

- ITS improvement by use of chromogenic medium and PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 2012, 157 (2): 189-194.
47. Sarma Z., Heifetz M., Talmor J. et al. Evaluation of use of a new chromogenic agar in detection of urinary tract pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36 (4): 990-994.
48. Sikora A.E., Beyhan S., Yildiz F.H. Cell envelope perturbation induces oxidative stress and changes in iron homeostasis in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2009, 191 (17): 5398-5408.
49. Townsley L., Mangus M.P.S., Mehic S., Yildiz F.H. Response of *Vibrio cholerae* to low-temperature shifts: CspV regulation of VI secretion, biofilm formation, and association with zooplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016, 82 (14): 4441-4452.
50. Xu Q., Dziejman M., Mekalanos J.J. Determination of the transcriptome of *Vibrio cholerae* during intrainestinal growth and midexponential phase in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003, 100 (3): 1285-1291.

Поступила 15.11.16

Контактная информация: Мазрухо Алексей Борисович, к.м.н.,
344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, р.т. (863)240-27-03

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*И.А.Иванова, Б.Н.Мишанькин, И.А.Беспалова,
Н.Д.Омельченко, Е.С.Шипко, А.В.Филиппенко*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ СТРУКТУР ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ И ДИАГНОСТИКИ ХОЛЕРЫ

Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт

Потребность в эффективной и экономичной вакцине против холеры продолжает оставаться актуальной в связи с появлением новых штаммов, которые вызывают тяжелые клинические формы холеры и могут вытеснить штаммы седьмой пандемии, а также угрозе выноса инфекции из эндемичных стран. В обзоре представлены литературные данные об использовании белков наружных мембран, везикул, «теней» возбудителя холеры для специфической профилактики и диагностики этого заболевания.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 110—115

Ключевые слова: белки наружных мембран, везикулы, «тени» возбудителя холеры, вакцина

*I.A.Ivanova, B.N.Mishankin, I.A.Bespalova,
N.D.Omelchenko, E.S.Shipko, A.V.Filippenko*

USE OF *VIBRIO CHOLERAE* SURFACE STRUCTURES FOR SPECIFIC PROPHYLAXIS AND DIAGNOSTICS OF CHOLERA

Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control, Russia

The need for efficient and cost-effective cholera vaccine hasn't lost its actuality in view of the emergence of new strains leading to severe clinical forms of cholera and capable to replace strains of the seventh cholera pandemic, and in connection with the threat of cholera spreading beyond the borders of endemic countries. In this review data from literature sources are presented about the use of outer membrane proteins, vesicles, cell ghosts of the cholera causative agent in specific prophylaxis and diagnostics of the disease.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 110—115

Key words: outer membrane proteins, vesicles, cell ghosts of cholera causative agent, vaccine

Во время текущей пандемии получены противоречивые данные об эффективности специфической профилактики холеры и ее применении в случаях завоза инфекции из внеэндемичных территорий. В соответствии с этим менялась официальная точка зрения экспертов ВОЗ и национальных служб здравоохранения на эту проблему [10]. Идеальной вакцины, которая бы отвечала всем требованиям ВОЗ, до сих пор не существует [24]. Аттenuированные вакцины способны индуцировать мощный протективный ответ после однократного применения, но могут оказывать и негативное действие на больных с ослабленным иммунитетом. Убитые вакцины с успехом продемонстрировали свой потенциал по защите населения эндемичных районов, однако не способны обеспечить долгосрочную защиту и не подходят для детей в возрасте до двух лет. Кроме того, они принимаются в несколько доз [30]. Существенным препятствием для усовершенствования химических вакцин против холеры является недостаточность сведений о природе протективных антигенов холерного вибриона. Вместе с тем, установлено, что антигены, ответственные за формирование антибактериального иммунитета, локализованы, главным образом, на наружных мембранах (НМ) возбудителя, поэтому исследования по совершенствованию средств иммунопрофилактики и иммунодиагностики холеры тесно связаны с поверхностными структурами холерного вибриона [3].

Белки наружной мембраны различных бактерий играют двойственную роль во взаимоотношениях патогена с иммунной системой организма-хозяина. С одной стороны, наружные белки являются факторами патогенности, подавляющими отдельные стадии иммунной защиты хозяина, с другой — представляют собой молекулы-мишени для системы врожденного иммунитета макроорганизма, активируя факторы немедленной защиты и участвуя в формировании специфического иммунного ответа [8]. Поэтому понимание структуры и свойств белкового состава бактериальной наружной мембраны необходимо при разработке противоинфекционных препаратов и вакцин [17]. Кроме того, препараты, созданные на основе белков НМ бактерий, могут защищать от инфекции, вызываемой всеми типами данного вида микроорганизма, и являются перспективными для профилактики родственных инфекций [8].

Наружные мембраны *Vibrio cholerae* содержат белки (Omp), продукция которых регулируется в ответ на желчь, осмолярность, колебания pH и другие сигналы окружающей среды. В составе мембранных пузырьков поверхностные белки могут принимать участие в транспорте различных токсинов, ферментов, ДНК и т.д. в клетки хозяина во время колонизации кишечника [21], что предполагает их важную роль в индукции иммунного ответа макроорганизма. Белки внешней мембраны возбудителя холеры являются видоспецифическими антигенами и способны вызывать образование агглютинирующих и вибриоцидных антител, перекрестно реагирующих с вибрионами разных серогрупп [16]. Ранее сообщалось о наличии иммуногенной активности у белка OmpW (22 кДа), присутствующего практически у всех исследованных штаммов холерных вибрионов [16], и OmpV (25 кДа), связанного с пептидогликаном белка теплового шока [35]. Мишанькиным Б.Н. и др. [5] получены данные о наличии протективных и иммуногенных свойств у OmpT (около 40 кДа) возбудителя холеры, что может быть полезным для совершенствования специфической профилактики этого заболевания.

Иммуногенными свойствами обладают и токсин-корегулируемые пили адгезии (Tcp) [11, 33]. Антитела против Tcp, образующиеся непосредственно к белкам, входящим в состав дисульфидной петли, оказывают протективное действие при экспериментальной холере [27], предотвращая развитие инфекционного процесса на его первой стадии — колонизации. Включение Tcp в состав вакцинных препаратов может усилить их иммуногенность [2], так как адгезины вызывают выработку секреторных антител класса А, предотвращающих колонизацию кишечника. Фактор колонизации белок TcpF, продуцируемый *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, вызывает интерес исследователей как потенциальный протективный антиген. При оценке иммуногенности и протективности выявлен дополнительный протективный эффект при сочетании его с В субъединицей холерного токсина (ХТВ) [31]. Показано, что рекомбинантная субъединица А токсин-корегулируемых пилей (TcpA) холерного вибриона может использоваться в качестве носителя в оральной вакцине против холеры как самостоя-

тельно [19], так и совместно с ХТВ в качестве иммуногенов при разработке эффективной мультивалентной субъединичной вакцины против *V. cholerae* [32].

Экстрацеллюлярная секреция продуктов является основным механизмом «общения» грамотрицательных возбудителей с макроорганизмом. Патогенные и непатогенные виды грамотрицательных бактерий выделяют везикулы (пузырьки), которые служат транспортным средством для секретируемых белков и липидов и играют важную роль в колонизации, передавая факторы вирулентности в клетки хозяина, причем механизмы пузырек-опосредованной доставки токсинов очень разнообразны. Анализ биохимических и функциональных характеристик везикул продемонстрировал, что они содержат адгезины, токсины и иммуномодулирующие соединения, благодаря чему опосредуют проявление бактериальных и инвазивных свойств, являются причиной цитотоксичности, а также активируют иммунную систему макроорганизма [21, 26]. Сохранение нативной структуры мембранных антигенов и хорошая физико-химическая стабильность делают везикулы наружных мембран (ОМВ) привлекательными для использования их в качестве вакцин, адъювантов, в лекарственной терапии бактериальных и вирусных болезней [28].

Холерный вибрион, как и все грамотрицательные бактерии, выделяет для транспорта важных факторов вирулентности ОМВ, которые представляют собой образования сферической формы размером от 20 до 200 нм. Показано, что ОМВ играют важную роль в доставке ХТ к клеткам эпителия тонкого кишечника [14]. Также установлено, что взаимодействие ОМВ с эпителиальными клетками кишечника модулирует провоспалительный ответ клеток эпителия и активирует дендритные клетки, что способствует дифференциации Т-клеток в сторону Th2/Th17 ответа [15].

О возможности использования ОМВ холерного вибриона для специфической профилактики холеры свидетельствуют результаты, полученные за рубежом. Показано, что оральная или интраназальная иммунизация животных ОМВ индуцировала долгосрочную иммунную защиту от заражения холерой и защищала потомство от колонизации кишечника возбудителем. Независимо от способа иммунизации у мышей регистрировался выраженный иммунный ответ на различные антигены, присутствующие в ОМВ [23, 36, 37]. Иммунизация ОМВ холерного вибриона самок мышей снижала колонизацию бактериями кишечника новорожденных мышат, инфицированных *V. cholerae*: после заражения достоверно уменьшалось количество вибрионов, а также снижалась инфицирующая способность бактерий, выделяемых во внешнюю среду с фекалиями [12, 13]. Индийские авторы выявили, что пероральная иммунизация ОМВ *V. cholerae* вызывала формирование серогруппоспецифического иммунитета и защищала иммунизированных взрослых мышей от заражения гетерогенными штаммами этого возбудителя, что может быть полезным для создания новой вакцины против циркулирующих штаммов [38]. Японскими авторами также показано, что оральная иммунизация очищенными ОМВ холерного вибриона индуцировала высокие титры специфических антител, которые оказывали вибриоцидное действие на гомологичные и некоторые гетерологичные штаммы *V. cholerae*. Кроме того, ОМВ обладали протективными свойствами и защищали кроликов от последующего заражения холерой. Было также установлено, что ОМВ достоверно менее реактогенны, чем живые и убитые бактерии, что свидетельствует о перспективности их использования для профилактики этого заболевания [34].

Другим направлением в плане совершенствования профилактики инфекционных болезней является исследование иммуногенных и протективных свойств так называемых «теней», у которых сохраняются все поверхностные структуры. «Тени» проявляют адъювантные свойства и вызывают формирование гуморального и клеточного иммунного ответа на антигены. Протективные антигены могут быть представлены как на внутренней, так и на наружной мембране «теней». После очистки и лиофилизации препараты «теней» могут сохраняться при комнатной температуре достаточно долго. Цикл производства от исходной культуры до прививки очищенным препаратом занимает не более одного дня и, таким образом, отвечает современным критериям быстрого производства вакцин, что позволяет не хранить ее большие запасы [22]. Все вышеперечисленное обуславливает повышенный интерес исследователей к этим бактериальным структурам.

По данным F.O. Eko et al. [18] оральная иммунизация кроликов «теньями» клеток *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп стимулировала образование высокого титра вибриоцидных антител.

Для конструирования искусственных вакцин иркутскими исследователями были использованы наружные мембраны клеток возбудителя холеры, полученные в результате разрушения и инактивации вибрионов Эль тор мочевиной с последующей обработкой их трипсином [3]. Предложенный препарат был нетоксичен, обладал иммуногенностью и протективностью, что позволило рекомендовать его в качестве основы, обеспечивающей формирование эффективного антибактериального иммунитета, для конструирования оральной бесклеточной холерной вакцины [4, 9].

В Ростовском-на-Дону противочумном институте выявлены иммуногенная и протективная активности у НМ холерного вибриона, выделенных щадящими методами из штамма *V. cholerae* El tor 18950 (ctx⁻, tcp⁻, OmpT⁺, OmpU⁻, OmpW⁺). Иммунизация мышей и взрослых кроликов НМ претовращала развитие холеры у экспериментальных животных, зараженных вирулентными штаммами возбудителя, причем этот эффект сохранялся до 5 месяцев поствакцинального периода (срок наблюдения) [6].

Антитела, полученные к белковым компонентам НМ бактериальных клеток, также обладают протективным эффектом [20, 25]. M. Das et al. [16] показали, что антисыворотки к белкам НМ холерного вибриона значительно снижают секрецию жидкости в петлях тонкого кишечника взрослых кроликов при заражении их гомологичным штаммом возбудителя холеры, а комбинация антисывороток к разным белкам — у зараженных гетерологичными вибрионами серотипа Огава и штаммов O139 животных.

В последние годы развивается направление по использованию белков наружных мембран для диагностики инфекционных болезней. Разработан быстрый MALDI-TOF MS анализ, который может выявлять эпидемические штаммы возбудителя холеры O1/O139 и другие патогенные вибрионы по различию в массе белка OmpU, аминокислотная последовательность которого у эпидемически значимых штаммов холеры является уникальной и высоко консервативной [29]. Для детекции эпидемически опасных штаммов холерных вибрионов Эль тор O1 и O139 серогрупп Евдокимовой В.В. и др. [1] получены моноклональные антитела, которые выявляют антигенные детерминанты белковой природы, представленные только у штаммов холерных вибрионов O1, O139 с генетической характеристикой ctx⁺ tcp⁻ и ctx⁻ tcp⁺.

Таким образом, знание строения и свойств поверхностных структур возбудителей может серьезно повлиять на разработку противоиных препаратов и вакцин, предназначенных для профилактики заболеваний, вызванных патогенными грамотрицательными бактериями, в том числе и холеры. Это тем более актуально, так как до сих пор отсутствуют отечественные комплексные вакцины, обеспечивающие одновременную защиту от эпидемически опасных штаммов *V. cholerae* двух серогрупп — O1 и O139. Кроме того, для производства химических холерных вакцин используют высоковирулентные штаммы, применение которых требует больших материальных затрат для обеспечения биологической безопасности. В этой связи, разработка вакцинных препаратов нового поколения, а также создание универсальной технологии их производства является важным и перспективным направлением научных исследований [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Бурша О.С. Моноклональные антитела к термостабильным поверхностным антигенам холерных вибрионов O1 и O139-серогруппы. Эпидемиол. и инф. болезни. 2015, 20 (3): 51-57.
2. Заднова С.П., Топорков А.В., Смирнова Н.И. Получение препарата токсин-регулируемых пилей адгезии холерного вибриона классического биовара и изучение его биохимических и иммунобиологических свойств. Проблемы особо опасных инфекций. 2003, 85: 69-75.
3. Марков Е.Ю., Урбанович Л.Я., Колесник Р.С., Голубинский Е.П., Саппо С.Г., Иванова

- Т.А., Шкаруба Т.Т. Клеточные мембраны холерного вибриона как основа высокоиммунного вакцинного препарата против холеры. Бюллетень ВСНЦ ССО РАМН. 2004, 1: 127-132.
4. Марков Е.Ю., Урбанович Л.Я., Иванова Т.А., Николаев В.Б., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Козлов С.Н. Методические рекомендации по получению высокоиммунного препарата наружных мембран холерного вибриона Эль тор. Иркутск, 2013.
 5. Мишанькин Б.Н., Иванова И.А., Дуванова О.В., Романова Л.В., Шипко Е.С., Омельченко Н.Д., Дорошенко Е.П., Беспалова И.А., Судьина Л.В., Филиппенко А.В. Мембранный белок OmpT холерного вибриона как возможный компонент химической вакцины. Цитокины и воспаление. 2014, 13 (1): 114.
 6. Омельченко Н.Д., Мишанькин Б.Н., Иванова И.А., Дуванова О.В., Романова Л.В., Шипко Е.С., Филиппенко А.В., Галичева А.Л., Беспалова И.А., Дорошенко Е.П. Изучение иммуногенных свойств наружных мембран холерного вибриона. Медицинская иммунология. 2015, 17 (3s): 120-121.
 7. Онищенко Г.Г., Попова А. Ю., Кутырев В.В., Смирнова Н.И., Щербакова С.А., Москвитина Э.А., Титова С.В. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации. Журн. микробиол. 2016, 1: 89-101.
 8. Портнягина О.Ю., Новикова О.Д., Вострикова О.П., Хоменко В.А., Соловьева Т.Ф. Бактериальные порины как перспективные антигены для диагностики и вакцинопрофилактики инфекционных заболеваний. Вестник ДВО РАН. 2004, 3: 35-44.
 9. Урбанович Л.Я. Закономерности и механизмы формирования естественной резистентности организма под влиянием иммуногенного препарата клеточных мембран холерного вибриона (экспериментальное исследование). Автореф. дисс. д-ра мед. наук. Иркутск, 2000.
 10. Шуковская Т.Н., Саяпина Л.В., Кутырев В.В. Вакцинопрофилактика холеры: современное состояние вопроса. Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. 2009, 2 (45): 62-67.
 11. Asaduzzaman M., Ryan E.T., John M. et al. The major subunit of the toxin-coregulated pilus TcpA induces mucosal and systemic immunoglobulin A immune responses in patients with cholera caused by *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Infect. Immun.* 2005, 72 (8): 4448-4454.
 12. Bishop A.L., Schild S., Patimalla B. et al. Mucosal immunization with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles provides maternal protection mediated by antilipopolysaccharide antibodies that inhibit bacterial motility. *Infect. Immun.* 2010, 78 (10): 4402-4420.
 13. Bishop A.L., Tarique A.A., Patimalla B, et al. Immunization of mice with *Vibrio cholerae* outer-membrane vesicles protects against hyperinfectious challenge and blocks transmission. *J. Infect. Dis.* 2012, 205 (3): 412-421.
 14. Chatterjee D., Chaudhuri K. Association of cholera toxin with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles which are internalized by human intestinal epithelial cells. *FEBS Lett.* 2011, 589 (9): 1357-1362.
 15. Chatterjee D., Chaudhuri K. *Vibrio cholerae* O395 outer membrane vesicles modulate intestinal epithelial cells in a NOD1 dependent manner and induce dendritic cell-mediated Th2/Th17 responses. *J. Biol. Chem.* 2013, 288 (6): 4299-4309.
 16. Das M., Chopra A. K., Cantu J. M., Peterson J. W. Antisera to selected outer membrane proteins of *Vibrio cholerae* protect against challenge with homologous and heterologous strains of *V. cholerae*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1998, 22: 303-308.
 17. Eko F.O., Mania-Pramanik J., Pais R. et al. *Vibrio cholerae* ghosts (VCG) exert immunomodulatory effect on dendritic cells for enhanced antigen presentation and induction of protective immunity. *BMC Immunol.* 2014, 15: 584-596.
 18. Eko F.O., Schukovskaya T., Lotzmanova E.Y. et al. Evaluation of the protective efficacy of *Vibrio cholerae* ghost (VCG) candidate vaccines in rabbits. *Vaccine.* 2003, 21: 3663-3674.
 19. Kiaie S., Abtahi H., Mosayebi G. et al. Recombinant toxin-coregulated pilus A (TcpA) as a candidate subunit cholera vaccine. *Iran J. Microbiol.* 2014, 6 (2): 68-73.
 20. Kubo A., Stephens R.S. Characterization and functional analysis of PorB, a *Chlamydia* porin and neutralizing target. *Mol. Microbiol.* 2000, 38 (4): 772-780.
 21. Kuehn M.J., Kesty N.C. Bacterial outer membrane vesicles and the host pathogen interaction. *Genes Dev.* 2005, 19: 2645-2655.
 22. Langemann T., Koller V.J., Muhammad A. et al. The bacterial ghost platform system production and applications. *Bioengineered Bugs.* 2010, 1 (5): 326-336.

23. Leitner D.R., Feichter S., Schild-Prüfert K. et al. Lipopolysaccharide modifications of a cholera vaccine candidate based on outer membrane vesicles reduce endotoxicity and reveal the major protective antigen. *Infect. Immun.* 2013, 81 (7): 2379-2793.
24. Lopez A.L., Gonzales M.L., Aldaba J.G., Nair G.B. Killed oral cholera vaccines: history, development and implementation challenges. *Ther. Adv. Vaccines.* 2014, 2 (5): 123-136.
25. Marandi M.V., Mittal K.R. Role of outer membrane protein H (OmpH) and OmpA specific monoclonal antibodies from hybridoma tumors in protection of mice against *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.* 1997, 65 (11): 4502-4508.
26. McBroom A.J., Kuehn M.J. Release of outer membrane vesicles by gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Molecular Microbiol.* 2007, 63 (2): 545-558.
27. Meeck M.D., Wade T.K., Taylor R.K., Wade W.F. Immune response genes modulate serologic responses to *Vibrio cholerae* TcpA pilin peptides. *Infect. Immun.* 2001, 69 (12): 7687-7694.
28. Olsen I., Amano A. Outer membrane vesicles offensive weapons or good samaritans? *J. Oral Microbiol.* 2015, 7: 27468: 1-9.
29. Paauw A., Trip H., Niemcewicz M., Sellek R. et al. OmpU as a biomarker for rapid discrimination between toxigenic and epidemic *Vibrio cholerae* O1/O139 and non-epidemic *Vibrio cholerae* in a modified MALDI-TOF MS assay. *BMC Microbiol.* 2014, 14: 158.
30. Pastor M., Esquisabel A., Talavera A. et al. An approach to cold chain free oral cholera vaccine: in vitro and in vivo characterization of *Vibrio cholerae* gastro-resistant microparticles. *Int. J. Pharm.* 2013, 448 (1): 247-258.
31. Price G.A., Holmes R.K. Evaluation of TcpF-A2-CTB chimera and evidence of additive protective efficacy of immunizing with TcpF and CTB in the suckling mouse model of cholera. *PLoS One.* 2012, 7(8): e42434.
32. Price G.A., Holmes R.K. Immunizing adult female mice with a TcpA-A2-CTB chimera provides a high level of protection for the pups in the infant mouse model of cholera. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014, 8 (12): e3356.
33. Rollenhagen J.E., Kalsy A., Cerda F. et al. Transcutaneous immunization with toxin-coregulated pilin A induces protective immunity against *Vibrio cholerae* O1 El Tor challenge in mice. *Infect. Immun.* 2006, 74 (10): 5834-5839.
34. Roy N., Barman S., Ghosh A. et al. Immunogenicity and protective efficacy of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles in rabbit model. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2010, 60 (1): 18-27.
35. Sahu G.K., Chowdhury R., Das J. Heat shock response and heat shock protein antigens of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 1994, 62 (12): 5624-5629.
36. Schild S., Nelson E.J., Bishop A.L., Camilli A. Characterization of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles as a candidate vaccine for cholera. *Infect. Immun.* 2009, 77 (1): 472-484.
37. Schild S., Nelson E.J., Camilli A. Immunization with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles induces protective immunity in mice. *Infect. Immun.* 2008, 76 (10): 4554-4563.
38. Sinha R., Koley H., Nag D. et al. Pentavalent outer membrane vesicles of *Vibrio cholerae* induce adaptive immune response and protective efficacy in both adult and passive suckling mice models. *Microbes Infect.* 2015, 17 (3): 215-27.

Поступила 10.01.17

Контактная информация: Иванова Инна Александровна, к.б.н.,
344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117, р.т. (863)234-23-11
