

ЛИТЕРАТУРА

1. Богданова Е.А., Несвижский Ю.В., Воробьев А.А. Исследование пристеночной микрофлоры желудочно-кишечного тракта крыс при пероральном введении пробиотических препаратов. Вестн. РАМН. 2006, 2: 6-10.
2. Зоров Д.Б. и др. Друзья или враги. Активные формы кислорода и азота. Биохимия. 2005, 70 (2): 265-272.
3. Завгородняя Е.Ф. Особенности микробиологической характеристики дисбиозов кишечника в современных условиях. Дальневост. журн. инфекц. патологии. 2008, 12: 161-162.
4. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: биохимические и патофизиологические аспекты М.: Наука/Интерпериодика, 2001.
5. Костюкевич О.И. Современное представление о микробиоценозе кишечника. Дисбактериоз и его коррекция. РМЖ. 2007, 28: 2176-2182.
6. Королюк М.А. и др. Метод определения активности каталазы. Лаб. дело. 1988, 1: 16-19.
7. Макаренко Е.В. Комплексное определение активности супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы в эритроцитах больных с хроническими заболеваниями печени. Лаб. дело. 1988, 11: 48-50.
8. Несвижский Ю.В. и др. Микробиоценоз пристеночного муцина желудочно-кишечного тракта крыс с индуцированным дисбиозом Журн. микробиол. 2007, 3: 57-60.
9. Несвижский Ю.В. Изучение изменчивости кишечного микробиоценоза человека в норме и патологии. Вестн. РАМН. 2003, 1: 49-53.
10. Шишкина Л.Н. Особенности функционирования физико-химической системы регуляции перекисного окисления липидов в биологических объектах разной степени сложности в норме и при действии повреждающих факторов. Дис. д-ра хим. наук. М., 2003.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Е.Г.Семин, Л.Н.Синяшина, А.Ю.Медкова, Г.И.Каратаев

КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АТТЕНУИРОВАННЫХ БАКТЕРИЙ *BORDETELLA PERTUSSIS* ГЕНОТИПА PtxP3

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

Цель. Конструирование рекомбинантных бактерий *B. pertussis* генотипа ptxP3 и характеристика их генетической и биологической стабильности. *Материалы и методы.* В качестве реципиента при конструировании аттенуированных бактерий генотипа ptxP3 использованы вирулентные бактерии *B. pertussis* 475 генотипа ptxP1, применяемые для производства вакцины АКДС в Российской Федерации. Мутантные бактерии *B. pertussis* 475 получены в результате аллельного обмена между нативной копией целевой последовательности в составе хромосомы и ее мутантной копией в рекомбинантной суицидной плазмиде, переданной в реципиентную бактерию с помощью конъюгации. Конструирование рекомбинантных плазмид осуществлено стандартными методами генетической инженерии. Структура модифицированных участков хромосомы аттенуированных бактерий определена с помощью ПЦР и секвенирования фрагментов амплификации. Стабильность структуры и свойств аттенуированных бактерий определена после 15 пассажей бактерий на питательной среде и 5 — в организме мышей. *Результаты.* Сконструированы изогенные аттенуированные бактерии PtxP1 *B. pertussis* 4M и PtxP3 *B. pertussis* 4MKS, продуцирующие коклюшный токсин (КТ), лишенный ферментативной токсической активности, и не продуцирующие дермонекротический токсин. Промоторная область оперона ptx аттенуированных бактерий PtxP3 *B. pertussis* 4MKS содержит мутацию, характерную для «нового» генотипа циркулирующих в настоящее время вирулентных бактерий *B. pertussis* и увеличивающую продукцию КТ. Структура модифицированных фрагментов ДНК и свойства аттенуированных бактерий

не изменяются при хранении и пассажах на питательной среде и в организме мышей. *Заключение.* Сконструированы рекомбинантные аттенуированные бактерии *B. pertussis* 4MKS «нового» генотипа ptx*P3 и показана перспективность направленной генноинженерной модификации изогенных бактерий *B. pertussis* для создания инновационных препаратов для профилактики коклюша.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 33—41

Ключевые слова: коклюш, рекомбинантные аттенуированные бактерии *B. pertussis*, конструирование, генотип, вакцина

E.G.Semin, L.N.Sinyashina, A.Yu.Medkova, G.I.Karataev

CONSTRUCTION OF RECOMBINANT ATTENUATED *BORDETELLA PERTUSSIS* BACTERIA OF PTXP3 GENOTYPE

Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Aim. The construction of recombinant attenuated *Bordetella pertussis* bacteria of ptxP3 genotype and its genetic and biological stability characteristics. *Materials and methods.* During construction of recombinant attenuated bacteria of ptxP3 genotype virulent *Bordetella pertussis* bacteria of ptxP1 genotype were used as a recipient. PtxP1 genotype bacteria are used for whole cell pertussis (wP) vaccine production in Russia. Mutant bacteria *B. pertussis* 475 were received by crossing-over between chromosome comprising native copy of target sequence and its mutant copy in recombinant suicide plasmid transferred in recipient bacteria by conjugation. Genetically engineered construction of recombinant plasmids was conducted. The structure of modified chromosome locus of attenuated bacteria was determined by PCR and amplification fragments sequence. The stability of structure and characteristics of attenuated bacteria was defined after 15 passages of strains on culture medium and 5 passages in mice. *Results.* Isogenic attenuated ptxP1 *B. pertussis* 4M and ptxP3 *B. pertussis* 4MKS were constructed. These bacteria produce non-toxic pertussis toxin (PT) and do not produce dermonecrotic toxin (DNT). The promoter region of ptx operon contains mutation, typical for «new» genotype of circulating virulent bacteria and increasing PT production. The structure of modified DNA fragments and characteristics of attenuated bacteria did not change while storing and after passages on culture medium and in mice. *Conclusion.* Recombinant attenuated bacteria *B. pertussis* 4MKS of «new» ptxP3 genotype are constructed. Application perspectiveness of genetically engineered modification of isogenic *B. pertussis* bacteria for pertussis vaccines development is shown.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 33—41

Key words: pertussis, recombinant attenuated bacteria *B. pertussis*, construction, genotype, vaccines

ВВЕДЕНИЕ

Коклюш — высококонтагиозное инфекционное заболевание, вызываемое бактериями *Bordetella pertussis*, передающееся воздушно-капельным путем. Специфическая профилактика коклюша, проводимая с 50-х годов прошлого века цельноклеточными коклюшными вакцинами (ЦКВ), позволила снизить заболеваемость до единичных случаев на 100 тыс. населения [3]. Однако наряду с положительным эффектом наблюдали нежелательные побочные реакции и поствакцинальные осложнения, которые в 90-х годах инициировали отмену в ряде стран вакцинации против коклюша и, как следствие, резкое увеличение тяжелых форм заболевания и смертности детей [12], что послужило основанием для разработки бесклеточных коклюшных вакцин

(БКВ), признанных ВОЗ менее реактогенными [11,13]. В настоящее время для массовой иммунизации применяют оба типа коклюшных вакцин в составе комбинированных препаратов. Тем не менее, показатели заболеваемости коклюшем растут как во всем мире, так и в России, особенно среди детей в возрасте до 1 года [1, 2, 13], наиболее значимо в тех странах, где для первичной иммунизации применяют только БКВ [10]. Одной из причин роста заболеваемости коклюшем является краткосрочная эффективность современных вакцин [7].

В развитии инфекционного процесса бактерии *V.pertussis* реализуют множественные факторы патогенности. Важнейшим фактором вирулентности признан коклюшный токсин. В настоящее время в геноме циркулирующих бактерий *V.pertussis* отмечают существенные изменения по сравнению со штаммами довакцинального периода. Накопление в популяции вирулентных бактерий *V.pertussis* с так называемыми «новыми» генотипами позволяет возбудителю «ускользнуть» от коллективного иммунитета, формируемого современными коклюшными вакцинами. Особенно быстрое формирование «новых» генотипов бактерий *V.pertussis* наблюдается с начала периода применения бесклеточных коклюшных вакцин (БКВ). К «новым» генотипам относятся бактерии генотипа *ptxP3* с мутацией в промоторной области оперона *ptx*, увеличивающие продукцию КТ и вирулентность бактерий. Частота встречаемости «новых» генотипов возбудителя коклюша достигает 30–70% от общего числа циркулирующих бактерий *V. pertussis* [10]. Изменение иммунобиологических свойств возбудителя коклюша отражается и на эффективности ЦКВ [6].

Изучение механизма патогенеза коклюша и изменчивости бактерий привело научное сообщество к пониманию необходимости создания нового поколения вакцин и замены «старых» вакцинных штаммов на «новые». Разрабатываемые в течение последних десятилетий методы генетической модификации бактерий *V. pertussis* позволяют конструировать аттенуированные рекомбинантные бактерии и разрабатывать эффективные препараты для профилактики коклюша [8, 9]. В предыдущей работе нами было проведено конструирование аттенуированных бактерий *V. pertussis* на основе реципиентов, несущих генотип *ptx P1* [8]. Аттенуированные бактерии *V. pertussis* KS содержат две мутации в опероне *ptx*, нокаутную мутацию гена *dnt*, продуцируют нетоксичную форму коклюшного токсина (КТ*) и не синтезируют дермонекротический токсин. Показана их высокая протективная активность и низкая токсичность. Можно ожидать, что увеличение уровня продукции КТ*, характерное для «нового» генотипа *ptxP3*, способно повысить защитную активность аттенуированных бактерий *V. pertussis*.

Целью настоящей работы было конструирование рекомбинантных бактерий *V. pertussis* генотипа *ptxP3* и характеристика их генетической и биологической стабильности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы бактерий и плазмиды, использованные и сконструированные в работе, представлены в табл. 1 и 2.

Клонирование, рестрикционный анализ, лигирование, электрофорез ДНК, генетические манипуляции (трансформацию клеток *Escherichia coli* плазмидной ДНК или лигированной смесью) проводили в соответствии со стандартными рекомендациями [4].

Выделение ДНК плазмид, хромосомы и продуктов ПЦР из геля проводили с помощью систем Wizard Plus SV Mini Preps DNA purification system

Таблица 1. Плазмиды, использованные и сконструированные в настоящей работе

Название	Маркеры	Структура	Источник
pJQ	Gm ^R	вектор (γ -ori-R6K и mob-сайт oriTRP4), чувствительность к Sm	НИЦЭМ
pKS2	Gm ^R	pJQ::ptx*::kan	Н.Р.
pKS7	Sm ^R	pJQ::dnt::cat (в Tth111 I)	Н.Р.
pGemT	Ap ^R	Вектор для клонирования	Promega
pKS9	Ap ^R	pGemT:: ptxP3 (ампликон)	Н.Р.
pKS10	Gm ^R	pJQ::ptxP3(EcoRI ф-т pKS9)	Н.Р.

Таблица 2. Штаммы бактерий *B. pertussis* и *Escherichia coli*, использованные и сконструированные в настоящей работе

Штамм	Генотип	Фенотип	Источник
<i>B. pertussis</i> 475	Rif ^S Cm ^S Km ^S Sm ^S Nal ^S	1.2.3. Bvg+	НИЦЭМ
<i>B. pertussis</i> 476	Sm ^R Nal ^R	1.2.3. Bvg+	Н.Р.
<i>B. pertussis</i> 4	Sm ^R Nal ^R Km ^R ptx*	1.2.3. B. p 476 ptx*	Н.Р.
<i>B. pertussis</i> 4M	Cm ^R Sm ^R Nal ^R Km ^R ptx*dnt::cat	1.2.3.7. B. p 4 Dnt	Н.Р.
<i>B. pertussis</i> 4MKS	Cm ^R Sm ^R Nal ^R Km ^S ptx*dnt PtxP3	1.2.3.7. B. p 4M PtxP3	Н.Р.
<i>E. coli</i> Sm 10	Km ^R recA, RP4:2-Tc::Mu aph:: Tn7 pir		НИЦЭМ

Примечание. Н.Р. сконструированы в настоящей работе; НИЦЭМ коллекция НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи; ptx * мутантный оперон ptx.

(Promega, США), Wizard Plus Mini Preps DNA purification system (Promega, США) и Wizard SV Geland PCR Clean-up System (Promega, США). ПЦР проводили на приборе Терцик (Россия) с использованием специфических праймеров, синтезированных ЗАО «СИНОЛ».

Мышей усыпляли эфиром, легкие извлекали и гомогенизировали в 0,85 % растворе хлорида натрия pH 7.2-7.4, инкубировали 15 мин при температуре 36 °С и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5-10 мин. По 0,1 мл супернатанта высевали на три чашки Петри с селективной средой и использовали для выделения ДНК. Супернатанты гомогенатов легких обрабатывали раствором гуанидинтиоцианата с последующей сорбцией ДНК на магнитном сорбенте фирмы «Promega» США.

Автоматическое секвенирование проводили на 373A Automatic Sequencer (Applied Biosystems, USA) с использованием реактивов Dye Deoing Terminator AB Isequencing Kit с Taq-полимеразой FS (Perkin Elmer, USA). Для реакции использовали плазмиды или продукты амплификации ДНК.

Фенотипические характеристики аттенуированных бактерий *B. pertussis* изучали на отдельных колониях, выросших на среде КУА с добавлением селективных антибиотиков и 15% дефибрированной крови барана для регистрации гемолитической активности. Для серотипирования использовали сухие диагностические коклюшные сыворотки для реакции агглютинации (РА) к главным агглютиногенам бактерий *B. pertussis* — 1, 2, 3, в соответствии с рекомендациями МУК 4.2.2317-080 и производителя [5].

Изучение структуры модифицированных фрагментов генома аттенуированных бактерий *B. pertussis* проводили с помощью генетических (методом реплик на селективные среды) и молекулярно-биологических методов (анализ структуры и последовательности продуктов ПЦР ДНК хромосомы *B. pertussis*, содержащих мутантные гены). Для проведения ПЦР были использованы праймеры. специфичные для последовательностей генов ptx, kan, cat и dnt.

Специфическую активность КТ — лейкоцитозстимулирующую (ЛСА) и гистаминсенсibiliзирующую (ГСА) активность определяли в соответствии со стандартными методиками при внутрибрюшинном и интраназальном введении лабораторным мышам. Активность дермонекротического токсина аттенуированных бактерий *V. pertussis* определяли при внутрикожном введении кроликам и морским свинкам [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее нами было описано конструирование мутантного оперона *ptx*, гена *dnt*, генома аттенуированных бактерий на основе реципиентов *V. pertussis* 135 и 232 и их иммунобиологические характеристики [8].

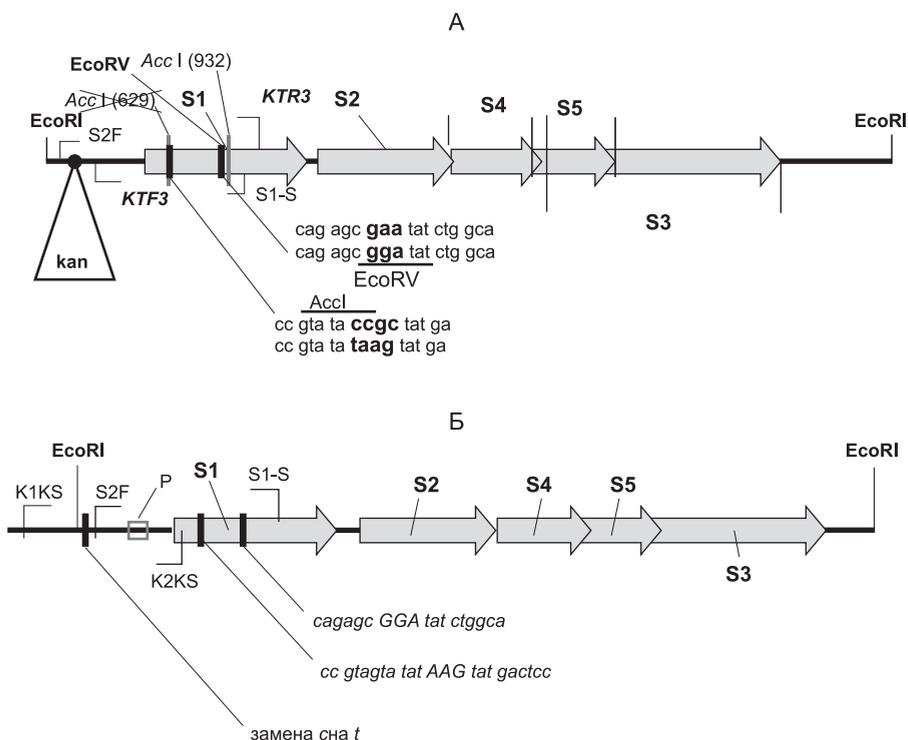
В настоящей работе в качестве реципиента использованы бактерии *V. pertussis* 475 генотипа *ptxP1*, входящие в состав коклюшного компонента вакцины АКДС. Последовательность оперона *ptx* содержала описанные ранее мутации аминокислот Arg9 и Glu129, а ген *dnt* — нокаутную инсерцию последовательности *cat* [8]. Для аллельного обмена использовали суицидные плазмиды, сконструированные на основе вектора *pJQ*. Характеристики рекомбинантных плазмид *pKS2* и *pKS7*, содержащих мутантный, маркированный геном *kan*, оперон *ptx*, и последовательность гена *dnt* с инсерцией гена *cat* в сайте *Tth111*, представлены в табл. 1.

Рекомбинантные бактерии *Ptx* P1 V. pertussis* 4М, содержащие мутацию в опероне *ptx*, сконструированы в результате скрещивания *Str^RNal^R V. pertussis* 475 x *E. coli* *Sm10/pSK2*. Селекцию *Nal^RKm^R* транскоъюгантов проводили на селективной среде КУА, содержащей налидиксовую кислоту и канамицин. Доминантность признака *Str^S* в составе плазмиды *pJQ* позволяла осуществить отбор транскоъюгантов, содержащих в хромосоме *V. pertussis* только копию целевой мутантной последовательности, и исключить транскоъюганты, имеющие коинтегра́т хромосомы с плазмидой. Искомые транскоъюганты должны иметь фенотип *Str^RGm^SKm^RNal^R*. Поэтому после расчистки *Nal^RKm^R* транскоъюганты высевали на чашки КУА со стрептомицином или стрептомицином и канамицином. Выросшие колонии двукратно расчищали на чашках со стрептомицином + канамицин и проверяли по маркерам устойчивости к *Str*, *Nal*, *Km* и *Gm*. Клоны *Str^RNal^RKm^RGm^S* использовали для дальнейшего анализа. Генетический анализ транскоъюгантов показал, что все клоны *Str^RNal^RKm^R*, выросшие на среде с добавлением стрептомицина, чувствительны к *Gm*. ПЦР, рестрикция и секвенирование фрагментов амплификации нескольких *Str^RNal^RKm^RGm^S* транскоъюгантов показали, что они являются искомыми рекомбинантными бактериями *V. pertussis*, в хромосоме которых на месте дикого аллеля *ptx* находится его мутантная копия, маркированная геном устойчивости к канамицину. Один из охарактеризованных транскоъюгантов назван *V. pertussis* 4.

Аналогичным образом были отобраны и проанализированы *Str^RNal^RKm^RGm^S Cm^R* транскоъюганты, полученные в скрещивании *Sm10/pKS7* x *Str^RNal^RKm^R V. pertussis* 4. Для дальнейшего конструирования использован охарактеризованный *Dnt-Ptx*P1 Str^RNal^RKm^RCm^R* рекомбинант, названный *V. pertussis* 4М.

Рекомбинантные бактерии *Dnt-Ptx*P3 V. pertussis* сконструированы в результате замены фрагмента, содержащего последовательность *ptxP1* в геноме бактерий *V. pertussis* 4М, на последовательность *ptxP3* в составе плазмиды *pKS10*. Источником последовательности *ptxP3* являлась хромосома *V. pertussis* «нового», синтезированная в результате амплификации ДНК *V. pertussis* 55-12, выделенного

в России, описанного и предоставленного нам Борисовой О.Ю. Для амплификации целевого фрагмента, содержащего мутацию и сайт узнавания *StuI*, использованы праймеры K1KS и K2KS. Амплифицированный фрагмент клонирован в векторе pGemT (плазмида pKS9) (Promega, USA) и переклонирован в вектор pJQ. Рекомбинантная плазмида получила название pKS10. Плазмиду pKS10 трансформировали в бактерии *E. coli* SM10-донора в скрещивании с аттенуированными бактериями *B. pertussis* 4M. Трансконъюганты отбирали на селективной среде, содержащей Cm, Str и Gm. Поскольку целевой фрагмент содержит сайт *StuI* хромосомы *B. pertussis* 4M с интегрированной последовательностью гена *kan*, то событие аллельного обмена, приводящее к искомой замене последовательности регуляторной области *ptxP1* на *ptxP3*, должно сопровождаться потерей маркера устойчивости к канамицину. В связи с этим, после расчистки трансконъюгантов на селективной среде бактерии *B. pertussis* высевали до отдельных колоний на среду КУА с добавлением Cm и Str. Отдельные колонии методом реплик переносили на селективные среды, содержащие один из пяти антибиотиков: Cm, Str, Gm, Km или Nal. Трансконъюганты с фенотипом Km^SCm^RNal^RStr^RGm^S проверяли на наличие последовательности гена *kan*, соответствие структуры регуляторной области оперона *ptx** генотипу *ptxP3* и инсерции в гене *dnt*. Анализ структуры модифицированных участков проводили с помощью ПЦР и секвенирования. На рис. показано расположение мутации на хромосоме бактерий «нового» генотипа *ptxP3*, названных *B. pertussis* 4MKS. Амплификация ДНК, рестрикция и секвенирование подтвердили идентичность модифицированных участков



Структура фрагментов хромосомы *Bordetella pertussis* 4M (А) и *Bordetella pertussis* 4MKS (Б).

Ломаные линии показывают положение праймеров, использованных для определения структуры модифицированных фрагментов генома *B. pertussis*; квадратный бокс с надписью P отображает положение промотора оперона *ptx*; S1-S5 — положение соответствующих генов КТ в опероне *ptx*; заглавные и прописные буквы курсива обозначают описанные в тексте последовательности; *EcoRI* — сайты рестрикции на карте фрагментов хромосомы *Bordetella pertussis*.

хромосом *B. pertussis* 4MKS и *B. pertussis* 4M, наличие замен аминокислот Arg9 (CGC) и Glu129(AAG) и замену нуклеотида *c* на *t* в положении — 65, соответствующую «новому» генотипу ptxP3 в хромосоме *B. pertussis* 4MKS (рис.).

После 15 пересевов на среде КУА с добавлением дефибрированной крови и пяти пассажей в легких мышей аттенуированных бактерий PtxP3 *B. pertussis* 4MKS изучали стабильность морфологических и фенотипических характеристик микробных

клеток и колоний, гемолитическую активность, состав видоспецифических агглютиногенов, маркеры устойчивости к антибиотикам, структуру модифицированных участков хромосомы. Наблюдалось формирование типичных для *B. pertussis* округлых блестящих колоний, размером около 1 мм, с четко очерченными краями, гладкой поверхностью и зоной гемолиза диаметром 1-2 мм. При микроскопии грамтрицательные коккобациллы располагались отдельно или парами. Все изученные клоны сохранили серовар 1.2.3. При определении маркеров S_m^R и K_m^S в составе модифицированных участков генома аттенуированных бактерий PtxP3 *B. pertussis* 4MKS методом реплик не было выявлено ни одной колонии, потерявшей устойчивость к хлорамфениколу (проверено около 500 КОЕ).

Изучение токсической активности КТ*, экспрессируемого рекомбинантными бактериями PtxP3 *B. pertussis* 4MKS, проводили в тестах ЛСА и ГСА после интраназального (i/n) и интраперитонеального (i/p) введения мышам Balb/c. Интраназально вводили 10^{10} м.к. (200 МЕ) в 25 мкл 0,85 % р-р NaCl; интраперитонеально — 10^{10} м.к. в 0,5 мл 0,85 % р-р NaCl (табл. 3 и 4). В соответствии с МУК (4.2.2317-080) ЛСА рекомбинантных бактерий PtxP3 *B. pertussis* 4MKS определяли параллельно с отраслевым стандартным образ-

Таблица 3. Лейкоцитостимулирующая активность аттенуированных бактерий *B. pertussis* 4MKS ptxP3 при интраназальном и интраперитонеальном введении мышам линии Balb/c

Бактерии	Доза	No ¹⁾	Способ введения	Nл ²⁾ через 72 ч
<i>B. pertussis</i> 4MKS	10 МЕ	10	i/n ³⁾	9700± 900
<i>B. pertussis</i> 4MKS	10 МЕ	10	i/p ⁴⁾	12700± 1000
ОСО-3	10 МЕ			17000+ 1050
0,85 % р-р NaCl	0,5 мл	5	i/p	7990 ±1151
0,85 % р-р NaCl	25 мкл	5	i/ n	6840 ±737

Примечание. 1) количество мышей в эксперименте; 2) количество лейкоцитов в мкл крови; 3) интраназальное введение; 4) интраперитонеальное введение.

Таблица 4. Гистаминсенсбилизирующая активность аттенуированных бактерий *B. pertussis* 4MKS при интраназальном и интраперитонеальном введении мышам линии C57 BL/6

Бактерии	Доза (м.к. $\times 10^9$)	No ¹⁾	Способ введения	Гибель мышей		N _v ²⁾	N _n ³⁾	% гибели мышей	ГСД ₅₀ (м.к. $\times 10^9$)
				2 ч	24 ч				
<i>B. pertussis</i> 4MKS	10,0	10	i/n	0	0	10	0	0	>10,0
	2,0	10		0	0	10	0	0	
	0,4	10		0	0	10	0	0	
<i>B. pertussis</i> 4MKS	10,0	10	i/p	0	0	9	1	10	> 10,0
	2,0	10		0	0	10	0	0	
	0,4	10		0	0	10	0	0	
ОСО-5 42-28-87-02П	10,0	10	i/p	8	0	2	8	80	2,0
	2,0	10		6	0	4	6	60	
	0,4	10		0	0	10	0	0	
Контроль	0,85% NaCl	10	i/p	0	0	0	0	0	-
Контроль	0,85% NaCl	10	i/n	0	0	0	0	0	-

Примечание. 1) количество мышей в опыте; 2) количество выживших мышей; 3) количество погибших мышей.

цом — ОСО-3 (42-28-89) и ГСА сравнительно с ОСО-5 (42-28-87-02П). Расчет ГСД₅₀ (ГСА) представлен только для ОСО-5, поскольку после введения разрешающей дозы гистамина не было гибели мышей, иммунизированных бактериями *B. pertussis* 4MKS. ГСА препарата ОСО-5 имела дозозависимый характер, что позволило считать эксперимент корректным. Дермонекротическую активность аттенуированных бактерий PtxP3 *B. pertussis* 4MKS изучали в сравнении с изогенными вирулентными бактериями *B. pertussis* 475. При внутрикожном введении кроликам и морским свинкам 0,2 мл суспензии, содержащей от 10 до 50 МОЕ *B. pertussis* 4MKS, активности дермонекротического токсина выявлено не было, в то время как при введении вирулентных бактерий *B. pertussis* 475 в дозе 2×10^8 м.к. наблюдали образование выраженного некроза, достигающего $20 \pm 0,5$ мм в диаметре. Аналогичные результаты получены при изучении токсической активности бактерий PtxP1 *B. pertussis* 4M.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования последнего десятилетия в разных странах, в том числе и в России, показали, что в настоящее время на фоне массовой вакцинации циркулирующие штаммы бактерии *B. pertussis* содержат измененные последовательности *ptx*, *fga*, *prn*, отличающиеся от последовательностей в штаммах *B. pertussis* довакцинального периода. Высказываются предположения, что рост заболеваемости коклюшем непосредственно связан с циркуляцией бактерий «новых» генотипов [2, 10]. Для производства современных коклюшных вакцин рассматривается возможность замены вакцинных штаммов на «новые», несущие современные генотипы. Большинство выявленных мутаций в последовательности *ptx*, кодирующей КТ, расположены в области, ответственной за формирование структур протективных эпитопов. На данный момент нет достоверных данных, подтверждающих практическую целесообразность использования бактерий с «новыми» генотипами, касающимися структуры протективных антигенов для производства вакцин, однако они, вероятно, появятся, так как исследования в этом направлении проводятся в ряде лабораторий мира. Исключение составляет генотип *ptxP3*, доминирующий в последнее десятилетие. Бактерии, несущие генотип *ptxP3*, содержат точечные мутации в регуляторной области промотора оперона *ptx*, ответственной за связывание белка BvgA, усиливающего экспрессию оперона и продукцию КТ, и не затрагивающие его структуру. Показано, что бактерии *B. pertussis* генотипа *ptxP3* продуцируют увеличенное количество коклюшного токсина и более вирулентны в экспериментах на животных. Сконструированные нами ранее аттенуированные бактерии *B. pertussis* имеют довакцинный генотип *ptxP1* [8].

Для увеличения продукции КТ* как основного протективного антигена возбудителя коклюша и создания модели для изучения влияния этой мутации на протективность коклюшной вакцины нами были сконструированы рекомбинантные бактерии *B. pertussis* 4MKS с «новым» генотипом *ptxP3* на основе изогенных аттенуированных бактерий *B. pertussis* 4M генотипа *ptxP1*.

Сопоставление рекомбинантов PtxP3 *B. pertussis* 4MKS и PtxP1 *B. pertussis* 4M показало полное отсутствие у них токсической активности, независимо от уровня продукции КТ*.

Стабильность структуры модифицированных участков оперона *ptx* и гена *dnt* после хранения бактерий, пассажей на питательной среде и в организме

животных подтверждена амплификацией соответствующих фрагментов хромосомы, их рестрикционным картированием, секвенированием и не зависела от генотипа бактерий. На следующем этапе будет проведено сравнительное изучение защитной активности изогенных аттенуированных бактерий с генотипами ptx* P1 и ptx* P3.

Таким образом, сконструированные нами аттенуированные рекомбинантные бактерии *B. pertussis* 4MKS с «новым» ptxP3 генотипом регуляторной области оперона ptx сохранили кодирующую последовательность ptx* бактерий Ptx*P1 *B. pertussis* 4M и нокаутную мутацию в гене *dnt*. Генетическая структура и биологические свойства бактерий Ptx*P3 *B. pertussis* 4MKS стабильны при пересевах на селективных питательных средах и пассажах в организме лабораторных животных. Аттенуированные бактерии Ptx*P3 *B. pertussis* 4MKS могут быть более эффективными при создании новых рекомбинантных препаратов для профилактики коклюша, в частности, живой коклюшной вакцины (Патент РФ № 2455024 ⁽¹³⁾ С1. 10.07.2012).

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева И.А., Чупринина Р.П., Борисова В.Н. Сравнительный анализ безопасности и эффективности отечественных и зарубежных комплексных вакцин, содержащих цельноклеточную коклюшную вакцину. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2012, 3(64): 48-54.
2. Борисова О.Ю., Пименова А.С., Попова О.П. и др. Структура популяции штаммов возбудителя коклюша на территории России. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016, 4(86): 22-27.
3. Захарова М.С. Влияние вакцинации на эпидемиологию коклюша в СССР. В кн.: *Эпидемиология и иммунопрофилактика коклюша в СССР, ВНР, НРБ и ЧССР*. М., 1985.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М., Мир, 1984.
5. МУК 4.2.2317-08. Методические указания. Издание официальное. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. М., 2009.
6. Перельгина О.В., Алексеева И.А. Безопасность комбинированных вакцин с цельноклеточным коклюшным компонентом. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016, 6 (91): С. 62-69.
7. Пименова А.С., Борисова О.Ю., Цвиркун О.В. и др. Эффективность применения молекулярно-генетической диагностики при обследовании очагов коклюшной инфекции. *Журн. инфекция и иммунитет*. 2017, 7(2): 162-170.
8. Снягина Л.Н., Снягина Л.С., Семин Е.Г. и др. Конструирование генетически аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis*, утративших активность дермонекротического токсина и продуцирующих измененную нетоксичную форму коклюшного токсина. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2010, 3: 31-36.
9. Mielcarek N., Debrie A.S., Raze D. et al. Live attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. *PLoS Pathog.* 2006, 2 (7): 65-69.
10. Mooi F.R. *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect. Genet. Evol.* 2010, 10 (1): 36-49.
11. Sato Y., Sato H. Development of acellular pertussis vaccines. *Biologicals*. 1999, 27: 61-67.
12. WHO. Expert committee on biological standardization. Recommendation to Assure the Quality, Safety and Efficacy of Acellular Pertussis Vaccines. Geneva, 17-20 October. 2011.
13. WHO. Weekly epidemiological record. 2014, 89(21).

ИНФЕКТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ СИМБИОТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

О.В.Бухарин¹, И.Н.Чайникова^{1,2}, Е.В.Иванова¹, Н.Б.Перунова¹, Т.А.Бондаренко¹, А.И.Смолягин²

ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЙ ПРОФИЛЬ МИКРОСИМБИОНТОВ КИШЕЧНОГО БИОТОПА ЧЕЛОВЕКА

¹Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург; ²Оренбургский государственный медицинский университет

Цель. Сравнительное изучение иммунорегуляторных свойств метаболитов доминантных и ассоциативных микросимбионтов при эубиозе и дисбиозе толстого кишечника человека. *Материалы и методы.* В качестве доминантной микробиоты использовали 260 штаммов бифидобактерий, ассоциативных микросимбионтов — 132 культуры условно патогенных бактерий и грибов из 122 кишечных микросимбиоценозов. Продукцию цитокинов изучали у культур мононуклеаров, сокультивируемых с супернатантами микросимбионтов. Результаты обработаны статистически (Statistica 10.0). *Результаты.* При эубиозе доминантные и ассоциативные микросимбионты проявляли гетерогенность иммунорегуляторных свойств. В отношении флогенных цитокинов ассоцианты в равной степени проявляли стимуляцию/супрессию/отсутствие влияния на цитокины, за исключением энтерококков и бактероидов, стимулирующих секрецию ИЛ-8, и лактобацилл, индуцирующих ИФН γ . Доминанты характеризовались однонаправленностью эффекта: стимуляция секреции ИЛ-10 и супрессия ФНО α , ИФН γ и ИЛ-17 при сохранении индукции ИЛ-10 при дисбиозе. Напротив, супернатанты ассоциантов сочетанно увеличивали продукцию оппозитных цитокинов: раннего провоспалительного цитокина ФНО α , иммунорегуляторного цитокина ИФН γ и противовоспалительного цитокина ИЛ-10. *Заключение.* Кишечный гомеостаз при эубиозе поддерживается дифференцированным воздействием метаболитов микросимбионтов на продукцию про-, противовоспалительных, иммунорегуляторных цитокинов с формированием оптимального баланса, ограничивающего воспалительные и аутоиммунные реакции. В условиях дисбиоза у доминантов сохраняется направленность иммунорегуляторных свойств, у ассоциантов — ограничивается разнообразие эффектов влияния на про-/противовоспалительные цитокины.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 42—51

Ключевые слова: бифидобактерии, ассоциативные микросимбионты, симбиоз, эубиоз, дисбиоз, цитокины, иммунный гомеостаз кишечника

О.В.Бухарин¹, И.Н.Чайникова^{1,2}, Е.В.Иванова¹, Н.Б.Перунова¹, Т.А.Бондаренко¹, А.И.Смолягин²

IMMUNOREGULATORY PROFILE OF MICROSymbionTS OF THE INTESTINAL HUMAN BIOTOPE

¹Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg; ²Orenburg State Medical University, Russia

Aim. To study in comparison immunoregulatory properties of dominant and associative microsymbiotes metabolites in human large intestine's eubiosis and dysbiosis. *Materials and methods.* 260 strains of bifidobacteria used as dominant microbiota, 132 cultures of conditionally pathogenic bacteria and fungi used as associative microsymbiotes from 122 intestinal microsymbioceneses. The cytokines production was studied in cultures of mononuclear cells co-cultivated with