

УДК 579.842.23:547.455.627

ГАЛАКТОЗА СПОСОБСТВУЕТ РАЗМНОЖЕНИЮ БАКТЕРИЙ ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

С.И. Бахолдина¹, Ф.Н. Шубин², М.П. Исаева¹, А.В. Ракин³, Т.Ф. Соловьева¹

¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159),

² НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1),

³ Институт гигиены и медицинской микробиологии (Д-80336 г. Мюнхен, ул. Петтенкофера, 9а)

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, галактоза, вирулентность, биомасса бактерий.

Изучены влияние галактозы на размножение энтеробактерий и вирулентные свойства бактерий псевдотуберкулеза «галактозного фенотипа». 20 штаммов энтеробактерий выращивали в аэробных условиях на бульоне Luria Bertran (LB) и бульоне LB с добавлением 0,5 % галактозы (LB+Gal). Динамику роста оценивали по изменению оптической плотности суспензий. Неинбрейдных мышей заражали штаммом *Yersinia pseudotuberculosis*, несущим рекомбинантную плазмиду с репортерной системой на основе флюоресцентного белка. Исследовали две группы по 10 животных, которым перорально вводили бактериальную суспензию, выращенную в бульонах LB и LB+Gal. Биологический материал засевали на питательный агар с хлорамфениколом и через 48–72 часа подсчитывали число колоний на 1 г массы фекалий и печени. Большинство штаммов *Y. pseudotuberculosis* более интенсивно размножались в бульоне LB+Gal. Другие виды иерсиний за исключением *Y. ruckeri* и *Y. pestis* Pestoides демонстрировали такую же зависимость роста. Для штаммов *Escherichia coli* в бульоне LB+Gal отмечено усиление роста, а у представителей родов *Salmonella* и *Shigella* размножение не зависело от присутствия углевода. Для *Y. pseudotuberculosis*, культивированных в бульоне LB+Gal, наблюдалось увеличение интенсивности размножения в желудочно-кишечном тракте и рост способности преодолевать эпителиальный барьер кишечника и проникать во внутреннюю среду организма.

В жизненном цикле факультативных паразитов, типичным представителем которых является *Yersinia pseudotuberculosis*, обязательна реализация двух фаз развития: фазы пребывания в организме хозяина (паразитической) и фазы существования во внешней среде (сапрофитной) [4]. Следовательно, экология паразита – это не только его взаимодействие с хозяином, но и выживание во внешней среде. В условиях окружающей среды на микроорганизм действуют одни факторы, а в организме хозяина – другие. В результате происходит перестройка метаболизма бактерий, адекватная условиям их временного пребывания. Возбудители псевдотуберкулеза являются удобной моделью для изучения молекулярных механизмов экологически зависимой пластичности бактерий, находящих отражение в эпидемиологии и инфекционной патологии.

Ранее нами были изучены некоторые условия формирования потенциально вирулентного фенотипа *Y. pseudotuberculosis*, который обладает определенными преимуществами на начальной стадии инфекции [1, 2]. Обнаружено, что присутствие галактозы в среде культивирования увеличивает выход биомассы

Бахолдина Светлана Ивановна – канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета ТИБОХ ДВО РАН; тел.: 8 (4232) 31-07-19, e-mail: bakholdina@piboc.dvo.ru

этих микроорганизмов в гораздо большей степени, чем присутствие другого широко распространенного углеводного субстрата – глюкозы. Также было установлено, что у бактерий, выращенных в среде с галактозой при низкой температуре, изменяются биологические свойства [1]. Как было показано в опытах *in vitro*, у них увеличивается инвазивная активность в отношении эпителиальных клеток, а также повышается устойчивость к некоторым антибиотикам (ампициллин, эритромицин) [1].

В данной работе мы продолжили изучение вирулентных свойств «галактозного» фенотипа бактерий псевдотуберкулеза на модели *in vivo*, а также исследовали влияние галактозы на размножение некоторых представителей энтеробактерий – *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* и *Escherichia* в опытах *in vitro*.

Материал и методы. Использовали различные виды энтеробактерий: девять штаммов *Y. pseudotuberculosis* (серовары O1b, O10, O12, O15), по одному штамму *Y. enterocolitica* (серовар O3), *Y. frederiksenii*, *Y. ruckeri*, *Y. pestis* (биовар Antiqua, штамм Kuma), *Y. pestis* Pestoides, *Shigella flexneri*, *S. sonnei*, а также штаммы *Escherichia coli* K-12, *E. coli* M-17 и два штамма *Salmonella enterica* серовара Enteritidis (табл.). Бактерии выращивали в аэробных условиях в колбах на качалке (180 об./мин) в бульоне Luria Bertani (LB), производства Difco Ltd. и в бульоне LB с добавлением 0,5 % галактозы (LB+Gal) в течение 24 часов при 27 °C. Интенсивность роста оценивали по изменению оптической плотности суспензий на спектрофотометре при длине волны 600 нм.

Для изучения динамики накопления бактерий псевдотуберкулеза в организме неинбрейдных мышей был получен штамм *Y. pseudotuberculosis* IP 3295 серовара O1b, несущий рекомбинантную плазмиду с репортерной системой на основе зеленого флюоресцентного белка – TurboGFP. Для этого фрагмент плазмиды pTurboGFP-B («Евроген», Россия), содержащий кодирующую часть гена gfp с промотором T5/lac и терминатором rrnB T1, был вырезан с помощью эндонуклеаз рестрикции XbaI и XbaI (Fermentas, Литва). Для последующего клонирования в плазмиду pACYC184 (New England Biolabs, Великобритания), обработанную рестриктазами SalI и EcoRV (Fermentas, Литва), один из концов плазмиды pTurboGFP-B (XbaI) был обработан T4 ДНК-полимеразой (Fermentas, Литва). Полученной результирующей плазмидой pACYC-

Таблица

Влияние галактозы на размножение различных видов бактерий, культивируемых при 27°C

Штамм	Характеристика штамма	Интенсивность роста, ЕОП ¹	
		LB	LB+Gal
<i>Y. pseudotuberculosis</i> , 423	O1b, олень, Австралия	2,0±0,1	3,1±0,1
<i>Y. pseudotuberculosis</i> , 422	O1b, заяц, Германия	2,1±0,2	4,0±0,2
<i>Y. pseudotuberculosis</i> , 425	O1b, человек, Япония	2,0±0,3	3,8±0,2
<i>Y. pseudotuberculosis</i> , 603	O10, Япония	2,0±0,1	3,8±0,2
<i>Y. pseudotuberculosis</i> , 605	O12, Япония	1,6±0,3	2,4±0,3
<i>Y. pseudotuberculosis</i> , 608	O15, Япония	1,5±0,1	3,0±0,1
<i>Y. pseudotuberculosis</i> , 276	O1b, вода, Дальний Восток	2,1±0,2	2,1±0,2
<i>Y. pseudotuberculosis</i> , KS 3058	O1b, человек, Дальний Восток	2,3±0,3	3,4±0,4
<i>Y. pseudotuberculosis</i> , IP3295	O1b, Европа	3,7±0,2	5,5±0,3
<i>Y. enterocolitica</i> , Y11	O3, человек	1,7±0,1	2,4±0,3
<i>Y. pestis</i> Pestoides, 8786	Нет данных	1,1±0,2	1,1±0,2
<i>Y. pestis</i> , биовар Antiqua, штамм Kuma	Нет данных	1,0±0,2	1,5±0,3
<i>Y. frederiksenii</i> , 500	O9	2,0±0,4	4,5±0,4
<i>Y. ruckeri</i> , 339	Рыба	1,3±0,3	1,2±0,1
<i>E. coli</i> , K-12, 3254	Человек	2,5±0,2	3,8±0,2
<i>E. coli</i> , M-17	Человек	2,6±0,1	4,3±0,2
<i>S. flexneri</i> , 5236	Человек	2,2±0,4	2,4±0,3
<i>S. sonni</i> , 3221	Человек	2,1±0,5	2,0±0,4
<i>S. enteritidis</i> , 122932	Человек	2,7±0,2	2,5±0,1
<i>S. enteritidis</i> , 12291	Человек	2,2±0,1	1,9±0,3

¹ Единицы оптической плотности.

TurboGFP путем электропорации был трансформирован штамм *Y. pseudotuberculosis*. Отбор трансформантов *Y. pseudotuberculosis*-GFP осуществляли по зеленому свечению колоний в ультрафиолетовом свете на селективной среде LB, содержащей 34 мкг/мл хлорамфеникола (Serva, США).

Штамм *Y. pseudotuberculosis*-GFP выращивали на бульонах LB и LB+Gal при 8 °C в течение 6 суток до достижения ранней стационарной фазы. Обе питательные среды содержали 34 мкг/мл хлорамфеникола. Мышей массой 12 г делили на две группы по 10 особей в каждой и заражали два дня подряд перорально 40 мкл бактериальной суспензии (10⁹ микробных клеток в 1 мл), выращенной на бульонах LB и LB+Gal. Бактериологическое исследование фекалий животных проводили через 2, 5, 7 и 8 суток после заражения. Для исследования печени мышей декапитировали под эфирным наркозом по 5 особей из каждой группы через 5 и 8 суток после заражения. Свежие образцы фекалий и кусочки печени взвешивали, растирали в ступке, высевали по 0,1 мл на питательный агар с хлорамфениколом с учетом необходимых разведений и культивировали при комнатной температуре. Через 48–72 часа под флюоресцентной лампой подсчитывали число выросших колоний на 1 г массы фекалий или органа.

Каждое исследование выполнено в трех независимых опытах. При обработке результатов применяли общепринятые методы статистического анализа с использованием критерия Стьюдента в программе SigmaPlot 3.02 (Jandel Corporation, США).

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. Влияние галактозы на рост бактерий было изучено на 20 штаммах энтеробактерий, принадлежащих к родам *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* и *Escherichia*. Большинство штаммов *Y. pseudotuberculosis* (8 из 9), которые относились к различным серовариантам и были изолированы в различных районах мира (Дальний Восток России, Япония, Австралия, Европа), за исключением одного (штамм 276, O1b – вода, Дальний Восток), более интенсивно размножались в питательной среде с галактозой, чем на бульоне LB. Об этом свидетельствует статистически достоверное увеличение их оптической плотности: в 1,5–2,3 раза при культивировании на бульоне LB+Gal (табл.). Другие виды иерсиний, за исключением *Y. ruckeri* и *Y. pestis* Pestoides, показали такую же зависимость накопления от наличия в среде галактозы. Напротив, штаммы энтеробактерий других родов реагировали по-разному на присутствие галактозы в качестве питательного субстрата. Для обоих исследованных штаммов *E. coli* было отмечено усиление роста, а у представителей родов *Salmonella* и *Shigella* размножение бактерий не зависело от присутствия этого углевода в среде культивирования.

Таким образом, стимулирующее действие галактозы на размножение бактерий (галактозный эффект накопления биомассы) зарегистрировано в отношении иерсиний псевдотуберкулеза. Биологический смысл «галактозного эффекта», установленного для иерсиний, в настоящее время не ясен. Что касается других видов бактерий, для более точных выводов о влиянии галактозы на их рост, по-видимому, необходимо исследование

большего количества штаммов каждого вида. Выявленные различия в размножении исследованных энтеропатогенов при добавлении в культуральную среду галактозы, вероятно, обусловлены разной стратегией выживания этих бактерий [6].

Инициация псевдотуберкулезной инфекции (как естественной, так и экспериментальной) у разных восприимчивых животных определяется не только величиной заражающей дозы, способом заражения и индивидуальными особенностями самих животных, но также наличием у возбудителя факторов патогенности с функцией проникновения и распространения, вырабатываемых при пониженной температуре и кодируемыми хромосомными генами [3, 5]. В данной работе с целью исследования влияния галактозы на вирулентные свойства псевдотуберкулезного микробы использована экспериментальная модель на мышах с пероральным заражением, поскольку наиболее распространенным способом инфицирования людей и животных является попадание иерсиний в желудочно-кишечный тракт с пищей. Как известно, выделение бактерий псевдотуберкулеза из содержимого кишечника зараженных животных представляет определенные трудности. Поэтому в наших исследованиях был использован специально сконструированный штамм *Y. pseudotuberculosis*-GFP, устойчивый к хлорамфениколу, колонии которого имеют специфическое зеленое свечение в ультрафиолетовом свете, что позволило осуществлять количественный анализ возбудителя в фекалиях и органах зараженных животных. Дозы бактерий, культивируемых на бульонах LB и LB+Gal, перед введением двум группам животных были выравнены по оптической плотности при 600 нм и по колониообразующим единицам на питательном агаре.

Количество бактерий, высеваемых из фекалий мышей после заражения штаммом *Y. pseudotuberculosis*-GFP, культивированным в присутствии галактозы, было заметно (на 1,2–1,4 log) выше на протяжении всего эксперимента, в сравнении с животными, инфицированными этим микробом, выращенным без галактозы (рис.). Таким образом, бактерии, культивированные на среде с галактозой, более интенсивно размножаются в желудочно-кишечном тракте животных, что увеличивает вероятность развития инфекции.

В группе мышей, инфицированных бактериями псевдотуберкулеза, выросшими на галактозе, количество особей, в печени которых обнаруживался возбудитель, было в 1,7 раза выше, чем в группе животных, зараженных иерсиниями, культивированными без галактозы: 50 и 30% соответственно. Однако средняя концентрация бактерий на 1 г печени в обеих группах животных не имела статистически достоверного различия ($2,4 \pm 0,2$ и $2,4 \pm 0,3$ log). Следовательно, культивирование возбудителей псевдотуберкулеза в среде с галактозой до попадания их в организм животных не влияло на интенсивность размножения бактерий внутри органа. Полученные данные свидетельствуют о том, что под влиянием галактозы увеличивается

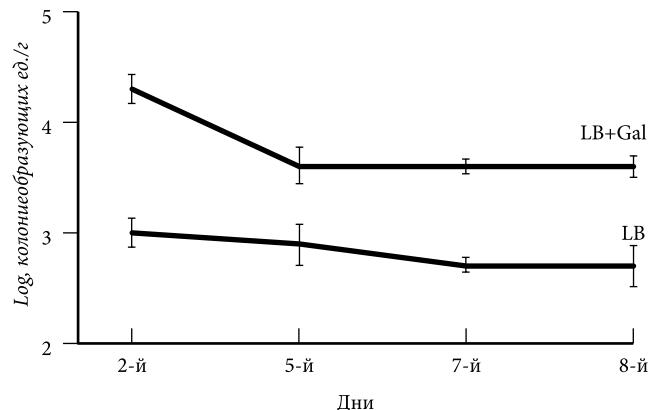


Рис. Концентрация *Y. pseudotuberculosis*-GFP в фекальных образцах животных, зараженных бактериями, выращенными в бульонах LB и LB+Gal.

способность бактерий преодолевать эпителиальный барьер кишечника и проникать во внутреннюю среду организма. Увеличение инвазивной активности *Y. pseudotuberculosis*, выращенных в среде с галактозой при низкой температуре, в условиях *in vivo* может быть связано как с их быстрым размножением (поскольку инвазивность бактерий зависит от их концентрации), так и с увеличением продукции веществ, которые обеспечивают возбудителя способностью успешно преодолевать мембранны клеток млекопитающих. Как известно, энтеропатогенные иерсинии обладают множественными факторами, обеспечивающими их проникновение в клетки хозяина. К ним относятся прежде всего белки, кодируемые хромосомными *inv* (*invasion*), *ail* (*attachment-invasion locus*) и плазмидным *yadA* (*Yersinia adhesion*) генами [5]. Однако в исследуемых вариантах бесплазмидной культуры увеличение инвазивной способности под влиянием галактозы, вероятно, вызвано накоплением в наружной мембране белка инвазина (продукт гена *inv*), так как он кодируется хромосомным геном и экспрессируется при низкой температуре, в отличие от белка *Ail*, а также является первичным фактором адгезии и инвазии.

Таким образом, результаты эксперимента *in vivo* позволяют говорить о том, что культивирование на галактозе способствует увеличению вирулентного потенциала штамма *Y. pseudotuberculosis*-GFP для мышей.

Галактоза широко распространена в природе (молочные продукты, овощи, фрукты) и как субстрат легко доступна для бактерий псевдотуберкулеза. Поэтому «галактозный» фенотип *Y. pseudotuberculosis* может довольно часто встречаться в окружающей среде. Поскольку заражение *Y. pseudotuberculosis* происходит чаще всего через обсемененные сырье продукты, длительно хранившиеся при низкой температуре, не исключено, что инициация псевдотуберкулезной инфекции связана с выявленным «галактозным эффектом».

Литература

1. Бахолдина С.И., Соловьева Т.Ф., Шубин Ф.Н. и др. Влияние глюкозы и галактозы на морфологию и биологические свойства *Yersinia pseudotuberculosis* // Журн. микробиол. 2005. № 5. С. 6–10.

2. Бахолдина С.И., Шубин Ф.Н., Соловьева Т.Ф. Дефицит кислорода при низкой температуре роста увеличивает инвазивную активность и устойчивость к тепловому шоку *Yersinia pseudotuberculosis* // Журн. микробиол. 2009. № 3. С. 18–23.
3. Куклева Л.М., Кутырев В.В., Проценко О.А. Молекулярно-генетические аспекты инвазивных и антифагоцитарных свойств иерсиний // Мол. генетика. 1996. № 1. С. 11–15.
4. Псевдотуберкулез / Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н. и др. М.: Медицина, 2001. 256 с.
5. Ценева Г.Я., Соловьевникова Н.Ю., Воскресенская Е.А. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний // Клин. микробиол. и антимикробн. химиотерапия. 2002. № 3. С. 248–266.
6. Finlay B.B., Cossart P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens // Science. 1997. Vol. 276. P. 718–725.

Поступила в редакцию 15.02.2010.

GALACTOSE AS A CONTRIBUTING FACTOR IN MULTIPLICATION OF PSEUDOTUBERCULOSIS BACTERIA IN VITRO AND IN VIVO

S.I. Bakholdina¹, F.N. Shubin², M.P. Isaeva¹, A.V. Rakin³,
T.F. Solovyova¹

¹ Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS (159100 Ann. of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russia), ² Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Siberian Branch of RAMS (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia), ³ Max von Pettenkofer-Institute for Hygiene and Medical Microbiology (9a Pettenkoferstraße D-80336 München Germany)

УДК 579.869.1:616.98(571.63)

РАСПРОСТРАНЕНИЕ *LISTERIA MONOCYTOGENES* И ЕЕ РОЛЬ В ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ РОССИИ

E.A. Зайцева¹, С.А. Ермолова², Н.М. Пуховская³, Ю.С. Мусатов³, Л.И. Иванов³, Г.П. Сомов¹

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1),

² НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН (123098 г. Москва, ул. Гамалеи, 18),

³ Хабаровская противочумная станция Роспотребнадзора (680031 г. Хабаровск, Санитарный пер., 7)

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, сиквенс-типы, эпидемически опасные штаммы.

В последнее время важное значение придается изучению листериоза, вызываемого бактериями *Listeria monocytogenes*, в связи с их возрастающей ролью в перинатальной и неонатальной патологии, способностью вызывать тяжелые формы заболевания, массивной контаминацией и накоплением в пищевых продуктах. Изучено распространение на Дальнем Востоке России патогенного вида *L. monocytogenes*, выявлены его эпидемически опасные штаммы и установлено их участие в развитии листериозной инфекции в регионе. Впервые определена филогенетическая структура штаммов *L. monocytogenes*, распространенных на Дальнем Востоке, и подтверждено существование двух филогенетических линий внутри вида. Установлена связь между филогенетическим положением штамма *L. monocytogenes* и его эпидемиологическим потенциалом. Впервые показано, что распространенные среди диких грызунов и морских гидробионтов штаммы *L. monocytogenes* могут обуславливать внутриутробную инфекцию у человека, что свидетельствует о возможности прямого заноса вирулентных микроорганизмов из окружающей среды в антропогенные системы.

Интерес к изучению распространения бактерий *Listeria monocytogenes* вызван многочисленными эпидемиями

Зайцева Елена Александровна – канд. мед. наук, в.н.с. лаборатории экологии патогенных бактерий НИИЭМ СО РАМН; тел.: 8 (4232) 44-26-04, e-mail: elza200707@mail.ru

Summary – The authors study effects of galactose in reproduction of enterobacteria and virulent properties of pseudotuberculosis bacteria of 'galactose phenotype'. Twenty strains of enterobacteria were being cultivated under aerobic conditions using Luria broth (LB) and LB with 0.5 % of galactose (LB+Gal). The reproduction dynamics was estimated by studying optical density of suspensions. Non-inbred mice were infested with *Yersinia pseudotuberculosis* strain known to carry recombinant plasmid with reporter system based upon fluorescent protein. The authors have studied two groups by 10 animals undergone peroral introduction of bacterial suspension cultivated in LB and LB+Gal broths. The biological material was inoculated on nutrient agar with chloramphenicol to calculate the number of colonies per 1 gram of fecals mass and liver in 48–72 hours. Most of *Y. pseudotuberculosis* strains were propagating more intensively in the LB+Gal broth. The others, except *Y. ruckeri* and *Y. pestis* Pestoides, showed the same characteristics. The strains of *Escherichia coli* found in the LB+Gal broth demonstrated increasing multiplication. The *Salmonella* and *Shigella* strain propagation did not depend on carbohydrates. As observed, *Y. pseudotuberculosis* bacteria cultivated in the LB+Gal broth propagated more intensively in the digestive tract and demonstrated increasing capability of penetrating epithelial barrier of bowels thus percolating the internal environment.

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, galactose, virulence, bacterial biomass.

Pacific Medical Journal, 2010, No. 4, p. 16–19.

демическими вспышками листериоза в развитых странах (Франция, США, Германия, Испания и др.), связанных с употреблением в пищу продуктов, контаминированных этим микроорганизмом. Он может вызывать тяжелые инфекции (менингит, менингоэнцефалит, септициемия, гастроэнтериты и др.) с высоким уровнем летальности. Особую группу риска при листериозе составляют беременные женщины, у которых инфицирование может обуславливать аборты и мертворождения, чаще на последнем триместре беременности [9].

Исследования последних лет показали, что внутри вида *L. monocytogenes* выделяются три филогенетические линии, отличающиеся по своему эпидемическому потенциалу. Линия, с которой связано до 90% эпидемических вспышек листериоза у человека, у разных авторов имеет обозначение как линия I, линия II или линия B и характеризуется принадлежностью к определенному сероварианту и наличием определенных генов, кодирующих белки-интерналины [6, 10, 12]. Из 13 известных серовариантов *L. monocytogenes* не все способны вызывать заболевание.