მიკროორგანიზმების სრულ განადგურებამდე. ცნობილია, რომ ფაგები ხასიათდებიან უვნებლობით, სტაბილურობით და მოქმედების სპეციფიკურობით. ანტიბიოტიკების მოხმარებით გამოწვეული მთელი რიგი გართულებების გათვალისწინებით, ფაგური პრეპარატების მიმართ ინტერესი მკვეთრად გაიზარდა ბიოფილმების წარმოქმნის კონტროლისათვის შესაძლო გამოყენების გამო. ფაგების უპირატესობას წარმოადგენს

მათი მოქმედების მაღალი სპეციფიკურობა, მოქმედებს მხოლოდ ინფექციის გამომწვევზე და არა ადამიანისა და ცხოველის ნორმალურ მიკროფლორაზე, მრავლობით რეზისტენტული შტამების ლიზისის უნარი და, რაც მთავარია, აბსოლუტურად უვნებლობა ადამიანების, ცხოველების და გარემოს მიმართ [31, 32].

ბაქტერიოფაგები ფართოდ გამოიყენება როგორც კვების უსაფრთხოებაში, ასევე ბაქტერიული დაავადებების წინააღმდეგ ბრძოლაში. სხვადასხვა კვლევებმა აჩვენა, რომ ფაგების გამოყენებას კვების უსაფრთხოებაში დამაიმედებელი შედეგები აქვს. ფაგების გამოყენება საშუალებას გვაძლევს თავიდან ავიცილოთ პათოგენური მიკროორგანიზმებით საკვები პროდუქტების კონტამინცია. საკვები პროდუქტების, წარმოებების, საავადმყოფოების და სხვა ზედაპირების ფაგებით დამუშავებით შემცირდება ინფექციური დაავადებების გამომწვევი მიკროორგანიზმების გავრცელება, რაც ასევე შეამცირებს ადამიანების დაავადებების რისკს.

სწორედ ამ მახასიათებლების გამო ბაქტერიოფაგების გამოყენებამ დიდი ყურადღება დაიმსახურა, როგორც თანამედროვე სამედიცინო პრაქტიკაში, ასევე ვეტერინარიას, აგრონომიასა და სურსათის უვნებლობაში. მაგალითისთვის, იმის გამო, რომ *E.coli* ძირითადად, კვებითი ჯაჭვით ვრცელდება, ამერიკაში სხვადასხვა კომპანიები აწარმოებენ და პრაქტიკაში იყენებენ ფაგებით ბოსტნეულის (Omnilytics), კვერცხისა (Intralitix) და საკლავი ცხოველების დამუშავებას (Elanco). გარდა ამისა, ფაგებით, შესაძლებელია, დაავადების გავრცელების შემზღუდავი პრევენციული ღონისძიებების ჩატარება, კერძოდ, პროდუქტის ან/და შესაფუთი მასალის დამუშავება, რაც საგრძნობლად შეამცირებს დამაბინძურებლების გავრცელებისა და, შესაბამისად, დაავადების რისკს.

4. საკვლევი მასალები და მეთოდები

ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ენტეროპათოგენური E.coli-ს მიმართ ფართო სპექტრის ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და დეკონტამინაციური ეფექტის შესწავლა სამოდელო ცდებში.

კვლევის მიზნის მისაღწევად დავისახეთ შემდეგი ამოცანები:

1) საქართველოს ბაზარზე არსებული პროდუქტების (ყველი, მაწონი, ძეხვი, ფარში და სხვ.) დაბინძურების ხარისხის შეფასება;

2) ახალი E.coli-ის შტამების გამოყოფა, იდენტიფიკაცია და ანტიბიოტიკო მგრძნობელობის შეფასება;

3) გამოყოფილი შტამების მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და დახასიათება;

4) გამოყოფილი ბაქტერიოფაგების გამოყენება ზედაპირების დაბინძურების ბიომაკონტროლებელ საშუალებად სამოდელო ცდებში.

4.1 E.coli-ის გამოყოფა და შესწავლა

4.1.1 ნიმუშის აღება

E.coli-ის გამოსაყოფად საკვლევი მასალა შეგროვდა ადგილობრივი ბაზრებიდან და მაღაზიებიდან. ნიმუშებს შორის იყო ძეხვი, ქათმის და ღორის ხორცი, ყველი და სხვა რძის ნაწარმი როგორც ქარხნული, ასევე კუსტარული წარმოების შეფუთული და /ან შეუფუთავი ნიმუში.

<u>ძეხვის სინჯის აღება:</u> ძეხვის ნაჭრის ზედაპირი მუშავდება ეთილის სპირტით, რომელსაც გასტერილების მიზნით უკიდებენ ცეცხლს. შემდეგ სტერილური დანის საშუალებით პროდუქტის სიღრმიდან იღებენ 1 გრ ძეხვს, რომლის ჰომოგენიზაციის შედეგ იგი შეაქვთ 9 მლ თხევად ბულიონში (LB BHI broth).

<u>ქათმის და ღორის ხორცის სინჯის აღება:</u> პირველ რიგში ხდება პროდუქტის ზედაპირის სტერილიზაცია ეთილის სპირტით დამუშავებით და მოწვით. შემდეგ

ასეპტიკური პირობების დაცვით პროდუქტის სიღრმიდან ხდება 1 გრ ხორცის ამოჭრა, რომელსაც აჰომოგენიზირებენ და შეაქვთ 9 მლ თხევად ბულიონში (LB BHI broth).

<u>მაწვნის სინჯის აღება:</u> პროდუქტის სიღრმიდან ასეპტიკური პირობების დაცვით იღებენ 1 მლ მაწონს, რომელიც შემდგომში სინჯის 10-ჯერადი განზავების მიზნით გადააქვთ 9 მლ LB თხევად საკვებ არეში.

<u>ყველის სინჯის აღება:</u> შერჩეული ყველის ნაჭრის ზედაპირი მუშავდება ეთილის სპირტით, რომელსაც უკიდებენ ცეცხლს ზედაპირის ტემპერატურული გასტერილების მიზნით. შემდეგ სტერილური წკირის მეშვეობით ყველის სიღრმიდან იღებენ 1გ ყველს, ათავსებენ სტერილურ როდინში და ჰომოგენიზაციის შემდეგ გადააქვთ 9მლ LB თევად საკვებ არეში.

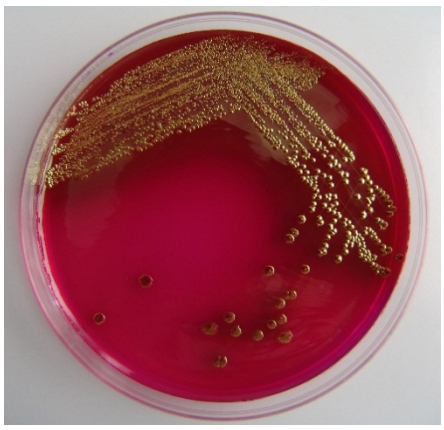
<u>პასტერიზებული და უმი რძის სინჯის აღება:</u> ასეპტიკური პირობების დაცვით რძის ნიმუშიდან იღებენ 1 მლ რძის სინჯს და შეაქვთ 9 მლ თხევად ბულიონში (LB BHI broth).

24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ მიღებული მასის 1 მლ სტერილური მარყუჟის ან პიპეტის მეშვეობით გადაიტანენ შესაბამის სელექტიურ ნიადაგის შემცველ პეტრის ფინჯანზე, და თანაბრად ანაწილებენ სტერილური შპადელის მეშვეობით. ფინჯნების ინკუბირება ხდება თერმოსტატში 37°C-ზე 24 სთ-ის განმავლობაში.

4.1.2 E.coli-ის სელექტიურ არეებზე გამოვლენა

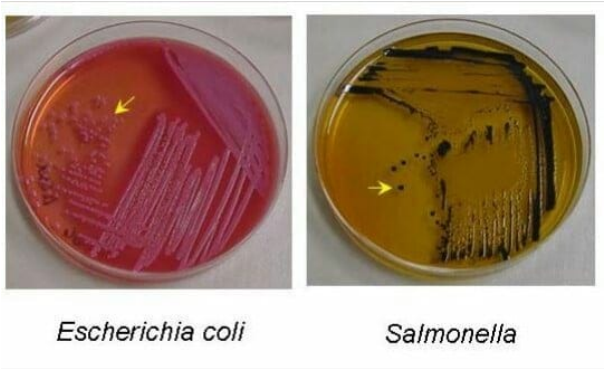
E.coli-ს გამოსავლენად გამოვიყენეთ ენდოს (Endo) აგარი და SS აგარი.

ENDO ნიადაგის შემადგენლობაში არსებული ნატრიუმის სულფატი და ძირითადი ფუქსინი თრგუნავენ გრამ-დადებით მიკროორგანიზმებს. *Escherichia*-ს გვარის წამომადგენლები ლაქტოზას შლიან ალდეჰიდისა და მჟავის წარმოქმნამდე. ალდეჰიდი ათავისუფლებს არეში შემავალ ფუქსინს, ფუქსინ-სულფატის კომპლექსიდან, რაც განაპირობებს კოლონიის შეღებვას წითლად, ფუქსინის კრისტალიზაციისას კი *E.coli*-ს კოლონიები მეტალური ბრწყინვალებით ვლინდება [33] (სურ.8).



სურ. 8. ENDO აგარზე Escherichia coli-ის ზრდა

SS სელექტიურ ნიადაგში შემავალი კომპონენტები, საქონლის ექსტრაქტი, ენზიმურად დაშლილი კაზეინის და ცხოველური ქსოვილი მიკროორგანიზმების ზრდისთვის აუცილებელი აზოტის, ნახშირბადის და ვიტამინების წყაროა. ნახშირწყალი- ლაქტოზა, ნატრიუმის ციტრატი, ნაღვლის მარილები და ბილიანტის მწვანე - გრამ-დადებითი ბაქტერიების, უმეტესი კოლიფორმების და *Proteus* spp დამთრგუნველი კომპონენტებია. ნატირუმის თიოსულფატი და რკინის ციტრატი გოგირდწყალბადის წარმომქმნელ შტამებს ანიჭებს შავ წერტილისებრ შეფერილობას კოლონიის ცენტრში. ნეიტრალური წითელი pH ინდიკატორია. შესაბამისად აგარზე უხვად იზრდება *Salmonella* spp, შავი პიგმენტირებული კოლონიების ფორმირებით. ასევე შესაძლებელია *E.coli* ზრდა, რომელიც აფერმენტირებს არეში შემავალ ლაქტოზას და იზრდება ვარდისფერი ან წითელი კოლონიები [34].



სურ. 9. Salmonella და Escherichia coli-ის ზრდა SS აგარზე

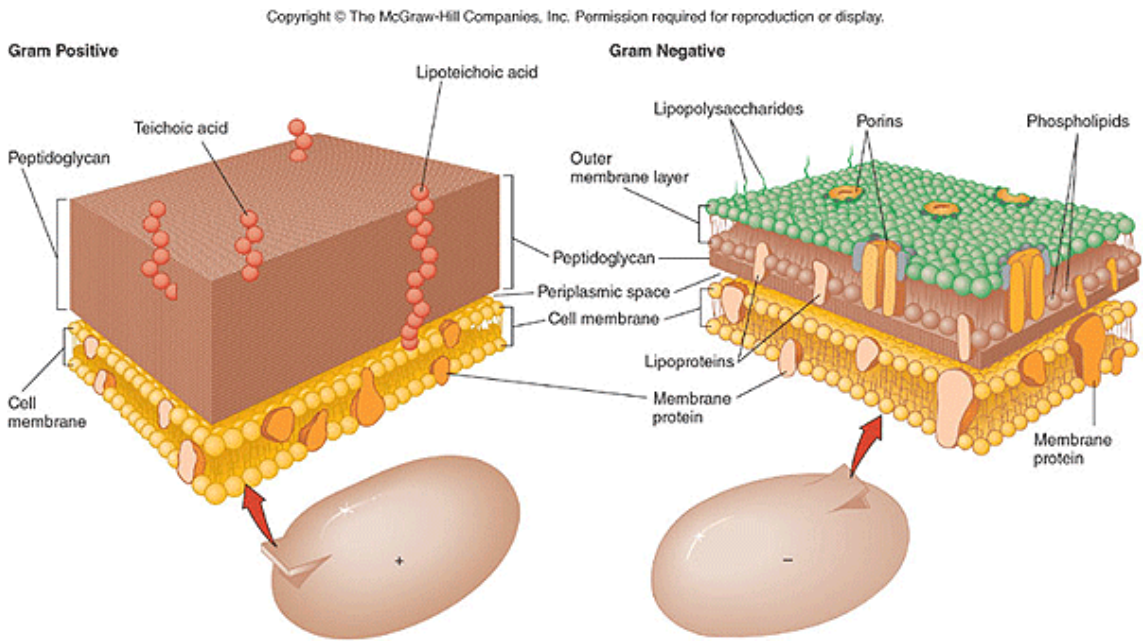
ინკუბაციის შემდეგ კოლონიების დიფერენცირება და გასუფთავება ცალკეული კოლონიების ვიზუალური იდენტიფიკაციით და გადათესვით (საშუალოდ 3 პასაჟით) ხორციელდება, რის შემდეგადაც მიიღება ბაქტერიების გასუფთავებული შტამები, რომლებიც მზადაა კვლევის მომდევნო ეტაპისთვის.

4.1.3 გრამის წესით შეღებვა

ბაქტერიული უჯრედული კედელი მკვრივი, რიგიდული და ელასტიურია. ის იცავს ბაქტერიებს გარე ზემოქმედებისგან და ანიჭებს დამახასიათებელ ფორმას (კოკი, ჩხირი). ბაქტერიული კედლის საყრდენ ჩონჩხს წარმოადგენს პეპტიდოგლიკანი - მურეინი. უჯრედული კედლის შემადგენლობა და სტრუქტურა განაპირობებს ბაქტერიების ტინკტორიულ თვისებას - „მიიღოს"— გარკვეული ტიპის საღებავი. 1884 წელს გერმანელი მეცნიერის გრამის მიერ შემოთავაზებულმა შეღებვის წესმა ბაქტერიები ორ დიდ ჯგუფად დაჰყო: ბაქტერიები, რომლებიც გრამის წესით იღებებიან მოიასამნისფრო/ლურჯი ელფერით ანუ გრამ-დადებითი ბაქტერიები და ბაქტერიები, რომლებიც შეღებვის შედეგად იღებებიან ვარდისფერ/წითელ ფერად ანუ გრამ - უარყოფითი ბაქტერიები.

გრამ-დადებითი ბაქტერიების უჯრედულ კედელში პეპტიდოგლიკანების, კერძოდ მურეინის მჟავის შემცველობა საკმაოდ მაღალია: 30-70%, ცილების და პოლისაქარიდების კი დაბალი. მათ უჯრედულ კედელს გააჩნია ერთგვაროვანი სტრუქტურა და პეპტიდოგლიკანის 5-6 შრე. გარდა ამისა ისინი შეიცავენ თეიხოის მჟავებს. ეს მჟავები ხშირად წარმოადგენენ გრამ + ბაქტერიების ზედაპირულ ანტიგენს. სწორედ ეს თავისებურებები აპირობებს ამ ბაქტერიების იასამნისფერ/ლურჯად შეღებვას.

გრამ- უარყოფითი ბაქტერიების უჯრედულ კედელში, მურეინის შემცველობა დაბალია -10%, ლიპიდების შემცველობა კი მაღალია. თეიხოის მჟავები კი საერთოდ არ არის უჯრედის კედლის შემადგენლობაში (სურ.10).



სურ. 10. გრამ-დადებითი და გრამ-უარყოფითი ბაქტერიული კედლის შენება.

ბაქტერიული უჯრედის კედლების ეს თავისებურებები საფუძვლად უდევს გრამის წესით მიკროორგანიზმების დიფერენციაციას. წინასწარ გამზადებულ სასაგნე მინაზე მარყუჟის საშუალებით გადააქვთ ბაქტერიული კოლონიის ნაცხი და წრიული მოძრაობებით ხსნიან ერთ წვეთ ფიზიოლოგიურ ხსნარში. ნაცხის გაშრობის შემდეგ, უკეთესი ფიქსაციისთვის სასაგნე მინას ატარებენ ალზე. ასეთი პრეპარატი მზადაა შესაღებად. შეღებვა წარმოებს რამდენიმე ეტაპად:

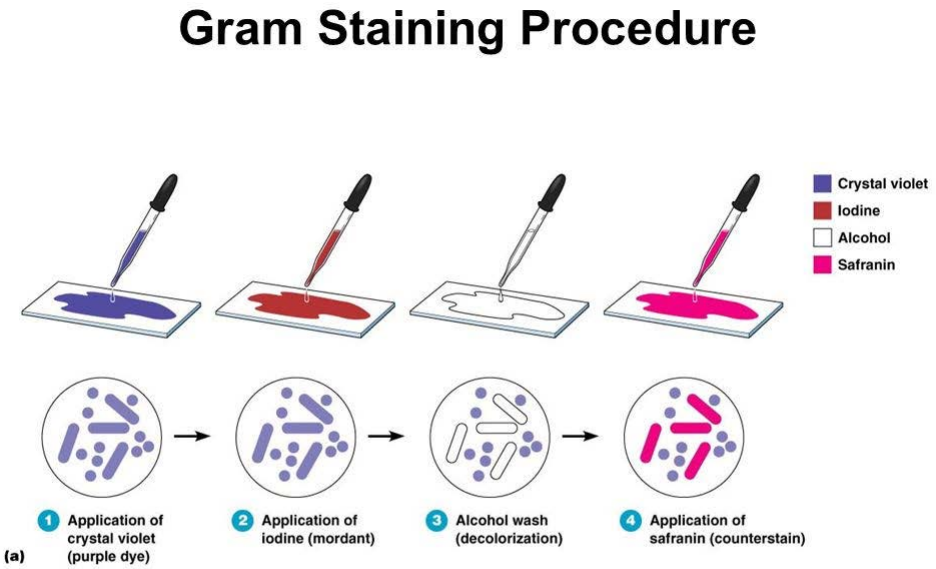
1) თავდაპირველად პრეპარატს აწვეთებენ გენციან-ვიოლეტს და ტოვებენ 2-3წთ-ით, შემდგომ ჩარეცხავენ დისტილირებული წყლით;

2) პრეპარატს აწვეთებენ იოდის ხსნარს 1-2 წთ-ით, ამის შემდეგ კვლავ ჩარეცხავენ;

3) პრეპარატს რეცხავენ ეთილის სპირტით 30 წამის განმავლობაში, საგულდაგულოდ ჩარეცხავენ წყლით;

4) საბოლოოდ პრეპარატს აწვეთებენ ფუქსინის საღებავს და ტოვებენ 1-2წთ-ით, რის შემდეგაც ჩარეცხავენ წყლით და ამშრალებენ ფილტრის ქაღალდით (სურ.11)

.



სურ.11. გრამის წესით შეღებვის პროცედურა.

ასეთი პრეპარატი მზადაა მიკროსკოპირებისთვის. აუცილებელია მიკროსკოპირებამდე პრეპარატს დაეწვეთოს იმერსიული ზეთი. მეთოდის მიზანს წარმოადგენს გრამ+ და გრამ- ბაქტერიების ვიზუალიზაცია, დიფერენცირება და ცალკეული უჯრედების დახასიათება.

4.2 კვლევის მოლეკულური მეთოდები

4.2.1 დნმ-ის ექსტრაქცია (დაწვრილებითი პროტოკოლი)

დნმ-ის გამოსაყოფად შტამს ვთესავდით LB Broth აგარზე და 24 სთ-იანი ინკუბაციისათვის ვათავსებდით თერმოსტატში. ფინჯანზე გაზრდილი კულტურიდან ვახდენდით დნმ-ის გამოყოფას.

1. მიკროსინჯარაში ვასხამთ 300 მკლ ლიზისის ბუფერს - MicroBead Solution, მარყუჟის საშუალებით მასში ვათავსებთ ფინჯნის 1 სმ კვადრატზე გაზრდილ კულტურას.
2. კულტურის ბუფერში გახსნის შემდეგ სუსპენზია გადაგვაქვს MicroBead Tube-ში და ვუმატებთ 50 მკლ Solution MD1
3. ვანჯღრევთ ჰორიზონტალურად 10000 ბრ/წთ-ში 10 წუთი;
4. ვაცენტრიფუგირებთ 10000 ბრ/წთ 30წამი ოთახი სტემპერატურაზე
5. სუპერნატანტი გადაგვაქვს 2 მლ სინჯარაში (Collection Tube-ში), სუპერნატანტი უნდა იყოს 300-350 მკლ.
6. ემატება 100 მკლ Solution MD2.
7. ვანჟღრევთ VORTEX აპარატზე და ვათავსებთ მაცივარში 4C-ზე 5წუთი.
8. ვაცენტრიფუგირებთ 10000 ბრ/წთ 1 წუთი.
9. მთლიანი სუპერნატანტი გადაგვაქვს 2 მლ სინჯარაში (Collection Tube)-ში დაახლოებით 450 მლ.
10. სუპერნატანტს ვუმატებთ 900 მკლ MD3 ხსნარს.
11. ვანჟღრევთ VORTEX აპარატზე და 700 მკლ გადაგვაქვს მოტრიალე ფილტრში (Spin Filter-ში).
12. ვაცენტრიფუგირებთ 10000 ბრ/წთ 30 წამი
13. ფილტრატს ვღვრიდით.

14. დარჩენილ სუპერნატანტსაც ვამატებთ მოტრიალე ფილტრში (Spin Filter-ში)

15. ვაცენტრიფუგირებთ 10000 ბრ/წთ 30 წამი

16. ფილტრატს ვღვრიდით. .

17. ფილტრზე ვაწვეთებთ 300 მკლ MD4 ხსნარს.

18. ვაცენტრიფუგირებთ 10000 ბრ/წთ 30 წამი

19. ფილტრატს ვღვრიდით.

20. ვაცენტრიფუგირებთ 10000 ბრ/წთ 1 წუთი

21. მოტრიალე ფილტრი გადაგვაქვს 2 მლ სინჯარაში (Collection Tube-ში)

22. 50 მკლ MD5 ხსნარი ემატება პირდაპირ ფილტრის ცენტრს

23. ვაცენტრიფუგირებთ 10000 ბრ/წთ 30 წამი

24. მოტრიალე ფილტრს ვაგდებთ

25. 2 მლ სინჯარაში (Collection Tube-ში) დარჩენილ დნმ-ს ვინახავთ -20 C-ზე

4.2.2 პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის (პჯრ) მეთოდი

პჯრ საშუალებას იძლევა, in vitro პირობებში დნმ-ის საკვლევი ფრაგმენტის რაოდენობა 1012 -ჯერ გავზარდოთ.

მეთოდი ემყარება ფერმენტების მეშვეობით დნმ-ის გარკვეული უბნების შერჩევით კოპირებას ხელოვნურ პირობებში. PCR-ისთვის ვამზადებდით სარეაქციო ნარევს (50 მკლ), რომელიც შეიცავდა: PCRSuperMix 45 მკლ (TermoFisher), 1 მკლ R პრაიმერი, 1 მკლ F პრაიმერი, 3 მკლ დნმ.

დნმ-ის კონკრეტული ფრაგმენტის (გენის) ამპლიფიკაციისათვის ვიყენებდით განსაზღვრული ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის მქონე პრაიმერებს. PCR-ს ვატარებდით წინსწარ დაპროგრამებულ თერმოციკლერში. ტემპერატურული რეჟიმის შერჩევა ხდებოდა გამოყენებული პრაიმერების და დნმ-ის სამიზნე უბნის სპეციფიკიდან გამომდინარე. პირველი სტადია მოიცავდა დნმ-ის დენატურაციას (ლღობას). დნმ-ის ჯაჭვებს შორის არსებული წყალბადური ბმების გაწყვეტა დაახლოებით 94 C-მდე ტეპერატურის პირობებში წარმოებს. იმისთვის, რომ მომხდარიყო დნმ-ის მატრიცასთან

პრაიმერების დაკავშირება (გამოწვა), საჭირო იყო ტეპერატურის დაწევა 50-65C-მდე; შემდეგ ვზრდიდით ტემპერატურას დნმ-ის პოლიმერიზაციისთვის ოპტიმალური პირობების შესაქმნელად (ჩვეულებრივ, დაახლოებით 72 C-მდე) [35].

ამპლიფიკაციის შედეგად მიღებული პროდუქტების ვიზუალიზაციას ვახდენდით აგაროზას გელში.

პრაიმერის დასახელება	პრაიმერის მიმდევრობა
uspA Forward	5'-CCGATACGCTGCCAATCAGT-3'
uspA Reverse	5'-ACGCAGACCGTAAGGGCCAGAT-3'

ცხრილი 1. გამოყენებული პრაიმერები

4.2.3 გელ-ელექტროფორეზი

დნმ-მანიპულაციების დროს, დნმ-ის სხვადასხვა სიგრძის ფრაგმენტებთან გვაქვს საქმე. მაგალითად, ორგანიზმიდან ქიმიურად გამოყოფილი დნმ-ის რესტრიქტაზებით დამუშავებისას, უმეტესწილად მიიღება სხვადასხვა სიგრძის დნმ-ფრაგმენტების ნარევი. დნმ-ის ნებისმიერი მოლეკულა წყალხსნარში უარყოფითი მუხტის მატარებელია. ეს მახასიათებელი საშუალებას იძლევა, მოხდეს განსხვავებული სიგრძის ფრაგმენტების ელექტროფორეზული დაყოფა. გელ-ელექტროფორეზის მეთოდი დნმ-ფრაგმენტების სიგრძის მიხედვით დალაგების საშუალებას იძლევა. ამისთვის დნმ თავსდება აგაროზის გელში, გელი თავსდებოდა მუდმივ ელექტრულ ველში. უარყოფითი მუხტის გამო დნმ-ის მოლეკულები გადაადგილდებოდნენ ანოდისკენ (უარყოფითი ელექტროდი). ამასთან, გადაადგილების სიჩქარე დამოკიდებულია მოლეკულის სიგრძეზე. მოკლე ფრაგმენტები გელში უფრო სწრაფად გადაადგილდებოდა, გრძელი - უფრო ნელა. ელექტროფორეზის დასრულების შემდეგ სხვადასხვა სიგრძის ფრაგმენტები გელში წარმოქნიდა ზოლებს ე.წ. „ბენდებს", რომელთა სიგრძის გასაზღვრა შესაძლებელია სპეციალური მარკერების საშუალებით [35]. ელექტროფორეზისთვის ვიყენებდით 1,5% აგაროზის გელს. გელის დასამზადებლად და ელექტროფორეზისთვის ვიყენებდით TAE ბუფერს. თითოეულ ფოსოზე დატანილი სინჯი შეიცავდა 10 მკლ ლადერს, 2 მკლ გელის დასატვირთ ხსნარს და 10 მკლ PCR-ის პროდუქტს. ელექტროფორეზს ვატარებდით ჰორიზონტალური ელექტროფორეზის აპარატში (100-150 V). გელს ვღებავდით ეთიდიუმის ბრომიდის 5 მმოლ კონცენტრაციის ხსნარში (Sigma) 20 წუთის განმავლობაში, შემდეგ ვრეცხავდით დისტილირებული წყლით. შედეგების ანალიზს ვახდენდით ულტრაიისფერი UV-ტრანსილუმინაციის მეშვეობით.

4.3 ანტიბიოტიკო-რეზისტენტობის სპექტრის დადგენა

მიღებული ბაქტერიული კულტურების ანტიბიოტებისადმი მგრძნობელობის შესწავლა მოხდა Kirby-Bauer-ის ე.წ. გელში დიფუზიის მეთოდით, პირველი და მეორე რიგის ანტიბიოტიკების მიმართ.

საკვებ არეზე ვთესავდით 1-მლ 18-24 საათიან ბულიონის კულტურას. ფინჯნებს ვაშრობდით ოთახის ტემპერატურაზე 15-30 წუთის განმავლობაში, რის შემდეგ უკვე დათესილი ნიადაგის ზედაპირზე ვათავსებდით ანტიბიოტიკის დისკებს. დისკები დაშორებულები უნდა იყვნენ 2-2 სმ-ით ფინჯნის ნაპირებიდან. დისკიან ფინჯნებს ვათავსებდით თერმოსტატში 37°C-ზე 16-18 საათის განმავლობაში. კულტივირების შემდეგ სპეციალური სახაზავით ვზომავდით სტერილურ ზონებს ანტიბიოტიკური დისკების ირგვლივ. მგრძნობელობის შეფასების კრიტერიუმები შემდეგია: 5-მმ-დან 11-მმ-მდე-რეზისტენტული, 12-მმ-დან 19-მმ-მდე ზომიერად მგრძნობიარე, ხოლო 20-მმ-დან 29-მმ-მდე დიამეტრი კი მგრძნობიარე.

4.4 ბაქტერიოფაგების შესასწავლად გამოყენებული მეთოდები

4.4.1 E.coli-ს სპეციფიური ფაგების გამოყოფა გამდიდრების მეთოდით და გამოვლენა შტრიხების (სკრინინგი) მეთოდით

ბაქტერიოფაგების გამოყოფა ძირითად ხდება ჩამდინარე წყლებიდან. ჩვენ შემთხვევაში გამოვიყენეთ მტკვრის წყალი. 90 მლ ჩამდინარე წყალს უმატებენ 10 მლ კონცენტრირებულ ბულიონს და 1 მლ წინასწარ შერჩეული ინდიკატორული კულტურის ან კულტურების ნარევს. თერმოსტატში 37°C-ზე 18 სთ ინკუბაციის შემდეგ ნარევს აცენტრიფუგებენ 5,000 g-ზე 30-40 წთ-ით და სუპერნატანტს ფილტრავენ 0.22 μm ზომის

მემბრანულ ფილტრებში. გაფილტრული ლიზატი შემოწმდა აქტიური ფაგების არსებობაზე ე.წ. spot test-ის მეთოდით.

ბაქტერიოფაგის გამოსავლენად 18-24 სთ-იანი ინკუბირების შემდეგ ბაქტერიის ბულიონიანი კულტურის 1 წვეთს მარყუჟის საშუალებით ავლებენ პეტრის ფინჯანზე, დიამეტრის პარალელური შტრიხების სახით. ბაქტერიული შტრიხების გაშრობის შემდეგ (15-20 წთ), მათზე აწვეთებენ საკვლევი ფაგის 0,05 მლ-ს. წვეთების გაშრობის შემდეგ ფინჯნებს ათავსებენ თერმოსტატში 370C-ზე, 18-24 საათიანი ინკუბაციისათვის. ფაგის არსებობის შემთხვევაში ბაქტერიულ ნაზარდზე აღინიშნება ლიზისური უბნები.

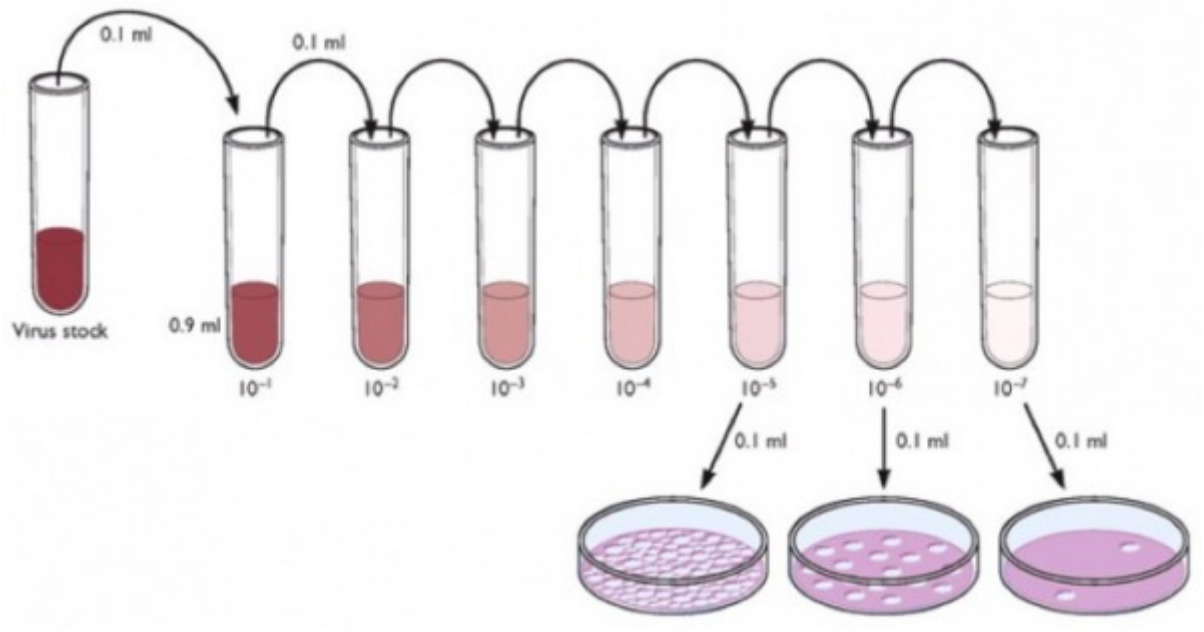
4.4.2 ფაგების ბუნებრივი ნარევების გასუფთავება და კლონირება

ფაგების გამოყოფის შემთხვევაში მათი გასუფთავება გრძელდება ერთგვაროვანი ნეგატიური კლონების მიღებამდე. ფაგის კოლონიებიანი ფინჯნებიდან ხდება სტერილური პასტერის პიპეტით ერთგვაროვანი ნეგატიური კოლონიის ამოღება და მისი შეტანა 2 მლ ბულიონიან სინჯარაში. სინჯარას 2 სთ ათავსებენ თერმოსტატში 37 °C ტემპერატურაზე და შემდეგ 30 წთ მაცივარში +4 C. ამის შემდგომ ტიტრავენ გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით. აღნიშნული პროცესი მეორდება ფაგის მორფოლოგიურად ერთგვაროვანი ნეგატიური კოლონიების მიღებამდე, რაც თანამიმდევრულად რამდენიმე პასაჟს მოითხოვს.

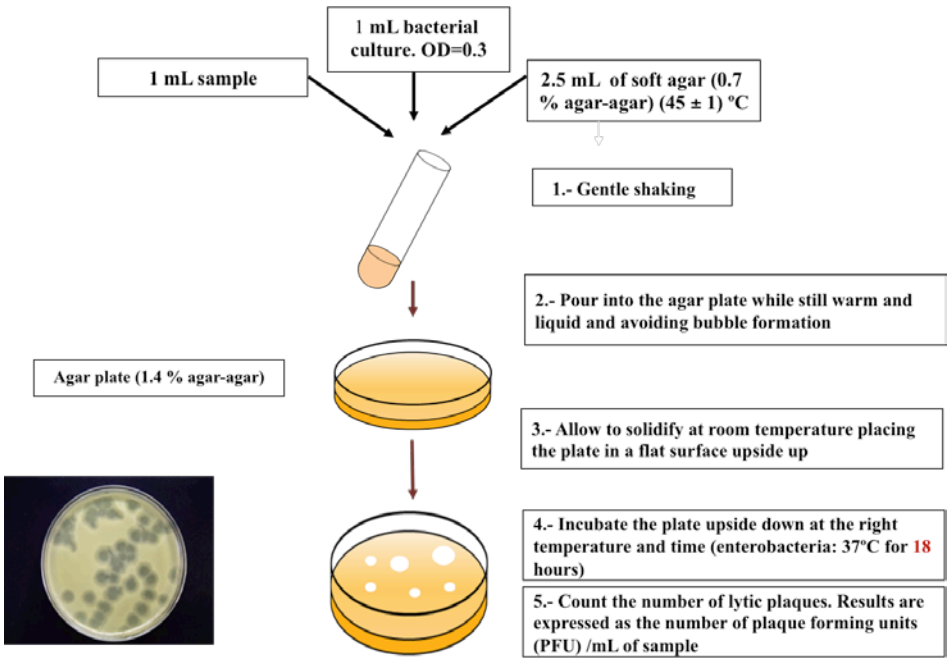
4.4.3 ბაქტერიოფაგების ტიტრის დადგენა ორშრიანი აგარის ანუ გრაციას მეთოდით

ფაგის ტიტრის დასადგენად ვიყენებდით გრაციას მეთოდს, რომლის საშუალებითაც განისაზღვრება ფაგური ნაწილაკების რაოდენობა საწყისი ლიზატის 1 მლ-ში. გამოსაკვლევ ფაგს ტიტრავენ სასურველ განზავებამდე ათჯერადი განზავების მეთოდით. სათანადო განზავების შემდეგ 1 მლ ფაგი გადაგვქონდა სტერილურ სინჯარაში, ვამატებდით 0,1 მლ მილიარდიან კულტურას (წინა დღის კულტურას) და 5 მლ ნახევრად თხიერ LB აგარს (0,6%). სინჯარის სწრაფი შენჯღრევის შემდეგ, ნარევი გადაგვქონდა 1,8% LB აგარიან პეტრის ფინჯანზე. 30წთ-ის შემდეგ ფინჯნები თავსდებოდა თერმოსტატში 37 °C -ზე 18-24 სთ-ის განმავლობაში. შედეგების აღრიცხვა ხდებოდა მეორე დღეს. ფაგის

ტიტრი განისაზღვრება 1მლ საკვლევ სითხეში ფაგის ნეგატიური კოლონიების რაოდენობით (სურ 12 და 13).



სურ. 12. ბაქტერიოფაგების 10-ჯერადი ტიტრაციის მეთოდი.



სურ. 13. აგარზე გათესვის ორშრიანი მეთოდი ფაგების რიცხვის დადგენისათვის.

4.4.4 ბაქტერიოფაგების გამრავლება კონცენტრირების მეთოდით

ბაქტერიოფაგების გასამრავლებლად კონცენტრირების გზით გამოიყენება პეტრის ფინჯანზე ორშრიანი აგარის მეთოდი. თავდაპირველად ტიტრავენ ფაგს სასურველ განზავებამდე. იღებენ ირიბ აგარზე ბულიონით ჩამორეცხილი კულტურის 10-ჯერად განზავებას (1*109 უჯრ/მლ მილიარდიანი კულტურა). თითოეულ სინჯარაში გადააქვთ მილიარდიანი კულტურის 1მლ, რომელსაც ემატება 0.1 მლ ფაგი შესაბამისი განზავებიდან და 7 მლ 0.6 % ნახევრად თხიერი აგარი. სინჯარას კარგად ანჯღრევენ და შიგთავსს ასხამენ 1,8 % აგარიან პეტრის ფინჯნებზე. 37 °C 18-24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ, ფინჯნებიდან მიღებულ ზედა შრეს ჩამოხსნიან და და 5,000 g -ზე 30-40 წთ ცენტრიფუგირების გზით მიღებული სუპერნატანტი იფილტრება 0.22 µm ზომის მემბრანულ ფილტრებში (Milipore).

4.4.5 ბაქტერიოფაგების შესწავლა ელექტრონული მიკროსკოპით

გასუფთავებული, კონცენტრირებული ბაქტერიოფაგების მორფოლოგიის შესწავლა ხდება ტრანსმისიული ელექტრონული მიკროსკოპის გამოყენებით. ელექტრონული მიკროსკოპიისათვის გამოიყენება მაღალ ტიტრიანი PEG – ით (პოლიეთილენგლიკოლით) გასუფთავებული ფაგური ლიზატი. ამისათვის 5 µl PEG- იანი ლიზატი თავსდება პიოლოფორმიანი საფენის მქონე ბადებზე. ბადე ირეცხება ორჯერ, ორმაგად დისტილირებული წყლით და ემატება 2 წვეთი 1 % -იანი ურანილ აცეტატის ხსნარი. ზედმეტი ხსნარი მაშინვე სცილდება და ბადეები შრება ჰაერზე. სინჯების დათვალიერება ხდება 80kV დენის ძაბვით JEOL JEM 1400 ტრანსმისიული ელექტრონული მიკროსკოპის დახმარებით.

4.4.6 ბაქტერიოფაგის ლიზისური აქტივობის და სპექტრის განსაზღვრა

ლიზისური აქტივობისა და სპექტრის განსაზღვრისათვის ვიღებთ ირიბ აგარზე გათესილი ღამის კულტურის ჩამონარეცხის ათჯერად განზავებას (108 უჯრ/მლ). ვაკეთებთ კულტურის შტრიხებს, როგორც ეს შტრიხების (სკრინინგი) მეთოდშია აღწერილი და ვაწვეთებთ 5 µl ფაგს. 37 °C- ზე 18 - 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ

შედეგებს აფასებენ ფაგის მიერ წარმოქმნილი ლიზისური ზონების ხარისხის მიხედვით. შეფასებისათვის იყენებენ სხადასხვა აღნიშვნებს:

Cl - სრული ლიზისი, მიკრობზე ფაგის მოქმედების ადგილი გამჭვირვალეა

OL - აღინიშნება ლიზისური უბნები მეორადი ზრდით

SOL- ძლიერი მეორადი ზრდა

tv-ერთეული კოლონიები.

R - შტამი რეზისტენტულია ფაგისადმი

4.4.7 ზედაპირების დეკონტამინაცია

ზედაპირების დეკონტამინაციისათვის ჩვენ გამოვიყენეთ ჩვენს მირე მოდიფიცირებული მეთოდი, რომელიც აღწერილია „საკუთარ შედეგებ"-ში. ექსპერიმენტი ჩატარებულ იქნა *E.coli*-ის ბაქტერიოფაგის (ΦM.4) გამოყენებით, პატრონ ბაქტერიულ უჯრედად გამოყენებული იქნა შტამი *E.coli* M.4.

5. საკუთარი კვლევის შედეგები და განხილვა

ამოცანა 1. საკვები პროდუქტებიდან E.coli-ის გამოყოფა და მათი მოლეკულურ-ბიოლოგიური დახასიათება.

5.1 E.coli-ის გამოყოფა და შესწავლა

ნიმუშები შეგროვდა ადგილობრივი ბაზრებიდან და მაღაზიებიდან. ნიმუშებს შორის იყო ძეხვი, ქათმის და ღორის ხორცი, ყველი და სხვა რძის ნაწარმი როგორც ქარხნული, ასევე კუსტარული წარმოების შეფუთული და /ან შეუფუთავი ნიმუში. კვლევისათვის გამოყენებული იყო განსხვავებული ადგილწარმოშობის მქონე საკვები

პროდუქტის 25 სინჯი. აღებული სინჯების მიკრობიოლოგიური შესწავლა განხორციელდა გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის კვლევისა და განვითარების დეპარტამენტის ლაბორატორიაში.

SS და Endo საკვებ ნიადაგზე კულტივაციის შემდეგ 25 სინჯიდან სულ გამოიყო 20 შტამი.

როგორც ცნობილია, Endo საკვები არე გამოიყენება Escherichia coli-ის გამოსაყოფად სხვადასხვა მასალიდან. Endo საკვები ნიადაგის შემადგენლობაში შემავალი კომპონენტები თრგუნავენ გრამ+ მიკროორგანიზმებს. გარდა ამისა, Endo არეზე გაზრდილი E.coli ხასიათდება ჟოლოსფერი შეფერილობით, რომელსაც თან სდევს მეტალური ბზინვარება. ჩვენ მიერ მიღებული შედეგების საფუძველზე შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ 10 სინჯი შეიცავს E.coli-ის შტამებს.

ცხრილი 2. ENDO საკვებ არეზე გაზრდილი კოლონიების დახასიათება.

ნიმუში #	გამოყოფის წყარო	მინიჭებული ნომენკლატურა	ნაზარდის მორფოლოგიური დახასიათება		
			ფერი	ფორმა	კიდეების ფორმა
1	მაწონი 1	S.m. 1	ჟოლოსფერი მეტალის ელფერით	მრგვალი,გლუვი	სწორი
2	რძე 1	M. 1	ჟოლოსფერი მეტალის ელფერით	მრგვალი,გლუვი	სწორი
3	რძე 2	M. 2	ჟოლოსფერი მეტალის ელფერით	მრგვალი,გლუვი	სწორი
4	რძე 4	M. 4	ვარდისფერი მეტალის ელფერით	მრგვალი,გლუვი	სწორი
5	რძე 5	M. 5	ვარდისფერი მეტალის ელფერით	მრგვალი,გლუვი	სწორი
6	ქათამი 1	Chick. 1	ვარდისფერი მეტალის ელფერით	მრგვალი,გლუვი	სწორი
7	ქათამი 2	Chick. 2	ვარდისფერი მეტალის ელფერით	მრგვალი,გლუვი	სწორი
8	ქათამი 3	Chick. 3	ვარდისფერი მეტალის ელფერით	მრგვალი,გლუვი	სწორი
9	ქათამი 4	Chick. 4	ვარდისფერი მეტალის ელფერით	მრგვალი,გლუვი	სწორი
10	ქათამი 5	Chick. 5	ვარდისფერი მეტალის ელფერით	მრგვალი,გლუვი	სწორი

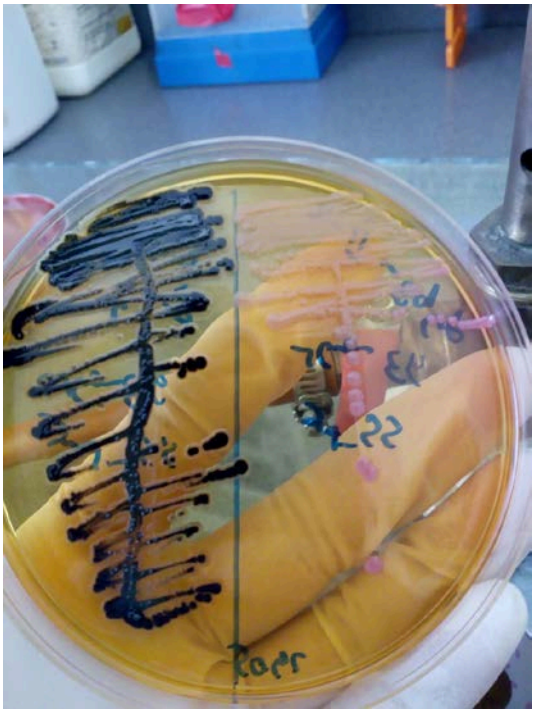
როგორც ცნობილია, SS აგარი გამოიყენება Enterobacteriaceae-გვარის სელექციისათვის, კერძოდ არეში შემავალი კომპონენტები ზრდისთვის საკმარისი საკვებით უზრუნველყოფენ Salmonella და Shigella-ს გვარის ბაქტერიებს. ასევე შესაძლებელია E.coli ზრდა, რომელიც აფერმენტირებს არეში შემავალ ლაქტოზას. სხვა მიკროორგანიზმების ზრდა კი მაინჰიბირებელი ნივთიერებებით (ნაღვლის მარილები, ბრილიანტის მწვანე) იზღუდება.

ჩვენ მიერ SS საკვებ ნიადაგზე კულტივირებული შტამების ზრდის შედეგად მიღებული შედეგების საფუძველზე, შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ 10 შტამს აქვს E.coli-თვის დამახასიათებელი ზრდა.ერთი შტამი კი სავარაუდოდ წარმოადგენს სალმონელას.

ცხრილი 3. შესაბამისი სინჯებიდან SS საკვებ არეზე გაზრდილი კოლონიების დახასიათება.

ნიმუში #	გამოყოფის წყარო	მინიჭებული ნომენკლატურა	ნაზარდის მორფოლოგიური დახასიათება		
			ფერი	ფორმა	კიდეების ფორმა
1	მაწონი 1	S.m. 1	ვარდისფერიდან წითლამდე	მრგვალი,გლუვი	სწორი
2	რძე 1	M. 1	ჟოლოსფერი	მრგვალი,გლუვი	სწორი
3	რძე 2	M. 2	ჟოლოსფერი	მრგვალი,გლუვი	სწორი
4	რძე 4	M. 4	ჟოლოსფერი	მრგვალი,გლუვი	სწორი
5	რძე 5	M. 5	ჟოლოსფერი	მრგვალი,გლუვი	სწორი
6	ქათამი 1	Chick. 1	ღია ვარდისფერი	მრგვალი,გლუვი	უსწორმასწორო
7	ქათამი 2	Chick. 2	ღია ვარდისფერი	მრგვალი,გლუვი	უსწორმასწორო
8	ქათამი 3	Chick. 3	ღია ვარდისფერი	მრგვალი,გლუვი	უსწორმასწორო
9	ქათამი 4	Chick. 4	ღია ვარდისფერი	მრგვალი,გლუვი	უსწორმასწორო
10	ქათამი 5	Chick. 5	ღია ვარდისფერი	მრგვალი,გლუვი	უსწორმასწორო
11	ქათამი 5	Chick. S	შავი	მრგვალი,გლუვი	სწორი

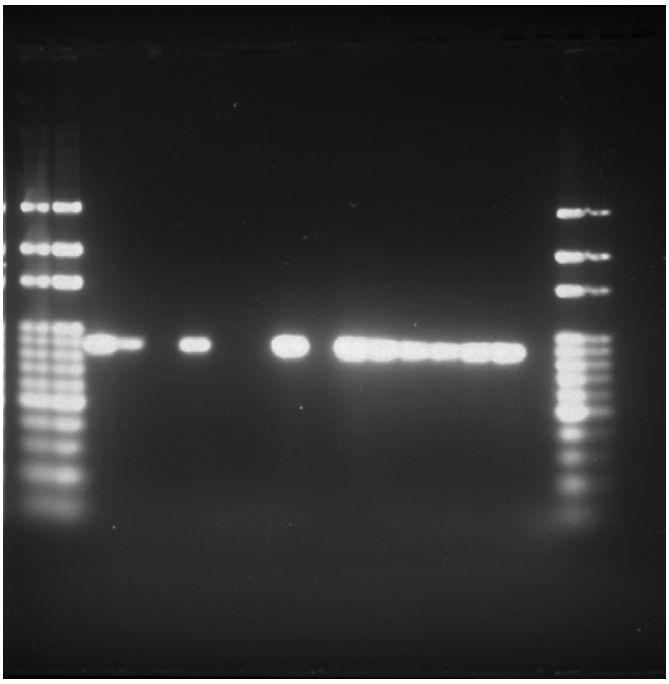
სურ. 14. Endo ნიადაგზე E.coli-ის ზრდა



სურ. 15. SS ნიადაგზე Salmonella (მარცხნივ) და E.coli-ის (მარჯვნივ) ზრდა

5.2 საკვებიდან გამოყოფილი ბაქტერიების მოლეკულური იდენტიფიკაციის შედეგები

E.coli-ის იდენტიფიკაციის დასადასტურებლად გამოყენებული იყო uspA გენი, რომელიც სახეობა სპეციფიკურია. uspA გენის ამპლიფიკაციის შედეგად 15-დან 10 შტამის შემთხვევაში აღრიცხული იყო 800 bp ზომის პროდუქტი, რაც დამახასიათებელია E.coli-ისთვის (სურ. 16)



სურ. 16. ელექტროფორეზის შედეგად მიღებული სურათი

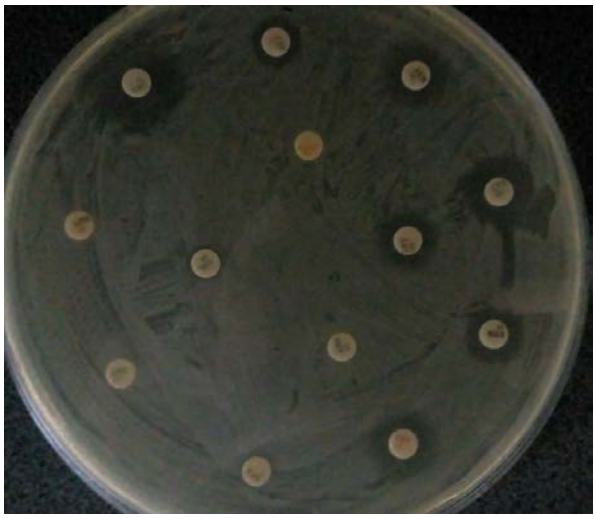
ამოცანა 2. გამოყოფილი ბაქტერიული კულტურების ანტიბიოტიკორეზისტენტობის სპექტრის დადგენა

5.3 გამოყოფილი E.coli-ის ანტიბიოტიკებისადმი რეზისტენტობის შესწავლა

ჩვენი კვლევის მიზანი იყო შეგვესწავლა გამოყოფილი *E.coli*-ის ანტიბიოტიკებისადმი რეზისტენტობა,რისთვისაც გამოვიყენეთ Kirby Bauer -ის გელში დიფუზიის მეთოდი.

ცდაში გამოვიყენეთ შემდეგი ანტიბიოტიკები: სპექტინომიცინი - 100 მკგ, ცეფტრიაქსონი - 30 მკგ, ტეტრაციკლინი - 30 მკგ, ამოქსიცილინი - 30 მკგ, კანამიცინი - 30 მკგ, ამპიცილინი - 10 მკგ, ამიკაცინი - 30 მკგ, გენტამიცინი - 10 მკგ, ქლორამფენიკოლი - 30 მკგ, ოფლოქსაცინი - 5 მკგ, ერითრომიცინი - 15 მკგ, ციპროფლოქსაცინი - 5 მკგ, ცეფოტაქსიმი - 30 მკგ.

სურ. 17. გამოყოფილი E.coli -ის კულტურების ანტიბიოტიკოგრამა



სურ. 18. E.coli-ის კულტურის ანტიბიოტიკოგრამა (რეზისტენტული 6 ანტიბიოტიკის მიმართ)

ჩატარებულმა კვლევამ აჩვენა, რომ გამოყოფილი E.coli-ის კულტურების უმრავლესობა რეზისტენტული ან ზომიერად რეზისტენტულია ანტიბიოტიკების მიმართ.

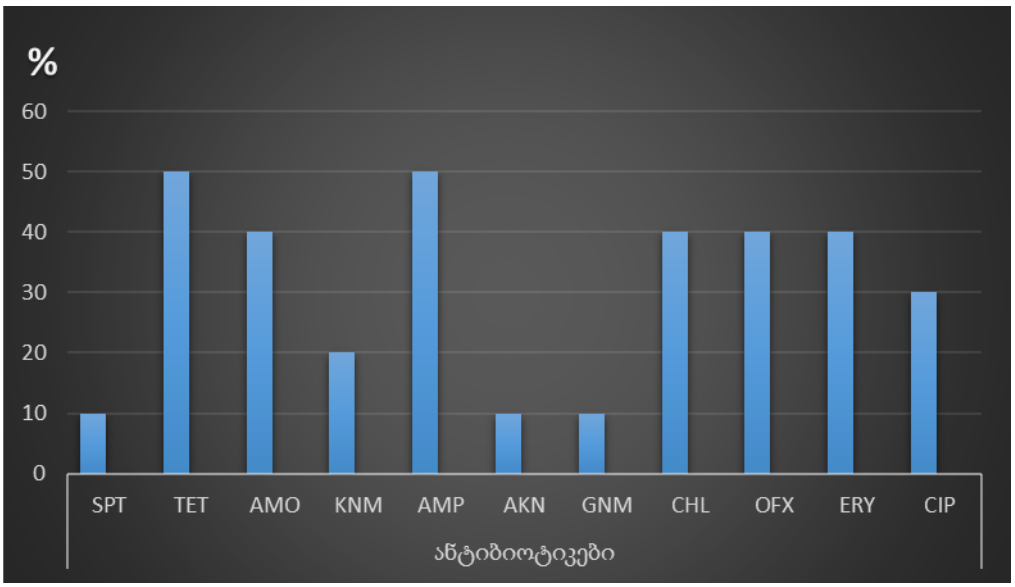
ცხრილი 4. E.coli-ის შტამების რეზისტენტობის შესწავლა სხვადასხვა ანტიბიოტიკების

#	შტამი	სპექტინომიცინი	ცეფტრიაქსონი	ტეტრაციკლინი	ამოქსიცილინი	კანამიცინი	ამპიცილინი	ამიკაცინი	გენტამიცინი	ქლორამფენიკოლი	ოფლოქსაცინი	ერითრომიცინი	ციპროფლოქსაცინი	ცეფოტაქსიმი
1	S.m. 1	I	I	S	I	I	I	I	I	S	I	R	S	S
2	M. 1	S	S	I	S	I	I	I	I	S	S	I	S	I
3	M. 2	I	S	I	I	I	I	I	I	S	S	I	S	S
4	M. 4	I	S	I	I	I	I	I	I	S	S	I	S	S
5	M. 5	S	S	I	I	I	R	I	I	S	S	I	S	S
6	Chick. 1	I	S	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R	I
7	Chick. 2	I	S	R	I	I	R	I	S	I	R	I	R	S
8	Chick. 3	R	S	R	R	I	R	I	I	R	I	R	S	S
9	Chick. 4	I	S	R	R	I	R	I	R	R	R	I	I	I
10	Chick. 5	I	I	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	I

მიმართ

R-რეზისტენტული, I-ზომიერად რეზისტენტული, S-მგრძნობიარე

მიღებული შედეგები გვიჩვენებს, რომ *E.coli*-ის 10 შტამიდან 1 (10%) იყო რეზისტენტული სპექტინომიცინის (ამინოგლიკოზიდის) მიმართ, 5 (50%) - ტეტრაციკლინის, 4 (40%) - ამოქსაცილინის (ლაქტამაზური), 2 (20%) - კანამიცინის (ამინოგლიკოზიდი), 6 (60%) - ამპიცილინის (ლაქტამაზური), 1 (10%) - ამიკაცინის, 1 (10%) - გენტამიცინის, 4 (40%) - ქლორამფენიკოლის, 4 (40%) - ოფლოქსაცინის, 4 (40%) - ერითრომიცინის, 3 (30%) - ციპროფლოქსაცინის მიმართ (გრაფიკი 1)



გრაფიკი 1. E.coli -ის ანტიბიოტიკებისადმი რეზისტენტობის პროცენტული მაჩვენებლები

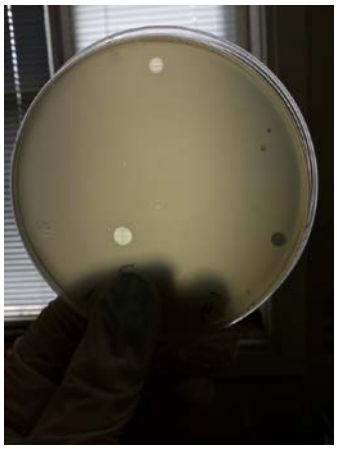
გრაფიკიდან ჩანს, რომ ჩვენს მიერ სურსათის ნიმუშებიდან გამოყოფილი *E.coli* შტამების უმრავლესობა რეზისტენტულია ბეტა-ლაქტამაზური ჯგუფის ანტიბიოტიკების მიმართ, როგორიცაა ამოქსაცილინი და ამპლიცილინი; ასევე მაკროლიდების მიმართ, როგორიცაა ერითრომიცინი და ტეტრაციკლინი. ამავე დროს, უნდა აღინიშნოს, რომ ცეფტრიაქსონი (ცეფალოსპორინი) ეფექტური იყო 10-დან 8 შტამის (80%) მიმართ, ციპროფლოქსაცინი (ქიულონონი) და ცეფოტაქსიმი (ცეფალოსპორინი) 10-დან 6-6 შტამის (60%) მიმართ, ხოლო ქლორამფენიკოლი (მაკროლიდი) და ოფლოქსაცინი (ქიულონონი) 5-5 შტამის (50%) მიმართ. საკმაოდ ეფექტური აღმოჩნდა ასევე ამინოგლიკოზიდური ჯგუფის პრეპარატი სპექტინომიცინი.

ამოცანა 3. საკვებისმიერი E.coli-ის საწინააღმდეგო ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და შესწავლა

5.4 E.coli-ის სპეციფიური ბაქტერიოფაგების გამოყოფა და დახასიათება

მოცემული კვლევის მიმდინარეობის პერიოდში *E.coli*-ის საწინააღმდეგო ბაქტერიოფაგების გამოყოფის მიზნით ჩანდინარე წყალის და მდ. მტკვრის ნიმუშებს ვათავსებდით ბაქტერიოლოგიურ მდიდარ საკვებ არეში სადაც შეგვქონდა შესაბამისი პატრონი ბაქტერიების ნარევი. ამ ნარევის 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ, ფილტრატს ვამოწმებდით ფაგების შემცველობზაე ე.წ. spot–test-ით. თავდაპირველად ფაგების შემცველობა აღინიშნა 6 ფილტრატში. თუმცა, მრავალჯერადი პასირების შედეგად შევარჩიეთ სამი *E.coli*-ის სპეციფიური ბაქტერიოფაგი. ესენია: ΦM.2, ΦM.4 და ΦM.5.

ბაქტერიოფაგი ΦM.2 დამახასიათებელი დიდი ზომის ნათელი კოლონიები. ელექტრონული მიკროსკოპით დადგინდა, რომ ბაქტერიოფაგი ΦM.2 მიეკუთვნება Podoviridae-ს ოჯახს. ტიტრი გრაციას მეთოდით შეადგენდა $1*10^{10}$ ნაწ/მლ. (სურ. 19)

ა.  ბ.

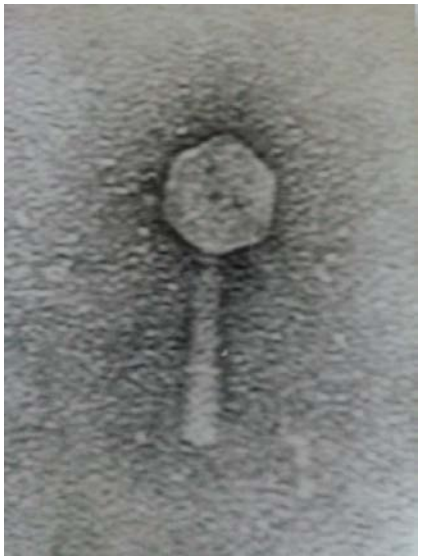
სურ. 19. ბაქტერიოფაგ ΦM.2-ის მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონი; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია (JEOL 1400 X 220,000)

ბაქტერიოფაგი ΦM.4 დამახასიათებელია წვრილი ნათელი კოლონიები. ელექტრონული მიკროსკოპით დადგინდა, რომ მიეკუთვნება Myoviridae-ს ოჯახს. ტიტრი გრაციას მეთოდით შეადგენდა $1*10^{10}$ ნაწ/მლ. (სურ. 20)

ა. ბ.

სურ. 20. ბაქტერიოფაგ ΦM.4-ის მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონი; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია (JEOL 1400 X 220,000)

ბაქტერიოფაგი ΦM.5 დამახასიათებელია წვრილი, ნათელი კოლონიები. ელექტრონული მიკროსკოპით დადგინდა, რომ მიეკუთვნება Myoviridae-ს ოჯახს. ტიტრი გრაციას მეთოდით შეადგენდა $1*10^9$ ნაწ/მლ. (სურ. 21).

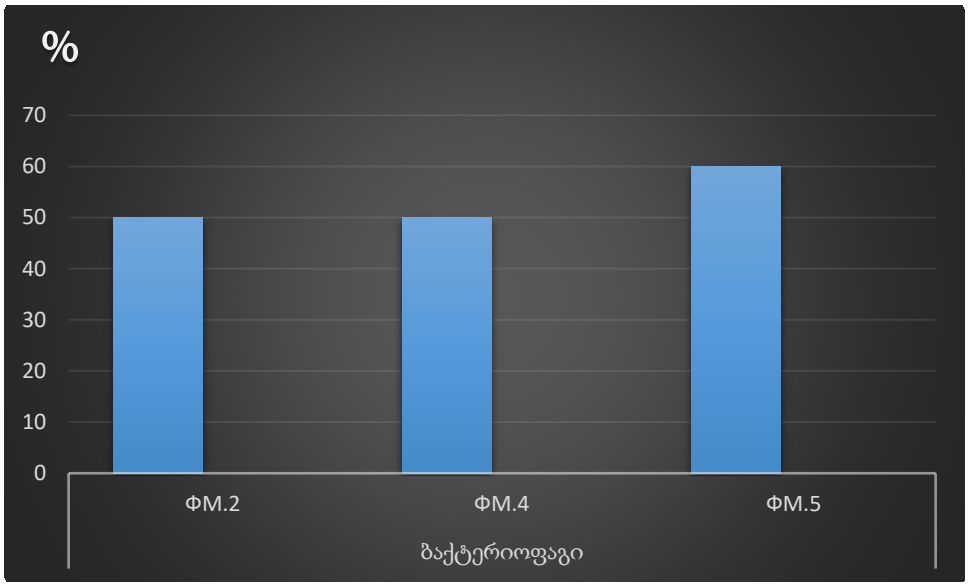
ა. ბ. 

სურ. 21. ბაქტერიოფაგ ΦM.5-ის მორფოლოგია. ა. ნეგატიური კოლონი; ბ. ელექტრონული მიკროსკოპია (JEOL 1400 X 220,000)

5.5 ბაქტერიოფაგების აქტივობის სპექტრის შესწავლა

კვლევის ფარგლებში, ჩვენ მიერ გამოყოფილი ბაქტერიოფაგების მოქმედების დიაპაზონი შესასწავლად გამოვიყენეთ *Escherichia coli*-ის 23 და *Salmonella* spp. 1 შტამი. კვლევაში გამოყენებულია ჩვენ მიერ საკვებიდან გამოყოფილი 10 *Escherichia coli,* 1 *Salmonella* spp და ლაბორატორიის კოლექციაში არსებული 13 კლინიკური *Escherichia coli* შტამი.

ფაგის მოქმედების დიაპაზონის შესწავლამ აჩვენა, რომ მოცემულ კვლევაში გამოყენებული *E.coli* -ის საწინააღმდეგო ბაქტერიოფაგები სუსტად (23%) მოქმედებენ კლინიკურ შტამებზე. ხოლო საკვებიდან გამოყოფილი *E.coli*-ის 10 შტამზე მოქმედების სპექტრის შესწავლამ აჩვენა, რომ ბაქტერიოფაგი ΦM.2 აქტივობის სპექტრი განისაზღვრა 50%-ით, ბაქტერიოფაგი ΦM.4 აქტივობის სპექტრი ასევე განისაზღვრა 50%-ით. ხოლო ბაქტერიოფაგი ΦM.5 მოქმედების დიაპაზონი განისაზღვრა 60%-ით (გრაფიკი 2)



გრაფიკი 2. Escherichia coli-ის საწინააღმდეგო ბაქტერიოფაგების მოქმედების სპექტრის შედეგები

აღნიშნული შედეგები ნათლად მიუთითებს ფაგის ვირულენტურობას, რაც მნიშვნელოვან მოთხოვნას წარმოადგენს სურსათისა თუ ზედაპირების დეკონტამინაციისთვის გამოსაყენებელი ბაქტერიოფაგების მიმართ.

ამოცანა 4. გამოყოფილი ბაქტერიოფაგების გამოყენება ზედაპირების დაბინძურების ბიომაკონტროლებელ საშუალებად სამოდელო ცდებში

5.6 E.coli-ით დაბინძურებული ზედეპირის დეკონტამინაცია სპეციფიკური ფაგის მეშვეობით

ხშირია შემთხვევები, როდესაც სურსათი პათოგენური მიკროორგანიზმებით, მათ შორის *Escherichia coli*-ით ბინძურდება სურსათთან შეხებაში მყოფი ზედაპირებიდან. ამიტომ მნიშვნელოვანი იყო შეგვესწავლა *Escherichia coli*-ის ახალი ბაქტერიოფაგის მიერ ზედაპირების, კერძოდ, მინის ზედაპირების დეკონტამინაციის უნარი.

ექსპერიმენტი ჩატარებულ იქნა *E.coli*-სპეციფიკური ბაქტერიოფაგის ΦM.4 გამოყენებით, პატრონ ბაქტერიულ უჯრედად გამოყენებული იქნა შტამი *E.coli* M.4.

1. ცდის ჩასატარებლად წინასწარ მოვამზადეთ ბაქტერიოფაგის სუსპენზია ფიზიოლოგიურ ხსნარში, რომელშიც ფაგის საბოლოო ტიტრი შეადგენდა $1X10^8$ უჯრ/მლ.
2. ღამენათევი ბაქტერიული კულტურა გავაზავეთ თხევად ნიადაგში საბოლოო ტიტრი $1X10^7$ უჯრ/მლ მიღწევამდე. ტიტრს ვსაზღვრავდით მაკ-ფარლანის სიმკვრივის სტანდართით და ვამოწმებდით 10-ჯერადი განზავების მეთოდით.
3. ცდის ეფექტურობისათვის მნიშვნელოვანია, რომ ფაგის ტიტრი 10-ჯერ აღემატებოდეს პატრონი ბაქტერიის ტიტრს, რათა მიღწეულ იქნეს ინფექციის მრავლობითობა 0.1 (Multiflicity of infection – MOI=0.1).
4. ცდის ჩასატარებლად ზედაპირის მოდელად ვიყენებთ სასაგნე მინებს, რომელიც წინასწარ გავასტერილეთ 2 საათის განმავლობაში $160^{O}C$ -ზე.
5. ცდის დაწყებამდე სასაგნე მინებს 5-10 წთ-ის განმავლობაში ვაყოვნებთ პატრეიზებულ რძეში, რომელიც წინასწარ შევამოწმეთ მიკროორგანიზმების არსებობაზე და დავადასტურეთ მისი სტერილურობა.
6. სასაგნე მინები სტერილური პინცეტით გადავტანეთ სტერილურ პეტრის ფინჯნებზე და გავაშრეთ ლამინარულ ბოქსში ოთახის ტემპერატურაზე 20-25 წთ განმავლობაში. სასაგნე მინაზე გამშრალი რძე წარმოადგენს ორგანული არის მსგავს ანალოგს, რაც მიკრორგანიზმების გამრავლების საშუალებას იძლევა.

7. მშრალ სასაგნე მინაზე დავაწვეთეთ 0,1 მლ ბაქტერია და გავაშრეთ ოთახის ტემპერატურაზე ლამინარული ბოქსის გამოყენებით.

8. გაშრობის შემდეგ დავაწვეთეთ 0,1 მლ ბაქტერიოფაგი.

ექვსი ერთნაირად დამუშავებული და შემდგომში ბაქტერიით დასნებოვნებული სასაგნე მინა, რომლებზედაც დატანილი იყო ფაგი დავყავით ხუთ საექსპერიმენტო ჯგუფად, რათა სინჯები ბაქტერიისა და ფაგის ექსპოზიციის სხვადასხვა ინტერვალებში აგვეღო:

ჯგუფი 1. 0,1 მლ ბაქტერიის + 0,1 მლ ბაქტერიოფაგის ექსპოზიცია 5 წთ

ჯგუფი 2. 0,1 მლ ბაქტერიის + 0,1 მლ ბაქტერიოფაგის ექსპოზიცია 15 წთ

ჯგუფი 3. 0,1 მლ ბაქტერიის + 0,1 მლ ბაქტერიოფაგის ექსპოზიცია 30 წთ

ჯგუფი 4. 0,1 მლ ბაქტერიის + 0,1 მლ ბაქტერიოფაგის ექსპოზიცია 1 სთ

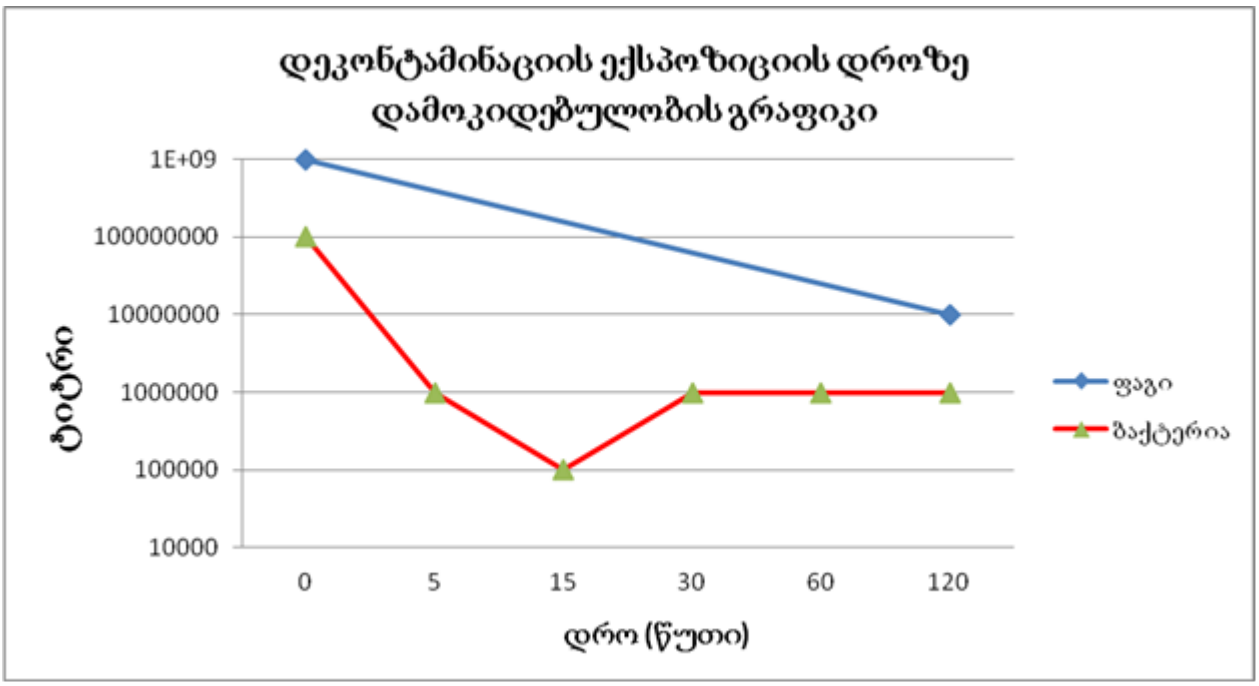
ჯგუფი 5. 0,1 მლ ბაქტერიის + 0,1 მლ ბაქტერიოფაგის ექსპოზიცია 2 სთ

9. სინჯების აღება ხდებოდა მითითებული დროების შესაბამისად. თითოეულ სასაგნე მინას სტერილური პინცეტის საშუალებით ვათავსებდით სტერილურ პეტრის ცარიელ ფინჯანში და 10 წთ-ის განმავლობაში ვამუშავებდით 5 მლ ფიზიოლოგიურ ხსნარში და შემდეგ ფინჯნების წრიული მოძრაობით ვახდენდით სასაგნე მინების კარგად ჩამორეცხვას.

სასაგნე მინის ჩამონარეცხიდან პიპეტის საშუალებით 0,5 მლ ვიღებდით და 10-ჯერადი განზავებით ვაზავებდით 10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-7} განზავებებამდე. თითოეული განზავებიდან და ასევე განუზავებელი სინჯარიდან ვიღებდით 0,1 მლ სუსპენზიას და შპადელით ვანაწილებდით აგარიან პეტრის ფინჯანზე

10. ოთახის ტემპერატურაზე გაშრობის შემდეგ ფინჯნებს საინკუბაციოდ 18 -24 სთ-ით ვათავსებდით თერმოსტატში 37 C. მეორე დღეს ხდებოდა შედეგების აღრიცხვა და ანალიზი.

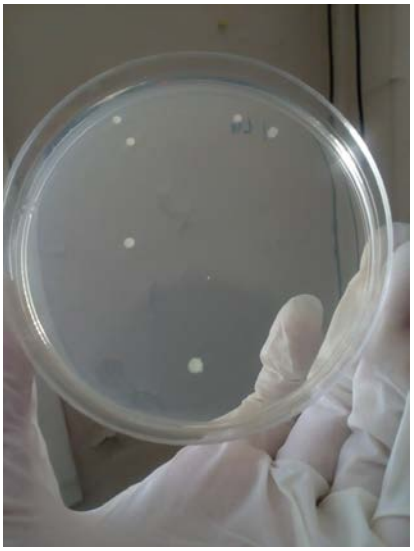
მიღებული შედეგები დაჯამებულია გრაფიკში # 1.



გრაფიკიდან ჩანს, რომ ბაქტერიების რიცხვი პირველივე 5 წუთში 2 ლოგარითმით მცირდება და მაქსიმუმს 15 წუთის შემდეგ აღწევს ანუ საწყისი დონიდან 3 ლოგარითმით არის დაკლებული. თუმცა, 30 წუთის შემდეგ ბაქტერიის რიცხვი კვლავ 1 ლოგარითმით იზრდება და შემდგომი 1,5 საათის განმავლობაში უცვლელია. შესაბამისად, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ფაგის ეფექტურობა ექსპოზიციის დროზეა დამოკიდებული და ექსპოზიციის ყველაზე ოპტიმალურ დროის ინტერვალად შეიძლება ჩავთალოთ 15 წუთი. მიუხედავად იმისა, რომ ფაგით ბაქტერიაზე 30 წუთიანი ზემოქმედების შემდეგ ბაქტერიის ტიტრმა 15 წუთიანი ექსპოზიციასთან შედარებით 1 ლოგარითმით იმატა, ის საწყისთან შედარებით მაინც 2 ლოგარითმით დაბალი იყო, რაც იმას ნიშნავს, რომ ფაგის ზემოქმედების ეფექტი ექსპოზიციის 30, 60, და 120 წუთიან ინტერვალებშიც გრძელდებოდა და სტაბილურად ნარჩუნდებოდა. ის, რომ 30 წუთის შემდეგ ბაქტერიის ტიტრის მატება იმით აიხსნება, რომ სასაგნე მინა რძით იყო დამუშავებული, რამაც ბაქტერიის გასამრევლებლად საკმარისად ნოყიერი ნიადაგი შექმნა. ამავდროულად, უნდა აღინიშნოს ის გარემოება, რომ ფაგის ტიტრი 120 წუთის განმავლობაში თანდათან 2 ლოგარითმით შემცირდა (იხ. სურ.21). 120 წუთის ინტერვალის შემდეგაც ფაგსა და ბაქტერიას შორის თანაფარდობა კვლავაც 0.1 იყო, რაც ინფექციის მრავლობითობის ეფექტურ მაჩვენებელს შეესაბამება (MOI = 0.1). შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ 120 წუთის შემდეგ მიღწეული ბაქტერიის ტიტრის სტაბილურობა კიდევ გარკვეული დროის განმავლობაში შეიძლება გაგრძელებულიყო. დასკვნის სახით შეიძლება ითქვას, რომ

სამოდელო ცდებში დამტკიცდა მინის დაბინძურების დეკონტამინაციის ეფექტი, რომელიც შერჩეული ფაგის მიერ იყო გამოწვეული.

საინტერსოა ის, გარემოება, რომ სამოდელო ცდებში გამოყენებული E.coli M4 შტამი, რომელიც უმი რძიდან იყო გამოყოფილი, მრავლობით რეზისტენტობას ამჟღვანებდა ბეტა ლაქტამაზური ჯგუფის ანტიბიოტიკების მიმართ. მასზე მხოლოდ ფართე სპექტრის ანტიბიოტიკები, როგორიცაა ქიულონინები, ცეფალოსპორინები და მაკროლიდები იყვნენ ეფექტური. თითოეული ეს ანტიბიოოტიკი მთელი რიგი უკუჩვენებებით არის ცნობილი, რადგან მოქმდებენ ღვიძლზე, თირკმელებზე და სხვა ორგანოებზე. ამავდროულად, ზოგადად ფაგების თერაპიული გამოყენების თითქმის 100 წლიანმა პრაქტიკამ აჩვენა, რომ მათ მოხმარებას უკუჩვენებები არ აქვს, რაც ფაგების არა მხოლოდ როგორც თერაპიული აგენტებად, არამედ დეკონტამინაციის საშუალებებად გამოყენების უპირატესობაზე მეტყველებს.

ა. ბ. 

სურ. 22. ფაგის 5 წთ-იანი (ა) და 1 სთ-იანი (ბ) მოქმედების შედეგად მინის ზედაპირზე არსებული Escherichia coli -ის რაოდენობის შემცირება.

დასკვნები

1) საკვები პროდუქტების (ძეხვი, ქათმის და ღორის ხორცი, ყველი და სხვა რძის ნაწარმი) 25 ნიმუშიდან გამოყოფილი მიკროორგანიზმების შესწავლის შედეგად დადგინდა საკვები პროდუქტების *Escherichia coli* -ით კონტამინაციის მაღალი დონე (40%).
2) სურსათის ნიმუშებიდან გამოყოფილი *E.coli* შტამების უმრავლესობა რეზისტენტული აღმოჩნდა ბეტა-ლაქტამაზური ჯგუფის ანტიბიოტიკების მიმართ, როგორიცაა ამოქსაცილინი და ამპლიცილინი; ასევე მაკროლიდების მიმართ, როგორიცაა ერითრომიცინი და ტეტრაციკლინი. შესაბამისად შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ ისინი უაღრესად საშიშ ESBL (Extended spectrum beta lactamase) ჯგუფის ბაქტერიების რიცხვს განეკუთვნებიან.
3) *Escherichia coli*-ის მიმართ სპეციფიკური 3 ბაქტერიოფაგიდან ერთი - ΦM.2 მიეკუთვნება *Podoviridae*-ს ოჯახს ხოლო ΦM.4 და ΦM.5 მიეკუთვნება *Myoviridae*-ს ოჯახს.
4) ჩვენ მიერ ჩატარებულმა მოდელურმა ცდებმა გამოავლინა ΦM.4 ბაქტერიოფაგის გამოყენების ეფექტურობა *Escherichia coli*-ის უჯრედებით დასნებოვნებული მინის ზედაპირების დეკონტამინაციისათვის.
5) ფაგის ეფექტურობა ექსპოზიციის დროზეა დამოკიდებული და ექსპოზიციის ყველაზე ოპტიმალურ დროის ინტერვალად 15 წუთი შეიძლება ჩავთალოთ, როდესაც ბაქტერიის საწყისმა ტიტრმა 3 ლოგარითმით დაიკლო.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. Scallan E., Hoekstra R.M., Angulo F.J., Tauxe R.V., Widdowson M.A., Roy S.L., Jones J.L., Griffin P.M. Emerging Infectious Diseases; 2011
2. Makalatia, K., Kakabadze, E., Bakuradze, N., Grdzelishvili, N., Natroshvili, G., & Chanishvili, N. (2018). Decontamination Effect of the Eggshells with the Mixture of Salmonella and E. Coli Specific Phages. Bull. Georg. Natl. Acad. Sci, 12(1).
3. Feng, Peter, et al., (2002). Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria, Bacterioplogical Analytical Manual (8th Ed.).
4. Vogt RL, Dippold L (2005). Escherichia coli O157:H7 outbreak associated with consumption
   of ground beef, June-July 2002. Public Health Reports.
5. Покровский В.Н., Поздеев О.К. (1998) Медицинская микробиология, Геотар, Моск;
6. დ.ჩიკვილაძე, დ.მეტრეველი (2016) სამედიცინო მიკრობიოლოგია, თბილისი.
7. Ramírez-Castillo, Flor Y., et al. "An evaluation of multidrug-resistant Escherichia coli isolates in urinary tract infections from Aguascalientes, Mexico: cross-sectional study." Annals of clinical microbiology and antimicrobials 17.1 (2018): 34
8. CDC. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States. Annual Report, 2013
9. WHO. Food Safety. Fact sheet №399. 2015
10. Frank, Christina, et al. "Epidemic profile of Shiga-toxin–producing Escherichia coli O104: H4 outbreak in Germany." New England Journal of Medicine 365.19 (2011): 1771-1780.
11. Gobin, M., Hawker, J., Cleary, P., Inns, T., Gardiner, D., Mikhail, A., ... & Roddick, I. (2018). National outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157: H7 linked to mixed salad leaves, United Kingdom, 2016. Eurosurveillance, 23(18).
12. Genomic Comparison of Escherichia coli O104:H4 Isolates from 2009 and 2011 Reveals Plasmid, and Prophage Heterogeneity, Includin Shiga Toxin Encoding Phage stx2. – Sanaa A. Ahmed, Joy Awosika, Carson Baldwin, Kimberly A. Bishop-Lilly, Biswajit Biswas, .. PloS One, 2012, 7(11) e48228
13. NCDC, აპრილი #4, ტომი 21, 2017
14. Tam C.C., O'Brien S.J., Tompkins D.S., Bolton F.J., Berry L., Dodds J., Choudhury D., Halstead F., Iturriza-Gómara M., Mather K., Rait G., Ridge A., Rodrigues L.C., Wain J., Wood B., Gray J.J. Clin. Infect. Dis. 54(9), 2012
15. Kariuki S., Revathi G., Kariuki N., Kiiru J., Mwituria J., Muyodi J., Githinji J.W., Kagendo D., Munyalo A., Hart C.A. Journal of Med. Microbiol, 55 (Pt 5), 2006
16. Oliver S.P., Jayarao B.M., Almeida R.A. Foodborne Pathog. Dis. 2(2), 2005
17. Bergogne- Berezin E - Impact ecologiques de l'antibiotherapie. Plase des micro-organismes de substitution dans le controle des diarrheas et colites associees aux antibiotiques. 1995
18. D. S. Lee, H.-S. Choe, S. J. Lee et al., "Antimicrobial susceptibility pattern and epidemiology of female urinary tract infections in South Korea, 2010-2011," Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 57, no. 11, pp. 5384–5393, 2013
19. Lee, Dong Sup, Seung-Ju Lee, and Hyun-Sop Choe. "Community-Acquired Urinary Tract Infection by Escherichia coli in the Era of Antibiotic Resistance." BioMed research international 2018 (2018)

20. F. Baquero, “Low-level antibacterial resistance: A gateway to clinical resistance,” Drug Resistance Updates, vol. 4, no. 2, pp. 93–105, 2001
21. G. A. Jacoby and L. S. Munoz-Price, “The new ß-lactamases,” The New England Journal of Medicine, vol. 352, no. 4, pp. 380–391, 2005.
22. D. L. Paterson, W.-C. Ko, A. Von Gottberg et al., “International Prospective Study of Klebsiella pneumoniae Bacteremia: Implications of Extended-Spectrum β-Lactamase Production in Nosocomial Infections,” Annals of Internal Medicine, vol. 140, no. 1, pp. 26–32, 2004.
23. J. W. Harrison and T. A. Svec, “The beginning of the end of the antibiotic era? Part I. The problem: Abuse of the “miracle drugs”,” Quintessence International, vol. 29, no. 3, pp. 151–162, 1998
24. წულაია ქ. ახალი სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის დახასიათება და მისი დეკონტამინაციის უნარის შესწავლა სურსათის უვნებლობის კუთხით.2017
25. Bacteriophages : biology and applications. Elizabeth Kutter, Alexander Sulakvelidze.p. cm. Boca Raton London New York Washington, D.C
26. Phage approved in food, why not as a therapeutic? Wessam A Sarhan, Azzazy HM. 2014
27. Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J.G. Antimicrob. Agents Chemother. 2001
28. Drulis-Kawa Z., Weber-Dabrowska B., Lusiak-Szelachowska M., Doroszkiewicz W. Polish Journal of Microbiology. 2005
29. Maukonen J., Mättö J., Wirtanen G., Raaska L., Mattila-Sandholm T., Saarela M. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnol. 2003
30. Sulakvelidze A. and Pasternack G. Bacteriophages in the Control of Food-and Waterborne Pathogens, Sabour, P.M. and M.W. Griffiths (Eds.). ASM Press, Washington, DC., ISBN: 9781555815028. 2010
31. Kutateladze M., Adamia R. Trends Biotechnol. vol. 28, № 12. 2010
32. Wittebole X., De Roock S., Opal S.M.Virulence. vol. 5. № 1. 2014
33. http://epidbiomed-d.ru/catalog/pitatelnie-sredi/agar-endo-grm
34. https://microbeonline.com/salmonella-shigella-ss-agar-composition-principle-procedure-results/
35. ხუხუნაიშვილი 2015