

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-734>



Генетическое разнообразие мутаций, влияющих на гемолитическую активность бактерий *Bordetella pertussis* при культивировании *in vitro*

Куликов С.В., Медкова А.Ю.[✉], Локтев М.А., Синяшина Л.Н., Каратаев Г.И.

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Ключевую роль в патогенезе коклюша, антропонозного инфекционного заболевания, играет двухкомпонентная система BvgAS, регулирующая транскрипцию генов вирулентности возбудителя. Факторы, оказывающие воздействие на работу системы BvgAS бактерий *Bordetella pertussis* в организме человека, практически не изучены. Известно, что нарушение структуры оперона *bvgAS* приводит к фазовым переходам и изменению вирулентности. Перемещение IS-элементов в оперон *bvgAS* и другие гены вирулентности возбудителя коклюша является важным механизмом в регуляции их экспрессии, потенциально приводящим к длительной персистенции бактерий в организме человека.

Цель работы — поиск и характеристика спонтанных инсерционных мутантов бактерий *B. pertussis* по генам вирулентности *bvgAS*, *суа* и *fhaB*, ответственным за гемолитическую активность при культивировании бактерий *in vitro*.

Материалы и методы. Использованы штаммы *B. pertussis* из коллекции НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи: вирулентный штамм *B. pertussis* 475 и изогенный ему аттенуированный штамм *B. pertussis* 4MKS, вирулентный штамм *B. pertussis* Tohama I и его авирулентный мутант *B. pertussis* 347. Бактерии культивировали на казеиново-угольном агаре с добавлением крови. Формирование зон гемолиза оценивали визуально. Для молекулярно-генетической характеристики полученных инсерционных мутантов использовали методы ПЦР, ПЦР-РВ, секвенирования.

Результаты. *In vitro* выделены мутанты *B. pertussis* с нарушенной гемолитической активностью (фенотип Hly⁻) с инсерциями IS-элементов в генах *fhaB* и *bvgAS*, а также мутанты, сохранившие гемолитическую активность (фенотип Hly⁺), содержащие IS-элементы в ранее не описанной ориентации в гене *bvgAS*. Частота образования инсерционных мутантов зависела от условий культивирования и генотипа бактерий.

Заключение. Приведены аргументы, свидетельствующие о возможной роли IS-элементов в переходе бактерий *B. pertussis* в состояние пониженной вирулентности, что обеспечивает длительную персистенцию возбудителя коклюша в организме человека.

Ключевые слова: *Bordetella pertussis*, IS-элементы, регуляция транскрипции, вирулентность, персистенция, гемолитическая активность, Hly⁻-фенотип

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Куликов С.В., Медкова А.Ю., Локтев М.А., Синяшина Л.Н., Каратаев Г.И. Генетическое разнообразие мутаций, влияющих на гемолитическую активность бактерий *Bordetella pertussis* при культивировании *in vitro*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2025;102(5):592–604.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-734>

EDN: <https://www.elibrary.ru/OVPBTA>

Genetic diversity of mutations affecting the hemolytic activity of *Bordetella pertussis* bacteria during *in vitro* cultivation

Sergey V. Kulikov, Alisa Yu. Medkova[✉], Matvej A. Loktev,
Lyudmila N. Sinyashina, Gennady I. Karataev

N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. The two-component BvgAS system regulates the transcription of the pathogen's virulence genes and plays a key role in the pathogenesis of whooping cough, an anthroponotic infectious disease. Currently, the factors affecting the BvgAS system of *Bordetella pertussis* bacteria in the human organism have not been studied in practice. It is known that disruption of the *bvgAS* operon structure leads to phase modulations and changes in virulence. IS-elements intergation into the *bvgAS* operon and other virulence genes of *B. pertussis* bacteria is important mechanism in regulating their expression, potentially leading to the long-term persistence of this pathogen in the human body.

Aim. Identification and description of spontaneous IS-elements insertions in *B. pertussis* into *bvgAS*, *cya* and *fhaB* virulence genes responsible for hemolytic activity during *in vitro* bacterial cultivation.

Materials and methods. *B. pertussis* strains from the collection of the N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology were used: virulent *B. pertussis* 475 strain and its isogenic attenuated strain *B. pertussis* 4MKS; virulent *B. pertussis* strain Tohama I and its avirulent mutant *B. pertussis* 347. Bacteria were cultivated on casein-charcoal agar with blood addition. The formation of haemolysis zones was assessed visually. PCR, real-time PCR and sequencing were used for the genetic characterization of the obtained insertion mutants.

Results. *B. pertussis* mutants containing insertions of IS-elements in *fhaB* and *bvgAS* genes with impaired hemolytic activity (Hly⁻ phenotype) have been isolated *in vitro*, as well as *B. pertussis* mutants that retained hemolytic activity (Hly⁺ phenotype), containing IS-elements in a previously undescribed orientation in the *bvgAS* gene. The frequency of insertional mutant formation depended on conditions of cultivation and bacteria genotype.

Conclusion. Arguments are made for the hypotheses about the IS-elements involvement in *B. pertussis* bacteria transition to a state of reduced virulence, which provides the possibility of long-term persistence of this pathogen in the human body.

Keywords: *Bordetella pertussis*, IS-elements, regulation of transcription, virulence, persistence, hemolytic activity, Hly⁻ phenotype

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Kulikov S.V., Medkova A.Yu., Loktev M.A., Sinyashina L.N., Karataev G.I. Genetic diversity of mutations affecting the hemolytic activity of *Bordetella pertussis* bacteria during *in vitro* cultivation. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(5):592–604.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-734>

EDN: <https://www.elibrary.ru/OVPBTA>

Введение

Грамотрицательные бактерии *Bordetella pertussis* вызывают острое контагиозное инфекционное заболевание у человека, называемое коклюшем. В роде *Bordetella* принято выделять «классические» виды — *B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*, а также «новые» виды — *B. avium*, *B. petrii*, *B. holmesii*, *B. hinzii*, *B. trematum* и *B. ansorpii*. В последние годы описаны ещё 3 вида: *B. bronchialis*, *B. flabilis*, *B. sputigena* [1].

Среди факторов вирулентности возбудителя коклюша выделяют две основные группы: токсины и адгезины. К токсинам относят коклюшный токсин, аденилатциклазный токсин (АЦТ), трахе-

альный цитотоксин, дермoneкротический токсин, липополисахаридный эндотоксин. К адгезинам — филаментозный гемагглютинин, агглютиногены, или фимбрии 2 и 3, белок наружной мембраны пертактин, белок BrkA и другие компоненты системы секреции *Bordetella* III типа. Считается, что гемолизин у бактерий *B. pertussis* является АЦТ [2], однако в настоящее время имеются данные о влиянии белка FhaB на гемолиз эритроцитов *in vitro* при взаимодействии с АЦТ [3].

Важной особенностью генома бактерий рода *Bordetella* является наличие в хромосоме повторяющихся инсерционных последовательностей — IS-элементов [4]. Количество и разнообразие

IS-элементов отличается у разных представителей рода. Максимальное число IS481 и IS1002 зарегистрировано в хромосоме *B. pertussis* [4]. Считается, что IS-элементы принимали участие в эволюции бактерий рода *Bordetella* от общего предшественника *B. bronchiseptica* [5].

В патогенезе коклюша особую роль играет двухкомпонентная система BvgAS, состоящая из гистидинкиназы BvgS и белка — регулятора транскрипции BvgA. Система BvgAS выступает ключевым регулятором, контролирующим процесс транскрипции генов, отвечающих за вирулентность бактерий *B. pertussis* [6–8]. Дополнительно система BvgAS регулирует многие внутриклеточные процессы, включая метаболизм *B. pertussis* и взаимодействие «микроб–хозяин» [8]. Уровень продукции и степень фосфорилирования BvgA~P определяет уровень транскрипции bvg-зависимых генов. Уровень фосфорилирования BvgA~P определяется активностью и количеством фосфокиназы BvgS, зависящей от ряда факторов, в том числе от условий культивирования. В зависимости от функционирования системы BvgAS бактерии *B. pertussis* могут находиться в вирулентном состоянии — I фаза (Bvg⁺), авирулентном — IV фаза (Bvg[−]) или в промежуточной фазе Bvgⁱ, каждая из которых вносит вклад в патогенез коклюша, сохранение бактерий в организме человека и их передачу новому хозяину.

Несмотря на отсутствие информации о факторах, оказывающих воздействие на работу системы BvgAS в живом организме, описаны некоторые условия, изменяющие степень вирулентности бактерий *B. pertussis* при культивировании *in vitro* на плотных питательных средах [6–8]. Так, снижение температуры культивирования до 27°C, добавление в питательную среду 50 мМ сульфата магния или никотиновой кислоты способствуют переходу бактерий в авирулентную фазу.

Изменение фазового состояния бактерий *B. pertussis* может происходить в результате нарушения структуры оперона вирулентности *bvgAS*. Описаны два типа индуцированных мутаций, вызывающих изменение фенотипа *B. pertussis*. Первые мутанты без гемолитической активности (с отсутствием зон гемолиза на питательных средах с добавлением крови, Hly[−]-мутанты) были отобраны при культивировании лабораторного вирулентного штамма *B. pertussis* Tohama I в присутствии эритромицина [9]. Основной фенотипической характеристикой Hly[−]-мутантов было отсутствие зон гемолиза вокруг отдельных колоний, выросших на среде Борде–Жангу с добавлением крови барана. Частота выявления Hly[−]-мутантов охарактеризована авторами как 10^{−5}–10^{−6}. В 1989 г. опубликована работа S. Stibitz и соавт., в которой было проведено картирование и секвенирование мутантной по гемолитической активности области *B. pertussis* Tohama I.

Показано, что Hly[−]-мутанты содержали *frameshift* (f.s.) мутацию, связанную с приобретением цитозина в последовательности из 6 цитозинов в гене *bvgS* [10]. Другой тип мутантов *B. pertussis* в штамме Tohama I был выделен S. Stibitz в 1998 г. [11]. Мутанты по оперону *bvgAS* оказались жизнеспособными в селективных условиях, характеризующихся суперпродукцией мутантного белка BvgA, клонированного в составе плазмиды. Авторами были охарактеризованы 15 инсерционных мутантов *B. pertussis*, выживших в указанных условиях, у 7 из которых определены соответствующие последовательности. Пять мутантов содержали IS481, 2 мутанта — IS1002 в *cctagc*-сайте оперона *bvgAS* [12]. В наших исследованиях было показано, что мутанты *B. pertussis*, подобные полученным в экспериментах *in vitro*, обнаружены у поздних реконвалесцентов коклюша, у бессимптомных носителей, контактных с больными коклюшем [13], а также при экспериментальном коклюше у низших обезьян Старого Света на поздней стадии инфекционного процесса [14].

В последние десятилетия от больных коклюшем выделены различные типы нокаутных и регуляторных мутантов по генам вирулентности *fhaB*, *katA*, *prn*, *brkA* *B. pertussis*, содержащих инсерции IS-элементов. Предполагается, что накопление в популяции таких мутантов *B. pertussis* связано с широким использованием в ряде стран бесклеточных коклюшных вакцин [15–18].

Нами предложена гипотеза, согласно которой IS-элементы принимают участие в регуляции экспрессии генов вирулентности и генов «домашнего хозяйства» возбудителя коклюша, что является одним из механизмов длительного сохранения бактерий *B. pertussis* и формирования персистенции в организме человека и обуславливает циркуляцию и поддержание очагов антропонозной инфекции.

Целью настоящего исследования явились поиск и характеристика спонтанных инсерционных мутантов бактерий *B. pertussis* по генам вирулентности *bvgAS*, *cya* и *fhaB*, ответственным за фенотип Hly[−], формирующихся в процессе культивирования бактерий *in vitro*.

Материалы и методы

В работе использованы штаммы бактерий *B. pertussis* из коллекции НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи: вирулентные бактерии *B. pertussis* 475 и изогенные им аттенуированные бактерии *B. pertussis* 4MKS Str^RNal^RCm^R [19]; вирулентные бактерии *B. pertussis* лабораторного штамма Tohama I и его авирулентные мутанты *B. pertussis* 347 *bvgAS::Tn5* Str^RKm^R.

Бактерии *B. pertussis* культивировали на казеиново-угольном агаре («Медгамал») с добавлением крови барана в концентрации 15% при 35°C в тече-

ние 24–36 ч для роста культуры и в течение 72–96 ч для формирования колониеобразующих единиц (КОЕ). Подсчёт количества колоний, характеристику их размера и формы проводили визуально. Отсутствие посторонней микрофлоры контролировали с помощью световой микроскопии после окрашивания по Грамму.

Для выделения ДНК бактерий *B. pertussis* использовали набор для выделения ДНК-сорб-В («Амплисенс»). Для очистки продуктов амплификации — набор для выделения и очистки ДНК из агарозного геля («Евроген»).

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (ПЦР-РВ) использовали амплификатор «CFX96 Touch» («BioRad»), для ПЦР — прибор фирмы «Терцик».

Последовательность нуклеотидов продуктов амплификации определяли на приборе «3130 GeneticAnalyzer» («AppliedBiosystems/Hitachi»).

Результаты

Метод регистрации интеграции IS-элементов в оперон *bvgAS*

Среди описанных мутаций в генах вирулентности возбудителя коклюша особого внимания, согласно нашей гипотезе, заслуживают инсерционные мутации — интеграции IS-элементов в специфический сайт оперона *bvgAS* *B. pertussis*. В предыдущих

работах нами описаны метод и тест-системы для выявления мутаций в опероне *bvgAS*, содержащем интеграции IS-элементов 481 и 1002 в определённой, на тот момент единственной известной ориентации, которую мы условно обозначили ориентация (1) [13].

С целью выявления мутантов *B. pertussis*, содержащих интеграции IS-элементов 481 и 1002 с ранее не описанной противоположной ориентацией по отношению к известной ориентации (1), нами модифицирована разработанная ранее система ПЦР-РВ. Новая ориентация условно обозначена как ориентация (2).

Интеграции IS-элементов 481 и 1002 в ориентации (2) — IS481 (2) и IS1002 (2), положение праймеров и зондов схематически изображены на **рис. 1**. В **табл. 1** представлены нуклеотидные последовательности зондов и праймеров, в том числе фланкирующих специфические сайты *NctagN*, расположенные в структуре генов *суа* и *fhaB*.

Температурно-временной профиль ПЦР-РВ и ПЦР для регистрации интеграций IS481 и IS1002 в ориентации (2) и в *NctagN*-сайт оперона *bvgAS* и генов *суа* и *fhaB* представлен в **табл. 2**.

Специфичность выбранных праймеров и зондов подтверждена определением нуклеотидной последовательности соответствующих продуктов амплификации. Количество геном-эквивалентов (ГЭ) ДНК *B. pertussis* и интеграций IS481 (1) и IS1002 (1) определяли с помощью тест-систем ПЦР-РВ

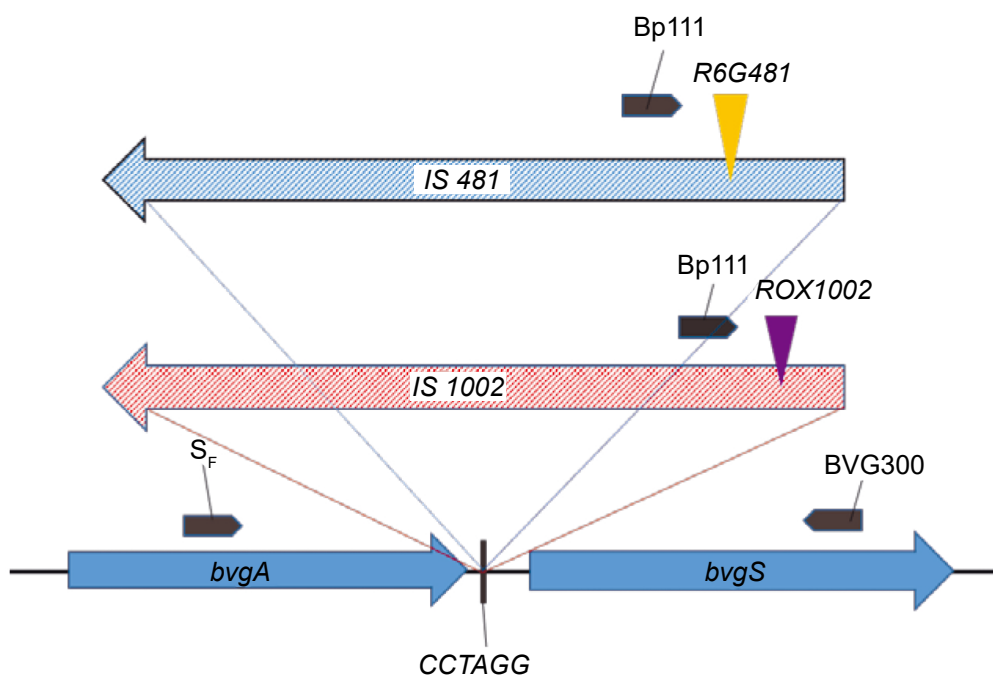


Рис. 1. Структура участка хромосомы *B. pertussis*, содержащего интеграцию IS481 (2) или IS1002 (2) в *cctagg*-сайте оперона *bvgAS*.

Заштрихованные стрелки показывают положение интегрированного элемента IS481 (синяя стрелка) или IS1002 (красная стрелка) в *cctagg* сайт оперона *bvgAS* (синие сплошные стрелки). Темными пятиугольниками обозначено положение праймеров, использованных для амплификации. Цветными треугольниками обозначено положение ДНК-зондов, использованных в реакции гибридизации ПЦР-РВ.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, использованные для регистрации интеграций IS-элементов 481 и 1002 в ориентации (2) — IS481 (2) и IS1002 (2) — в гены *bvgAS*, *cya* и *fhaB*

Праймер/зонд	Нуклеотидная последовательность
ПЦР-PB	
Bp111	GGTCAATCGGGCATGCTTATGG
BVG300	ACGTGCAACGGAGGAATGTC
R6G481, зонд	(R6G)TCGCCGACCCCCAGTTCACTCAAG(BHQ1)
Rox1002, зонд	(ROX)ACCACGCCATCGCAACTCAGGGCA(BHQ2)
ПЦР <i>bvgAS</i>::IS; ПЦР <i>cya</i>::IS; ПЦР <i>fhaB</i>::IS	
CyaF	CCATGTCGAGCTGGCCCGTG
CyaR	GGCCACTTCTCGACCGTGCC
FhaB1-F	GGCTGAGCCGTTTCGACCTT
FhaB1-R	CACGGTCGTTTCAGCGCAACA
S _F	GTCGCTGGTGGAACTGATAG

Таблица 2. Температурно-временные профили ПЦР-PB и ПЦР для регистрации интеграций IS-элементов в NctagN сайт оперона *bvgAS*, *cya* и *fhaB*

Мишень	Праймеры/зонд	Температура, °C	Время, с	Количество циклов
ПЦР-PB <i>bvgAS</i> ::IS481 (2)	Bp111-BVG300/R6G481	95	300	1
		95	20	} 40
		60	50	
ПЦР-PB <i>bvgAS</i> ::IS1002 (2)	Bp111-BVG300/Rox1002	95	300	1
		95	20	} 40
		60	50	
ПЦР <i>bvgAS</i> ::IS	S _F -BVG300	95	300	1
		95	20	} 40
		63	30	
		72	30	
ПЦР <i>cya</i> ::IS	CyaF-CyaR	95	300	1
		95	20	} 40
		67	30	
		72	30	
ПЦР <i>fhaB</i> ::IS	FhaB1-F-FhaB1-R	95	300	1
		95	20	} 40
		67	30	
		64	30	

(BpIS-Q) и ПЦР-PB BpIS-INT1 [13] соответственно. Количество интеграций IS481 (2) и IS1002 (2) оценивали по значениям предельных циклов реакции. Соответствующий набор реактивов, по аналогии с набором для количественной оценки интеграций IS-элементов в ориентации (1) обозначен как BpIS-INT2. Частоту интеграций, как и прежде, рассчитывали по соотношению $N_{IS}/N_{ГЭ}$, где N_{IS} — количество интеграций, а $N_{ГЭ}$ — количество ГЭ в 5 мкл раствора исследуемой ДНК.

Фенотип бактерий *B. pertussis* 4MKS, 475, Tohama I и Tohama 347 и молекулярно-генетическая характеристика их популяций

В рамках настоящего исследования был проведён анализ популяций бактерий лабораторного

штамма *B. pertussis* Tohama I и его Bvg⁻-мутанта *B. pertussis* Tohama 347, а также вирулентных бактерий *B. pertussis* 475 и изогенных аттенуированных бактерий *B. pertussis* 4MKS с целью выявления инсерционных мутантов в генах вирулентности *bvgAS*, *cya* и *fhaA*, ответственных за фенотип Hly⁻, формирующийся при культивировании бактерий *B. pertussis* *in vitro*.

B. pertussis представляют собой медленно растущие, прихотливые к условиям культивирования бактерии. Для фенотипической дифференциации фазовых состояний бактерий *B. pertussis* при культивировании на твёрдой питательной среде с добавлением крови могут быть использованы характеристики КОЕ: размер, форма колоний и наличие зон гемолиза. Bvg⁺-колонии — выпуклые, ровные, блестящие

мелкие (1–2 мм), образуют выраженные зоны гемолиза; Bvg⁺-колонии — плоские, шероховатые, более крупные (2,0–2,5 мм), зон гемолиза не образуют.

КОЕ бактерий *B. pertussis*, выросших на казеиново-угольном агаре (КУА) с кровью, проанализированы по перечисленным параметрам. Культуру *B. pertussis* из ампулы высевали на чашку Петри с КУА с добавлением крови (высев), после инкубации при 35°C в течение 24–36 ч пересевали плотным штрихом на такую же чашку Петри (первый пассаж). После контроля микробиологической чистоты методом световой микроскопии осуществляли ещё один пересев (2-й пассаж). Культуру 3-го пассажа использовали для посева ампульной культуры до отдельных колоний методом титрования (анализ ампульной культуры). Параллельно отдельные колонии 2-го пассажа, выросшие на среде КУА с кровью, анализировали по морфологии и наличию зон гемолиза. Три КОЕ каждого штамма, соответствующие критериям вирулентных бактерий *B. pertussis*, пересевали штрихом на свежие чашки Петри с КУА с добавлением крови, из выросшей культуры выделяли ДНК, одновременно рассевали бактерии методом титрования до формирования КОЕ на среде КУА с кровью. КОЕ анализировали по морфологии и наличию зон гемолиза (анализ культуры из отдельных КОЕ). В рамках настоящего исследования охарактеризовано 500–1000 КОЕ каждого штамма вирулентных и аттенуированных бактерий *B. pertussis*, выращенных из ампульной культуры и отдельных КОЕ.

Проведён фенотипический и молекулярно-биологический анализ бактерий *B. pertussis*, высушенных в разное время в разных лабораториях. КОЕ ампульных культур 3-го пассажа бактерий *B. pertussis* 4MKS и *B. pertussis* 475 в подавляющем большинстве содержали бактерии в вирулентной Bvg⁺-фазе, интеграции IS-элементов в опероне *bvgAS* регистрировали в ПЦР-РВ с низкой частотой — менее 10⁻⁴ на одну бактериальную клетку. В посевах ампульных культур все выросшие колонии имели фенотип Bvg⁺.

В отдельных случаях в бактериях *B. pertussis* 4MKS из 3-го пассажа ампульной культуры, высу-

шенной более 4 лет назад, суммарная частота инсерционных мутантов в обеих ориентациях составила (2–5) × 10⁻² (табл. 3). При посеве регистрировали около 2–3% Hly⁺-КОЕ. Колонии имели плоскую и шероховатую форму и размер 2,0–2,5 мм, Hly⁺-колонии — 1–2 мм.

Схожие результаты были получены при исследовании ампульных культур *B. pertussis* Tohama I. Частота интеграций IS481 (1) в опероне *bvgAS*, зарегистрированная с помощью ПЦР-РВ, составила от 10⁻⁴ на бактерию до нескольких процентов. Интеграций других IS-элементов в бактериях *B. pertussis* Tohama I не обнаружено. Максимальное количество КОЕ, не образующих зон гемолиза, достигавшее 95% от общего числа колоний, выявлено при посеве бактерий высушенных 13.04.1974 (30 лет назад). При этом частота интеграций IS-элементов в опероне *bvgAS* составила 4 × 10⁻² на бактерию (табл. 3).

КОЕ штамма *B. pertussis* Tohama 347 *bvgAS*::Tn5 ожидаемо не образовывали зон гемолиза, размер и форма колоний соответствовали фенотипу Bvg⁺. Частота интеграций во всех проанализированных с помощью ПЦР-РВ культурах *B. pertussis* Tohama 347 составила меньше 10⁻⁶ на бактерию.

Такое же исследование было проведено с культурами, выращенными из отдельных Hly⁺-колоний *B. pertussis* 475, *B. pertussis* 4MKS и *B. pertussis* Tohama I. При посеве бактерий каждого штамма из отдельных колоний на среде КУА с добавлением крови из 10³ КОЕ не было обнаружено колоний, не образующих зон гемолиза. Размер и форма колоний соответствовали описанному выше фенотипу Bvg⁺. Частота интеграций IS-элементов в опероне *bvgAS* не превышала 10⁻⁴–10⁻⁵ на бактерию.

Колонии Hly⁺-штаммов *B. pertussis* 4MKS и *B. pertussis* Tohama I выборочно были подвергнуты дальнейшему анализу. По 46 колоний каждого штамма перенесли на чашки Петри с КУА с добавлением крови и антибиотиками для проверки их устойчивости к антибиотикам и способности к гемолизу. В результате все отдельные колонии *B. pertussis* 4MKS были устойчивы к стрептоми-

Таблица 3. Доля Hly⁺-колоний и регистрация событий интеграции IS-элементов в опероне *bvgAS* бактерий *B. pertussis* 475, *B. pertussis* 4MKS и *B. pertussis* Tohama I при их культивировании на среде КУА с кровью

Штамм	Ампульная культура		Культура из КОЕ	
	Hly ⁺ , %	<i>bvgAS</i> ::IS*	Hly ⁺ , %	<i>bvgAS</i> ::IS*
<i>B. pertussis</i> 475	НО	5 × 10 ⁻⁵	НО	3 × 10 ⁻⁵
<i>B. pertussis</i> 4MKS	2	(2–5) × 10 ⁻²	НО	2 × 10 ⁻⁴
<i>B. pertussis</i> Tohama I	95	4 × 10 ⁻²	НО	5 × 10 ⁻⁴
<i>B. pertussis</i> Tohama 347	100	≤ 10 ⁻⁶	100	≤ 10 ⁻⁶

Примечание. *Приведена суммарная частота интеграции по всем IS-элементам. Для ПЦР использована ДНК, выделенная из 3-го посева ампульной культуры или КОЕ; НО — не обнаружено.

цину, налидиксовой кислоте и хлорамфениколу, а бактерии *B. pertussis* Tohama I были чувствительны ко всем проверенным антибиотикам. Выявленная устойчивость к антибиотикам полностью соответствует характеристикам родительских штаммов *B. pertussis* 4MKS и *B. pertussis* Tohama I. КОЕ обоих штаммов сохраняли выраженный фенотип Hly⁻ в репликах.

В ПЦР с праймерами S_F-BVG300 в ДНК, выделенной из посева 3-го пассажа ампульных культур и КОЕ тестируемых штаммов, не зарегистрировано фрагментов большого размера, несмотря на наличие у части бактерий в популяции интеграции IS-элемента. Отсутствие продуктов амплификации со вставкой обусловлено значительно более низкой эффективностью амплификации больших фрагментов в сравнении с маленькими фрагментами без вставки.

Таким образом, в культурах проанализированных штаммов вирулентных и аттенуированных бактерий *B. pertussis*, выращенных из ампульных куль-

тур, с разной частотой регистрируются Hly⁻-мутанты, не обладающие гемолитической активностью и содержащие интеграции IS-элементов в опероне *bvgAS*. Культура, выращенная из отдельных колоний бактерий, гомогенна и содержит инсерционные мутанты с частотой меньше 10⁻⁴ на бактерию. Популяции бактерий, выращенные из отдельных колоний, содержат негемолизирующие колонии бактерий фенотипа Hly⁻ в количестве, недостаточном для фенотипического анализа.

Молекулярно-генетическая характеристика Hly⁻-мутантов *B. pertussis* 4MKS и Tohama I

Из 40 реплик каждого штамма *B. pertussis* 4MKS и *B. pertussis* Tohama I, с Hly⁻-фенотипом была выделена ДНК. Полученные образцы проанализировали с помощью ПЦР с праймерами S_F-BVG300, FhaB1-F-FhaB1-R и CyaF-CyaR.

Размер продуктов амплификации с праймерами S_F-BVG300 исследованных Hly⁻-мутантов

a

GGAAGTATAGACCTCGCCAAACGCAACAATCTCGCCTAGCGCCGCGCATGCCCCGCCCCGCACCG
CCTGTACCCCCGAGTCTGATCTGCCTGGCTCAGGCGCTATTGGCATGGGCTTTGCTgGCATGGGC
GCCCCGCGCA

б

GGAAGTATAGACCTCGCCAAACGCAACAATCTCGCCTAGCGCCGCGCATGCCCCGCCCCGCACCG
CCTGTACCCCCGAGTCTGATCTGCCTGGCTCAGGCGCTATTGGCATG

Рис. 2. Фрагмент последовательности оперона *bvgAS* дикого типа *B. pertussis* (а) и Hly⁻-мутанта *B. pertussis* № 33 (б).

Заглавными буквами представлены нуклеотидные последовательности оперона *bvgAS*; ATG — метиониновый кодон гена *bvgS*; **tg** — делеция; CCTAGC — специфический сайт интеграции IS-элементов.

Таблица 4. Результаты ПЦР-анализа ДНК клонов *B. pertussis* 4MKS с фенотипом Hly⁻ (выборочно)

Номер клона на матрицах штампов	Гены, типы мутаций		
	<i>bvgAS</i> ::IS	<i>fhaB</i> ::IS	<i>cya</i> ::IS
2	IS481 (2)*	НО*	НО
3	IS481 (2)*	НО	НО
49	IS481 (2)*	НО	НО
48	IS481 (2)*	НО	НО
22	IS481 (2)*	НО	НО
9	IS1002 (1)*	НО	НО
10	IS1002 (1)*	НО	НО
32	IS1002 (1) *	НО	НО
34	IS1002 (1) *	НО	НО
43	IS1002 (1) *	НО	НО
31	НО*	IS481 (1)*	НО
33	ΔTG*	НО	НО
3-2	НО	IS481 (1) *	НО
32-2	НО*	НО*	НО
15-2	НО*	НО	НО
17-2	НО*	НО	НО
28-2	НО	IS481 (1) *	НО

Примечание. *Структура подтверждена секвенированием. НО — интеграции методом ПЦР не обнаружено.

a

*attttcagttttc~~caaat~~ccggttcggatgaaccatgcatacaacctattgaatctTcacaCCTAGCGCCGCGCATGCCCCG
CCCCGCACCGCCTGTACCCCCGCAGTCTGATCTGCCTGGCTCAGGCGCTATTGGCATG*

b

*tgaaccatgcatacaacctattgaatctTcacacctaacgagcacggacttctccgcgccacgcgggacgcgaagaacgccggac
aggccgcggttacc~~aac~~atggtatccggcgggctggttgccgtgccccgcgcgcgcacatccggccatcgccgcccc~~aac~~acgga
qgacccgcacata~~g~~ ttgaqcaac*

Рис. 3. Фрагменты последовательности оперона *bvgAS* Hly-мутанта *B. pertussis* 4MKS, клон 49 (а) и инсерционного мутанта *B. pertussis* с интеграцией *IS481* в вырожденный сайт *cctaac*, расположенный перед стартом транскрипции гена *bteA* (б) [16].

Заглавными буквами обозначена последовательность оперона *bvgAS*, подчёркнут специфический сайт интеграции CCTAGC; курсивом выделена последовательность гена *bteA*, подчёркнут специфически вырожденный сайт интеграции cctaac; стартовые кодоны метионина белков BvgS и BteA выделены жирным шрифтом; строчными буквами обозначена последовательность 3'-конца IS481(1); жирной заглавной буквой **T** — предполагаемый старт транскрипции.

B. pertussis 4MK5 в 25% (10 клонов) составил около 1300 пар нуклеотидов (п. н.), а в 75% (30 клонов) — около 300 п. н.

В табл. 4 представлены результаты анализа продуктов ПЦР некоторых Hly-клонов *B. pertussis* 4MKS с праймерами S_F-BVG300, FhaB1-F-FhaB1-R и CyaF-CyaR.

Ни в одном из клонов не выявлено интеграции в гене *суа*, тогда как в гене *fhaB* интеграция зарегистрирована у 26 из 30 Hly-мутантов *B. pertussis* 4MKS, не содержащих интеграции IS-элементов в опероне *bvgAS*. Для 3 Hly-мутантов определена последовательность нуклеотидов продуктов амплификации фрагмента гена *fhaB* размером 1300 п. н. Во всех случаях обнаружена интеграция IS481 (1) в специфическом сайте *fhaB*.

У клона № 33, не содержащего интеграции в генах *bvgAS* или *fhaB*, выявлена делеция 2 нуклеотидов вблизи от сайта *cctagc* в гене *bvgS* (рис. 2). В 3 Hly-клонах (№ 32-2, 15-2 и 17-2) не выявлено интеграций IS-элементов и других нарушений последовательности нуклеотидов проанализированных ампликонов.

Из 10 инсерционных Hly-BvgAS мутантов с определённой нуклеотидной последовательностью 5 содержат инсерцию IS481 (2), 5 мутантов — IS1002 (1). На **рис. 3** приведён фрагмент последовательности, содержащей IS481 (2) в специфическом сайте оперона *bvgAS*.

Среди проанализированных Hly-клонов не выявлено интеграций IS1002 (2) и IS481 (1), тогда как соответствующие интеграции регистрируются в популяции при её анализе с помощью ПЦР-РВ.

Продукты ПЦР 40 проанализированных Hly-мутантов *B. pertussis* Tohama I с использованием пар праймеров S_F-BVG300, FhaB1-F-FhaB1-R и CyaF-CyaR имели близкий к расчётному размер — около 300, 388 и 261 п. н. соответственно. Определение последовательности нуклеотидов 3 ампликонов: *bvgAS*, *cya* и *fhaB* подтвердило отсутствие в них интеграций IS-элементов и не выявило нарушений их структуры по сравнению с нативной.

С учётом наличия интеграций IS-элементов в опероне *bvgAS* в 4% популяции бактерий *B. pertussis* Tohama I и их отсутствия в ДНК бактерий с фенотипом Hly⁻ нами предпринят поиск интеграций IS-элементов в оперон *bvgAS* у бактерий с фенотипом Hly⁺. ПЦР с праймерами S_F-BVG300 ДНК, выделенной из 12 КОЕ с фенотипом Hly⁺, обнаружил в 5 (41,7%) КОЕ продукты размером около 1300 п. н., предположительно содержащие инсерцию IS-элемента в анализируемом сайте. Методом ПЦР-РВ установлено, что все они содержат интеграцию IS481 (1) в оперон *bvgAS*. Определение последовательности продуктов ПЦР S_F-BVG300 размером 1300 п. н. у 3 из них подтвердил наличие инсерции IS481 (1) и сохранение нативной последовательности вокруг сайта интеграции.

Таким образом, появление бактерий *B. pertussis* с фенотипом Hly⁻ при культивировании на плотной питательной среде обусловлено не только известными ранее мутациями сдвига рамки считывания в *bvgS*, делециями и вставками в гене *bvgA*, интеграцией IS481 (2) и IS1002 (1) в межгенное пространство оперона *bvgAS* или делециями в гене *bvgS*, которые были обнаружены в данном исследовании, но и вновь выявленными вставками IS-элементов в ген *fhaB*. Перемещение IS481 (1) в *cctagc* сайт оперона *bvgAS* *B. pertussis* Tohama I не приводит к формированию выраженного Hly⁻-фенотипа бактерий. ПЦР-анализ фрагментов генов вирулентности *bvgAS*, *cydA* и *fhaB*, содержащих специфические сайты *NctagcN*, не выявил видимых изменений структуры анализируемых участков генов у Hly⁻-мутантов *B. pertussis* Tohama I.

Обсуждение

В наших предшествующих работах показано, что популяция вирулентных бактерий *B. pertussis*, культивируемых на твёрдой среде КУА, не является однородной, в ней присутствовала определённая доля мутантов, характеризующихся вставками IS-элементов в специфическом сайте оперона *hlyAS*. Такие мутанты были описаны не только на-

ми, но и получены и охарактеризованы в селективных условиях *S. Stibitz* и соавт. В наших исследованиях инсерционные *BvgAS*-мутанты обнаружены у реконвалесцентов и контактных по коклюшу лиц, у экспериментальных животных на поздних стадиях коклюшной инфекции. Используемая в экспериментах разработанная нами ранее тест-система ПЦР-РВ позволяла учитывать события интеграции IS1002 и IS481 только в одной ориентации, названной нами (1). Мы предположили, что IS-элементы способны перемещаться и интегрироваться в специфический сайт оперона *bvgAS* и в обратной ориентации (2). Поэтому в настоящей работе предпринята разработка метода, позволяющего выявлять события интеграции IS-элементов в оперон *bvgAS* в ориентации (2) и регистрация соответствующих инсерционных мутантов *B. pertussis* при культивировании *in vitro*.

Для проведения ПЦР и регистрации продуктов амплификации, возникающих в результате интеграции IS-элементов в обеих ориентациях, использованы одни и те же праймеры и зонды, комплементарные последовательностям IS-элементов, но в парах с праймером S_F для ориентации (1) и с BVG300 для ориентации (2) (рис. 1). Для оценки количества интеграций в ориентации (2) в рамках настоящей работы использовали значения предельных циклов реакций, а не калибровочные кривые, как в предыдущих экспериментах, что несколько уменьшает точность количественного определения интеграций.

В независимых экспериментах при расщепе бактерий всех штаммов, выращенных из КОЕ, за исключением *B. pertussis* Tohama 347, частота выявления событий интеграции с помощью ПЦР-РВ существенно не отличалась от определённой нами ранее и составила 10^{-4} – 10^{-5} на бактерию.

В настоящем исследовании нами проанализированы культуры *B. pertussis* 4MKS и *B. pertussis* 475, высушенные в разное время в нашей лаборатории, а также культуры *B. pertussis* 475, полученные в разное время из разных источников, в том числе из коллекции ГНИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича. Во всех ампульных культурах были выявлены интеграции IS-элементов как в ориентации (1), так и ориентации (2). В ходе анализа 16 препаратов в 7 из них интеграция IS1002 в оперон *bvgAS* отсутствовала либо в одной, либо в обеих исследованных ориентациях. Интеграция IS481 присутствовала в опероне *bvgAS* в ориентации (1) в 75% случаев и в ориентации (2) в 25% случаев. Только в одной ампульной культуре штамма *B. pertussis* 475 интеграция IS 481 не была зарегистрирована. В 25% случаев не выявлено интеграции IS1002 (1), а в 3 (16%) образцах не выявлено интеграций как IS1002 (1), так и IS 1002 (2). Таким образом, частота ре-

гистрации IS-элементов в опероне *bvgAS* двух изогенных штаммов снижается в последовательностях IS481 (1), IS481 (2), IS1002 (1) и IS1002 (2). Достоверность и значимость выявленных закономерностей для других штаммов бактерий *B. pertussis* предстоит выяснить в последующих исследованиях.

Среди проанализированных Hly^- -клонов ампульных культур *B. pertussis* 4MKS не выявлено интеграций IS1002 (2) и IS481 (1) (табл. 4), в то время как они регистрируются методом ПЦР-РВ в общей популяции *B. pertussis* 4MKS. Предположительно, такие инсерционные мутанты находятся среди бактерий с фенотипом Hly^+ . Анализ 10 отпечатков КОЕ, формирующих зоны гемолиза, не выявил изменений в размере соответствующего ампликона, что указывает на невысокий процент возможных инсерционных мутантов в популяции Hly^+ -клонов. Результаты ПЦР-РВ анализа бактериальной популяции, включающей изученные Hly^- и Hly^+ -клоны, подтверждают данное заключение: частота обнаружения интеграций IS1002 (2) и IS481 (1) в 10 раз ниже, чем IS1002 (1) и IS481 (2), регистрируемых с частотой около 10^{-2} на бактерию. Однако поиск интегрантов, не имеющих фенотипических признаков, с ожидаемой частотой меньше 10^{-3} на бактерию представляется затруднительным. По этой причине Hly^+ -клоны с возможными интеграциями IS1002 (2) и IS481 (1) остались за рамками настоящего исследования.

В популяции бактерий *B. pertussis* Tohama I в опероне *bvgAS* выявлена интеграция только IS481 (1) и не обнаружено интеграций IS1002. При расщепе тестируемых культур, выращенных из КОЕ, не выявлено колоний с фенотипом Hly^- на среде КУА с кровью, что согласуется с частотой выявления событий интеграции методом ПЦР-РВ. Факт интеграции преимущественно IS481 (1) в специфический сайт оперона *bvgAS* бактерий *B. pertussis* Tohama I, как и разная частота при интеграции IS481 и IS1002 у изогенных вариантов штамма *B. pertussis* 475, требует дальнейшего изучения и может быть связана с особенностью перемещения IS-элементов у разных штаммов.

Частота интеграций IS481 в культуре бактерий *B. pertussis* Tohama 347, выращенных из ампулы и КОЕ, примерно в 100 раз ниже (10^{-6} – 10^{-7} на бактерию), чем у изогенных вирулентных бактерий *B. pertussis* Tohama I. Этот факт был отмечен нами в предшествующих исследованиях [20, 21]. Анализ продукта амплификации ДНК *B. pertussis* Tohama 347 с праймерами S_F -BVG300 показал, что инсерция Tn5 в опероне *bvgAS* расположена вне анализируемого фрагмента оперона вирулентности и, вероятно, не способна препятствовать перемещению IS-элементов в анализируемый сайт. Это обстоятельство указывает на зависимость частоты транспозиции от целостности оперона *bvgAS*. Сле-

дует отметить, что нам не удалось зарегистрировать зависимость частоты транспозиции IS-элементов в оперон *bvgAS* от модулирующих условий при культивировании бактерий *B. pertussis* Tohama I, 4MKS и 475 в присутствии $MgSO_4$ и пониженной температуры. С одной стороны, данное наблюдение не подтверждает зависимости транспозиции от модулирующих условий, а с другой, учитывая выявленное снижение частоты интеграций у *B. pertussis* Tohama 347, можно предположить, что белки Bvg A и Bvg S не принимают непосредственного участия в регуляции транспозиции. Полученный эмпирический результат требует дальнейшего изучения.

Обнаруженные нами с высокой частотой инсерционные мутанты *B. pertussis* в некоторых ампульных культурах свидетельствуют о выраженной зависимости частоты транспозиции от условий культивирования бактерий, в том числе, вероятно, и в организме хозяина. Возможно, этим обстоятельством обусловлена нестабильность получения мутантов сдвига рамки и их ревертантов, отмеченная A. Weiss и соавт. [9].

Таким образом, представленные результаты показывают, что предложенные нами тест-системы ПЦР-РВ позволяют регистрировать события интеграции IS-элементов в обеих ориентациях в оперон *bvgAS*. Частота их транспозиции зависит от генотипа, в том числе от целостности оперона вирулентности, и условий культивирования бактерий.

Анализ структуры фрагментов генов вирулентности *bvgAS*, *суа* и *phaB* Hly-мутантов показал, что они содержат интеграцию IS481 (2) или IS1002 (1) в специфическом *cctagc* сайте оперона *bvgAS* (*B. pertussis* 4MKS), либо IS481 (1) в аналогичном сайте *phaB* (*B. pertussis* Tohama I). Обнаружены также 4 Hly-мутанта, хромосома которых не имеет инсерций в тестированных фрагментах генов вирулентности. В гене *bvgS* одного из них обнаружена делеция 2 нуклеотидов, нарушающая экспрессию фосфокиназы Bvg S, участвующей в регуляции большого количества генов возбудителя коклюша, в том числе всех генов вирулентности. В 3 из 4 Hly-мутантов использованные методы не выявили нарушений в структуре генов *bvgAS* или *phaB*. Ни в одном из проанализированных клонов не было интеграций в гене *суа*. Вероятно, что эти 3 мутанта содержат охарактеризованные S. Stibitz инсерции IS-элементов в гене *bvgA* или другие, например, f.s.-мутации в гене *bvgS*, не выявленные нами с помощью использованных методов.

Наличие интеграции одного из IS-элементов в межгенное пространство оперона *bvgAS*, блокирующей транскрипцию гена *bvgS*, представляется вполне ожидаемой причиной формирования фенотипа Hly-мутантов *B. pertussis* 4MKS. Однако существует несколько примеров интеграции IS481 в специфический сайт, расположенный *up stream*

генов *brkA*, *kat*, *bvgS*, *fim*, как минимум не сопровождающихся прекращением их экспрессии [16, 18, 20, 22]. В одной из работ не только сформулировано предположение, что транскрипция с промотора, расположенного на конце IS481, регулирует экспрессию продукта гена *brkA*, но и определено начало соответствующего транскрипта (рис. 2). Выявленный авторами промотор расположен на том же конце IS481 (2) в геноме клона 49 *B. pertussis* 4MKS, но, по-видимому, не обеспечивает достаточный уровень транскрипции гена *bvgS*, в результате чего формируется фенотип Hly-клона 49 (рис. 2). Можно предположить, что нарушение транскрипции гена *bvgS* у мутантов, содержащих инсерцию IS1002 (1), происходит по такому же механизму или в результате полного её прекращения. Отсутствие экспериментальных данных о наличии промоторов в структуре IS1002 пока не позволяет сделать окончательный вывод. По-видимому, подобным образом, инсерция IS481 обеспечивает транскрипцию гена *bvgS* и дифференциальную экспрессию генов вирулентности отобранных S. Stibitz мутантов, проявляющуюся в сохранении, но значительном снижении экспрессии генов *ptx* и менее выраженном снижении *pha* [20]. Интересный случай регуляции транскрипции рассмотрен A. D'Halluina и соавт. [22]. Показана регуляция транскрипции/трансляции гена *fim2* в результате синтеза антисмысловой РНК с внутреннего промотора IS481, интегрированного выше гена *fim2*. Предполагается, что описанные изменения регуляции генов вирулентности *B. pertussis*, в особенности оперона *bvgAS*, могут быть одним из «пусковых» механизмов формирования персистенции бактерий *B. pertussis* в организме единственного хозяина — человека. Или могут повышать жизнеспособность бактерий вне организма, облегчая передачу инфекции новому восприимчивому организму.

Во всех Hly-мутантах, содержащих инсерцию в гене *phaB*, была обнаружена интеграция IS481 (1). Поскольку интеграции расположены в кодирующей последовательности гена *phaB*, они нарушают его транскрипцию и трансляцию, независимо от направления интеграции IS-элемента. Если взаимосвязь мутаций в опероне *bvgAS* с Hly-фенотипом представляется очевидной, то влияние нокаутной мутации в гене *phaB* на гемолитическую активность *B. pertussis* требует дальнейшего изучения. Согласно современным представлениям, белок PhaB не имеет прямого отношения к реакции гемолиза эритроцитов крови. Эта функция приписывается АЦТ, точнее его С-концевому участку. Однако последние данные говорят о том, что белок PhaB взаимодействует с АЦТ. Скорее всего, гемолитическая активность АЦТ *in vitro* реализуется после взаимодействия с филаментозным гемагглютинином на поверхности бактериальной клетки и доставки АЦТ в эукариотическую клетку [3].

Обращает на себя внимание факт отсутствия описанных инсерционных мутантов *bvgAS::IS481* или *bvgAS::IS1002* среди бактерий, выделенных от больных коклюшем, тогда как клинические изоляты, содержащие инсерции IS-элементов в генах *fhaB*, *prn* и участвующие в регуляции *katA* и *brkA*, описаны в литературе [16, 18, 20, 22]. В наших экспериментах такие мутантные бактерии *bvgAS::IS481* (1) были зарегистрированы в популяциях бактерий *B. pertussis*, персистирующих в организме реконвалесцентов коклюша и бессимптомных бактерионосителей. Можно предположить, что такое состояние возбудителя коклюша является оптимальным для персистенции в организме человека и выживания во внешней среде, а при попадании в восприимчивый организм происходят точное исключение IS-элемента (или инверсия), восстановление вирулентности бактерий, инфицирование организма и развитие заболевания. Похожую роль бактериям в состоянии пониженной вирулентности отводят M.R. Farman и соавт., изучившие профили транскрипции большой группы генов в бактериях *B. pertussis* внутри макрофагов [23]. Доказанное нами существование (накопление) инсерционных *Bvg*-мутантов *B. pertussis* на поздних стадиях инфекции указывает на регуляторную роль интеграций IS-элементов в формировании персистирующих бактерий в организме человека и, возможно, на их участие в передаче бактерий новому хозяину. Можно ожидать, что точное исключение IS-элемента из оперона вирулентности восстанавливает его структуру и способность бактерий вызывать заболевание. Остаются невыясненными механизмы и условия, вызывающие обычно редкие события точного исключения. Неясно также, на каком этапе персистенции или трансмиссии патогена оно происходит. Способность IS-элемента к точному исключению показана нами ранее на модели *Escherichia coli* [21, 24].

Неожиданными представляются результаты анализа *Hly*-мутантов *B. pertussis* Tohama I, зарегистрированных нами примерно в 95% проанализированных отдельных колоний, выращенных при расщепе одной из серий лиофилизированных культур из музея НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Среди 40 *Hly*-колоний не обнаружено мутантов *B. pertussis*, содержащих интеграции в специфической последовательности *NctagN* в генах *bvgAS*, *cya* и *fhaB*. В настоящее время мутации, ответственные за формирование генотипа выделенных нами *Hly*-клонов *B. pertussis* Tohama I, не установлены. Вполне вероятно, что они, как и 3 не установленные мутации *Hly*-клонов *B. pertussis* 4MKS, относятся к классу мутаций сдвига рамки считывания в гене *bvgS*, инсерциям в специфический сайт *bvg A* или содержат другие не идентифицированные нами нарушения в структуре оперона *bvgAS*, генов *fhaB* или *cya*.

Отсутствие интеграций в сайте *cctagg* оперона *bvgAS* проанализированных *Hly*-колоний на фоне их достоверной регистрации методом ПЦР в популяции перед её расщепом (до 4% интеграций *IS481* (1)) позволило предположить, что интеграции в соответствующем сайте могут присутствовать в геноме некоторых бактерий, сохранивших гемолитическую активность (с фенотипом *Hly*⁺). Действительно, среди бактерий фенотипа *Hly*⁺ были обнаружены 41,7% инсерционных мутантов, содержащих *IS481* (1) в опероне *bvgAS* при сохранении нативной последовательности оперона вокруг сайта интеграции. Учитывая проведённый выше анализ и ориентации *IS481*, можно ожидать, что эффективный промотор, обеспечивающий транскрипцию гена *bvgS* и *Hly*⁺-фенотип у инсерционных мутантов *B. pertussis*, расположен на конце элемента *IS481*, противоположном описанному Н. Нап и соавт. [18] и в работе S. Stibitz, показавшем дифференциальное снижение экспрессии генов *fhaB* и *ptx* и менее выраженные зоны гемолиза у КОЕ бактерий инсерционного мутанта *B. pertussis* [12].

Для более детальной характеристики мутанта *bvgAS::IS481* (1) *Hly*⁺-фенотипа нами запланировано сравнительное изучение токсической активности коклюшного и дермонекротического токсинов, титров агглютинации и электронно-микроскопический анализ морфологии и структуры бактерий *B. pertussis* Tohama I и их мутантного генотипа, биоинформационный анализ последовательности *IS481*, направленный на идентификацию и сравнение предполагаемых промоторов, расположенных на концах IS-элементов.

Таким образом, при культивировании *in vitro* бактерий *B. pertussis* в опероне *bvgAS* чаще других регистрируются интеграции *IS481* (1), которые ранее мы выявили в геномах бактерий *B. pertussis*, выделенных у реконвалесцентов коклюша и у экспериментальных животных. Прежние данные по анализу событий интеграции IS-элементов в одной ориентации (1) в значительной мере отражают динамику накопления всех инсерционных мутантов *bvgAS::IS* у бактерий *B. pertussis*.

Заключение

Полученные данные дают возможность сделать ряд значимых выводов, касающихся характеристик IS-элементов *B. pertussis*:

- IS-элементы способны перемещаться между специфическими сайтами на хромосоме *B. pertussis*, вызывая инактивацию генов или изменение регуляции их транскрипции при культивировании бактерий *in vitro*;
- частота перемещения IS-элементов и типы индуцируемых ими спонтанных мутаций зависят от генотипа и условий культивирования бактерий *B. pertussis*;

- факторы, влияющие на частоту перемещения IS-элементов, формирования спонтанных, инсерционных или иных мутантов, индуцированных IS-элементами, требуют дальнейшего изучения;
- в процессе культивирования и хранения бактерий *B. pertussis* могут возникать условия, индуцирующие формирование популяции гетерогенной по структуре генов вирулентности *fhaB*, *bvgAS* и, вероятно, других генов вирулентности бактерий;
- перемещение IS-элементов в специфический сайт межгенного пространства оперона *bvgAS* приводит к изменению регуляции генов вирулентности и других *bvg*-зависимых генов, возможно, обеспечивая длительную персистенцию бактерий *B. pertussis* в организме хозяина.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Vandamme P.A., Peeters C., Cnockaert M., et al. *Bordetella bronchialis* sp. nov., *Bordetella flabilis* sp. nov. and *Bordetella sputigena* sp. nov., isolated from human respiratory specimens, and reclassification of *Achromobacter sediminum* Zhang et al. 2014 as *Verticia sediminum* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015;65(10):3674–82. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000473>
2. Guiso N. Bordetella adenylate cyclase-hemolysin toxins. *Toxins (Basel)*. 2017;9(9):277. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins9090277>
3. Nash Z.M., Inatsuka C.S., Cotter P.A., et al. Bordetella filamentous hemagglutinin and adenylate cyclase toxin interactions on the bacterial surface are consistent with FhaB-mediated delivery of ACT to phagocytic cells. *mBio*. 2024;15(5):e0063224. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.00632-24>
4. Parkhill J., Sebahia M., Preston A., et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat. Genet.* 2003;35(1):32–40. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng1227>
5. Weigand M.R., Peng Y., Loparev V., et al. The history of *Bordetella pertussis* genome evolution includes structural rearrangement. *J. Bacteriol.* 2017;199(8):e00806–16. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.00806-16>
6. Chen Q., Stibitz S. The BvgASR virulence regulon of *Bordetella pertussis*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2019;47:74–81. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.01.002>
7. Boulanger A., Chen Q., Hinton D.M., et al. In vivo phosphorylation dynamics of the *Bordetella pertussis* virulence-controlling response regulator BvgA. *Mol. Microbiol.* 2013;88(1):156–72. DOI: <https://doi.org/10.1111/mmi.12177>
8. Belcher T., Dubois V., Rivera-Millot A., et al. Pathogenicity and virulence of *Bordetella pertussis* and its adaptation to its strictly human host. *Virulence*. 2021;12(1):2608–32. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1980987>
9. Weiss A.A., Falkow S. Genetic analysis of phase change in *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 1984;43(1):263–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.43.1.263-269.1984>
10. Stibitz S., Aaronson W., Monack D., et al. Phase variation in *Bordetella pertussis* by frameshift mutation in a gene for a novel two-component system. *Nature*. 1989;338(6212):266–9. DOI: <https://doi.org/10.1038/338266a0>
11. Stibitz S. IS481 and IS1002 of *Bordetella pertussis* create a 6-base-pair duplication upon insertion at a consensus target site. *J. Bacteriol.* 1998;180(18):4963–6. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.180.18.4963-4966.1998>
12. Stibitz S. Mutations affecting the alpha subunit of *Bordetella pertussis* RNA polymerase suppress growth inhibition conferred by short C-terminal deletions of the response regulator BvgA. *J. Bacteriol.* 1998;180(9):2484–92. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.180.9.2484-2492.1998>
13. Нестерова Ю.В., Медкова А.Ю., Бабаченко И.В. и др. Клинико-диагностическое значение генетических маркеров *Bordetella pertussis* у контактных лиц в семейных очагах. *Журнал инфектологии*. 2019;11(1):17–24. Nesterova Yu.V., Medkova A.Yu., Babachenko I.V., et al. Clinical-diagnostic value of *Bordetella pertussis* genetic markers in contact persons in familial foci. *Journal Infectology*. 2019;11(1):17–24. DOI: <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-1-17-24> EDN: <https://elibrary.ru/ubtkhk>
14. Каратаев Г.И., Синяшина Л.Н., Медкова А.Ю. и др. Инсерционная инактивация оперона вирулентности в популяции персистирующих бактерий *Bordetella pertussis*. *Генетика*. 2016;52(4):422–30. Karataev G.I., Sinyashina L.N., Medkova A.Yu., et al. Insertional inactivation of virulence operon in population of persistent *Bordetella pertussis* bacteria. *Genetika*. 2016;52(4):422–30. DOI: <https://doi.org/10.7868/S0016675816030085> EDN: <https://elibrary.ru/vvgoit>
15. Weigand M.R., Pawloski L.C., Peng Y., et al. Screening and genomic characterization of filamentous hemagglutinin-deficient *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 2018;86(4):e00869–17. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00869-17>
16. DeShazer D., Wood G.E., Friedman R.L. Molecular characterization of catalase from *Bordetella pertussis*: identification of the katA promoter in an upstream insertion sequence. *Mol. Microbiol.* 1994;14(1):123–30. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01272.x>
17. Ma L., Caulfield A., Dewan K.K., et al. Pertactin-deficient *Bordetella pertussis*, vaccine-driven evolution, and reemergence of pertussis. *Emerg. Infect. Dis.* 2021;27(6):1561–6. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2706.203850>
18. Han H.J., Kuwae A., Abe A., et al. Differential expression of type III effector BteA protein due to IS481 insertion in *Bordetella pertussis*. *PLoS One*. 2011;6(3):e17797. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017797>
19. Семин Е.Г., Синяшина Л.Н., Медкова А.Ю. и др. Конструирование рекомбинантных аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* генотипа ptxP3. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018;95(4):33–41. Semin E.G., Sinyashina L.N., Medkova A.Y., et al. Construction of recombinant attenuated *Bordetella pertussis* bacteria of ptxP3 genotype. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2018;95(4):33–41. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-4-33-41> EDN: <https://elibrary.ru/npsjcf>
20. Синяшина Л.Н., Воронцов В.В., Семин Е.Г. и др. Bvg-негативная регуляция перемещений повторяющихся последовательностей в клетках *B. pertussis*. *Генетика*. 2005;41(12):1–9. EDN: <https://elibrary.ru/hswjwl> Sinyashina L.N., Vorontsov V.V., Semin E.G., et al. Bvg-negative regulation of repeated sequence transposition in *Bordetella pertussis* cells. *Russian Journal of Genetics*. 2005;41(12):1–9. EDN: <https://elibrary.ru/ljjdgb>
21. Сивов И.Г., Большакова Т.Н., Каратаев Г.И. Интеграция и внутримолекулярное перемещение транспозона TnBp3 *B. pertussis* в клетках *E. coli* K-12, мутантных по белку Hpr фосфоенолпируват-зависимой фосфотрансферазной системы. *Генетика*. 2001;37(7):900–7. Sivov I.G., Bol'shakova T.N., Karataev G.I. Integration and intramolecular transposition of the TnBp3 transposon from *B. pertussis* in *E. coli* K-12 cells mutant for the Hpr protein of the phosphoenolpyruvate-

- dependent phosphotransferase system. *Russian Journal of Genetics*. 2001;37(7):900–7.
22. D'Halluin A., Petrácková D., Čurnová I., et al. An IS element-driven antisense RNA attenuates the expression of serotype 2 fimbriae and the cytotoxicity of *Bordetella pertussis*. *Emerg. Microbes Infect.* 2025;14(1):2451718. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2025.2451718>
 23. Farman M.R., Petrácková D., Kumar D., et al. Avirulent phenotype promotes *Bordetella pertussis* adaptation to the intramacrophage environment. *Emerg. Microbes Infect.* 2023;12(1):e2146536. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2146536>
 24. Сивов И.Г., Каратаев Г.И., Белявский О.А. Интеграция плазмиды в хромосому *E. coli* K12, обусловленная транспозоном *Bordetella*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2000;(2):33–6. Sivov I.G., Karataev G.I., Belyavsky O.A. Integration of a plasmid into the *E. coli* K12 chromosome mediated by a *Bordetella* transposon. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2000;(2):33–6.

Информация об авторах

Куликов Сергей Вячеславович — м. н. с. лаб. генетики бактерий отдела медицинской микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, stromdang@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7478-3624>

Медкова Алиса Юрьевна — канд. мед. наук, с. н. с. лаб. генетики бактерий отдела медицинской микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, baburida@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1509-0622>

Локтев Матвей Андреевич — лаборант-исследователь лаб. генетики бактерий НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, m_loktev00@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0002-5128-7681>

Синяшина Людмила Николаевна — д-р мед. наук, в. н. с. лаб. генетики бактерий отдела медицинской микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, vasilissa7777@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1708-5453>

Каратаев Геннадий Иванович — д-р биол. наук, в. н. с., руководитель лаб. генетики бактерий отдела медицинской микробиологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, karataevgi@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8771-6092>

Участие авторов: Куликов С.В. — подготовка и проведение микробиологических и молекулярно-генетических исследований, анализ данных литературы и полученных экспериментальных данных, подготовка рукописи статьи; Медкова А.Ю. — проведение молекулярно-генетических исследований, анализ данных литературы и полученных экспериментальных данных, оформление и редактирование рукописи статьи, подготовка графического материала и таблиц; Локтев М.А. — проведение микробиологических и молекулярно-генетических исследований, работа с литературой; Синяшина Л.Н. — идея и концепция исследования, подготовка и проведение микробиологических исследований, анализ и обсуждение полученных результатов, рецензирование и редактирование рукописи; Каратаев Г.И. — руководство, идея, концепция, планирование исследования, анализ полученных результатов, сопоставление полученных данных с данными мировой литературы, рецензирование рукописи статьи, утверждение окончательного варианта для публикации. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 05.08.2025;
принята к публикации 14.10.2025;
опубликована 31.10.2025

Information about the authors

Sergey V. Kulikov — junior researcher, Laboratory of bacterial genetics, Department of medical microbiology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, stromdang@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7478-3624>

Alisa Yu. Medkova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of bacterial genetics, Department of medical microbiology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, baburida@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1509-0622>

Matvej A. Loktev — research assistant, Laboratory of bacterial genetics, Department of medical microbiology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, m_loktev00@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0002-5128-7681>

Lyudmila N. Sinyashina — Dr. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of bacterial genetics, Department of medical microbiology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, vasilissa7777@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1708-5453>

Gennady I. Karataev — Dr. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Laboratory of bacterial genetics, Department of medical microbiology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia, karataevgi@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8771-6092>

Authors' contribution: Kulikov S.V. — preparation and conducting of microbiological and molecular genetic studies, analysis of literature data, analysis of experimental data, and preparation of the manuscript of an article; Medkova A.Yu. — conducting molecular genetic research, analyzing literature data and experimental data, formatting and editing the manuscript of the article, and preparing graphical material and tables; Loktev M.A. — conducting microbiological and molecular genetic research, and working with literature; Sinyashina L.N. — idea and concept of the study, preparation and conducting of microbiological research, analysis and discussion of the results obtained, review and editing of the manuscript; Karataev G.I. — management, idea, concept, research planning, analysis of the obtained results, comparison of the obtained data with the data from the world literature, review of the manuscript of the article, approval of the final version for publication. All of the authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 05.08.2025;
accepted for publication 14.10.2025;
published 31.10.2025