ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

УДК 579.843.1:579.26:579:575.25

ИЗУЧЕНИЕ МЕЖВИДОВОЙ КОНКУРЕНЦИИ *VIBRIO CHOLERAE* В БИОПЛЕНКАХ

С.О. Водопьянов, С.В. Титова, А.С. Водопьянов, Л.М. Веркина, И.П. Олейников, Р.В. Писанов, Л.К. Лысова, Н.А. Селянская, О.А. Рыковская

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

На модели биопленок изучена межвидовая конкуренция токсигенных Vibrio cholerae и гетерологичных микроорганизмов E. coli, Klebsiella spp. и Enterococcus spp. Биопленку формировали на пластинках из пищевого пластика в стерильной водопроводной воде. Количество ctx+ вибрионов определяли с помощью ПЦР в режиме реального времени. Предварительно была показана полная корреляция результатов ПЦР и стандартного посева на питательной среде. Обнаружено, что все изученные токсигенные штаммы в условиях межвидовой конкуренции со штаммом кишечной палочки формировали биопленку с плотностью колонизации от 103 до 105 вибрионов на см² пластиковой пластины. Штаммы-конкуренты по ингибирующей активности в отношении вибрионов обладали выраженной гетерогенностью. Выявленная устойчивость токсигенных вибрионов в составе биопленок к ингибирующей активности других гетерологичных микроорганизмов позволяет надеяться на успешное использование в практике эпиднадзора за холерой нового типа ловушек, основанных на феномене формирования биопленок.

***Ключевые слова**: Vibrio cholerae, биопленка, ПЦР, конкуренция.*

S.O. Vodop'yanov, S.V. Titova, A.S. Vodop'yanov, L.M. Verkina, I.P. Oleynikov, R.V. Pizanov, L.K. Lysova, N.A. Selanskaya, O.A. Rykovskaya ❑ **THE STUDY OF INTERSPECIFIC COMPETITION VIBRIO CHOLERAE IN BIOFILMS** ❑ Rostov-on-Don Antiplague Institute of Rosporebnadzor, Rostov-on-Don, Russia.

On the model of biofilms studied interspecific competition toxigenic Vibrio cholerae and the heterologous bacteria E. coli, Klebsiella spp. and Enterococcus spp. Biofilms formed on the plates of food grade plastic in sterile tap water. Ctx + vibrio number was determined by real time-PCR. It has been previously shown complete correlation between results and standard PCR plating on a nutrient agar. It was found that all toxigenic strains in interspecific competition conditions with a strain of E. coli formed biofilm with a density of colonization from 103 to 105 vibrios per cm² plastic plate. Strains competitors for inhibitory activity against Vibrio have a pronounced heterogeneity. Toxigenic vibrio detection of resistance as part of a biofilm inhibitory activity of other heterologous microorganisms gives hope for successful use in the practice of surveillance of cholera a new type of traps based on the phenomenon of the formation of biofilms.

***Key words**: Vibrio cholerae, biofilms , PCR, competition.*

Многие бактерии существуют в природе не только в виде свободноплавающих клеток (планктонной формы), но в виде специфически организованных биопленок, адгезирующих на самых различных субстратах, включая нержавеющую сталь [7, 9, 14–16].

Такая форма существования предоставляет бактериям массу преимуществ – повышенная устойчивость к воздействию неблагоприятных факторов физической, химической и биологической природы, воздействию ультрафиолетового излучения, дегидратации, антибиотикам. Поэтому способность эпидемически опасных холерных вибрионов образовывать биопленку привлекает внимание исследователей [2–4, 8, 14].

Процесс формирования биопленки в природе никогда не протекает в виде монокультуры, токсигенные штаммы, как минимум, конкурируют как с атоксигенными вибрионами, так и с представителями других видов, присутствующими в объектах внешней среды. Процессы, протекающие в сложных биопленках, построенных из микроорганизмов нескольких видов, изучены чрезвычайно слабо [12, 13, 15, 16].

Кроме того, в последнее время отмечена глобальная тенденция увеличения использования пластика в промышленности и быту (ежегодно около 35 кг пластика на каждого жителя Земли). Это закономерно приводит к попаданию пластика в виде различных отходов в водоемы, включая океаны, что может изменять сложившуюся экосистему и создавать новую экологическую нишу, обозначенную как пластисфера, для выживания вибрионов [16].

Феномен внутривидовой конкуренции у холерных вибрионов в планктонной фазе довольно хорошо изучен [2–5]. Ранее на модели анализа уникальных INDEL-маркеров описана внутривидовая гетерогенность токсигенных штаммов холерного вибриона по способности токсигенных вибрионов конкурировать с атоксигенным штаммом и в составе биопленок [1, 2]. Предполагается, что способность токсигенных штаммов вибрионов противостоять внутривидовой конкуренции может иметь большое биологическое значение, поскольку способствует выживанию подобных штаммов с «резистентным» фенотипом при попадании в водоемы.

Однако сведений о способности токсигенных эпидемически опасных вибрионов конкурировать с гетерологичными микроорганизмами в составе сложных биопленок в доступной литературе мы не встретили.

Цель исследования – разработка способа изучения межвидовой конкуренции *Vibrio cholerae* в биопленках и анализ этого потенциала у эпидемически опасных токсигенных вибрионов.

Материалы и методы. В работе использовали девять (ctx+) штаммов *V. cholerae* O1: 19830, 19812, 19242, 19191, 17821, 16302, 5879, 18331, 19613, выделенных на территории Российской Федерации. Штаммы получены из музея живых культур ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора.

В качестве гетерологичных культур использовали одни из основных симбиотических микроорганизмов кишечника человека. Три клинических штамма *E. coli* с фенотипом *Lac*+, *Klebsiella spp.* 226, *Klebsiella spp.* 256 и *Enterococcus* выделены из *faeces* больных дисбактериозом II–III степени. Видовую принадлежность данных культур подтвердили классическими микробиологическими методами и с помощью программно-аппаратного комплекса MALDI Biotyper. Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex («Bruker Daltonics», Германия). Для записи, обработки и анализа масс-спектров использовали программное обеспечение фирмы «Bruker Daltonics» (Германия): flexControl 2.4 (Build 38) и flexAnalysis 2.4 (Build 11).

Из 18 часовых агаровых культур, выращенных при температуре 37 °С на агаре Мартена, (pH 7,6–7,8) и Хоттингера (pH 7,2), готовили 1 млрд взвеси по отраслевому стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича (ОСО-42-25-59-86П). Культуры вибрионов и гетерологичных микроорганизмов в соответствующем разведении (10^4 КОЕ/мл) объединяли в изучаемые пары в соотношении 2 : 1, контрольные пробы содержали только один из исследуемых штаммов в той же концентрации. Количество микробных клеток подтверждали путем подсчета КОЕ на пластинках агара Мартена. Формирование биопленки проводили способом, описанным в наших предыдущих работах, в 30 мл стерильной водопроводной воды при комнатной температуре; в качестве твердого субстрата использовали пластинки (0,5 × 1,5 см) из пищевого пластика [4].

Через определенные временные интервалы инкубации – один час, 1, 3, 7, 16 сут. (срок наблюдения) – пластиковые пластины стерильно извлекали из флаконов, трижды промывали стерильной водой от неадгезированных вибрионов, высушивали на листе фильтровальной бумаги и помещали в пробирку типа «эппендорф» емкостью 1,5 мл, содержащую 1,0 мл деионизированной воды (рис. 1). Для определения жизнеспособности бактерий в составе биопленки пластиковые пластины несколько раз последовательно отпечатывали на поверхности щелочного агара Мартена, посевы инкубировали при 37 °С в течение 24 часов. Обеззараживание пластиковых пластин, содержащеих биопленку, и выделение ДНК проводили немедленно путем температурного лизиса, прогревая пробирки с пластиковыми пластинами при 99 °С в течение 30 минут.

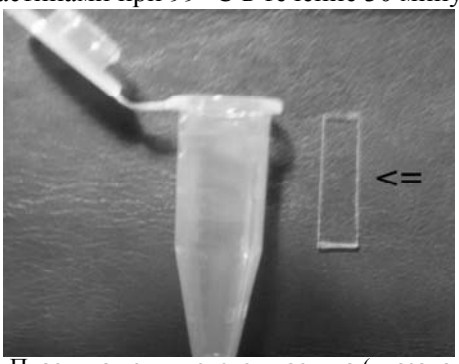


Рис. 1. Пластина из пищевого пластика (указана стрелкой), используемая для формирования сложной биопленки. Для обеззараживания и выделения ДНК пластину помещали в пробирку типа «эппендорф» (слева) и обрабатывали как описано в тексте

Для количественного обнаружения токсигенных штаммов вибрионов использовали ПЦР в реальном времени. Использовали описанную систему (праймеры и зонд) [10]. Олигонуклеотидный зонд, меченный по концам флюорофором HEX и гасителем BHQ1, был синтезирован НПФ фирмой «Евроген» (Москва). Амплификацию в формате реального времени ставили в амплификаторе ДТ-лайт (НПФ «ДНК-технология», Москва). В качестве стандарта использовали 1 млрд взвесь штамма 19191 в соответствующем разведении.

Результаты исследования. В первой серии экспериментов определяли достоверность методики количественного определения токсигенных вибрионов в составе биопленки. Для этого образцы пластиковых пластин, содержащих биопленку токсигенного штамма вибрионов в виде монокультуры, параллельно анализировали двумя способами – с помощью ПЦР и подсчетом КОЕ на пластинках агара Мартена. Предварительно перед высевом для десорбции и дезинтеграции биопленки на изолированные бактериальные клетки пластиковые пластины переносили в стандартные стеклянные пробирки и обрабатывали в гомогенизаторе «Cenco».

Результаты определения количества токсигенных вибрионов в составе биопленки, полученные с помощью ПЦР и путем традиционного высева на плотную питательную среду, совпали, что свидетельствовало о достоверности разработанного метода оценки числа токсигенных вибрионов без использования приема дополнительной обработки моноазидом этидиума [11, 15].

В следующей серии экспериментов мы приступили к оценке межвидовой конкуренции между токсигенными холерными вибрионами и клиническим штаммом *E. coli Lac*+ (таблица 1).

Полученные результаты свидетельствовали, что все изученные токсигенные штаммы в условиях межвидовой конкуренции со штаммом кишечной палочки обладали способностью формировать биопленку в течение 16 суток (срок наблюдения). Плотность колонизации пластика биопленкой токсигеных вибрионов зависела от срока инкубации и штамма, но в среднем составила от 10^3 (Lg 3) на первые–вторые сутки до 10^5 (Lg 5) клеток токсигенных вибрионов на 1 $см^2$ пластиковой пластины к 16 суткам инкубации (таблица 1).

Таблица 1. **Количество клеток *V. cholerae ctx*+ (Lg) в совместной биопленке с *E. coli* Lac+ на 1 $см^2$ пищевого пластика**

№	Штаммы *V. cholerae ctx*+	Срок инкубации (сут.)				
		1	2	3	8	16
1	19830	3	4	4	5	5
2	19812	3	4	4	5	5
3	19242	3	4	4	5	5
4	19191	3	4	4	5	5
5	17821	2	3	3	4	5
6	16302	3	4	4	5	5
7	5879	3	4	4	5	5
8	18331	3	4	4	5	5
9	19613	3	4	4	5	5

Дополнительным контролем доказательства совместного нахождения жизнеспособных токсигенных вибрионов в составе зрелой биопленки служили отпечатки биопленок на агаре Мартена (рис. 2). Во всех случаях на агаре регист-

рировали рост двух морфотипов: просвечивающие в проходящем свете колонии вибрионов в виде круглых, гладких, плоских, голубоватых и четко дискриминируемый рост кишечной палочки в виде мелких, плотных, темных колоний.

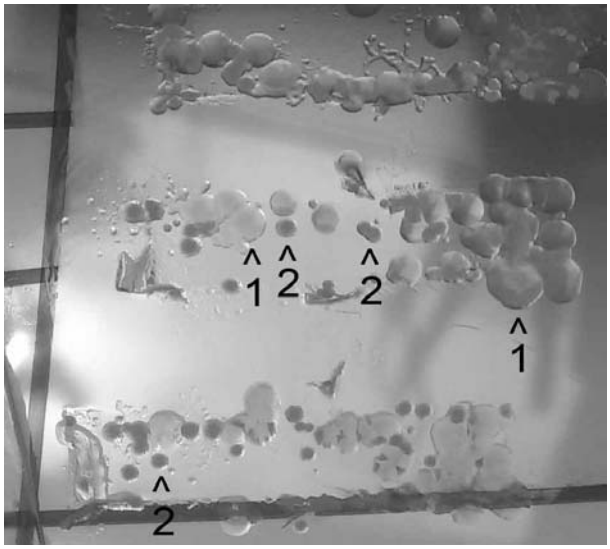


Рис. 2. Колонии *V. cholerae* и *E. coli* Lac+, выросшие на агаре Мартена в отпечатках пластин, содержащих сложную биопленку из клеток *V. cholerae* и *E. coli* Lac+. Обозначения: 1 – Колонии *V. Cholerae,* просвечивающие в проходящем свете круглые, гладкие, плоские, голубоватые, 2 – Колонии *E. coli (*Lac+) мелкие, плотные, темные

Полученные данные свидетельствуют о том, что все девять изученных *V. cholerae* токсигенных вибрионов способны формировать устойчивую биопленку на пищевом пластике даже в условиях межвидовой конкуренции с клиническим штаммом *E. coli*.

В следующей серии экспериментов изучали межвидовую конкуренцию токсигенного штамма *V. cholerae* 19191 с гетерологичными микроорганизмами семейства *Enterobacteriae* и *Enterococcus spp*. Полученные результаты свидетельствовали о гетерогенности штаммов-конкурентов по ингибирующей активности в отношении вибрионов. Так, из двух пар исследованных клинических штаммов *Klebsiella spp.* и *E. coli* только один представитель оказывал выраженное ингибирующее действие на клетки токсигенного штамма вибрионов 19191, снижая количество вибрионов в биопленке на 15 сутки инкубации не менее чем на три порядка по сравнению с другим представителем этого же вида (таблица 2). Подобным ингибирующим действием обладали и клетки штамма *Enterococcus spp.* Тонкие механизмы, обуславливающие столь выраженный антагонизм у отдельных штаммов, нуждаются в дальнейшем изучении.

***Таблица 2*. Количество клеток *V. cholerae ctx*+ (Lg) на 1 см^2 пищевого пластика в совместной биопленке в процессе межвидовой конкуренции с различными гетерологичными микророганизмами**

№	Гетерологичный штамм	Срок инкубации (сутки)			
		1	3	6	15
1	*E. coli* 263	5	3	3	3
2	*E. coli* 217	3	3	3	6
3	*Klebsiella* 226	–	3	–	4
4	*Klebsiella* 256	3	3	2	–
5	*Enterococcus spp.*	–	2	2	–
Примечание: (–) КОЕ холерных вибрионов не обнаружено					

К настоящему времени в науке накоплены данные по взаимоотношению холерных вибрионов с представителями фито- и зоопланктона, однако работ по межвидовому взаимоотношению холерных вибрионов в составе биопленок мы не встречали. Вероятно, характер взаимоотношений идет по типу конкуренции между холерными вибрионами и другими гетерологичными микроорганизмами, что сказывается на их росте и выживаемости. Как видно из полученных данных, холерные вибрионы достигают преимуществ в борьбе за существование, используя разные типы экологических стратегий (r- или K-стратегия) [6].

Полученные данные о роли уникальных особенностей штаммов-антагонистов позволяют объяснить противоречивые данные исследований по изучению конкуренции вибрионов в составе биопленок. Так, в пионерском исследовании на одном образце пластика из океана бактериальное сообщество отличалось от микрофлоры окружающей воды, а суммарное содержание ДНК вибрионов в составе сложной биопленки составило 24 %, в то время в других образцах вибрионы не обнаружены [16]. Возможно, результат в этом конкретном случае может быть обусловлен индивидуальными особенностями штаммов-конкурентов, колонизировавших изученные авторами образцы пластика.

Выводы. Учитывая возрастающую степень загрязнения окружающей среды пластиковыми отходами, приводящую к появлению новой экологической ниши, обозначаемой как пластисфера [16], выявленная с помощью разработанного метода способность токсигенных штаммов холерного вибриона формировать биопленку в присутствии гетерологичных микроорганизмов может влиять на выживание и распространение этого патогена в объектах внешней среды. Данный феномен, на наш взгляд, нуждается в дальнейшем изучении.

Выявленная устойчивость токсигенных вибрионов в составе биопленок к ингибирующей активности других представителей семейства *Enterobacteriae* позволяет надеяться на успешное использование в практике эпиднадзора за холерой нового типа ловушек, основанных на феномене формирования биопленок.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Водопьянов С.О. и др.* Анализ внутривидовой конкуренции *Vibrio cholerae* в биопленках / С.О. Водопьянов, С.В. Титова, А.С. Водопьянов [и др.] // Известия ВУЗ Сев.-Кав. региона. Естественные науки. 2016. № 1. С. 49–53.
2. *Водопьянов С.О. и др.* Анализ внутривидовой конкуренции штаммов *Vibrio cholerae* с помощью INDEL-маркеров / С.О. Водопьянов, А.С. Водопьянов, И.П. Олейников // Здоровье населения и среда обитания. 2016. № 4 (277). С. 35–38.
3. *Заднова С.П. и др.* Сравнительный анализ выживаемости типичных штаммов и штаммов геновариантов Vibrio cholerae биовара эль тор in vitro и in vivo / С.П. Заднова, Т.А. Кульшань, Н.Б. Челдышова // Проблемы особо опасных инфекций. 2015. Вып. 4. С. 65–69.
4. *Титова С.В. и др.* Оценка способности холерных вибрионов к образованию биопленок *in vitro* с помощью нового методического подхода / С.В. Титова, Е.В. Кушнарева // Фундаментальные исследования. 2014. № 10. С. 375–379.
5. *Титова С.В. и др.* Потенциальная возможность заражения водных объектов биопленками холерного вибриона / С.В. Титова, Л.М. Веркина, Л.К. Лысова // Известия ВУЗ Сев.-Кав. региона. Естественные науки. 2016. № 1. С. 80–83.

6. *Одум Ю.* Экология: В 2-х т. / Пер. с англ. М.: Мир, 1986. Т. 1. 326 с.; Т. 2. 376 с.
7. *Burmølle M. et al.* Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? / M. Burmølle, D. Ren, T. Bjarnsholt, S.J. Sørensen // Trends Microbiol. 2014. № 22 (2). P. 84–91.
8. *Farhana I. et al.* Survival of Vibrio cholerae O1 on fomites/ I. Farhana, Z.Z. Hossain, S.M. Tulsiani // World J Microbiol Biotechnol. 2016. № 32.
9. *Fernández-Delgado M. et al.* Biofilm formation of Vibrio cholerae on stainless steel used in food processing / M. Fernández-Delgado, H. Rojas, Z. Duque // Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 2016. № 58.
10. *Huang J. et al.* Quadruplex real-time PCR assay for detection and identification of Vibrio cholerae O1 and O139 strains and determination of their toxigenic potential / J. Huang, Y. Zhu, H. Wen // Appl. Environ. Microbiology. 2009. Vol.75. № 22. P. 6981–6985.
11. *Nocker A. et al.* Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide/ A. Nocker, A.K. Camper // Appl. Environ. Microbiology. 2006. Vol. 72. № 3. P. 1997–2004.
12. *Ren D. et al.* High-throughput screening of multispecies biofilm formation and quantitative PCR-based assessment of individual species proportions, useful for exploring interspecific bacterial interactions / D. Ren, J.S. Madsen, C.I. de la Cruz-Perera // Microb. Ecol. 2014. № 68(1). P. 54–146.
13. *Røder H.L. et al.* Studying Bacterial Multispecies Biofilms: Where to Start? / H.L. Røder, S.J. Sørensen, M. Burmølle // Trends Microbiol. 2016. №24(6).
14. *Silva A.J. et al. Vibrio cholerae* biofilms and Cholera Pathogenesis / A.J. Silva, J.A. Benitez // PLOS Neglected Tropical Diseases. 2016. February, 4.
15. *Tavernier S. et al.* Quantification of Pseudomonas aeruginosa in multispecies biofilms using PMA-qPCR / S. Tavernier, T. Coenye // Peer J. 2015. February, 24.
16. *Zettler E.R. et al.* Life in the «plastisphere»: microbial communities on plastic marine debris./ E.R. Zettler, T.J. Mincer, L.A. Amaral-Zettler // Environ Sc. Technol. 2013. July, 2.

Контактная информация:
Водопьянов Сергей Олегович,
тел.: +7 (863) 240-22-66; 8-903-402-11-63,
e-mail: serge100v@gmail.com
Contact information:
Vodop'yanov Sergey,
phone: +7 (863) 240-22-66; 8-903-402-11-63,
e-mail: serge100v@gmail.com

УДК 616-093/-098

СТРУКТУРА МИКРОБИОЦЕНОЗА ГРУДНЫХ ДЕТЕЙ – ПАЦИЕНТОВ НАЦИОНАЛЬНОГО ГОСПИТАЛЯ ПЕДИАТРИИ Г. ХАНОЙ, СРВ

Т.Ф. Степанова[1], Л.В. Катаева[1], А.П. Ребещенко[1], Кху Тхи Кханх Дунг[3], О.В. Посоюзных[1], А.Н. Кузнецов[2], Ле Тхи Минх Хуонг[3], Тран Тхи Най[2]

[1]ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, Тюмень, Россия

[2]Совместный Российско-Вьетнамский тропический научно-исследовательский и технологический центр (Тропический центр), Ханой, Вьетнам

[3]Национальный госпиталь педиатрии, Ханой, Вьетнам

Представлены результаты исследований структуры микрофлоры, выделенной со слизистых зева и прямой кишки пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных Национального госпиталя педиатрии, г. Ханой. Показано, что структура микробиоценоза детей, получающих лечение в инфекционном блоке отделения, по всем группам бактерий не отличается от микробиоценоза детей неинфекционного блока.
***Ключевые слова**: микробиоценоз, грудные дети, виды бактерий.*

T.F. Stepanova, L.V. Kataeva, A.P. Rebeschenko, Khu Thi Khanh Dung, O.V. Posoiuznykh, A.N. Kuznetsov, Le Thi Minh Huong, Tran Thi Nhai ❑ **MICROBIOCENOSIS STRUCTURE OF NEWBORN – PATIENTS OF NATIONAL HOSPITAL OF PEDIATRICS, HANOI, VIETNAM** ❑ Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russia; Russian-Vietnamese Tropical Research and Technology Centre (Tropical Centre), Hanoi, Vietnam; National Hospital of Pediatrics (NHP), Hanoi, Vietnam.

The results of studies of the microflora structure isolated from mucous pharynx and rectum of newborn patients of intensive care unit of National Hospital of Pediatrics, Hanoi, are presented. It is shown that the structure of microbiocenosis of children receiving treatment in an infectious separation unit for all groups of bacteria is different from microbiocenosis of children of noninfectious unit.
***Key words**: microbiocenosis, infants, bacterial species.*

В рамках реализации программы сотрудничества Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека с Министерством здравоохранения Социалистической Республики Вьетнам по оказанию помощи СРВ в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения в 2015–2017 гг. ТНИИКИП Роспотребнадзора проводил работу по внедрению микробиологического мониторинга и систем биологической безопасности медицинской помощи при организации санитарно-эпидемиологического режима в лечебных организациях.

Заболеваемость инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП), является одной из глобальных мировых проблем на современном этапе развития здравоохранения и затрагивает все страны вне зависимости от степени их развития [3]. Широкое распространение ИСМП в медицинских организациях различного профиля, значительный ущерб здоровью населения, экономике и демографической ситуации в различных странах континента определяют актуальность их профилактики на современном этапе [1].