

## ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*С.В.Титова, Л.П.Алексеева, И.Т.Андрусенко*

### **РОЛЬ БИОПЛЕНОК В ВЫЖИВАЕМОСТИ И СОХРАНЕНИИ ВИРУЛЕНТНОСТИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ И ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА**

Ростовский-на-Дону противочумный институт

Представлены материалы относительно биопленок холерных вибрионов. Показано, что формирование биопленок является существенным фактором патогенности и одной из основных стратегий, повышающих выживание холерных вибрионов в организме человека и в окружающей среде.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 88—97

Ключевые слова: холерные вибрионы, биопленка, окружающая среда, кишечник человека, факторы патогенности

*S.V.Titova, L.P.Alekseeva, I.T.Andrusenko*

### **ROLE OF BIOFILMS IN SURVIVAL AND PRESERVATION OF VIRULENCE OF CHOLERA VIBRIOS IN THE ENVIRONMENT AND HUMAN ORGANISM**

Rostov-on-Don Institute for Plague Control, Russia

Materials regarding biofilms of cholera vibrios are presented. Formation of biofilms is shown to be a significant pathogenicity factor and one of the main strategies, increasing survival of cholera vibrios in human organism and the environment.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 88—97

Key words: cholera vibrios, biofilm, environment, human intestine, pathogenicity factors

Холера — тяжелая диарейная болезнь, вызываемая токсигенными штаммами *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп, которой ежегодно заболевают миллионы людей во всем мире. Для существования в организме человека и объектах окружающей среды холерные вибрионы формируют биопленки, играющие важную роль в патогенезе, передаче инфекции, а также в выживаемости холерных вибрионов в организме человека и в водной среде. При благоприятных условиях биопленки, содержащие высоковирулентные бактерии, могут быть перенесены на большие расстояния и стать источником новых вспышек холеры.

Холерные эпидемии распространяются в результате контаминации воды фекалиями людей, зараженными токсигенными бактериями *V. cholerae*.

Данные, представленные в обзоре [17], свидетельствуют о том, что на очаговых территориях, т.е. там, где регистрируются эпидемии, вспышки и спорадические случаи заболеваний холерой, в водных объектах окружающей среды присутствуют как токсигенные, так и атоксигенные штаммы, причем часть токсигенных штаммов, попадая в окружающую среду, возможно, утрачивают гены вирулентности, а сама среда становится резервуаром данных генов. Кроме того, обсуждается гипотеза о том, что в случае задействования водного фактора передачи при зараже-

нии человека атоксигенным штаммом последний приобретает СТХ<sub>φ</sub> фаг и ген *tsc* в макроорганизме с развитием инфекционного процесса и последующим выделением уже холерогенного штамма в окружающую среду. Вместе с тем, на внеочаговых территориях (где не регистрируются больные и носители) в воде открытых водоемов преобладают атоксигенные штаммы холерных вибрионов O1 [16]. Помимо планктонных (свободноживущих) особей холерные вибрионы существуют в водных экосистемах в виде некультивируемых клеток. Эти некультивируемые, но жизнеспособные клетки, по мнению ряда исследователей, играют важную роль в эпидемиологии холеры [Титова С.В. и др., 2004].

Часть холерных вибрионов, попадая от больных людей в водоемы, погибает, частично поедаясь хищниками. Другая часть в виде свободноживущих особей, благодаря хемотаксису, прикрепляется к абиотическим субстратам, одним из основных компонентов которых являются отрицательно заряженные силикаты, фрагменты полиэтилена, пластикового мусора [40], а также к биотической поверхности зоо- и фитопланктона и формирует биопленку [24]. Впервые особенности биопленочного фенотипа четко определили Costerton J.W. et al., обсуждая различия между планктонными культурами, колониями микроорганизмов и биопленками [15]. В водоемах биопленки могут располагаться на поверхности живых и погибших водорослей и зоопланктоне: на цианобактериях — *Anabana* sp., в организме амебы *Acanthamoeba castellanii*, в кишечнике детритофагов, усоногих рачков, членистоногих, на хитине и щитках креветок, в крабах, рыбах, насекомых и других обитателях водной среды [24]. Purdy A.E. и Watnick P.I. показали, что биопленки являются резервуаром *V. cholerae* в природной среде и что зависимость от полисахарида биопленка холерных вибрионов приобретает высокий уровень активности после их проникновения в кишечник членистоногих [31].

Предложена общая для большинства микроорганизмов, в том числе и холерных вибрионов, модель формирования биопленки, состоящая из нескольких стадий: стадия планктонных клеток, монослой, собственно биопленки. На стадии планктонных клеток холерные вибрионы включают уникальные механизмы транскрипции. В стадии, когда микробные клетки образуют монослой, разрушаются полисахаридные полимеры, тем самым создается богатыми углеводами среда, далее через систему кворум-сенсинг *V. cholerae* начинают формировать биопленку. Эта фаза характеризуется снижением экспрессии жгутиковых генов и повышением их транскрипции, что необходимо для межклеточной адгезии и продукции EPS [39]. Формирование биопленки бактериями является постепенно развивающимся процессом. Прикрепившись к питательным поверхностям, типичные холерные вибрионы могут образовывать ругозные, или морщинистые, колонии. Формирование ругозного фенотипа за счет продукции экзополисахарида обеспечивает устойчивость к неблагоприятным условиям [4]. В работе [32] показано на примере *Vibrio fisheri*, что появление морщинистых колоний является индикатором образования биопленок. Штаммы с дефектом формирования биопленок *in vitro* характеризуются также дефектом колонизации, а у штаммов с повышенной способностью к формированию биопленок — повышенный уровень колонизации. Moorthy S. и Watnic P.I. показали, что планктонные клетки прикрепляются к поверхности, образуя монослой, затем кластеры клеток, размножаясь, образуют биопленку [27]. Berk V. et al. наблюдали три различные стадии образования пространственной организации биопленок холерных вибрионов: клетки, кластеры клеток и объединения кластеров [11]. В процессе перехода от свободного плавания к состоянию неподвижного клеточного существования в биопленке бактерии продуцируют и секретируют внеклеточный матрикс, состоящий из нуклеиновых кислот, экзополисахарида и белков адгезии. Матрикс содержит три основных белка — RbmA, RbmC и VarP [20]. Установлены комплемен-

тарные роли четырех важных компонентов матрикса в архитектуре биопленок: структурный белок RbmA обеспечивая межклеточную адгезию на раннем этапе формирования биопленки и локализован во всех местах межклеточных контактов, RbmC и Var1 формировали динамичные, гибкие и упорядоченные оболочки, в которые были заключены кластеры клеток [26]. В процессе формирования биопленки холерные вибрионы синтезируют поверхностные структуры, включающие полисахариды: липополисахарид, гликопротеины, протеогликаны и экзополисахарид, благодаря чему формируется сложная трехмерная структура биопленки с каналами, через которые питательные вещества поступают к бактериям и вымываются продукты их жизнедеятельности.

В некоторых случаях вещества, секретируемые зоо- и фитопланктоном, привлекают холерные вибрионы и активируют образование ими биопленок. В частности, метанол, основной продукт фотосинтеза, защищающий водоросли от осмотического стресса, активизирует образование биопленки и транскрипцию *vps*-генов синтеза экзополисахаридного матрикса биопленки на поверхности водорослей [22]. В то же время, некоторые актиномицеты продуцируют вещества, ингибирующие образование биопленок холерными вибрионами на своей поверхности [10].

Холерные вибрионы прикрепляются к аттрактантам жгутиками, при помощи которых колонизируют хитин и целлюлозу, используя их в качестве питательных поверхностей, на которых бактериальные клетки формируют колонии, а впоследствии и биопленки, это позволяет клеткам защищать себя от хищников. Хитин и целлюлоза обеспечивают холерным вибрионам питание, толерантность к стрессам, таким как воздействие высокой температуры, низких значений pH, обезвоживания, а также защиту от хищников и тем самым создают условия, способствующие выживанию возбудителя, сохранению его вирулентности в окружающей среде, а биопленки, в свою очередь, являются резервуаром холерных вибрионов между эпидемиями [14]. Отмечена уникальная способность хитина индуцировать программу развития естественной компетентности у некоторых видов вибрионов. Поскольку хитиновая поверхность может являться единственным источником углерода, была изучена связь между репрессией катаболитов углерода и индуцируемой хитином естественной компетентностью для трансформации. Установлено, что 3'5'-циклический АМФ (цАМФ) и белок — регулятор CRP необходимы для осуществления программы индуцируемой хитином естественной компетентности бактерий. Таким образом, цАМФ необходим для успешной колонизации хитиновых поверхностей, способствует деградации и утилизации хитина и совместно с белком рецептором цАМФ CRP играет роль в повышении экспрессии генов компетентности [12]. В биопленках существуют условия для обмена генетической информацией: переноса генов, кодирующих холерный токсин (СТХ профар), геном филаментозного фага, и островка патогенности VPI, в том числе генов *tcr*, возможности сероконверсии, передачи плазмид антибиотикоустойчивости и др. Горизонтальный обмен генетической информацией происходит между близкородственными видами микроорганизмов, и природные популяции холерных вибрионов принято считать в последнее время резервуарами генов, что может способствовать формированию высоковирулентных клонов. Встраивание чужеродных генов происходит путем замены фрагмента собственной ДНК на похожий фрагмент. По мнению Basler M. et al. (2012) холерные вибрионы при помощи системы секреции шестого типа (Т6SS) впрыскивают свою ДНК через оболочку чужой бактериальной клетки. Методом сканирующей электронной микроскопии для визуализации этапов формирования биопленок штаммом дикого типа и мутантом по TCR на хитиновых поверхностях головоногих моллюсков было обнаружено, что TCR способствует бактериальным взаимодействиям, необходимым

для дифференциации биопленок на хитиновых поверхностях. По мнению Nalin D.R. et al. (1979), в эндемичных районах хитин с адгезированными холерными вибрионами может обеспечить их защиту от воздействия соляной кислоты в желудке человека при инфицировании. Факторы колонизации кишечника (TCP и MSHP) вовлечены в связывание хитина и образование биопленки на хитиновых поверхностях. Эти данные позволяют предположить, что клоны *V. cholerae*, способные колонизировать желудочно-кишечный тракт, вероятно, в окружающей среде будут персистировать в биопленке.

Сигналы из внешней среды активизируют транскрипционные гены, участвующие в формировании биопленки (*vps*, *msh*, *hap*, *nsr*), которые регулируются активаторами транскрипции *vpsR* и *vpsT*. Выработка экзополисахарида на молекулярно-генетическом уровне регулируется генами *vpsR* и *mshA* (маннозо-чувствительного гемагглютинина), способствующего колонизации холерными вибрионами абиотических поверхностей, а также генами *mbaA1* и *mbaA2*, ответственными за формирование биопленки [24].

Холерные вибрионы во внеклеточном матриксе биопленки помимо экзополисахарида содержат внеклеточную ДНК, моделируемую и регулируемую внеклеточными нуклеазами *Dns* и *Xds*, роль которых очень значительна, поскольку они определяют структуру биопленки, приобретение питательных веществ, отделение клеток от биопленки, способность комочков биопленки колонизировать тонкий кишечник и обеспечивают защиту бактериального сообщества [33].

Формирование биопленки холерных вибрионов также частично регулируется норспермидином-полиамином, синтезируемым ферментом карбоксинорспермидиндекарбоксилазой (*NspC*). Его отсутствие в клетках приводит к снижению ими способности образовывать биопленки. Установлено также, что при гиперэкспрессии гена *nspC* значительно повышается образование биопленок холерными вибрионами, а при экспрессии *vps* генов достоверно снижается подвижность вибрионов, что свидетельствует о роли указанных генов в регуляции формирования биопленок [30].

У *V. cholerae* ц-ди-ГМФ (циклический димерный гуанозинмонофосфат) положительно регулирует образование биопленки и отрицательно влияет на подвижность и вирулентность. Экспрессия биопленки индуцируется ц-ди-ГМФ путем индукция генов *vps*, при этом ц-ди-ГМФ репрессирует экспрессию генов биосинтеза жгутика. Транскрипция генов вирулентности также репрессируется ц-ди-ГМФ. В связи с этим, была предложена модель, согласно которой высокий уровень содержания ц-ди-ГМФ отмечен у биопленочных холерных вибрионов при персистенции в природных условиях и его образование репрессируется после инфицирования человека [13, 36].

Биопленки, являясь существенным фактором патогенности и одной из основных стратегий, повышающих выживание бактерий в организме человека и в окружающей среде, способствуют также обмену генетической информацией между бактериями. Это осуществляют целенаправленные лиганды за счет одного и того же специфического связывания. Такие молекулы, осуществляющие связь между двумя способами жизни холерных вибрионов, получили название «факторы колонизации с двойной ролью». Вибрионы, находящиеся в составе биопленок, более устойчивы к действию антибиотиков и других антибактериальных препаратов, к дезинфицирующим средствам, а также к воздействиям неблагоприятных факторов окружающей среды. Существование холерных вибрионов в биопленке дает бактериям ряд существенных преимуществ, в том числе наилучший доступ к питательным веществам, преимущества при размножении и сопротивление стрессовым факторам окружающей среды. Ю.В.Сизовой и др. обнаружено интенсивное образование биопленки эпидемически значимыми штаммами холерных

вibriонов, культивируемых в экспериментах с речной водой при температуре 22°C, но уже при 4°C они утрачивают эту способность и в большинстве своем погибают. В то же время, атоксигенные штаммы холерных вибрионов при температуре 4°C в семь раз интенсивнее образуют биопленку, чем при 22°C [8].

Авторы, изучавшие систему регуляции генов компетентности у холерных вибрионов Эль Тор, выяснили, что несколько генов, необходимых для поглощения чужеродной ДНК, включаются в ответ на комбинацию двух стимулов. Первый стимул — хитин, в присутствии которого вибрионы начинают производить регуляторный белок. Вторым сигналом является кратность популяции, которую холерные вибрионы оценивают по концентрации выделенных ими веществ (аутоиндукторов) при помощи системы QS [35].

Регулятором транскрипции для холерного токсина (ХТ) и токсин-регулируемых пилей (TCP) является *ToxR*, моделирующий экспрессию белков внешней мембраны *OmpU* и *OmpT*. В работе [38] отмечена роль свободноживущей амобы *Acanthamoeba castellanii* в выживаемости диких штаммов холерных вибрионов в отличие от мутантов по гену *ToxR* при температуре 37°C. Авторы предполагают, что *ToxR* играет регуляторную роль в переключении экспрессии *OmpT/OmpU*, изменениях в биопленке, ругозном фенотипе и выживании в ассоциации с *A. castellanii*.

Биопленки, образованные холерными вибрионами, представляют собой инфекционную форму этого патогенного микроорганизма. Экспериментально подтверждено, что колонизировавшие тело дафний холерные вибрионы выживали дольше, чем в среде культивирования. Концентрация  $10^5$  КОЕ/мл холерных вибрионов Эль Тор в теле циклопов, дафний, мойн была достаточной, чтобы вызвать инфекционный процесс у чувствительного организма (кролик). Колонизированный копепоид может содержать до  $10^4$  клеток холерных вибрионов, следовательно, биопленка на планктоне обеспечивает необходимую инфекционную дозу для «клинической» холеры [2].

Клетки холерных вибрионов, выделенные из биопленок, обладают гораздо более высоким уровнем инфекционности, чем планктонные клетки. Выявлены факторы, которые способствуют индукции биопленкой гиперинфекционности. Биопленки обогащены белком *PstS2* — периплазматическим компонентом системы поглощения фосфата *Pst2*, регулируемым геном *pst2*. Предполагается, что клетки *V. cholerae* в биопленках активизируют систему *Pst2* и за счет этого приобретают преимущество после проникновения в организм хозяина [28, 37].

Патогенные штаммы *V. cholerae* в составе биопленки, защищающей их от действия желудочного сока, проникают в кишечник человека [17]. Установлено, что вибрионы, находящиеся в биопленке, более эффективно, чем планктонные клетки, колонизируют кишечник [37]. Холерным вибрионам для достижения места колонизации — эпителия тонкого отдела кишечника — необходимо преодолеть ряд препятствий, в том числе перистальтику кишечника, вымывание жидкостью, вязкость слоя мукуса и pH. Известно, что, попав в организм человека, большая часть вибрионов погибает под действием кислой среды желудка. Лишь небольшая часть достигает тонкой кишки. Факторы патогенности обеспечивают колонизацию: жгутики обуславливают подвижность, муциназа разжижает слизь и облегчает достижения поверхности эпителия и нейроминидаза обеспечивает взаимодействие с микроворсинками [13]. В ответ на проникновение бактерий эпителиальные клетки выделяют щелочной секрет, насыщенный желчью — идеальная среда для размножения возбудителя. Биопленка способствует преодолению этих естественных барьеров и облегчает проникновение вибрионов в кишечник. В тонком кишечнике происходит отделение бактерий от биопленки, и высвободившиеся отдельные вибрионы начинают размножаться. Но прежде хо-

лрные вибрионы проходят через слой слизи на эпителии тонкого кишечника, состоящей из сахаридов муцина и гликокаликса, которые являются источниками углерода и азота, ферментов для утилизации сиаловых кислот, затем обнаруживают место своего прикрепления через восприятие полочки собственного жгутика [34].

Пробиотические бактерии, составляющие нормальную микрофлору, проходя желудок, могут находиться как на поверхности слизистой оболочки тонкого и толстого кишечника, будучи интимно с ней связанными (индигенная, мукозная или М-флора), так и в просвете кишки (просветная, полостная или П-флора), обеспечивая колонизационную резистентность. Представители М-флоры фиксируются к строго определенным рецепторам эпителиальных клеток. Штаммы, не являющиеся представителями нормальной флоры, должны проходить транзитом через желудок и тонкий кишечник. Механизмы, отвечающие за процесс специфической адгезии индигенных микроорганизмов, в последние годы интенсивно исследуются. Установлено, что одним из элементов, ответственных за нее, являются поверхностные структуры бактерий, содержащие адгезины, которые комплементарны соответствующим рецепторам, расположенным на мембранах эпителиоцитов. Адгезия бактерий может осуществляться и к рецепторам, локализованным в муциновом слое прикрытых другими микроорганизмами (опосредованная адгезия) [3].

Микробные клетки, окруженные полисахаридной капсулой, в слоях муциновой слизи равномерно распределены на расстоянии порядка размера микробной клетки друг от друга. Такое расположение обеспечивает контакт с диффундирующим в муцин химусом и клетками между собой для быстрого обмена продуктами метаболизма. Муцин состоит из пептидогликанов, продуцируемых бокаловидными клетками эпителия слизистой оболочки. Выявлены кишечные бактерии-комменсалы, которые могут ограничивать колонизацию кишечника возбудителем холеры. Такое антагонистическое взаимодействие может обуславливаться кворум-сенсингом. Авторы предполагают, что взаимоотношения между микроорганизмами способны оказывать помощь в предотвращении инфекционных болезней [35]. Участие генов *LuxS* в формировании биопленок указывает на кворум-зависимую природу этого процесса и у лактобацилл (состоят из клеточного муцина, фибропектина и бактериального экзополисахарида) — физическая защита соматических клеток кишечного эпителия от адгезии патогенных бактерий. Бифидобактерии представляются в виде очаговых пленок, а лактобациллы — в виде вкраплений в массе бифидобактерий [3].

По данным [9] для колонизации и сохранения/выживания у холерных вибрионов обнаружены ферменты, роль некоторых из них в биопленке еще предстоит выяснить, однако к настоящему времени обнаружена и изучена нейраминидаза, которая способна усиливать связывание энтеротоксина с эпителием клеток тонкого кишечника путем превращения поверхностных полисиалоганглиозидов в моносиалоганглиозид GM1, являющийся рецептором холерного токсина.

Показано также, что вибрионы обладают системой активации плазминогена в плазмин, которая включает как минимум  $\alpha$ -енолазу и мембранный белок OmpT, активность которого может играть существенную роль в патогенезе инфекции. Белок OmpT (сериновая протеаза) кроме защиты от антимикробных белков и активации плазминогена обеспечивает преимущество вибрионам в условиях кишечника чувствительного хозяина. Увеличение синтеза OmpT в присутствии высоких концентраций NaCl, пониженной (28°C) температуры и в минимальных средах позволило предположить его вклад в выживаемость во внешней среде [5, 7]. Проведено изучение хитиноподобного комплекса холерного вибриона.

Исследования позволили дополнить хитинолитический комплекс N-ацетил-β-D-глюкозаминидазой, ферментом, играющим важную роль, как и хитиназа, в выживаемости/сохраняемости холерных вибрионов в условиях контакта с хитинсодержащими объектами [6]. Выявленная антибактериальная способность у очищенного фермента N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы из *V. cholerae* [Дуванова О.В., 2015] представляется интересной, так как она перекликается с предположением Kaplan J. V. et al. о возможном участии аналогичного фермента из *Actinobacillus* spp. (в качестве фактора колонизации) в явлении устранения биопленок других бактерий с целью освобождения поверхностей для собственного укоренения в конкретной экологической нише [25].

Синтез биологически активных веществ остается одним из актуальных моментов взаимодействия холерных вибрионов с макроорганизмом. Одним из факторов, возможно, дающим холерным вибрионам селективное преимущество в микробных ассоциациях, является гемолизин, представляющий собой токсичное соединение как по отношению к клеткам эукариот, так и к клеткам прокариот. Его активность выявляется как на модели эритроцитов в пробе Грейга, так и на культурах клеток первичных и перевиваемых монослойных линий CHO, Hela, Vero и др., а также на модели инфузорий *Paramecium caudatum*. О важности гемолизина для жизнедеятельности холерных вибрионов говорит тот факт, что все холерные вибрионы в геноме имеют ген *hly*, кодирующий синтез гемолизина [Goldberg S.L. et al., 1985].

Для холерных вибрионов характерной особенностью является смена экологических ниш (макроорганизм и окружающая среда). Изменение условий существования является стрессом и ведет к синтезу биологически активных веществ, позволяющих вибрионам адаптироваться в новых экосистемах. Одним из таких адаптационных механизмов у холерных вибрионов является бактериоциногенность. Продукция бактериоцина — вибриоцина обеспечивает холерному вибриону селективное преимущество в условиях конкуренции во внешней среде. Холерные вибрионы продуцируют вибриоцины, проявляющие антагонистическую активность по отношению к энтеробактериям и отдельным штаммам холерных вибрионов. Вибриоцины схожи с другими известными бактериоцинами. Известно широкое распространение вибриоциногенности у холерных вибрионов, выделенных из различных экосистем, и установлено, что спектр вибриоциногенной активности холерных вибрионов O1 и не O1 групп коррелирует с их вирулентностью. Вирулентные штаммы чаще, чем авирулентные, продуцируют вибриоцины с широким и умеренным спектрами активности. Бактериоцины холерных вибрионов действуют на микрофлору кишечника, создавая вибрионам селективные преимущества и дисбиоз как одно из проявлений патогенетического потенциала [1]. Существует мнение, что бактериоцины имеют узкий спектр действия, так как активны против бактерий того же или филогенетически близкородственных микроорганизмов, но как показывают новейшие исследования, спектр ингибирующего действия многих бактериоцинов фактически распространяется на представителей таксономических неродственных бактерий [21]. Преимущественная привязка бактериоцинов к плазмидам широко известна. Особенно интересно, что на одном внехромосомном генетическом элементе могут одновременно располагаться гены бактериоциногенности, токсигенности и других факторов патогенности [19].

В процессе конкуренции за колонизационную нишу холерный вибрион может вести себя и как хищник, лизируя другие бактерии. При этом он получает и энергетические преимущества, используя продукты лизиса в качестве источника питательных веществ. Для эффективного хищничества нужны механизмы, позволяющие отличить своих от чужих, как, например, у колициногенной *Escherichia*

coli. Можно предположить и участие некоторых ферментов, обладающих литическими свойствами, подобно N-ацетил-β-D-глюкозаминидазе холерного вибриона [Дуванова О.В., 2015]. Для реализации хищничества холерные вибрионы могут использовать и систему T6SS, о которой говорилось выше.

Важная роль в процессе колонизации кишечника и формирования биопленок принадлежит факторам адгезии токсин-регулируемым пилиям, за образование которых ответствен кластер генов, входящий в состав острова патогенности VP1. Пили служат в качестве рецептора фага CTXφ, секретируют фактор колонизации, участвуют в формировании микроколоний, а также осуществляют защиту бактериальных клеток от антимикробных агентов. В процессе принимает участие пилин Сер, ген которого входит в состав профагов CTX и пре-CTX, белки наружной мембраны Omp и маннозочувствительные пили MSHA, а также повышающие адгезивную активность силидазы (Nah) и порообразователь (H) [29]. Актиномодуляторами кроме MARTX являются Zot, NAP, VopF (эффектор T3SS), VgrG1 (эффектор T6SS), но их роль в адгезии неясна.

В верхнем отделе кишечника человека после достижения размножающимися вибрионами четко определенного уровня плотности в процесс включается кворум сенсинг. Размножение бактерий и формирование биопленок прекращаются, активизируется продукция гемагглютинин-протеазы (HapA-), которая «вырезает» клетки из биопленок для дальнейшего удаления из кишечника. Вибрионы покидают кишечник в составе комочков биопленки, в которых они находятся в состоянии временной гиперинфекциозности [18, 23]. Транзиторная гиперинфекциозность увеличивает вирулентность возбудителя в 1000 раз, что является необходимым при дальнейшем инфицировании человека. Помимо этого, из кишечника человека с последующим попаданием в окружающую среду наряду с высоковирулентными штаммами выделяются измененные штаммы, утратившие под влиянием иммунного статуса организма или неадекватного приема противомикробных препаратов ряд свойств, в том числе и вирулентность.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Блинкова Л.П. Перспективы использования бактериоцинов для профилактики и терапии инфекций. Журн. микробиол. 1984, 5: 10-15.
2. Голубев Б.П. Экологические аспекты распространения вибрионов Эльтор в объектах окружающей среды. Автореф. дис. канд. мед. наук. Саратов, 1993.
3. Лахтин В.М., Алешкин В.А., Лахтин М.В. и др. Лектины, адгезины и лектиновые вещества лактобацилл и бифидобактерий. Вестник РАМН. 2006, 1: 28-34.
4. Маркина О.В., Шелухович А.И., Терентьев А.Н. и др. Стабилизированные фазовые варианты *Vibrio cholerae* El Tor P-18895: *V. Cholera* и патоген. для человека вибрионы. Ростов-на-Дону, Дониздат, 2014, 27: 112-114.
5. Мишанькин Б.Н., Дуванова О.В., Романова Л.В. и др. Мембранный белок OmpT холерного вибриона как возможный представитель омптинов семейства *Vibrionaceae*. Проблемы особо опасных инфекций. 2014, 3: 52-56.
6. Мишанькин Б.Н., Шиманюк Н.Я., Водопьянов С.О. и др. Изучение хитиноподобного комплекса холерного вибриона сероварианта O139. Биотехнология. 2010, 1: 32-40.
7. Мишанькин Б.Н., Дуванова О.В., Шипко Е.С. и др. Система активации плазминогена у *Vibrio cholerae*. Журн. микробиол. 2013, 5: 13-20.
8. Сизова Ю.В., Черепахина И.Я., Балахнова В.В. и др. Вариабельность свойств, характеризующих способность к выживанию холерных вибрионов в биопленочных сообществах. Пробл. особо опасных инф. 2012, 3 (113): 54-57.
9. Шиманюк Н.Я., Дуванова, О.В., Сучков И.Ю. и др. Нейраминидаза *Vibrio cholerae* O139 «Бенгал»: обнаружение, очистка и некоторые свойства. Биотехнология, 1999, 3: 56-62.
10. Augustine N., Peter A.W., Kerkar S., Thomas S. Arctic actinomycetes as potential inhibitors of *Vibrio cholerae* biofilm. Curr. Microbiol. 2012, 64 (4): 338-342.



11. Berk V., Fong J.C., Dempsey G.T. et al. Molecular architecture and assembly principles of *Vibrio cholerae* biofilms. *Science*. 2012, 337 (6091): 236-239.
12. Blokesch M. Chitin colonization, chitin degradation and chitin-induced natural competence of *Vibrio cholerae* are subject to catabolite repression. *Environ. Microbiol.* 2012, 14 (8): 1898-1912.
13. Boyhan S., Beyhan S., Tischler A.D. et al. Transcriptome and phenotypic responses of *Vibrio cholerae* to increased cyclic di-GMP level. *J. Bacteriol.* 2006, 188 (10): 3600-3613.
14. Castro-Rosas J., Escartin, E.F. Increased tolerance of *Vibrio cholerae* O1 to temperature, pH, or drying associated with colonization of shrimp carapaces. *Int. J. Food Microbiol.* 2005, 102: 195-201.
15. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999, 284: 1318-1322.
16. Emch M., Feldacker C., Yunus M. et al. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2008, 78: 823-832.
17. Faruque S.M., Albert M.J., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholera*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998, 62 (4): 1301-1314.
18. Faruque S.M., Biswas K., Udden S.M. et al. Transmissibility of cholera: in vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2006, 103 (16): 6350-6355.
19. Franklin A., Soderlind O., Mollby R. Plasmids coding for enterotoxins, K88 antigen and colicins in porcine *Escherichia coli* strains of O-group 149. *Med. Microbiol. Immunol.* 1981, 170: 63-72.
20. Giglio K.M., Fong J.C., Yildiz F.H., Sondermann H. Structural basis for biofilm formation via the *Vibrio cholerae* matrix protein RbmA. *J. Bacteriol.* 2013, 195 (14): 3277-3286.
21. Gillor O., Kirkur B.C., Riley M.A. Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. *Adv. Appl. Microbiol.* 2004, 54: 129-146.
22. Gopalakrishnan S., Durai M., Kitchens K. et al. Larazotide acetate regulates epithelial tight junctions in vitro and in vivo. *Peptides*. 2012, 35 (1): 86-94.
23. Hartley D.M., Morris J.M., Smith D.L. Hyperinfectivity: a critical element in the ability of *V. cholerae* to cause epidemics? *PLoS. Med.* 2006, 3 (1): e7.
24. Islam M.S., Drasar B.S., Bradley D.J. Survival of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 with a common duckweed, *Lemna minor*, in artificial aquatic ecosystems. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1990, 84 (3): 422-424.
25. Kaplan J.B., Raganath C., Ramasubbu N., Fine D.H. Detachment of *Actinobacillus actinomyces* comitans biofilm cells by an endogenous  $\beta$ -hexosaminidase activity. *J. Bacteriol.* 2003, 185 (16): 4693-4698.
26. Maestre-Reyna M., Wu W.J., Wang A.H. Structural insights into RbmA, a biofilm scaffolding protein of *V. cholerae*. *PLoS One*. 2013, 8 (12): e82458.
27. Moorthy S., Watnic P.I. Genetic evidence that the *Vibrio cholerae* monolayer is a distinct stage in biofilm development. *Mol. Microbiol.* 2004, 52 (2): 573-587.
28. Mudrak B., Tamayo R. The *Vibrio cholerae* Pst2 phosphate transport system is upregulated in biofilms and contributes to biofilm-induced hyperinfectivity. *Infect. Immun.* 2012, 80 (5): 1794-1802.
29. Olivier V., Queen J., Satchell K.J.F. Successful small intestine colonization of adult mice by *Vibrio cholerae* requires ketamine anesthesia and accessory toxins. *PLoS One*. 2009, 4 (10): e7352.
30. Parker Z.M., Pendergraft S.S., Sobieraj J. et al. Elevated levels of the norspermidine synthesis enzyme NspC enhance *Vibrio cholerae* biofilm formation without affecting intracellular norspermidine concentrations. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2012, 6 (1): 17-23.
31. Purdy A.E., Watnick P.I. Spatially selective colonization of the arthropod intestine through activation of *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2011, 108 (49): 19737-19742.
32. Ray V.A., Morris A.R., Visick K.L. A semi-quantitative approach to assess biofilm formation using wrinkled colony development. *J. Vis. Exp.* 2012, 64: pii-4035.
33. Seper A., Fengler V.H., Roier S. et al. Extracellular nucleases and extracellular DNA play important roles in *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 2011, 82 (4): 1015-1037.

34. Spagnuolo M.A., Dirita V., Kirschner D. A model for *Vibrio cholerae* colonization of the human intestine. *J. Theor. Biol.* 2011, 289: 247-258.
35. Suckow G., Seitz P., Blokesch M. Quorum sensing contributes to natural transformation of *Vibrio cholerae* in a species-specific manner. *J. Bacteriol.* 2011, 193 (18): 4914-4924.
36. Tamayo R., Pratt J.T., Camilli A. Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annual Rev. Microbiol.* 2007, 61: 131-148.
37. Tamayo R., Patimalla B., Camilli A. Growth in a biofilm induces a hyperinfectious phenotype in *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2010, 78 (8): 3560-3569.
38. Valeru S.P., Wai S.N., Saeed A. et al. ToxR of *Vibrio cholerae* affects biofilm, rugosity and survival with *Acanthamoeba castellanii*. *BMC Res. Notes.* 2012, 5 (1): 33.
39. Watnick P.I., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* 1999, 34: 586-595.
40. Zettler Erik R., Tracy J. Mincer, Linda A. Amaral-Zettler. Life in the «Plastisphere»: Microbial communities on plastic marine debris. *Envir. Sci. Technol.* 2013, 47 (13): 7137-7146.

*Поступила 15.01.16*

Контактная информация: Алексеева Людмила Павловна, д.б.н.,  
344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, р.т. (862)240-27-03

© Г.Г.ХАРСЕЕВА, Н.А.ВОРОНИНА, 2016

*Г.Г.Харсеева, Н.А.Воронина*

## **ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ *CORYNEBACTERIUM NON DIPHThERIAE***

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

В обзоре рассмотрены факторы патогенности *Corynebacterium non diphtheriae* — пили, микрокапсула, клеточная стенка, ферменты патогенности, токсины, которые обуславливают способность микроорганизмов последовательно взаимодействовать с эпителием входных ворот организма, размножаться *in vivo*, преодолевать клеточные и гуморальные механизмы защиты. Отдельное внимание в статье уделено видам недифтерийных коринебактерий, патогенных для человека и способных продуцировать токсины — *Corynebacterium ulcerans* и *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Описаны механизмы регуляции экспрессии PLD-экзотоксина, его взаимодействие с клетками иммунной системы.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 97—104

Ключевые слова: *Corynebacterium non diphtheriae*, PLD-экзотоксин, ферменты патогенности, пили (фимбрии), *Corynebacterium pseudotuberculosis*

*G.G.Kharseeva, N.A.Voronina*

## **PATHOGENICITY FACTORS OF *CORYNEBACTERIUM NON DIPHThERIAE***

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

Pathogenicity factors of *Corynebacterium non diphtheriae* — pili, microcapsule, cell wall, pathogenicity enzymes, toxins, that determine the ability of microorganisms to consequentially interact with epithelium of entry gates of the organism, replicate *in vivo*, overcome cell and humoral mechanisms of protection, are examined in the review. Particular attention in the paper is given to species of non-diphtheria corynebacteria, that are pathogenic for human and able to produce toxins — *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Mechanisms of expression regulation of PLD-exotoxins, its interaction with immune system cells are described.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 97—104