

С.П.Заднова, Л.Ф.Ливанова, Ю.В.Лозовский, Н.И.Смирнова

ВЫЯВЛЕНИЕ В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА КЛОНОВ С РАЗЛИЧНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ФАКТОРОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ И ПЕРСИСТЕНЦИИ И ИХ ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

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

При изучении популяционного состава 41 природного штамма *Vibrio cholerae* эльтор биовара получены новые данные о популяционной гетерогенности природных штаммов. Обнаружено 12 штаммов, формирующих типичные прозрачные и атипичные мутные колонии. Среди последних выявлено 3 штамма, вариабельность морфологии которых коррелировала с изменением продукции экзополисахарида, холерного токсина, гемолизина, растворимой гемагглютинин/протеазы и подвижности. Одним из внешних сигналов, вызывающих координированное переключение продукции указанных факторов патогенности и персистенции является щелочная (pH 9,0) реакция среды. Возможно, переключение «прозрачные-мутные» варианты относится к одной из форм фазовых вариаций и необходимо *V. cholerae* для выживания в изменяющихся условиях внешней среды.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, гетерогенная популяция, координированное переключение экспрессии генов вирулентности и персистенции.

Vibrio cholerae – возбудитель холеры, тяжелого диарейного заболевания, относится к группе патогенных бактерий, которые в определенных условиях способны существовать не только в организме хозяина (человек), но и вне его – в воде открытых водоемов. Пребывание в таких разных экологических нишах приводит к появлению фенотипически и генотипически измененных форм. В настоящее время накоплен значительный фактический материал, свидетельствующий о том, что изменчивости подвергаются все основные фенотипические признаки холерного вибриона (морфология колоний, серологические, биохимические, антигенные и другие свойства) [1, 3, 6]. Появление измененных вариантов *V. cholerae* затрудняет идентификацию возбудителя. Фенотипическая изменчивость может быть следствием различной экспрессии генов патогенности и персистенции. В связи с этим большой интерес вызывает анализ вариантов, отличающихся от типичных форм одновременно по нескольким фенотипическим свойствам. Появление таких клонов может быть связано с согласованным изменением экспрессии ряда генов, что является одним из важных механизмов адаптации этого патогена к меняющимся условиям среды обитания.

В связи с вышеизложенным целью нашей работы состояла в выявлении штаммов *V. cholerae*, имеющих в популяции клоны с измененными морфологическими свойствами, и их фенотипический анализ.

Материалы и методы

В работе был использован 41 штамм *V. cholerae* биовара эльтор и 4 штамма *V. cholerae* классического биовара, полученные из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» (Саратов).

При определении подвижности клеток (Mot)

учитывали зону распространения колонии в мм у подвижных штаммов или отсутствие таковой у неподвижных при культивировании на полужидком 0,6 % LB-агаре. Продукцию растворимой гемагглютинин/протеазы (Hap) определяли путем посева культур на агар, содержащий 10 % обезжиренного молока, гемолитическую активность (Hly) – с использованием сред, содержащих эритроциты барана. Продукцию холерного токсина (CT) определяли иммуноферментным методом GM₁ ELISA [15] после выращивания холерных вибрионов классического биовара в LB бульоне (pH 7,2) при 30 °C на круговой качалке, а штаммов *V. cholerae* эльтор биовара в АК1 бульоне при 37 °C по схеме [12].

Для определения синтеза белков проводили электрофорез по методу U.K.Laemmli [13]. Для выявления экзополисахаридов гелевую пластину после проведения электрофореза окрашивали раствором, содержащим 20 % азотнокислого серебра, и проявляли в растворе с добавлением 0,05 % формалина [11, 13]. Токсигенность культур определяли по методу, описанному S.N.De и D.N.Chatterjee [4]. Формирование биопленки определяли, выращивая культуру в LB бульоне в полистироловых плашках (объем 200 мкл) [14].

Результаты и обсуждение

В ранее проведенной работе при изучении популяционного состава 76 природных штаммов *V. cholerae* классического биовара (возбудителя 5-й и 6-й пандемий азиатской холеры) было выявлено 20 штаммов, формирующих типичные прозрачные или Т (от англ. translucent) и атипичные мутные или О (от англ. opaque) колонии. Поскольку морфологические изменения могут сопровождаться изменением

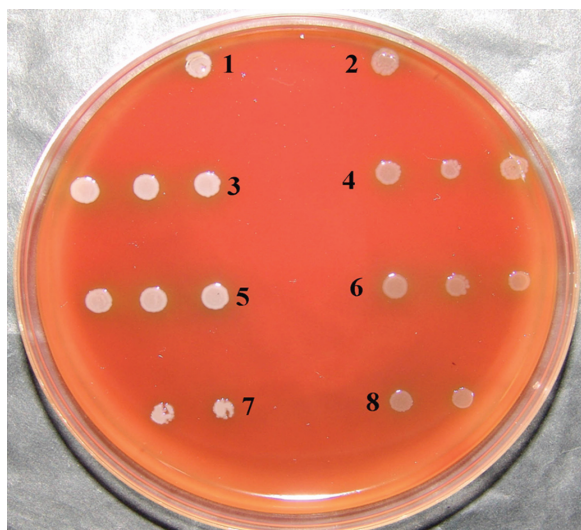


Рис. 1. Морфология колоний штаммов *V. cholerae* эльтор биовара:

1–2 – М-1085 эльтор биовара; 3–4 – М-1326 эльтор биовара;
5–6 – С-418 эльтор биовара; 7–8 – 9361 классического биовара
(контроль). Четные номера – варианты, формирующие прозрачные колонии; нечетные – мутные колонии

других признаков, включая и свойства, определяющие вирулентность популяции, у изогенных вариантов данных штаммов была изучена продукция ряда факторов патогенности и персистенции. При этом впервые было выявлено 5 штаммов, вариабельность морфологии которых коррелировала с изменением продукции экзополисахарида, холерного токсина, растворимой гемагглютинин/протеазы и подвижности [2]. Для выявления штаммов *V. cholerae* эльтор

биовара (возбудителя 7-й пандемии холеры), также содержащих клоны с одновременным изменением продукции нескольких факторов патогенности и персистенции, была изучена коллекция из 41 штамма, выделенных в разное время и на различных территориях России и стран зарубежья. В результате морфологического анализа выявлено 12 штаммов (или 30 % от числа изученных), в популяции которых, наряду с Т клонами, были обнаружены О варианты (рис. 1). При этом у 7 штаммов вариабельность морфологии колоний сопровождалась изменением продукции 2–4 факторов патогенности. Особое внимание привлекли штаммы *V. cholerae* М-1326, М-1085 и С-418, содержащие варианты, которые отличались друг от друга одновременно по четырем признакам. Т варианты синтезировали меньшее количество СТ, но больше Hly, Нар и были более подвижны, чем О варианты (таблица). Фенотип Т клонов был обозначен как Т Tox⁺Hly⁺Nar⁺Mot⁺, а О вариантов – как О Tox⁺Hly⁺Nar⁺Mot⁺. Полученные нами результаты относительно синтеза СТ и гемолизина у О вариантов эльтор вибрионов соответствовали данным литературы [7]. В то же время сведения о продукции Нар и подвижности у О вариантов эльтор вибрионов представлены нами впервые.

При сравнительном анализе Т и О вариантов холерных вибрионов разных биоваров было выявлено, что Т варианты классических вибрионов в отличие от Т вариантов холерных эльтор вибрионов были более токсигенны, продуцировали незначительное количество Нар и были менее подвижны (Т Tox⁺Nar⁺Mot⁺), чем О варианты, фенотип кото-

Фенотипические свойства двух морфологически различных вариантов *V. cholerae* эльтор и классического биоваров

Штаммы <i>V. cholerae</i>	Фенотип				
	Продукция СТ, мкг/мл	Продукция гемолизина, мм*	Подвижность, мм**	Продукция Нар, мм***	Морфология колоний
Холерные вибрионы биовара эльтор					
М-1085	0,01±0,006	3,0±0,4	5,0±0,5	5,0±0,5	Т
	0,17±0,005	1,0±0,4	2,0±0,3	3,0±0,5	О
С-418	0,02±0,005	3,0±0,2	10,0±0,4	3,0±0,3	Т
	0,06±0,02	1,0±0,5	1,0±0,3	2,0±0,4	О
М-1326	0,02±0,005	4,0±0,5	10,0±0,5	3,0±0,2	Т
	1,1±0,05	2,0±0,5	1,0±0,3	2,0±0,6	О
Холерные вибрионы классического биовара					
Дакка 35	13,0±1,0	0,0	2,0±0,2	2,0±0,5	Т
	0,03±0,02	0,0	8,0±0,5	6,0±0,5	О
9361	2,8±0,5	0,0	5,0±0,3	1,0±0,6	Т
	0,01±0,01	0,0	15,0±0,5	5,0±0,7	О
В-1307	3,0±0,5	0,0	3,0±0,5	3,0±0,2	Т
	0,02±0,01	0,0	10,0±0,5	6,0±0,4	О
49520	8,0±0,5	0,0	0,0	2,0±0,5	Т
	0,02±0,004	0,0	1,0±0,2	3,0±0,5	О

Примечания: * – в мм дана ширина зоны гемолиза; ** – в мм представлен радиус распространения макроколонии в полужидком агаре; *** – в мм дана зона просветления на агаре с 10 % молоком. Т – прозрачные, О – мутные колонии.

рых был $O\ Tox^+Har^{++}Mot^{++}$ (таблица). Гемолизин, как известно, вибрионы классического биовара не продуцируют.

Обнаруженный обратный характер связи между морфологией колоний и продукцией СТ, Har, а также подвижностью у холерных вибрионов двух биоваров, возможно, является следствием различной регуляции экспрессии данных факторов патогенности у *V. cholerae cholerae* и *V. cholerae eltor* [5, 9].

При определении токсигенности двух изогенных вариантов штаммов эльтор биовара (*V. cholerae* M-1085 и 1326) на модели лабораторных животных обнаружено, что Т и О клоны были токсигенны и обладали выраженным холерогенным эффектом, вызывая сильное растяжение и истончение стенок кишечника и накопление значительного количества жидкости внутри кишечника. Полученные нами данные не согласуются с данными литературы. Так, О варианты штамма *V. cholerae* 3083 Огава не отличались по токсигенности от Т клонов, *V. cholerae* C6709 обладали сниженной токсигенностью, в тоже время О варианты штамма *V. cholerae* C6707 так же, как и в нашем случае, были более токсигенными, чем Т колонии [7]. При сравнительном изучении токсигенности Т и О вариантов классического и эльтор вибрионов обнаружено, что изученные О варианты классического биовара были атоксигенными в отличие от Т клонов.

Присутствие в природных популяциях штаммов *V. cholerae* как классического, так и эльтор биовара О клонов ставит вопрос о том, какие клеточные структуры определяют непрозрачную морфологию колоний? Одной из возможных причин появления атипичных по морфологии колоний холерного вибриона может быть продукция белков внешней мембраны и/или экзополисахаридного слоя, кодируемого генами *vps* (от англ. *Vibrio polysaccharide synthesis*) [7, 17]. При изучении Т и О клонов штаммов классического биовара нами не выявлено различий по составу белков внешней мембраны, но впервые обнаружен экзополисахаридный слой (EPS) на поверхности клеток О вариантов [2]. При сравнительном анализе белкового спектра изогенных вариантов штаммов *V. cholerae* эльтор биовара нами также не обнаружено различий по составу белков внешней мембраны. В то же время при проведении гель-электрофореза и последующем окрашивании гелевых пластин ионами серебра у О вариантов эльтор вибрионов так же, как и у классических вибрионов, обнаружено большее количество экзополисахарида, который выявлялся в нижней части электрофореграммы (рис. 2). Полученные экспериментальные данные дают основание предположить, что различия в морфологии колоний у изогенных вариантов обусловлены слабой экспрессией *vps* генов у Т-клонов.

Механизм появления мутных О колоний, связанный с продукцией капсульного полисахарида, выполняющего защитную функцию, подробно изучен у родственных видов *V. parahaemolyticus* и *V. vulnificus*. Переключение «мутные-прозрачные» варианты у

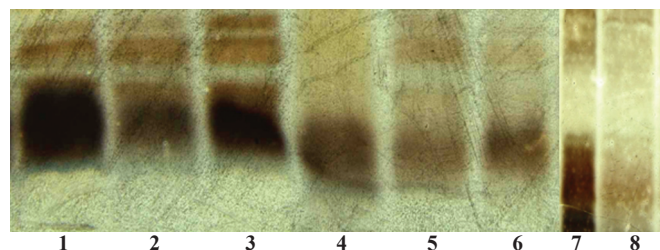


Рис. 2. Выявление экзополисахарида в штаммах *V. cholerae* эльтор биовара (окраска азотнокислым серебром):

1 – $O\ Tox^{++}Hly^+Har^+Mot^+$ вариант M-1326; 2 – $T\ Tox^{++}Hly^+Har^+Mot^+$ вариант M-1326; 3 – $O\ Tox^{++}Hly^+Har^+Mot^+$ вариант C-418; 4 – $T\ Tox^{++}Hly^+Har^+Mot^+$ вариант C-418; 5 – $T\ Tox^{++}Hly^+Har^+Mot^+$ вариант M-1085; 6 – $O\ Tox^{++}Hly^+Har^+Mot^+$ вариант M-1085; 7–8 (контроль) соответственно $O\ Tox^+Har^{++}Mot^{++}$ и $T\ Tox^{++}Har^+Mot^+$ клоны *V. cholerae* Дакка 35 классического биовара

данных микроорганизмов классифицируется как фазовые вариации. При изучении механизма фазовых вариаций было установлено влияние условий внешней среды (температуры, аэрации, времени инкубации), глобального регулятора сигма-фактора RpoS, фосфатазы. Обнаружены позитивный и негативный регуляторы продукции капсульного полисахарида [8, 10]. У *V. cholerae* также обнаружены фазовые вариации – «гладкие-ругозные». Появление ругозных колоний связано с продукцией на поверхности клеток значительного количества экзополисахарида. Наличие дополнительного экзополисахаридного слоя обеспечивает адаптивные преимущества клеткам и защищает их от повреждающих факторов внешней среды (хлор, кислый pH, ультрафиолетовое излучение, осмотический и оксидативный стресс, действие сывороток и комплемента), уничтожения простейшими, инфицирования фагами, а также повышает способность к формированию биопленки. Как известно, в составе биопленки вирулентные клоны *V. cholerae* способны к длительной персистенции во внешней среде [16].

Для выяснения функциональной роли EPS, обнаруженного на поверхности О клонов классических и эльтор вибрионов, была изучена способность изогенных вариантов к формированию биопленки, а также проведен сравнительный анализ резистентности двух клонов штамма *V. cholerae* Дакка 35 классического биовара и *V. cholerae* M-1326 эльтор биовара к действию осмотического (2,5 М раствор NaCl) и оксидативного (20 мМ раствор перекиси водорода) стрессов. В результате проведенных исследований установлено, что Т и О варианты как классических, так и эльтор вибрионов не отличаются по способности формировать биопленку. В то же время при изучении устойчивости О вариантов к стрессовым факторам было обнаружено, что $O\ Tox^+Har^{++}Mot^{++}$ клоны *V. cholerae* Дакка 35 действительно более устойчивы к действию высоких концентраций соли и перекиси водорода, чем $T\ Tox^{++}Har^+Mot^+$ варианты. При одинаковой начальной концентрации бактерий в растворе клетки $T\ Tox^{++}Har^+Mot^+$ варианта в присутствии высокой концентрации соли и перекиси водорода к концу

опыта снизили свою численность почти в 100 раз, тогда как снижение КОЕ у O Tox⁺Har⁺⁺Mot⁺⁺ вариантов было незначительным. В то же время у эльтор вибрионов не обнаружено отличий по выживаемости между T и O вариантами при действии данных стрессовых факторов.

Таким образом, обнаруженный на поверхности O вариантов холерного вибриона экзополисахаридный слой определяет морфологию колоний, но не оказывает значительного влияния на их способность формировать биопленку. EPS O вариантов *V. cholerae* классического биовара повышает устойчивость клеток к действию осмотического и оксидативного стрессов и образуется, видимо, в результате адаптации холерных вибрионов к неблагоприятным воздействиям окружающей среды. Функциональная роль экзополисахарида O вариантов эльтор вибрионов пока не установлена.

Одновременное изменение экспрессии нескольких генов вирулентности и персистенции у изученных штаммов *V. cholerae* указывает на присутствие у холерного вибриона общего белка-регулятора и/или регуляторной системы. Среди изученных и описанных в литературе регуляторных систем, контролирующих продукцию факторов патогенности и персистенции, мы не нашли сведений об участии какой-либо из них в одновременном изменении продукции СТ, Нар, экзополисахарида и подвижности. Возможно, у *V. cholerae* существует еще неизвестная двухкомпонентная регуляторная система, которая в ответ на определенные сигналы внешней среды изменяет экспрессию генов *ctxAB*, *hapA*, *vps*, *hly*, кодирующих соответственно синтез СТ, Нар, экзополисахарида, гемолизина, а также подвижность. В пользу данного предположения указывают результаты, полученные при изучении сигналов внешней среды, вызывающих координированное переключение экспрессии факторов патогенности и персистенции в изученных штаммах *V. cholerae*.

В качестве сигналов внешней среды было исследовано влияние различных факторов (температура, pH, осмолярность, присутствие аминокислот), изменяющих экспрессию известных регуляторных белков (ToxRS, ToxT, TcpPH, AphAB) [6]. В результате проведенных исследований выявлено, что одним из внешних сигналов, вызывающих одновременное альтернативное переключение активности генов, кодирующих продукцию экзополисахарида, холерного токсина, растворимой гемагглютинин/протеазы, гемолизина и подвижности, является щелочная (pH 9,0) реакция среды. При культивировании штаммов на средах с pH 9,0 в популяции T колоний появлялись O варианты с координированным изменением экспрессии указанных генов.

Таким образом, важным итогом проведенных исследований является получение новых данных о

популяционной гетерогенности природных штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы эльтор биовара. В популяции ряда штаммов впервые обнаружено два типа клонов, различающихся по уровню продукции экзополисахарида, СТ, Нар, гемолизина, а также подвижности. Экспрессия генов, связанных с указанными фенотипическими свойствами, имеет координированный характер. Одним из внешних сигналов, вызывающих переключение активности генов, кодирующих холерный токсин, растворимую гемагглютинин/протеазу, экзополисахарид, подвижность, а также гемолизин в штаммах холерного вибриона является щелочная (pH 9,0) реакция среды. Возможно, переключение «прозрачные-мутные» варианты является одной из форм фазовых вариаций и необходимо *V. cholerae* для выживания в изменяющихся условиях внешней среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамов А.К., Наумишина М.С. Холерные вибрионы. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та; 1984. 328 с.
2. 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.
3. Милютин В.Н., Дрозжевкина М.С., Ломов Ю.М., Уралова В.С., Либинзон А. Е., Подосинникова Л.С. Механизмы и диапазон изменчивости холерных вибрионов. Ростов н/Д: Ростовское книжное изд-во; 1981. 176 с.
4. De S.N., Chatterje D.N. An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. J. Path. Bacteriol. 1953; 66(2):559–62.
5. DiRita V.J., Neely M., Taylor R.K., Bruss P.M. Differential expression of the ToxR regulon in classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* is due to biotype-specific control over *toxT* expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996; 93(15):7991–95.
6. Faruque S.M., Nair G.B. *Vibrio cholerae* Genomics and Molecular Biology. Caister Academic Press, Norfolk, UK; 2008. 218 p.
7. Finkelstein R.A., Boesman-Finkelstein M., Chang Y., Häse C.C. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence and detachment. Infect. Immun. 1992; 60:472–8.
8. Guvener Z.T., McCarter L.L. Multiple regulators control capsular polysaccharide production in *Vibrio parahaemolyticus*. J. Bacteriol. 2003; 185(18):5431–41.
9. Hammer B.K., Bassler B.L. Distinct sensory pathways in *Vibrio cholerae* El Tor and classical biotypes modulate cyclic dimeric GMP levels to control biofilm formation. J. Bacteriol. 2009; 191(1):169–77.
10. Hilton T., Rosche T., Froelich B., Smith B., Oliver J. Capsular polysaccharide phase variation in *Vibrio vulnificus*. Appl. Environ. Microbiol. 2006; 72(11):6986–93.
11. Hitchcock P.J., Brown T.M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. J. Bacteriol. 1983; 154:269–77.
12. Iwanaga M., Yamamoto K., Higa N., Ichinose Y., Nakasone N., Tanabe M. Culture conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. Microbiol. Immunol. 1986; 30:1075–83.
13. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. Nature. 1970; 227:680–5.
14. Nesper J., Lauriano C.M., Klose K.E., Kapfhammer D., Kraiß A., Reidl J. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor *galU* and *galE* mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. Infect. Immun. 2001; 69(1):435–45.
15. Svennerholm A.M., Wiklund G. Rapid GM₁-enzyme-linked immunosorbent assay with visual reading for identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. J. Clin. Microbiol. 1983; 17:596–600.
16. Yildiz F.H., Lie X.S., Heydorn A., Schoolnik G.K. Molecular analysis of rugosity in a *Vibrio cholerae* O1 El Tor phase variant. Mol. Microbiol. 2004; 53(2):497–515.

Об авторах:

Заднова С.П., Ливанова Л.Ф., Лозовский Ю.В., Смирнова Н.И.
Российской научно-исследовательский противочумный институт
«Микроб». 410005, Саратов, Университетская, 46. Тел. (845-2) 26-21-31.
Факс (845-2) 51-52-12. E-mail: microbe@san.ru

S.P.Zadnova, L.F.Livanova, Yu.V.Lofovskiy, N.I.Smirnova

**Detection of Clones with Different Expression of Virulence
and Persistence Factors in Natural Populations
of Cholera *Vibrio* and Their Phenotypic Analysis**

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Analysis of the population structure of 41 *Vibrio cholerae* biovar eltor
natural strains permitted to detect 12 strains forming typical transparent and

atypical opaque colonies. Among the later were identified 3 strains which morphology variability correlated with altered production of exopolysaccharide, cholera toxin, hemolysine, soluble hemagglutinin/protease and altered mobility. One of the external signals causing coordinating switching of production of the indicated pathogenicity and persistence factors is alkaline (pH 9,0) reaction of the medium.

Key words: *Vibrio cholerae*, heterogeneous population, coordinated change of virulence and persistence gene expression.

Authors:

Zadnova S.P., Livanova L.F., Lofovskiy Yu.V., Smirnova N.I. Russian
Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya
St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 25.03.09.