ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев Б.Я., Васильева Р.И., Лобзин Ю.В. Острые кишечные заболевания: Ротавирусы и ротавирусная инфекция. СПб., Лань, 2000.
2. Дорошина Е.А. и др. Вирусные диареи в этиологической структуре ОКИ у детей, госпитализированных в стационар г. Москвы. Инфекционные болезни. 2009, 7 (3): 84-86.
3. Норовирусная инфекция: этиология, эпидемиология, диагностика. Аналитический обзор. Нижний Новгород, ННИИЭМ им. акад. И.Н.Блохиной, 2009.
4. Печеник А.С. Эволюция эпидемического процесса острых кишечных инфекций и пути оптимизации эпидемиологического надзора. Омск, 2012. http://www.dissercat.com/content/evolyutsiya-epidemicheskogo-protsessa-ostrykh-kishechnykh-infektsii-i-puti-optimizatsii-epid#ixzz4gnFOKA6J.
5. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. WHO Press, 2015. Available online: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165_eng.pdf?ua=1.
6. МУ 3.1.1.2969-11. Профилактика инфекционных болезней. Кишечные инфекции. Эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика и профилактика норовирусной инфекции, 2011.
7. МУК 4.2.2746-10. 4.2. Методы контроля. Биолологические и микробиологические факторы. Порядок применения молекулярно-генетических методов при обследовании очагов острых кишечных инфекций с групповой заболеваемостью, 2010.

Поступила 13.06.17

Контактная информация: Филатов Николай Николаевич, д.м.н., проф.,
105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Н.А.Терентьева[1], Е.К.Псарева[2], Н.Ф.Тимченко[2], В.А.Голотин[1], В.А.Рассказов[1]

ВЛИЯНИЕ ТОКСИНОВ YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ

[1]Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б.Елякова, [2]НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова, Владивосток

Цель. Исследовать влияние термостабильного (ТСТ) и термолабильного (ТЛТ) летальных токсинов Yersinia pseudotuberculosis на формирование биопленки этими бактериями. *Материалы и методы.* Для выделения токсинов и проведения экспериментов использовали штамм Y. pseudotuberculosis 512 (pYV48МД, pVM82МД) и штамм 2517, несущий плазмиду вирулентности pYV и утративший ее. *Результаты.* В присутствии ТЛТ наблюдалась стимуляция образования биопленки при 20°С как штаммом 2517 (pYV+), несущим плазмиду вирулентности, так и бесплазмидным штаммом 2517 (pYV). При низкой положительной температуре (6 — 8°С) ТЛТ снижал количество сформированной биопленки. ТСТ ингибировал образование биопленки обоими исследуемыми штаммами Y. pseudotuberculosis при инкубации в течение 3 суток при 20°С и 6 — 8°С. Со снижением температуры степень ингибирования уменьшалась. *Заключение.* Оба белковых токсина Y. pseudotuberculosis влияют на формирование биопленки бактериями псевдотуберкулеза, однако воздействие ТЛТ и ТСТ на процессы образования биопленки различаются, и механизм такого действия токсинов предстоит выяснить.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 37—42

Ключевые слова: Yersinia pseudotuberculosis, токсины, биопленка

N.A.Terenteva[1], E.K.Psareva, N.F.Timchenko[2], V.A.Golotin[1], V.A.Rasskazov[1]

EFFECT OF *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* TOXINS ON THE BIOFILM FORMATION

[1]Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, [2]Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia

Aim. To study the effect of heat-labile (HLTY) and heat-stable (HSTY) lethal toxins of the of *Yersinia pseudotuberculosis* on the formation of biofilms by these bacteria. *Materials and methods.* For the isolation of toxins and the investigation their ability to effect on the biofilm formation there were used the strain of *Y. pseudotuberculosis* 512 (pYV48МД, pVM82МД) and strain 2517, carrying virulence plasmid pYV and lost it, correspondingly. *Results.* The stimulation of biofilm formation at 20°C by the strain 2517 (pYV+), carrying virulence plasmid as well as the strain 2517 (pYV-) without plasmid were observed In the presence of HLTY. At low positive temperature (6 — 8°C) HLTY reduces the amount of the formed biofilm. HSTY inhibited the biofilm formation by the both strains of *Y. pseudotuberculosis* tested during the incubation for 3 days at 20°C and 6 — 8°C. Moreover the extent of inhibition was decreased with temperature decreasing. *Conclusion.* The both of the *Y. pseudotuberculosis* protein toxins has been revealed to affect on the biofilm formation by *Y. pseudotuberculosis* bacteria, however, the impact of HLTY and HSTY in the processes of biofilm formation was shown to be different, and the mechanism of such action of toxinsis under way.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 37—42

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, toxins, biofilm

ВВЕДЕНИЕ

Биопленка представляет собой сообщество одного или нескольких видов бактерий, прикрепленных к поверхности или друг к другу и заключенных в матрикс, состоящий из экзополисахаридов, белков, внеклеточной ДНК и других веществ [3, 8, 9.]. Биопленка защищает бактерии от неблагоприятных абиотических факторов внешней среды, а также от факторов специфической и неспецифической защиты иммунной системы хозяина. Бактерии в биопленке могут «общаться» между собой посредством секреторных интермедиаторов, которые служат основой их «социального» поведения или «quorum sensing».

Многие хронические инфекции обусловлены бактериями, растущими в виде биопленок. Устойчивость бактерий к антибиотикам в биопленке в 1000 раз больше, чем у планктонных форм [3, 8]. Это вызывает необходимость исследования механизмов образования биопленок, а также поиск агентов, влияющих на этот процесс. Для разрушения бактериальной биопленки или ингибирования ее образования могут быть использованы различные низкомолекулярные вещества, ферменты, разрушающие матрикс, а также вещества, действующие на систему «quorum sensing».

Возбудитель псевдотуберкулеза человека — Y. pseudotuberculosis — широко распространен в окружающей среде. Он изолирован из органов и фекалий многих видов млекопитающих, птиц, земноводных, рыб, членистоногих, а также из почвы, воды и растительных субстратов. Эти бактерии способны образовывать биопленку, которая защищает их от неблагоприятных экологических условий и от поедания беспозвоночными хищниками [1, 4].

К настоящему времени известно, что Y. pseudotuberculosis в разных средах обитания (эндо- и эктотермные организмы, растения и другие объекты) про-

дуцируют факторы патогенности с инвазивной, антифагоцитарной и токсической функциями [6]. В частности, имеются сведения о нескольких токсинах этих микроорганизмов, их патогенетической роли [6, 7, 13] Однако нет данных о влиянии этих биомолекул на процесс формирования биопленки Y. pseudotuberculosis .

Целью работы было изучение действия двух белковых токсинов, вызывающих гибель эндотермных экспериментальных животных при парентеральном введении — термолабильного и термостабильного на образование биопленки Y. pseudotuberculosis.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы штаммы Y. pseudotuberculosis из коллекции НИИЭМ им. Г.П.Сомова: 512 (pVM82МД и pYV48МД) — 0Ib серовар, изолированный от больного ДСЛ в РФ, 2517 — 03 серовар (Институт Пастера, Франция), несущий плазмиду вирулентности pYV и утративший ее.

Бактерии для выделения термостабильного (ТСТ) и термолабильного (ТЛТ) летальных токсинов выращивали на питательном агаре при температуре соответственно 6 — 8°С и 36 — 37°С. Токсины выделяли по методам [6], применяя фракционирование сульфатом аммония, ионообменную хроматографию и гель-фильтрацию. Биологическую активность этих токсинов определяли при парентеральном введении неинбредным мышам.

Для исследования действия токсинов на формирование биопленки Y. pseudotuberculosis ночную культуру бактерий, выращенных при температуре 20 — 22°С, разводили бульоном Хоттингера до 10^4 — 10^5 клеток в мл и инкубировали в 96-луночном планшете по 200 мкл на лунку в присутствии токсинов в течение 3 суток при 20 — 22°С или при 6 — 8°С. Конечная концентрация токсинов в разных экспериментах составляла 10 — 50 мкг/мл. После инкубации из лунок удаляли неприкрепленные клетки, трижды промывали лунки 0,85% NaCl и окрашивали биопленки 0,5% кристаллическим фиолетовым (CV) в течение 20 мин при комнатной температуре. Краситель удаляли из лунок, и несвязавшийся CV отмывали водопроводной водой. Планшеты высушивали на воздухе, в каждую лунку добавляли по 200 мкл 2% уксусной кислоты в 95% этаноле и определяли оптическую плотность при 600 нм.

Все эксперименты проводили в 4-кратной повторности. При статистической обработке использовали программу MS Exel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Бактерии Y. pseudotuberculosis продуцируют нескольких токсинов, в том числе термолабильный летальный токсин и термостабильный летальный токсин [6, 7]. Эти токсины отличаются друг от друга по молекулярной массе, отношению к температуре, биологическим свойствам. Их мишени и механизм действия остаются малоизученными.

Ранее нами было показано [5], что летальные токсины Y. pseudotuberculosis проявляли эмбриотоксичность по отношению к развивающимся эмбрионам морского ежа Strongylocentrotus intermedius. Кроме того, ТЛТ ингибировал биосинтез ДНК и РНК, определяемый по включению экзогенных [^{3}H]тимидина и [^{3}H]уридина клетками эмбрионов уже при 1 — 2 мкг/мл, а ТСТ не оказывал влияния на биосинтез нуклеиновых кислот даже в высоких концентрациях, но ингибировал биосинтез белка в эмбрионах морского ежа. ТЛТ не снижал уровня включения меченых аминокислот клетками эмбрионов (табл.).

Было показано, что ТЛТ ингибировал активность нуклеозидкиназ, тогда как ТСТ не влиял на активность этих ферментов биосинтеза предшественников нуклеиновых кислот. Однако роль этих летальных токсинов бактерий псевдотуберкулеза в патогенезе болезни не ясна.

Биологическая активность токсинов Y. pseudotuberculosis

Показатели активности токсинов	ТЛТ	ТСТ
Спермиотоксичность	$ЛД_{50}$ 1 мкг/мл	$ЛД_{50}$ 2 мкг/мл
Биосинтез ДНК	Ингибирует (1—2 мкг/мл)	Не ингибирует (200 мкг/мл)
Биосинтез РНК	Ингибирует (1—2 мкг/мл)	Не ингибирует (200 мкг/мл)
Биосинтез белка	Не ингибирует (10 мкг/мл)	Ингибирует (10 мкг/мл)
Активность тимидинкиназы	Ингибирует	Не ингибирует
Активность уридинкиназы	Ингибирует	Не ингибирует

Нами была показана способность четырех штаммов Y. pseudotuberculosis, выделенных из разных сред обитания, формировать биопленку на абиогенной поверхности [4]. Установлено также, что в процессе культивирования и формирования биопленки бактерии не утрачивали плазмиду вирулентности.

С помощью электронной микроскопии образцов Y. pseudotuberculosis, обработанных антителами к ТЛТ и коньюгатами коллоидного золота, показана возможность продукции этого токсина бактериями вне теплокровного организма (морская среда). Термолабильный летальный токсин вызывал значительные повреждения в организме морских животных [6]. Кроме того, получены данные о присутствии этого токсина во внеклеточном матриксе биопленки Y. pseudotuberculosis (рис. 1).

Для исследования воздействия токсинов на образование биопленки Y. pseudotuberculosis штаммы 2517 pYV- и 2517 pYV+ выращивали в присутствии токсинов при 20°С и 6 — 8°С в течении 3 суток и измеряли количество образовавшейся биопленки. Данные приведены на рис. 2.

Как видно из рис. 2, ТЛТ неодинаково действует на процесс образования биопленки Y. pseudotuberculosis при разной температуре. В присутствии этого токсина наблюдалась стимуляция образования биопленки при 20°С как штаммом 2517 (pYV+), несущим плазмиду вирулентности, так и бесплазмидным штаммом 2517 (pYV-). При низкой положительной температуре (6 — 8°С) количество биопленки снижалось в присутствии ТЛТ.

Рис. 1. Формирующаяся при 6 — 8°С в морской воде биопленка Y. pseudotuberculosis через 6 суток после инфицирования.
Видны гранулы термолабильного токсина.

ТСТ ингибировал образование биопленки обоими исследуемыми штаммами Y. pseudotuberculosis при инкубации в течение 3 суток при 20°С и 6 — 8°С. Причем со снижением температуры степень ингибирования уменьшалась. Механизм такого действия токсинов предстоит выяснить.

Рекомбинантный цитотоксический некротизирующий фактор Y. pseudotuberculosis [2] в концентрации 30 мкг/мл стимулировал образование биопленки теми же штаммами в два раза.

В литературе есть данные об уча-

стии в образовании биопленок пневмококков in vitro токсина — пневмолизина. Мутантные штаммы Streptococcus pneumoniae без пневмолизина не способны формировать такое же количество биопленки на абиогенных субстратах и клетках человека. Роль пневмолизина в образовании биопленки не связана с его гемолитической активностью, ответственной за повреждение ткани при пневмококковых заболеваниях. Предполагают, что пневмолизин может играть роль адгезина, скрепляющего клетки пневмококка друг с другом на ранних этапах формирования биопленки. Конфокальная и электронная микроскопия показали локализацию токсина на поверхности клеток пневмококков и во внеклеточном матриксе, что указывает на роль этого белка в фазе агрегации образования биопленки [14].

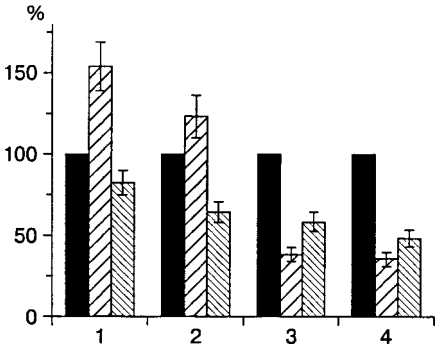

Рис. 2. Влияние токсинов на образование биопленки Y. pseudotuberculosis.
1 — влияние ТЛТ на штамм 2517+, 2 — влияние ТЛТ на штамм 2517-, 3 — влияние ТСТ на штамм 2517+, 4 — влияние ТСТ на штамм 2517-. В каждой группе столбиков слева направо: контроль, 20°С, 6 — 8°С.

В состав внеклеточного матрикса входят различные белки, которые могут участвовать в прикреплении клеток друг к другу и к поверхности. Так, бета-токсин — фактор вирулентности Staphylococcus aureus, обладающий сфингомиелиназной активностью, играет роль в созревании биопленки [11]. В присутствии ДНК он образует ковалентные поперечные связи, формируя нерастворимый нуклеопротеидный матрикс, который способствует образованию биопленки in vitro и in vivo [10, 12].

Термолабильный летальный токсин также обнаружен во внеклеточном матриксе биопленки Y. pseudotuberculosis, он стимулировал ее формирование при 20°С. Механизм этого действия белкового токсина возбудителя псевдотуберкулеза предстоит выяснить.

Одним из последних успехов молекулярной биологии стало открытие систем токсин-антитоксин, которые контролируют выживаемость бактерий и их вирулентность. Показано участие подобных систем в образовании биопленок [15].

Эти достижения открывают возможности для разработки новых способов лечения, поскольку высокая антибиотикорезистентность становится все более распространенной и критическая роль биопленок в вирулентности бактерий становится все очевидней. Терапевтическое воздействие на биопленки может быть направлено на различные этапы их формирования, такие как блокирование синтеза или разрушение полимерного матрикса, нарушение межклеточного обмена информацией, а также оно может сочетаться с собственно бактерицидными агентами. Такой подход будет более эффективным и требует углубления знаний о структуре и функциях биопленок.

ЛИТЕРАТУРА

1. Видяева Н.А., Ерошенко Г.А., Шавина Н.Ю., Кузнецов О.С., Кутырев В.В. Изучение способности к образованию биопленок у штаммов Y. pestis основного и неосновного подвидов. Журн. микробиол. 2009, 5: 13-19.
2. Псарева Е.К., Собянин К.А., Ермолаева С.А., Тимченко Н.Ф. Молекулярно-генетическая характеристика цитотоксического некротизирующего фактора Yersinia pseudotuberculosis. Российский иммунологический журнал. 2015, 9 (2): 602-603.
3. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма

существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. Журн. микробиол. 2011, 33: 99-109.
4. Терентьева Н.А., Тимченко Н.Ф., Балабанова Л.А., Рассказов В.А. Характеристика образования, ингибирования и разрушения биопленок Yersinia pseudotuberculosis, формирующихся на абиотических поверхностях. Журн. микробиол. 2015, 3: 72-78.
5. Терентьева, Н.А. Тимченко Н.Ф., Голотин В.А., Рассказов В.А. Биологическая активность токсинов Yersinia pseudotuberculosis. Журн. микробиол. 2016, 6: 10-19.
6. Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. Токсины Yersinia pseudotuberculosis. Владивосток, 2004.
7. Cornelis G.R. Yersinia type III secretion: send in the effectors. J. Cell. Biology. 2002, 158 (3): 401-408
8. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms:a common cause of persistent infections. Science. 1999, 284: 1318-1322.
9. Flemming H.C. EPS — then and now. Microorganisms. 2016, (4): 4. pii: E41 PMID: 27869702.
10. Herrera A., Vu B.G., Stach C.S. et al. Staphylococcus aureus β-toxin mutants are defective in biofilm ligase and sphingomyelinase activity, and causation of infective endocarditis and sepsis. Biochemistry. 2016, 55 (17): 2510-2517. doi: 10.1021/acs.biochem.6b00083.
11. Huseby M.J., Kruse A. C., Digre J. et al. Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010, 107: 14407-14412.
12. Lister J.L., Horswill A.R. Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2014, 4: 178.
13. Schweer J., Kulkarni D., Kochut A. et al. The cytotoxic necrotizing factor of Yersinia pseudotuberculosis (CNFY) enhances inflammation and Yop delivery during infection by activation of Rho GTPases. PLoS Pathog. 2013, 9 (11): e1003746. doi: 10.1371/journal.ppat.1003746.
14. Shak J.R., Ludewick H.P., Howery K.E. et al. Novel role for the Streptococcus pneumoniae toxin pneumolysin in the assembly of biofilms. MBio. 2013, 4 (5): e00655-13. doi: 10.1128/mBio.00655-13.
15. Wen Y., Behiels E., Devreese B. Toxin-Antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. Pathog. Dis. 2014, 70 (3): 240-249. doi: 10.1111/2049-632X.12145.

Поступила 10.06.17

Контактная информация: Терентьева Наталья Александровна, к.б.н.,
690022, Владивосток, пр. 100 лет Владивостоку, 159, р.т. (423)231-07-03

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Р.Б.Городничев, Д.В.Ракитина, А.И.Манолов, Ю.П.Байкова, П.Л.Щербаков, Г.Б.Смирнов, Е.Н.Ильина

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ESCHERICHIA COLI, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины, Москва

Цель. Оценить пул E.coli внутри пораженной зоны кишечника пациентов с болезнью Крона. *Материалы и методы.* Клинические изоляты (28), а также контрольные образцы были протестированы относительно их возможной принадлежности к определенной филогенетической группе, способности к адгезии и инвазии на модели монослоя эпителиальных клеток CaCo2, способности к формированию биопленки и подвижности. *Результаты.* Было показано, что E.coli, высеянные из различного биоматериала, отличались по филогенетической принадлежности и способности образовывать биопленку. E.coli, относящиеся к типу адгезивно-инвазивных, обнаруживались преимущественно в материале биопсии слизистой кишечника пациентов с болезнью Крона. *Заключение.* Есть основания полагать, что тип адгезивно-инвазивных E.coli сложился на стыке экологических ниш просвета и стенки кишечника.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 42—49