

М.В.Овчинникова, Г.И.Коровкина, И.В.Грачева, Т.В.Аленкина

ЛИЗОГЕННАЯ СИСТЕМА НЕЭПИДЕМИЧЕСКИХ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ БИОВАРА ЭЛЬТОР, РЕЗИСТЕНТНЫХ К ДИАГНОСТИЧЕСКОМУ БАКТЕРИОФАГУ СТХ⁻

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Изучены эпидемически неопасные штаммы *V. cholerae* O1 биовара эльтор из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб», которые на момент выделения были не чувствительны к бактериофагу диагностическому холерному эльтор ctx^- . Приведены результаты изучения одной из причин фагорезистентности данных культур с помощью специализированной тест-системы, состоящей из индикаторных штаммов. Выявлено носительство умеренных фагов в 88,0 % исследуемых культур.

Ключевые слова: неэпидемические холерные вибрионы эльтор, лизогения, умеренные фаги, индикаторные штаммы.

M.V.Ovchinnikova, G.I.Korovkina, I.V.Gracheva, T.V.Alenkina

Lysogenic System of Non-Epidemic Cholera Vibrio El Tor, Resistant to Diagnostic Bacteriophage CTX⁻

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Studied are non-epidemic strains of *V. cholerae* O1 biovar El Tor taken from the National collection of pathogenic bacteria lodged at the Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", which were not sensible to diagnostic cholera bacteriophage El Tor ctx^- at the time of isolation. Represented are the results of investigation regarding a cause of a phage-resistance of these cultures using specialized test-system consisting of indicator strains. Identified is the carriage of temperate phages among 88,0 % of the cultures examined.

Key words: non-epidemic cholera vibrios El Tor, lysogenicity, temperate phage, indicator strains.

За последние годы на территории Российской Федерации и в некоторых государствах СНГ из различных объектов внешней среды периодически выделяются эпидемически неопасные штаммы холерных вибрионов, у которых, по данным генетических исследований, отсутствует ген холерного токсина ctx АВ. В то же время неэпидемичность этих штаммов не подтверждается чувствительностью к диагностическому бактериофагу ctx^- .

Значение показателя специфической активности фага ctx^- зависит от места выделения культур, что, по мнению многих исследователей, может быть связано с индивидуальными особенностями штаммов, циркулирующих на различных территориях, наличием у них группо- и штаммоспецифических систем рестрикции-модификации, гомоиммунных умеренных фагов и другими факторами [1].

Умеренные фаги, тесно связаны с диссоциацией бактерий. Накопление умеренного фага в культуре приводит к изменению клеточного состава микробной популяции в сторону увеличения в ней доли шероховатых и других измененных форм, обладающих фагорезистентностью в силу различных причин [4, 5, 6, 7].

Цель работы – выявление у холерных вибрионов биовара эльтор носительства гомоиммунных умеренных фагов с помощью специализированной индикаторной системы.

Материалы и методы

Изучено 70 штаммов *V. cholerae* eltor из Государственной коллекции патогенных бактерий

РосНИПЧИ «Микроб», выделенных в различных регионах Российской Федерации из объектов внешней среды за период с 1992 по 2009 год. По паспортным данным, указанные штаммы не содержали ген CTX АВ и имели разный статус чувствительности к диагностическому бактериофагу ctx^- . В опыт по определению умеренных фагов в культуре были отобраны 25 фагоустойчивых штаммов *V. cholerae* eltor с типичными свойствами (таблица).

Изучение культуральных, морфологических, биохимических, серологических свойств тестируемых штаммов проводили по общепринятым методикам, изложенным в [2]. Посевы культур осуществляли на жидких и плотных питательных средах: 1 % пептонная вода и бульон Мартена, с содержанием пептона 2,2 %; 2 % агар Мартена, с содержанием аминного азота 80–90 г/л, рН всех сред составлял $7,6 \pm 0,1$.

Для проведения исследований использовали фаг ctx^- из комплекта коммерческого препарата «Бактериофаги диагностические холерные эльтор ctx^+ и ctx^- , раствор для диагностических целей» сер. 16.

Пробу с фагом ctx^- ставили методом агаровых слоев по Грациа. После застывания агара с культурой на его поверхность бактериологической петлей наносили каплю фага ctx^- , чашки инкубировали 18–20 ч при температуре 37 °С. За положительный результат принимали любую степень лизиса. Определение лизогенности штаммов холерных вибрионов проводили в агаровой культуре. Для этого 24-часовую агаровую культуру исследуемого штамма петлей наносили на газон индикаторного штамма в слое мягкого агара. На одной чашке Петри испытывали 10 штаммов. Через 18–20 ч инкубирования при температуре 37 °С

Краткая биохимическая характеристика фагорезистентных штаммов *V. cholerae* eltor, выделенных из объектов внешней среды

Штамм	Место выделения	Гемолиз по Грейгу	Чувствительность к фагу ctx [*]	Наличие гомоиммунного умеренного фага
M-1280	Астрахань	+	-	+
M-1337	Астрахань	+	-	+
M-1427	Астрахань	+	-	+
M-1414	Республика Калмыкия	Неполный гемолиз	-	-
M-1433	Республика Калмыкия	Неполный гемолиз	-	+
M-1443	Республика Калмыкия	+	±	+
122	Республика Калмыкия	+	-	+
M-1417	Пенза	+	-	+
M-1419	Пермь	+	-	+
M-1315	Пермь	Неполный гемолиз	-	+
M-1418	Пермь	+	-	+
M-1425	Пермь	+	+	+
M-1388	Саратов	+	±	+
M-1438	Самара	+	-	+
M-1383	Республика Татарстан	+	±	+
M-1332	Челябинск	Неполный гемолиз	-	+
M-1385	Астраханская обл.	+	±	+
M-1379	Республика Татарстан	+	-	+
M-1314	Республика Калмыкия	+	-	-
M-1432	Республика Калмыкия	+	±	+
M-1434	Республика Калмыкия	+	-	-
M-1444	Республика Калмыкия	+	-	+
95	Республика Калмыкия	+	-	+
M-1334	Курган	+	-	+
M-1426	Пермская обл.	+	-	+

Примечание: * – проба с фагом ctx⁻; «-» – отрицательная, «±» – единичные негативные колонии или мутное литическое пятно, «+» – положительная.

на месте нанесения исследуемых штаммов формировались крупные колонии холерных вибрионов. При наличии в них умеренного фага вокруг колонии появлялась полупрозрачная зона лизиса за счет подавления фагом роста соответствующего индикаторного штамма. При отсутствии фага в тестируемых культурах, вокруг колоний наблюдался равномерный рост индикаторного штамма.

Результаты и обсуждение

Согласно методическим указаниям «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней» 4.2.2870-11 схема идентификации типичных культур *V. cholerae* O1 биовара эльтор включает оценку эпидзначимости холерных вибрионов по чувствительности к бактериофагам диагностическим холерным эльтор ctx⁺ и ctx⁻ и гемолитической активности по Грейгу.

Исследуемые культуры по различному статусу чувствительности к диагностическому бактериофагу ctx⁻, были разделены на три группы: чувствительные; слабочувствительные; фагорезистентные.

Следует отметить, что культуры, отнесенные к группам 2 и 3, по схеме оценки эпидзначимости штаммов *V. cholerae* eltor, указанной в инструкции по применению, бактериофагов, определялись как эпидемиологически неопасные и не требовали дополнительных исследований по обнаружению гена холерного токсина.

В ходе работы было обнаружено, что основное

количество изучаемых культур характеризовались типичными для холерных вибрионов культуральными, морфологическими, биохимическими и серологическими свойствами. Штаммы, отнесенные к группе фагочувствительных культур (группа 1), были стабильны по изученным свойствам и проявили высокую чувствительность к фагу ctx⁻.

Из всего числа изученных культур, входивших в группу фагорезистентных (группа 3) и слабочувствительных (группа 2), 5 штаммов (7 %) проявили нехарактерные для *V. cholerae* O1 биовара эльтор биохимические свойства – не ферментировали маннозу, декарбоскилировали аргинин, отмечался слабый рост в среде с полимиксином; 3 штамма (4,2 %) проявили нетипичную реакцию Фогэс-Проскауэра при типичных характерных биохимических свойствах. Известно, что атипичные формы холерных вибрионов значительно чаще встречаются среди культур, несущих умеренные фаги. На основании этого данные штаммы были исключены из дальнейших исследований. Интерес представляли культуры с характерными для холерных вибрионов свойствами.

Различные условия хранения и культивирования могут приводить к изменению соотношения фагорезистентных и фагочувствительных клеток в составе популяции и оказывать влияние на результат взаимодействия системы фаг-бактерия. В целях повышения или восстановления фаголизательности исследуемых культур, после проведения многократных пассажей на обогащенных по солевому составу питательных средах, удалось восстановить фагочувствительность

у 1 штамма из группы 3 и повысить фаголизисность у 8 штаммов из группы 2, что составило 0,7 и 11,5 % соответственно.

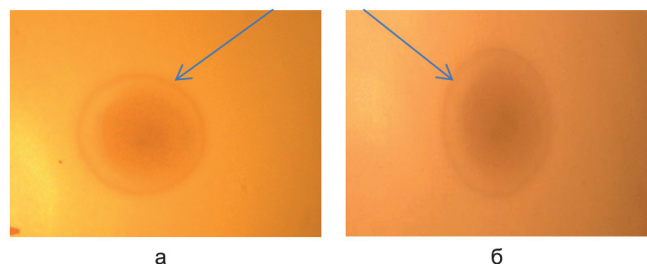
Специфический исход системы взаимодействия фаг-бактерия, на котором базируется фагодиагностика, контролируется наличием гомологии зон рецепции фага и клетки, наличием и соответствующей функциональной активностью у бактерии ферментативных систем, синтезирующих элементы паразита под контролем фаговой ДНК, существованием у клетки систем рестрикции-модификации различной специфичности.

Известно, что неэпидемические холерные вибрионы эльтор являются носителями умеренных фагов не менее трех серотипов – II, XI, XII (по отечественной классификации), которые по типу иммунитета представляют 11 иммунотипов. Тип фага является основной таксономической единицей внутри вида холерных фагов, который определяется строгой серологической специфичностью и характером литической активности в отношении биофаров и диссоциативных форм возбудителя холеры [2, 3]. Из этого следует, что различные внутривидовые группы холерных вибрионов являются носителями фагов определенных и строго специфичных для них иммунных типов, являющихся их генетической меткой. На этом основано применение метода профаготипирования, для дифференциации холерных вибрионов на биофары, классических вибрионов – на фаготипы, вибрионов эльтор – на эпидемические и неэпидемические. Для этих целей разработаны специализированные тест-системы, состоящие из индикаторных штаммов, обладающих специфической чувствительностью к умеренным фагам исследуемых культур [3].

Для определения умеренного фага в популяции фагорезистентных клеток использовали специализированную тест-систему [2, 3], предназначенную для выявления умеренных фагов неэпидемических холерных вибрионов биовара эльтор, состоящую из двух индикаторных штаммов *V. cholerae* eltor 379 и *V. cholerae* eltor 485, депонированных в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» под номерами КМ-12 и КМ-21 соответственно. Обнаружение умеренного фага достигается за счет высокой чувствительности каждой входящей в состав индикаторной системы тест-культуры к строго определенным группам умеренных фагов (III, V, VI иммунотипов) и резистентностью к фагам всех остальных групп.

При исследовании 25 культур фагорезистентных вибрионов с типичными морфологическими и биохимическими свойствами с помощью индикаторной тест-системы для определения лизогенности штаммов холерных вибрионов было обнаружено носительство умеренного фага у 22 штаммов, что составило 88 % из числа изученных культур. Реакция характеризовалась появлением полупрозрачной зоны лизиса вокруг выросших колоний испытуемых микроорганизмов (рисунок).

Таким образом, в результате проведенных исследований у изученных культур неэпидемических хо-



Полупрозрачная зона лизиса на газоне индикаторного штамма *V. cholerae* eltor 479 вокруг колоний изучаемых культур:

а – *V. cholerae* eltor M-1434; б – *V. cholerae* eltor M-1444

лерных вибрионов биовара эльтор выявлено лизогенное состояние, характеризующееся носительством гомоиммунного умеренного фага, что явилось причиной возникновения фагоустойчивых вариантов холерных вибрионов к бактериофагу *ctx*⁻. Дальнейшее более глубокое изучение явления лизогенности фагорезистентных культур может позволить адаптировать бактериофаг *ctx*⁻ к фагоустойчивым вариантам холерных вибрионов с целью повышения специфической активности данного препарата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д. и др. Фаги галофильных вибрионов и их применение. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1992; 9–10:5–7.
2. Мороз В.П., Остроумова Н.М., Коровкина Г.И. Штамм *V. cholerae* eltor 379, используемый для идентификации и диагностики холерных умеренных фагов тип 180. А.с. SU 1257087, опубл. 15.09.86.
3. Остроумова Н.М., Грачева И.В., Мороз В.П., Коровкина Г.И. Способ дифференциации эпидемических и неэпидемических холерных вибрионов эльтор, несущих гомоиммунные умеренные фаги III гетероиммунной категории. А.с. SU 1558987, опубл. 23.04.90.
4. Подосинникова Л.С., Либинзон А.Е., Шмеркевич Д.Л., Марамович А.С. О возможности реверсии вирулентности у холерных вибрионов. Микробиол. журн. 1983; 45(1):50–3.
5. Смирнова Н.И. Генетический контроль патогенности *V. cholerae*: умеренный нитевидный фаг СТХ, кодирующий токсин и «остров патогенности». Мол. генет. 1999; 4:3–11.
6. Basu S., Ghosh R.K. Identification and characterization of phage PS166 lysogens from non-O1, O139 strains of *Vibrio cholerae*. Med. Sci. Monit. 2009; 15(10):BR281–288.
7. Beilstein F., Dreiseikelmann B. Temperate bacteriophage PhiO18P from an *Aeromonas media* isolate: characterization and complete genome sequence. Virology. 2008; 373(1):25–9.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Kudryakova T.A., Makedonova L.D. et al. [Phages of halophilic vibrios and their application]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1992; 9–10:5–7.
2. Moroz V.P., Ostroumova N.M., Korovkina G.I. [The strain *V. cholerae* eltor 379 used for identification and diagnostics of cholera moderate phages, type 180]. A.s. SU 1257087.
3. Ostroumova N.M., Gracheva I.V., Moroz V.P., Korovkina G.I. [Method of differentiation between epidemic and non-epidemic cholera vibrios El Tor, which carry homoimmune moderate phages belonging to III heteroimmune category]. A.s. SU 1558987.
4. Podosinnikova L.S., Libinzon A.E., Shmerkevich D.L., Maramovich A.S. [Regarding the possibility of virulence reversion in cholera vibrios]. Mikrobiol. Zh. 1983; 45(1):50–3.
5. Smirnova N.I. [Genetic control of *V. cholerae* pathogenicity: moderate filamentous phage CTX, encoding toxin and “pathogenicity island”]. Mol. Gen. 1999; 4:3–11.

Authors:

Ovchinnikova M.V., Korovkina G.I., Gracheva I.V., Alenkina T.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrap@microbe.ru

Об авторах:

Овчинникова М.В., Коровкина Г.И., Грачева И.В., Аленикина Т.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Поступила 25.04.11.