

9. Суховская О.А., Александрова Н.И., Егорова Н.Б., Ефремова В.Н. Иммунореактивность больных хроническим бронхитом при вакцинотерапии. Журн. микробиол. 1996, 2:68-71.
10. Хаитов М.Р. Острые респираторные вирусные инфекции и бронхиальная астма. Клеточные и молекулярные аспекты проблемы. Журн.микробиол. 2002, 4:84-93.
11. Чучалин А.Г., Осипова Г.Л., Егорова Н.Б. и др. Контролируемые исследования по эффективности поликомпонентной вакцины при иммунотерапии у больных хроническими обструктивными заболеваниями органов дыхания. Пульмонология. 1995, 2:55-61.
12. Щербакова Б.В. Эффективность поликомпонентной бактериальной вакцины (ВП-4) при бронхиальной астме у детей. Автореф. дисс. канд. мед. наук. М., 1999.
13. Medzhitov R., Janeway Jr. C.A. Innate immunity: impact in the adaptive immune response. Curr. Opin. Immunol. 1997, 9: 4-9.
14. Medzhitov R., Janeway Jr. C.A. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. Science. 2002, 296:298-300.
15. Romagnani S., Parronchi O., Delios M.M. et al. An update on human Th1 and Th2 cells. Int. Arch. Allergy Immunol. 1997, 113:153-156.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Е.М.Зайцев, М.В.Брицина, М.Н.Озерецковская, Н.У.Мерцалова, И.Г.Бажанова

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ БИОПЛЕНОК *BORDETELLA PERTUSSIS* НА АБИОТИЧЕСКОМ СУБСТРАТЕ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

Цель. Выбор оптимальных условий культивирования биопленок *Bordetella pertussis* и сравнительная оценка способности разных штаммов формировать биопленки. *Материалы и методы.* Использовали вакцинный штамм *B. pertussis* № 475 и селекционированный из этого штамма штамм № 475а, отличающийся повышенной вирулентностью. В качестве инокулята для получения биопленок использовали культуры штаммов, выращенных на плотной питательной среде (ППС) и жидкой питательной среде (ЖПС). Интенсивность образования биопленок в круглодонных полистироловых 96-луночные планшетах оценивали окрашиванием 0,1% раствором генциан-фиолетового. *Результаты.* Суточные культуры штамма № 475 с ЖПС формировали умеренные биопленки в диапазоне доз 5 — 1,25 МОЕ (международных оптических единиц)/мл, при отсутствии роста на более низких дозах. Суточные культуры этого штамма с ППС формировали плотные биопленки при посевной дозе в диапазоне от 10 до 1,25 МОЕ/мл, умеренные от 0,625 до 0,157 МОЕ/мл и слабые биопленки в дозе 0,079 МОЕ/мл. Штамм № 475а с ППС формировал плотные биопленки в диапазоне доз от 10 до 0,04 МОЕ/мл и только при дозе 0,02 МОЕ/мл формировались умеренные биопленки. *Заключение.* Разработан простой и информативный метод, позволяющий оценивать способность штаммов *B. pertussis* формировать биопленки в полистироловых планшетах. Культуры, полученные с ППС, формировали более выраженные биопленки, чем культуры с ЖПС. Выявлена повышенная способность к образованию биопленок селекционированным штаммом № 475а, по сравнению с исходным штаммом № 475.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 49—53

Ключевые слова: штаммы *B. pertussis*, жидкая питательная среда, плотная питательная среда, биопленки

Е.М.Zaytsev, M.V.Britsina, M.N.Ozeretskoyanskaya, N.U.Mertsalova, I.G.Bazhanova

CULTIVATION OF *BORDETELLA PERTUSSIS* BIOFILMS ON ABIOTIC SUBSTRATE

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Selection of optimal conditions for the cultivation of *Bordetella pertussis* biofilms and comparative assessment of the ability of different strains to form biofilms. *Materials and methods.* Used a vaccine strain of *B. pertussis* № 475 and selected from this strain strain № 475а, characterized by high virulence. Cultures of strains grown on dense nutrient medium (DNM) and liquid nutrient medium (LNM) were used as inoculates for biofilms production. The intensity of biofilms formation in round-bottom 96-well

polystyrene plates was estimated by staining with 0,1% gentian-violet solution. *Results.* Daily cultures of the strain № 475 with LNM formed moderate biofilms in the range of doses 5 — 1,25 IOU (international optical units) /ml, in the absence of growth at lower doses. The daily cultures of this strain with the DNM formed a dense biofilms when planting a doses in the range from 10 to 1,25 IOU/ml, moderate from 0,625 to 0,157 IOU/ml and weak biofilms at a dose of 0,079 IOU/ml. Strain № 475a with the DNM formed dense biofilms in the doses range of 10 to 0,04 IOU/ml and only at the dose of 0,02 IOU/ml were formed moderate biofilms. *Conclusion.* A simple and informative method has been developed to evaluate the ability of *B. pertussis* strains to form biofilms in polystyrene plates. Cultures obtained with the DNM formed a more significant biofilms than cultures with LNM. Identified high ability to biofilms formation by a selected strain №. 475a, compared to the original strain № 475.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 49—53

Key words: *B. pertussis* strains, liquid nutrient medium, dense nutrient medium, biofilms

ВВЕДЕНИЕ

Эпидемический процесс коклюшной инфекции, несмотря на высокий уровень противокклюшной вакцинации, продолжается во многих странах мира. По данным ВОЗ, в 2008 г. в мире было зарегистрировано 16 млн случаев заболевания коклюшем, 195 тысяч детей погибли от него. В 2011 г. в мире зарегистрировано 162 047 случаев заболевания коклюшем, из них тяжелых 38 040 [1].

Исследования, проведенные во многих странах мира, показали, что основными причинами роста заболеваемости коклюшем является несоответствие генотипов *B. pertussis* циркулирующих штаммов генотипам вакцинных штаммов *B. pertussis*, вследствие адаптации бактерий к вакцинированной популяции, что привело к снижению иммунитета и возникновению вспышек заболевания коклюшем. Мутации в генах, кодирующих основные факторы вирулентности, аллельный полиморфизм и редукция генома *B. pertussis* привели к появлению циркулирующих штаммов *B. pertussis*, несущих в генотипе *ptxP3* аллель оперона коклюшного токсина, отличающийся повышенной вирулентностью и ассоциирующийся с увеличением заболеваемости коклюшем [9,11]. При этом, одним из возможных факторов высокой вирулентности циркулирующих штаммов может быть их повышенная способность к формированию биопленок. Обсуждается также возможность продукции биопленочными формами *B. pertussis* новых антигенов, не входящих в состав современных вакцин [6 — 8].

В настоящее время доказана роль микробных биопленок в развитии целого ряда инфекций человека. Установлено, что различные виды бактерий формируют биопленки на любых биотических и абиотических субстратах. Биопленочные формы бактерий отличаются от планктонных измененным спектром экспрессии генов и обладают повышенной устойчивостью к факторам внешней среды (антибиотикам, дезинфектантам, иммунным факторам) [3]. Способность коклюшного микроба формировать биопленки в биотических и абиотических условиях, механизмы формирования биопленок, их структура и функция изучены до настоящего времени недостаточно. Изучение закономерностей формирования биопленок *B. pertussis*, анализ способности штаммов коклюшного микроба с различными генотипическими характеристиками к формированию биопленок может внести существенный вклад в изучение патогенеза коклюша и совершенствование средств профилактики этой инфекции.

Цель работы заключалась в выборе оптимальных условий культивирования для образования биопленок *B. pertussis* и сравнительная оценка способности разных штаммов формировать биопленки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биопленочные формы *B. pertussis* культивировали в 96-луночных пластиковых планшетах в соответствии с ранее описанным методом [10] в нашей модификации. В опытах использовали вакцинный штамм № 475 (серовар 1.2.3) и селекционированный из этого штамма штамм № 475a [5]. В качестве инокулята для получения биопленок использовали ночную культуру штаммов, выращенных на плотной пита-

тельной среде («Бордетелагар», ГНЦПМБ, г.Оболенск) и жидкой (шуттелируемой) синтетической питательной среде [4]. Концентрацию микробных клеток (МОЕ/мл) определяли с помощью отраслевого стандартного образца мутности (ОСО42-28-85-08 П, 10 МЕ, Научный центр экспертизы средств медицинского применения).

Культуры, выращенные на жидкой и плотной питательных средах, доводили до концентрации микроорганизмов 20 МОЕ/мл. Затем коклюшные культуры титровали в пробирках с жидкой синтетической питательной средой начиная с 10 МОЕ/мл до 0,01 МОЕ/мл с двукратным интервалом. Каждое разведение культур в объеме 200 мкл вносили в 4 — 8 лунок круглодонных 96-луночных планшетов (Nunc, Дания). Дополнительно в 4 — 8 лунок вносили жидкую синтетическую питательную среду в качестве негативного контроля. Планшеты накрывали крышкой и выдерживали в термостате при 37°C в течение 24 и 48 ч. После окончания культивирования бактерий из лунок планшета осторожно удаляли питательную среду с планктонными клетками. Затем лунки с биопленками промывали 2-3 раза стерильным фосфатно-солевым буферным раствором рН 7,2. После этого в каждую лунку добавляли по 200 мкл 0,1% раствора генциан-фиолетового. Планшеты выдерживали с красителем в течение 10-15 минут при комнатной температуре, после чего удаляли из лунок несвязавшийся краситель, тщательно промывая планшеты водопроводной водой. Планшеты переворачивали на фильтровальную бумагу вверх дном и высушивали при комнатной температуре. Затем в лунки добавляли 95% этиловый спирт в объеме 200 мкл. Через 2-3 мин содержимое лунок переносили в чистые 96-луночные плоскодонные планшеты («Linbro») и измеряли оптическую плотность (ОП) при длине волны 620 нм с помощью вертикального спектрофотометра «Multiskan FC», Finland. Интенсивность образования биопленок оценивали по показателям ОП окрашенного растворителя по отношению к негативному контролю как плотные ($t > 4$), умеренные ($t \leq 4$), слабые ($t \leq 2$), отсутствие биопленок [2]. Статистический анализ проводили с использованием пакета прикладных программ Excel (Microsoft, США) с применением параметрических методов сравнения при нормальном распределении (t -критерий Стьюдента).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследований были разработаны оптимальные условия образования биопленок микробными клетками *B. pertussis*: интенсивность образования биопленок при различных концентрациях клеток при засева на 96-луночные полистироловые планшеты, длительность культивирования. Также было проведено сравнительное изучение способности формирования биопленок культурами *B. pertussis*, выращенными в жидкой и плотной питательных средах. Полученные результаты приведены в табл. 1. Результаты опытов выявили существенные различия между ин-

Таблица 1. Формировании биопленок культурами штамма № 475, выращенными на жидкой и плотной питательных средах

Доза культуры (МОЕ/мл)	Питательная среда			
	Жидкая		Плотная	
	Срок культивирования			
	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
Тип биопленки/Оптическая плотность (*)				
5	Умеренная/4	Плотная/4,6	Плотная/24,3	Плотная/6,5
2,5	Умеренная/2,6	Плотная/4,7	Плотная/9,3	Плотная/6,5
1,25	Умеренная/2,3	Плотная/4,5	Плотная/12,9	Плотная/10,7
0,625	Слабая/1,5	Умеренная/2,5	Плотная/6,15	Плотная/16,1
0,313	Нет/0,02	Умеренная/3,2	Умеренная/3,3	Плотная/7,5
0,157	Нет/0,02	Умеренная/2,6	Умеренная/3,0	Плотная/10,3
0,079	Нет/0,02	Слабая/1,4	Умеренная/2,8	Плотная/9,2

Примечание. * Отношение оптической плотности опытного образца к оптической плотности негативного контроля (здесь и в табл. 2).

тенсивностью образования биопленок культурами штамма № 475, выращенными в жидкой и плотной питательных средах.

При этом культуры, полученные с плотной питательной среды, формировали более выраженные биопленки, чем культуры с жидкой питательной среды. Суточные культуры с жидкой питательной среды формировали умеренные биопленки в диапазоне доз 5 — 1,25 МОЕ/мл при отсутствии роста на более низких дозах. Увеличение срока культивирования до 48 ч сопровождалось некоторым увеличением интенсивности образования биопленок. Плотные биопленки формировались при дозах 5-1,25 МОЕ/мл, а умеренные в дозах 0,625 — 0,157. Суточные культуры с плотной питательной среды формировали плотные биопленки при посевных дозах от 5 до 0,625 МОЕ/мл, а умеренные в дозах 0,313-0,079 МОЕ/мл. При увеличении срока культивирования до 48 ч были получены плотные биопленки при всех испытанных посевных дозах (5-0,04 МОЕ/мл). Таким образом, оптимальный срок культивирования, позволяющий оценить интенсивность образования биопленки *V. pertussis*, составил 24 ч.

После обработки условий культивирования мы провели сравнительное изучение способности образования биопленок двумя штаммами *V. pertussis*: вакцинным штаммом № 475 и селекционированным из него штаммом № 475а. Полученные с плотной питательной среде культуры штаммов выращивали в полистироловых планшетах фирмы Nunc в течение суток. Приведенные в табл. 2 данные указывают на значительные различия между исследованными штаммами по интенсивности образования биопленок. Исходный штамм № 475 формировал плотные биопленки при посевной дозе в диапазоне от 10 до 1,25 МОЕ/мл, умеренные от 0,625 до 0,157 МОЕ/мл и слабые биопленки в дозе 0,079 МОЕ/мл. При более низкой посевной дозе формирования биопленок не происходило. Селекционированный штамм отличался от исходного повышенной способностью образования биопленки. Плотные биопленки формировались при посевной дозе в диапазоне от 10 до 0,4 МОЕ/мл и только при дозе 0,02 МОЕ/мл формировались умеренные биопленки.

Таким образом, нами был разработан достаточно простой и воспроизводимый метод, позволяющий оценивать способность штаммов *V. pertussis* формировать биопленочные культуры на абиотическом субстрате. Установлено оптимальное время культивирования, проведено сравнительное изучение интенсивности образования биопленок культурами, выращенными на жидкой и плотной питательных средах. Более интенсивной рост биопленок культур, полученных с плотной питательной среды, по сравнению с планктонными культурами, может быть обусловлен особенностью экспрессии поверхностных структур, ответственных за адгезию микробных клеток на субстрате. Важное значение имеют выявленные нами выраженные отличия между штаммами № 475 и № 475а по способности к формированию биопленок. Штамм № 475а был селекционирован из исходного штамма № 475 и отличался от него повышенной вирулентностью и повышенным уровнем продукции коклюшно-

Таблица 2. Образование биопленок *V.pertussis* штаммами № 475 и 475а с плотной питательной среды

Разведение культуры в МОЕ/мл	Штамм <i>V.pertussis</i> № 475			Штамм <i>V.pertussis</i> № 475а		
	Оптическая плотность		Продукция биопленки	Оптическая плотность		Продукция биопленки
	t*	растворителя M±2m		t*	растворителя M±2m	
10	6,6	0,106±0,006	Плотная	18,7	0,211±0,006	Плотная
5	4,8	0,104±0,008	Плотная	20,1	0,224±0,006	Плотная
2,5	9,6	0,104±0,004	Плотная	17,9	0,204±0,006	Плотная
1,25	4,9	0,085±0,006	Плотная	18,9	0,194±0,004	Плотная
0,625	4,0	0,056±0,001	Умеренная	13,7	0,166±0,006	Плотная
0,313	3,3	0,052±0,001	Умеренная	10,4	0,147±0,006	Плотная
0,157	2,1	0,050±0,001	Умеренная	11,8	0,126±0,005	Плотная
0,079	1,5	0,049±0,001	Слабая	11,2	0,111±0,004	Плотная
0,040	0,125	0,047±0,004	Нет	8,2	0,092±0,004	Плотная
0,020	0,02	0,046±0,001	Нет	2,0	0,057±0,004	Умеренная
Негативный контроль		0,046±0,0006			0,044±0,0006	

го токсина [5]. Таким образом, прослеживается определенная связь между интенсивностью формирования биопленок и вирулентностью исследованных штаммов. Повышенная способность к образованию биопленок селекционированным штаммом может быть связана с изменением экспрессии факторов, обеспечивающих прикрепление микробных клеток к субстрату и межклеточные взаимодействия. Полученные результаты открывают новые возможности в исследовании механизмов формирования биопленок *B. pertussis*, вирулентности штаммов с различными генотипическими характеристиками и факторов, влияющих на эти процессы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Еженедельный эпидемиологический бюллетень. Вакцины против коклюша: документ по позиции ВОЗ, август 2015 г., № 35:433-460. <http://www.who.int/wer>.
2. Марданова А.М., Кабанов Д.А, Рудакова Н.Л., Шарипова М.Р. Биопленки: основные методы исследования: учебно-методическое пособие. Казань: К(П)ФУ, 2016.
3. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. Журн. микробиол. 2011, 3: 99-109.
4. Способ глубинного культивирования коклюшных бактерий. Авторское свидетельство № 762431 от 16.05.1980 г.
5. Штамм бактерий *Bordetella pertussis* — продуцент коклюшного токсина. Авторское свидетельство №1761795 от 15.05.1992 г.
6. Cattelan N., Dubey P., Arnal L. et al. *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog. Dis.* 2016 Feb;74(1):ftv108. doi: 10.1093/femspd/ftv108. Epub 2015 Nov 19.
7. Cattelan N., Jennings-Gee J., Dubey P. et al. Hyperbiofilm Formation by *Bordetella pertussis* Strains Correlates with Enhanced Virulence Traits. *Infect. Immun.* 2017 Nov 17;85(12). pii: e00373-17. doi: 10.1128/IAI.00373-17. Print 2017 Dec.
8. Dorji D., Mooi F., Yantorno O. et al. *Bordetella Pertussis* virulence factors in the continuing evolution of whooping cough vaccines for improved performance. *Med. Microbiol. Immunol.* 2018 Feb; 207(1):3-26. doi: 10.1007/s00430-017-0524-z. Epub 2017 Nov 21.
9. King A.J., van Gorkom T., van der Heide H.G. et al. Changes in the genomic content of circulating *Bordetella pertussis* strains isolated from the Netherlands, Sweden, Japan and Australia: adaptive evolution or drift? *BMC Genomics.* 2010 Jan 26;11:64.
10. O'Toole G.A. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *J. Vis. Exp.* 2011; 47: 2437.
11. Wagner B., Melzer H., Freymüller G. et al. Genetic Variation of *Bordetella pertussis* in Austria. *PLoS One.* 2015 Jul 16;10(7):e0132623.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Н.В.Крылова¹, С.А.Федореев², В.Ф.Лавров³, Н.П.Мищенко², Е.А.Васильева², О.А.Свитич³, Л.К.Эбралидзе³, О.В.Иунихина¹, Г.Н.Леонова¹

ПРОТИВОВИРУСНАЯ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭХИНОХРОМА А И КОМПОЗИЦИИ АНТИОКСИДАНТОВ НА ЕГО ОСНОВЕ

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова, ²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б.Елякова, Владивосток; ³НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

Цель. Изучение антиоксидантной и противовирусной активности эхинохрома А и композиции антиоксидантов на его основе в отношении вирусов клещевого энцефалита (ВКЭ) и простого герпеса 1 типа (ВПГ-1). *Материалы и методы.* ВКЭ (штамм Dal'negorsk, дальневосточного субтипа) выращивали на культуре клеток СПЭВ, ВПГ-1 (штамм VR3) — на культуре клеток Vero. Антиоксидантную активность соединений определяли с использованием модели перекисного окисления линетола. Цитотоксическую и противовирусную активность соединений оценивали по жизнеспособности клеток СПЭВ и Vero и подавлению цитопатогенного действия ВКЭ и ВПГ-1. *Результаты.* Композиция антиоксидантов (смесь эхинохрома А, аскорбиновой кислоты и α -токоферола — 5:5:1) обладала более выраженным антиоксидантным и противовирусным действием, чем эхинохром А. Механизмы противовирусной активности эхинохрома А и композиции антиоксидантов, вероятно, обусловлены его способностью непосредственно инактивировать вирусы и подавлять процесс заражения вирусами культур клеток. *Заключение.* Полученные результаты