

УДК 619.579

UDC 619.579

**УСКОРЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ
ИНДИКАЦИЯ ВЕГЕТАТИВНЫХ И L-ФОРМ
МИКРООРГАНИЗМОВ**

**ACCELERATED DIFFERENTIAL
INDICATION OF VEGETATIVE AND L-
FORMS OF MICROORGANISMS**

Бровкина Анна Николаевна
к.в.н., докторант
*Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский
институт ветеринарной санитарии, гигиены и
экологии РАСХН, Москва, Россия*

Brovkina Anna Nikolaevna
Cand.Vet.Sci., competitor for doctor's degree
*The state scientific institute the All-Russia scientific
research institute of veterinary sanitary, hygiene and
ecology, The Russian academy of agricultural
sciences, Moscow, Russia*

На основе дифференциального концентрирования бактерий с помощью сендвича фильтров с различным диаметром пор и ПЦР-РТ разработана схема индикации биологических агентов бактериологической природы, находящихся в L-трансформации

On the basis of differential concentration of bacteria with the help of a "sandwich" of filters with various pores diameters and PCR-RT, the circuit of indication of biological agents of the bacteriological nature which is taking place in L-transformation is developed

Ключевые слова: ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЕ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ, ВЕГЕТАТИВНЫЕ И L-ФОРМЫ, МЕТОД ПЦР-РТ, L-ТРАНСФОРМАЦИЯ

Keywords: DIFFERENTIAL CENTRIFUGATION, VEGETATIVE AND L-FORMS, L-TRANSFORMATION, METHOD PCR-RT

Бактерии, полностью или частично утратившие клеточную стенку, но сохранившие способность к размножению, называют L-формами (в честь института им. Д. Листера, Англия, в котором они были впервые выделены). Независимо от формы исходной клетки, L-формы бактерий морфологически неразличимы и представляют собой сферические образования различных размеров (3).

L-формы являются формой выживания и размножения микроорганизмов при отсутствии клеточной стенки. Различают нестабильные и стабильные L-формы бактерий. Нестабильные способны к реверсии в исходный вид в отсутствии L-трансформирующего фактора и являющиеся выражением фенотипических изменений бактерий. Стабильные L-формы бактерий, как правило, не способны к реверсии. Из нестабильных L-форм выделяют условно-стабильные. Они отличаются отсутствием способности к реверсии при пассировании на средах без L-трансформирующего агента. Могут реверсировать при дополнительных изменениях условий культивирования (1).

Как стабильные, так и нестабильные L-формы характеризуются значительным полиморфизмом, независимо от фазы развития и условий культивирования. В составе L-колоний обычно присутствуют:

- элементарные тела размером 0,2-1,0 мкм;
- шаровидные или неправильной формы клетки от 1 до 5 мкм;
- большие тела размером 5-50 мкм;
- нитевидные структуры диаметром 0,1-0,2 мкм;
- бесструктурная масса, являющаяся детритом клеток, в которой

граница отдельных клеток не видна (105).

Различия в структуре клеточной стенки стабильных и нестабильных L-форм особенно наглядно у L-форм грамотрицательных бактерий.

Изменения бактериальной клетки при L-трансформации не исчерпывается клеточной стенкой и мембранным аппаратом. Эти изменения на поздних стадиях L-трансформации затрагивают и генетический аппарат клетки. Существует также явление спонтанной L-трансформации бактерий, которое представляет собой естественную, генетически запрограммированную форму развития популяции, скорость и степень проявления которой определяется условиями среды обитания (1, 2).

Для L-форм характерны колонии, растущие в питательный субстрат, способные проходить через бактериальные фильтры, благодаря особым способам репродукции. Изменение характера роста и обменных процессов по сравнению с исходными формами, способность к стабилизации и другие признаки, существенно отличают L-формы от всех других групп микроорганизмов (2).

Гетероморфные формы, сферопласты и протопласты, могут являться потенциальными предшественниками L-форм, т.е. начальным этапом L-трансформации.

Приведенные данные, касающиеся полиморфизма L-форм, архитектоники колоний и взаимоотношения между отдельными клетками внутри колонии, показали перспективность дальнейшего исследования бактерий на популяционном уровне.

Изменение характера роста и обменных процессов по сравнению с исходными формами, способность проходить через бактериальные фильтры к реверсии и другие признаки, существенно отличают L-формы от всех других групп микроорганизмов и создает определенные трудности в диагностике. Индикация и идентификация L-форм методами иммунологического анализа затруднены и требуют предварительной реверсии трансформированных клеток. При этом, время анализа значительно увеличивается. Эта особенность может учитываться в тактике применения. Поэтому, разработка ускоренных способов индикации L-форм является актуальной задачей.

Перспективным в этом направлении является использование метода ПЦР в реальном времени с предварительным концентрированием L-форм на мембранных фильтрах.

Цель работы

Проведение исследований по индикации L-форм патогенных микроорганизмов родов *Salmonella* и *Shigella* с помощью метода ПЦР в реальном времени.

Материалы и методы

Исследовали пробы воды открытых водоемов со спецобъектов, а также воду, искусственно контаминированную L-формами сальмонелл.

Готовили серию разведений антибиотиков: кефзола, гентамицина и актиномицина с концентрацией от 12,5 до 600,0 мкг/см³.

Для искусственной контаминации к 2,5 см³ полужидкого МПА температурой 40-43°C, добавляли культуру клеток *S. enterocolitica* (10. ед.

по стандарту мутности ГИСК им. Тарасевича), перемешивали и вносили 0,1 см³ антибиотика в определенном разведении.

Затем пробирки помещали в термостат при 37⁰С для экспозиции с антибиотиком на 2 часа. После инкубации, культуру при воздействии антибиотиков в полужидком агаре раскапывали дозатором в количестве 0,5 см³ на мембранные фильтры и помещали в термостат на 18 часов при температуре 37⁰С. После экспозиции визуально определяли рост культуры при воздействии различных разведений антибиотиков.

Далее фильтры № 4 удаляли, а фильтры № 2 переносили на стерильные чашки Петри с обогащенной питательной средой (МПА с добавлением 10 % (об.) сыворотки лошади), и помещали в термостат при 37⁰С для учета степени реверсии. Реверсия учитывалась через 48-72 часа.

Пробы воды открытых водоемов отбирали параллельно в три стерильных флакона по 500 см³.

При значительном загрязнении пробы воды предварительно фильтровали через бумажный фильтр. Затем, пробы концентрировали фильтрованием через двойные мембранные фильтры “Millipor” S-РАК. На мембранный фильтр №2 с размером пор 0,22 мкм помещали фильтр № 4 с размером пор 0,45 мкм. Затем фильтр № 4 удаляли, а фильтр № 2 использовали для проведения дальнейших исследований. Фильтр №2 из первой пробы переносили в пробирку типа Эппендорф с 1,5 – 2 см³ стерильного физиологического раствора, осадок суспендировали, подвергали высокоскоростному центрифугированию (центрифугировали 10 минут при 10000 g). Осадок ресуспендировали в 300 мкл стерильного физиологического раствора и использовали для выделения ДНК.

Фильтр №2 из второй пробы помещали в пробирку с 9 см³ питательной среды (сердечно-мозговой бульон для культивирования притязательных микроорганизмов «Biomerieux», Франция) и

культивировали в течение 48 – 72 часов при температуре 37°C. Через 48 часов и 72 часа инкубирования делали высевы на трипказо-соевый агар («Biomerieux», Франция) в объеме 10 мкл. Инкубировали посеvy в течение при температуре 37°C. Учет результатов проводили через 24, 48, 72 часа.

Изучение различных морфологических форм бактерий проводили с помощью электронного микроскопа. На мембранных фильтрах фиксировали парами 25% глютарового альдегида и обезвоживали в парах пропиленоксида или ацетона. Затем интересующую область фильтра наклеивали на объектодержатель. Образцы препаратов напыляли золотом 10 минут на напылительной установке "Hitachi E-109" при толщине напыления 50 нм. В работе использовали электронный микроскоп "Hitachi-800" со сканирующей приставкой "Hitachi H-8010" (Япония) при ускоряющем напряжении 75 кВ и инструментальном увеличении 1-30 тыс.

Для выделения нуклеиновых кислот из исследуемых образцов использовали комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «ДНК-сорбВ», производства ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, а также автоматическую станцию для экстракции нуклеиновых кислот «NucliSENS® easyMAG™» («BioMerieux», Франция). Для выделения ДНК использовали 0,05 см³ осадка.

Для выделения ДНК с помощью прибора «NucliSENS® easyMAG™» использовали 100 мкл исследуемых проб. Экстракцию проводили в автоматическом режиме с лизисом в приборе в течение 20 минут. Объем элюата составлял 50 мкл.

Готовый препарат ДНК использовали для постановки реакции амплификации.

Индикацию бактерий родов *Salmonella* (*Salmonella* spp.) и *Shigella* (*Shigella* spp.) проводили на приборе «Rotor Gene 6000» (производства Corbett Research, Австралия) методом ПЦР в реальном времени. Для амплификации использовали «мультиплексный формат» - набор реагентов

для выявления и дифференциации ДНК микроорганизмов рода *Shigella* (*Shigella* spp.) и энтероинвазивных *E. coli* (EIEC), *Salmonella* (*Salmonella* spp.) и *Campilobacter* (*Campilobacter* spp.), аденовирусов F (*Adenovirus* F) и РНК ротавирусов группы А (*Rotavirus* А), норовирусов 2 генотипа (*Norovirus* 2 генотип) и астровирусов (*Astrovirus*) в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® ОКИ скрин-FL», производства ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора.

Все исследуемые образцы тестировали с одновременной постановкой всех необходимых контролей.

Результаты

Бактериальные клетки после действия антибиотиков переходили в стадию гетероморфного роста и L-трансформации. Трансформированные клетки, имеющие меньшие размеры и поврежденную клеточную стенку, проходили через поры верхнего фильтра, но удерживались на нижнем, в результате чего происходило разделение вегетативных клеток и клеток в стадии L-трансформации.

Исследование образцов препаратов из верхних фильтров показало наличие клеток, находящихся в стадии гетероморфизма и на разных этапах L-трансформации: клетки протопластного типа, гигантские клетки, L-формы.

При изучении образцов препаратов из нижних фильтров были выявлены преимущественно клетки в стадии L- трансформации, включая L-формы размером 0,25-0,70 мкм (рис. 1).



Рис. 1. Стадии L- трансформации, включая L-формы.

При воздействии ампициллина, гентамицина, кефзола и актиномицина в концентрациях от 12,5 до 50,0 мкг/ см³ наблюдали реверсию клеток на нижнем фильтре после инкубирования на обогащенной питательной среде при температуре 37⁰С через 24 часа; при воздействии ампициллина и гентамицина в концентрациях от 100 до 600 мкг/ см³ реверсию наблюдали через 36 - 48 часов инкубирования, что свидетельствовало о бактериостатическом действии данных антибиотиков. При этом на фильтрах методом сканирующей электронной микроскопии были выявлены клетки в стадии гетороморфизма и бактерии с морфологическими признаками свойственные не измененным клеткам – ревертантам (рис. 2).



Рис. 2. Клетки в стадии гетероморфизма и бактерии с морфологическими признаками свойственными ревертантам

Концентрации кефзола от 400 до 600 мкг/см³ и актиномицина от 100 до 500 мкг/мл не вызывали реверсии клеток в исходное состояние, что свидетельствовало о бактерицидном эффекте препаратов.

Исследование в СЭМ нижних фильтров показало наличие гетероморфных клеток на различных стадиях L-трансформации. При инкубировании этих фильтров на обогащенной питательной среде была выявлена реверсия клеток в исходное состояние.

Полученные при ПЦР-анализе результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на заданном уровне пороговой линией, что соответствовало наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «Сt» в соответствующей графе в таблице результатов.

По результатам исследований из 278 исследованных проб воды из открытых водоемов бактерии рода *Salmonella* были обнаружены при четком прохождении всех положительных, отрицательных и внутренних контролей в 4 пробах воды открытых водоемов. Бактерии рода *Shigella* обнаружены в 1 образце воды. При этом, необходимо отметить, что в 2

случаях при классическом методе экстракции ДНК результат амплификации был отрицательным. При повторном проведении выделения ДНК отмечена полная корреляция результатов.

При учете результатов бактериологического метода рост микроорганизмов на TSA регистрировали после 72-х часового обогащения в жидкой питательной среде на вторые и третьи сутки после пересевов на плотные питательные среды. Для идентификации выросших на TSA микроорганизмов проводили дальнейший посев на дифференциально-диагностические среды (Salmonella-Shigella agar, Hektoen agar), а также проводили идентификацию на приборе «VITEK2» («BioMerieux», Франция).

Результаты бактериологического анализа представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Результаты бактериологического анализа при индикации

Наименование исследуемого образца	Бактериологический метод исследования							
	Жидкие питательные среды (сердечно-мозговой бульон)				Плотные питательные среды (трипказо-соевый агар)			
	Время инкубирования до появления признаков роста				Время инкубирования до формирования колоний			
	24 часа	48 часов	72 часа	96 часов	24 часа	48 часов	72 часа	96 часов
образца воды из открытых водоемов	роста нет	помутнение среды (1 образец)	помутнение среды (5 образцов)	помутнение среды (5 образцов)	роста нет	рост мелких колоний	рост колоний	рост колоний

Валидация результатов исследований методом ПЦР и бактериологическим методом представлена в таблице 2.

Таблица 2.

Результаты исследований образцов воды открытых водоемов на присутствие L-форм бактерий родов *Salmonella* spp. и *Shigella* spp.

Наименование исследуемого образца	Метод исследования							
	ПЦР-РТ				Бактериологический метод			
	<i>Salmonella</i> spp.		<i>Shigella</i> spp.		<i>Salmonella</i> spp.		<i>Shigella</i> spp.	
	Время анализа	Положительные результаты	Время анализа	Положительные результаты	Время анализа	Положительные результаты	Время анализа	Положительные результаты
образцы воды из открытых водоемов	~12-18 ч	4	~12-18 ч	1	144-180 ч	4	180 ч	4

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что применение технологии с использованием сендвича мембранных фильтров и «мультиплексного» формата ПЦР в реальном времени в комплексе с автоматической экстракцией способно значительно повысить информативность анализа при сокращении времени его проведения, а также проводить качественную дифференциальную диагностику возбудителей инфекций, находящихся в L-трансформации. Применение данной технологии позволяет организовать мониторинговые исследования потенциально опасных в эпидемиологическом отношении очагов, а также проводить ускоренную индикацию биологических агентов.

Список использованной литературы:

1. Павлова И.Б. Закономерности развития популяций бактерий в окружающей среде (электронно-микроскопическое исследование) // Диссертация в виде научного доклада, М., 1999.
2. Павлова И.Б., Куликовский А.В. и др. Электронно-микроскопическое исследование развития бактерий в популяциях. Морфология колоний бактерий // Журнал микробиологии, эпизоотологии и иммунологии, 1990, № 9, с. 15-20.
3. Покровский В.И., Пак СГ, Брико НИ., Данилкин Б.К. Инфекционные болезни и эпидемиология. – М.- 2009.