

О.В.Маркина, А.И.Шелохович, А.Н.Терентьев, О.А.Татаренко, С.О.Водопьянов, А.Б.Мазрухо, Л.Д.Македонова, Д.И.Каминский, И.С.Шестиалтынова

СТАБИЛИЗИРОВАННЫЕ ФАЗОВЫЕ ВАРИАНТЫ *VIBRIO CHOLERAЕ* EL TOR P-18895

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Получены стабилизированные фазовые варианты *V. cholerae* El Tor P-18895 (О- и ругозные колонии) с частотой ревертирования к исходному ST-фенотипу не более 10 %. Идентичность их происхождения подтверждена с помощью VNTR-анализа. Оценена их активность в некоторых диагностических тестах: реакция агглютинации, чувствительность к диагностическим бактериофагам, характер роста на плотных питательных средах. Стабилизированные варианты *V. cholerae* El Tor P-18895 могут использоваться в дальнейших исследованиях, касающихся особенностей формирования биопленок на различных поверхностях, изучения устойчивости бактерий к факторам окружающей среды, а также в совершенствовании методов выделения фазовых вариантов холерных вибрионов из внешней среды

Ключевые слова: *V. cholerae* El Tor, фазовые варианты, диагностика.

O.V.Markina, A.I.Shelokhovich, A.N.Terent'ev, O.A.Tatarenko, S.O.Vodop'yarov, A.B.Mazrukho, L.D.Makedonova, D.I.Kaminsky, I.S.Shestialtynova

Stabilized Phase Variants of *Vibrio cholerae* El Tor P-18895

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Produced have been stabilized phase variants of *V. cholerae* El Tor P-18895 (O- and rugose colonies). Frequency of reversion to initial ST-phenotype does not exceed 10 %. Identity of the origin is verified in VNTR. Evaluated has also been their activity by means of the following diagnostic tests: agglutination assay, sensitivity to diagnostic bacteriophages test, and studies of growth behavior in solid nutrient media. Stabilized variants of *V. cholerae* El Tor P-18895 can be deployed for further investigations of peculiarities of biofilm formation on various surfaces, bacterial resistance to environmental factors, and for the enhancement of methods for isolation of cholera vibrio variants from ambient environment.

Key words: *V. cholerae* El Tor, phase variants, diagnostics.

Способность к фазовым переходам является показателем адаптационного потенциала различных микроорганизмов, в том числе и холерных вибрионов. Фазовым вариациям могут подвергаться различные поверхностные структуры бактериальной клетки, и одним из примеров является формирование ругозного фенотипа за счет продукции экзополисахарида (ЭПС). Продуцируя его в большом количестве, холерные вибрионы образуют биопленки, в составе которых они устойчивы к ультрафиолету (УФ), тепловому, осмотическому или окислительному стрессу [2, 7, 8], а также к захвату простейшими [10]. Кроме того, установлено, что существует корреляция между способностью вибрионов к фазовым вариациям и их патогенностью [2, 3]. В то же время в отечественной литературе данные относительно характера роста таких штаммов на питательных средах, их чувствительности к антибактериальным препаратам, оценки способности взаимодействовать со специфическими антителами и диагностическими бактериофагами малочисленны [2, 6]. Однако они необходимы для проведения эффективной лабораторной диагностики холеры. Кроме того, до сих пор не установлено, какие факторы окружающей среды влияют на степень выраженности ругозного фенотипа. Таким образом, изучение атипичных штаммов холерных вибрионов может внести существенный вклад в повышение эф-

фективности мониторинга внешней среды. А наличие вариантов штаммов, отличающихся стабильной продукцией ЭПС, способствовало бы проведению данных исследований.

Целью настоящей работы явилось получение и изучение стабилизированных фазовых вариантов *V. cholerae* El Tor.

Материалы и методы

В работе использованы токсигенные штаммы *V. cholerae* El Tor P-18895, P-4696, *V. cholerae classical* P-1391 (ctx⁺, tcp⁺, Hly⁻) и атоксигенные штаммы *V. cholerae* El Tor P-18943, P-18960 (ctx⁻, tcp⁻, Hly⁺) из музея Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института, ранее охарактеризованные как продуценты ЭПС [6]. Для получения ругозных колоний использовали среду М9 (рН 9,0) следующего состава: Na₂HPO₄ – 6 г/л, KH₂PO₄ – 3 г/л, NaCl – 0,5 г/л, NH₄Cl – 1 г/л, CaCl₂·2H₂O – 0,01 г/л, MgSO₄·7H₂O – 0,49 г/л, LiCl – 0,01 г/л, казामीновые кислоты – 5 г/л, глюкоза – 0,1 г/л, манноза – 1 г/л, вода дистиллированная. В 5 мл среды М9 готовили суспензию клеток холерных вибрионов до конечной концентрации 10⁶ КОЕ/мл и инкубировали две недели при комнатной температуре (25 °С), после этого высевали на агар Мартена (рН 7,7). В качестве селективного агента при

получении ругозных колоний использовали гидрохинон (пара-дигидроксibenзол, бензол-1,4-диол) (Serva). Полученные гладкие прозрачные колонии нами были обозначены как ST-колонии (от англ. – smooth, translucent), гладкие мутные – О-колонии (от англ. opaque), а мутные складчатые – ругозные. Диссоциативный спектр бактериальной популяции определяли при рас­се­ве 0,1 мл культур на агаризованные среды. Индекс диссоциации популяции определяли как долю (%) колоний определенного морфотипа к общему числу колоний. Стабильность выделенных клонов определяли по сохранению ими фенотипических признаков не менее чем 3 последовательных пассажей на агаризованной среде.

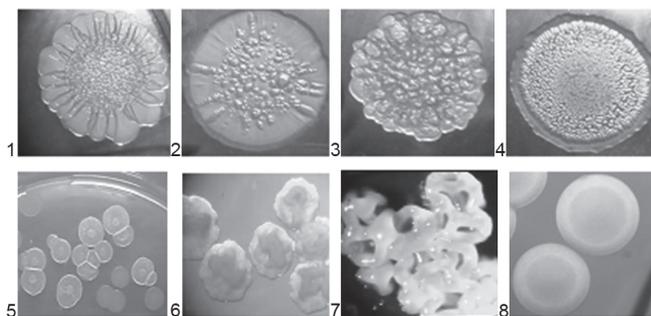
Для подтверждения идентичности происхождения ругозных, ST- и О-вариантов *V. cholerae* использовали ПЦР. ДНК хромосом выделяли путем кипячения в дистиллированной воде микробных взвесей культур, выращенных на агаре Мартена (рН 7,7) при 37 °С в течение 1 сут. Распределение вариабельных tandemных повторов в генетических локусах VcA (TGCTGT)_n, VcB (ACAAGA)_n, VcC (AACAGA)_n, VcD (GACCCTA)_n, VCG (GATAATCCA)_n, VcI (TTAACA)_n, VcL (GAAATCA)_n изучали в VNTR-анализе с использованием локус-специфических праймеров [5]. Кроме того, у ругозных вариантов токсигенных штаммов определяли наличие генов *ctx*, *toxR*, *tcp* и *zot*. Окрашивание ЭПС проводили конго красным [11].

Постановку развернутой реакции агглютинации (РАО) и слайд-агглютинации на стекле проводили, используя сыворотки О1 (сер. 69, титр 1:3200, РосНИПЧИ «Микроб», Саратов) и RO (сер. 67, 1:800, РосНИПЧИ «Микроб», Саратов), а для оценки чувствительности к фагам применяли диагностические бактериофаги: classical, El Tor, *ctx*⁺ и *ctx*⁻ (РосНИПЧИ «Микроб», Саратов). Для изучения особенностей роста холерных вибрионов использовали стандартные плотные среды: LB (рН 7,3), Мартена (рН 7,7) и TCBS (рН 8,6).

Фотографирование колоний вибрионов проводили с помощью стереомикроскопа МБС-10 (Россия).

Результаты и обсуждение

Ругозные варианты *Vibrio cholerae*, как правило, получают при длительном культивировании на среде LB, в пептонной воде с 0,05 % цитрата железа, на минимальной питательной среде М9 и др. [2, 6], поэтому клетки бактерий вносили в среду М9 (рН 9,0) и через 2 недели высевали на агар LB и Мартена (рН 7,7), рисунок. В качестве контроля эти же штаммы в течение 2 недель культивировали на тех же средах при 37 °С без предварительного выдерживания в среде М9. В результате эксперимента на агаре LB наблюдали формирование колоний только исходного ST-фенотипа, тогда как на агаре Мартена наблюдали расщепление популяции *V. cholerae* El Tor на два типа колоний: ST-колонии и ругозные, при этом частота появле-



Морфология колоний штаммов *V. cholerae* El Tor:

P-18895 (1), P-4696 (2), P-18960 (3), P-18943 (4), высеянных из среды М9 на агар Мартена (37 °С). Расщепление популяции *V. cholerae* El Tor P-18895 на два типа колоний: ST-вариант и ругозные (5). Вид ругозных колоний, выращенных при 23 °С (6, 7), О-колонии *V. cholerae* El Tor P-18895 (8)

ния ругозных колоний у штаммов *V. cholerae* El Tor P-18895 и P-18943 составила примерно (70±6,6) %, штаммов *V. cholerae* El Tor P-4696 и *V. cholerae* El Tor P-18960 – (95±3,3) и (55±3,3) % соответственно. У штамма *V. cholerae* classical P-1391 ругозный фенотип не формировался. Ревертирование штаммов *V. cholerae* El Tor к исходному гладкому фенотипу индуцировали путем добавления в агар Мартена сахарозы в концентрациях 0,5–1,0 % или путем их посева на стандартную плотную среду LB. В контрольных опытах на агаре LB (без выдерживания в среде М9) расщепления штаммов не наблюдали, в отличие от культивирования на агаре Мартена, где диссоциация штаммов составила около 20 %.

Наилучшей способностью формировать складчатые колонии характеризовался токсигенный штамм *V. cholerae* El Tor P-18895, который был использован в дальнейших экспериментах. Для селекции его ругозных вариантов использовали агар Мартена с добавлением гидрохинона в различных концентрациях – от 10 до 100 мкг/мл ($\approx 10^{-4}$ – 10^{-3} моль/л), который, как известно, в концентрациях менее $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л обладает слабыми проокислительными свойствами [1]. Очевидно, что на этой питательной среде вырастали только вибрионы, способные защищаться от воздействия «мягкого» окислительного стресса. В результате через 2 месяца с начала культивирования были получены колонии *V. cholerae* El Tor P-18895 с выраженной складчатостью, которые при последующих пересевах на агаре Мартена уже без гидрохинона при 37 °С сохраняли свою морфологию. Понижение температуры до 19 и 23 °С (условия термостата) приводило к тому, что через 24 ч после посева колонии были мелкими и без складок. Однако уже через 48 ч они становились рельефными объемными. Таким образом, на морфологию ругозных колоний *V. cholerae* El Tor P-18895 критически влияла температура выращивания: при 37 °С формировались колонии с плотной складчатой поверхностью, тогда как колонии, выращенные при температурах 19 и 23 °С, имели объемную рельефную структуру. Возможно, такая морфология ругозных колоний связана с присутствием в них ЭПС, структурированно-

Характеристика стабилизированных вариантов *V. cholerae* El Tor P-18895

Фенотип колоний <i>V. cholerae</i> El Tor P-18895, выращенных на плотных средах			РАО с сыворотками		Чувствительность к бактериофагам		
Мартена	LB	TCBS	O1	RO	El Tor	Classical	ctx ⁺
Гладкие мутные (О-колонии)	Гладкие прозрачные	Желтые гладкие	1:1600	-	++/+++	-	-
Складчатые мутные (ругозные)	Гладкие прозрачные	Желтые гладкие	1:400	-	+	-	-
Гладкие прозрачные (ST-колонии)	Гладкие прозрачные	Желтые гладкие	1:1600	-	++/+++	-	-

го различными белками [2]. В связи с этим клетки ругозной колонии были окрашены конго красным. В результате окрашивания карболовым фуксином вибрионы имели насыщенный пурпурно-красный цвет, а матрикс, окрашенный конго красным, – оранжево-розовый, таким образом, в колонии присутствовал экзополисахарид.

ST-вариант штамма *V. cholerae* El Tor P-18895, отобранный при первичном высеве из среды М9, сохранял свою морфологию при росте как при 37 °С, так и при 19 и 23 °С. Однако при пересеве на агар Мартена с гидрохиноном колонии становились плотными непрозрачными – О-колонии. Аналогично ругозным примерно через 5–7 дней роста вокруг О-колоний в 5–10 % случаев формировался прозрачный слой бактериальных клеток, при пересеве которых получали колонии только ST-фенотипа.

Полученные стабилизированные фазовые варианты *V. cholerae* El Tor P-18895 были испытаны в некоторых диагностических тестах, для сравнения использовали и другие штаммы холерных вибрионов. Как показали результаты, исходный штамм *V. cholerae* El Tor P-18895 оказался чувствительным к бактериофагам El Tor, при этом ругозные колонии были более устойчивыми к ним. В зоне лизиса ругозного варианта штамма *V. cholerae* El Tor P-18960 отмечено появление множества зон вторичного роста. Одновременно ругозный вариант штамма *V. cholerae* El Tor P-4696 был чувствителен к бактериофагам. Следовательно, нельзя однозначно сказать, что повышенная устойчивость ругозного варианта *V. cholerae* El Tor P-18895 к фагам может быть связана с наличием на поверхности клеток полисахаридного слоя. Часто фагорезистентность бактерий связывают с лизогенией, нарушением проникновения нуклеиновой кислоты фага в бактерию, возможно также присутствие в структуре ругозных колоний *V. cholerae* El Tor P-18895 соединений, непосредственно препятствующих связыванию фагов. Нельзя исключить и вероятность того, что фазовый переход в ругозное состояние сопровождается утратой специфических для фагов рецепторов, что, может быть, связано с изменением структуры бактериального липополисахарида [9].

Учитывая, что ругозные варианты обладают большей устойчивостью к действию сывороток, комплемента и других факторов, измененные и исходные ST-варианты *V. cholerae* El Tor P-18943, P-18960, P-18895, P-4696, P-1391, выращенные на агаре Мартена при 23 °С, были охарактеризованы в реакции агглютинации с диагностическими сыворотками O1 и RO. В результате все исходные вари-

анты *V. cholerae* агглютинировались сывороткой O1 и не вступали в реакцию с сывороткой RO в РАО. В то же время все ругозные варианты *V. cholerae* El Tor характеризовались более низкой активностью в РАО, чем исходные, возможно за счет ЭПС, находящегося на поверхности клеток.

Для оценки особенностей роста ругозные варианты *V. cholerae* El Tor высевали на селективно-дифференциальную среду TCBS [4]. Согласно полученным результатам ярко-желтые колонии холерных вибрионов появлялись уже через 18 ч, что свидетельствует о возможности их выявления на данной среде (таблица).

Для подтверждения идентичности происхождения ругозных, О- и ST-вариантов *V. cholerae* El Tor P-18895 был проведен VNTR-анализ с помощью локус-специфических праймеров. В результате все три варианта данного штамма показали идентичный VNTR-профиль: VcA 19, VcB 16, VcI10, VcD4, VcG5, VcLa. Кроме того, было установлено наличие генов *ctx*, *toxR*, *tcp* и *zot* у ругозного и О-вариантов штамма *V. cholerae* El Tor P-18895, что свидетельствует об их эпидемической опасности.

Таким образом, получены стабилизированные фазовые варианты штамма *V. cholerae* El Tor P-18895: ругозный, О- и ST-варианты. Частота ревертирования первых двух к исходному ST-фенотипу составила не более 5–10 %. Полученные варианты могут быть использованы в дальнейших исследованиях, касающихся особенностей формирования биопленок на различных поверхностях, для оценки устойчивости бактерий к факторам окружающей среды, в том числе и к антибиотикам, а также в совершенствовании методов выделения фазовых вариантов холерных вибрионов из внешней среды.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волобой Н. Л., Зверев Я.Ф., Брюханов В.М., Галалаева О.С., Замятина С.В., Зяблова О.Н. Антиоксидантный и прооксидантные эффекты арбутина и гидрохинона в эксперименте *in vitro*. *Бюл. сибирской медицины*. 2011; 5:41–4
2. Заднова С.П., Смирнова Н.И. Роль внеклеточного экзополисахарида в адаптации возбудителя холеры во внешней среде. *Пробл. особо опасных инф.* 2010; 105:13–9.
3. Исаев Н.Д., Лозовский Ю.В., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Популяционная неоднородность природных штаммов *Vibrio cholerae* классического биовара: координированное изменение морфологии колоний, подвижности, токсигенности и ферментативных свойств. *Пробл. особо опасных инф.* 2005; 1(89):43–6.
4. Лабораторная диагностика холеры. Методические указания. МУК 4.2.2218-07
5. Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С., Ломов Ю.М., Романова Л.В., Водопьянов С.О., Сучков И.Ю., Мишанькин

М.Б., Черепакхина И.Я., Дуванова О.В., Шишияну М.В. Ретроспективный VNTR-анализ генотипов штаммов *Vibrio cholerae* O1, выделенных на территории Ростовской области в годы VII пандемии холеры. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2004; 4:28–33.

6. Татаренко О.А., Алексеева Л.П., Телесманич Н.Р., Шестиалтынова И.С., Чемисова О.С., Маркина О.В. Влияние некоторых факторов на формирование биопленки токсигенными и атоксигенными холерными вибрионами эльтор. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2012; 5:36–40.

7. Johnson L.R.: Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *J. Theor. Biol.* 2008; 251(1):24–34.

8. van der Woude M.W., Bäuml A.J. Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17(3):581–611.

9. Preston A., Maskell D.J. Molecular genetics and role in infection of environmentally regulated lipopolysaccharide expression. *Int. J. Med. Microbiol.* 2002; 292(1):7–15.

10. Sandstrom G., Saeed A., Abd H. *Acanthamoeba polyphaga* is a possible host for *Vibrio cholerae* in aquatic environments. *Exp. Parasitol.* 2010; 126(1):65–8.

11. Yi K., Rasmussen A.W., Gudlavalleti S.K., Stephens D.S., Stojiljkovic I. Biofilm Formation by *Neisseria meningitidis*. *Inf. Immun.* 2004; 72(10):6132–8.

References

1. Voloboy N.L., Zverev Ya.F., Bryukhanov V.M., Talalaeva O.S., Zamyatina S.V., Zyablova O.N. [Antioxidant and pro-oxidant effects of arbutin and hydroquinone *in vitro*]. *Byul. Sibir. Meditsiny.* 2011; 5:41–4.

2. Zadnova S.P., Smirnova N.I. [The role of extracellular exopolysaccharide in cholera agent adaptation in the environment]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2010; 105:13–9.

3. Issayev N.D., Lozovsky Yu.V., Zadnova S.P., Smirnova N.I. [Populational heterogeneity of natural *Vibrio cholerae* strains of classical biovariant: coordinated changes in colony morphology, motility, toxigenicity, and enzymatic characteristics]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2005; 89:43–6.

4. [Laboratory diagnostics of cholera. Methodological regulations]. MR 4.2.2218-07. М.; 2007.

5. Mishan'kin B.N., Vodop'yanov A.S., Lomov Yu.M., Romanova L.V., Vodop'yanov S.O., Suchkov I.Yu., Mishan'kin M.B., Cherepakchina I.Ya., Duvanova O.V., Shishiyanu M.V. [Retrospective VNTR-analysis of *Vibrio cholerae* O1 strain genotypes, isolated in the territory of the Rostov Region during the VII pandemic of cholera]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2004; 4:28–33.

6. Tatarenko O.A., Alekseeva L.P., Telesmanich N.R., Shestialtynova I.S., Chemisova O.S., Markina O.V. [Impact of certain factors on biofilm formation by toxigenic and atoxigenic cholera vibrios El Tor]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2012; 5:36–40.

7. Johnson L.R.: Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *J. Theor. Biol.* 2008; 251(1):24–34.

8. van der Woude M.W., Bäuml A.J. Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17(3):581–611.

9. Preston A., Maskell D.J. Molecular genetics and role in infection of environmentally regulated lipopolysaccharide expression. *Int. J. Med. Microbiol.* 2002; 292(1):7–15.

10. Sandstrom G., Saeed A., Abd H. *Acanthamoeba polyphaga* is a possible host for *Vibrio cholerae* in aquatic environments. *Exp. Parasitol.* 2010; 126(1):65–8.

11. Yi K., Rasmussen A.W., Gudlavalleti S.K., Stephens D.S., Stojiljkovic I. Biofilm Formation by *Neisseria meningitidis*. *Inf. Immun.* 2004; 72(10):6132–8.

Authors:

Markina O.V., Shelokhovich A.I., Terent'ev A.N., Tatarenko O.A., Vodop'yanov S.O., Mazrukho A.B., Makedonova L.D., Kaminsky D.I., Shestialtynova I.S. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru

Об авторах:

Маркина О.В., Шелохович А.И., Терентьев А.Н., Татаренко О.А., Водопьянов С.О., Мазрухо А.Б., Македонова Л.Д., Каминский Д.И., Шестиалтынова И.С. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru

Поступила 07.07.14.