

ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНОК СВЕЖЕВЫДЕЛЕННЫМИ И ВАКЦИННЫМИ ШТАММАМИ *BORDETELLA PERTUSSIS* РАЗНЫХ СЕРОВАРОВ

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

Цель. Изучение формирования биопленок свежeweыделенными и вакцинными штаммами *B. pertussis* разных сероваров. *Материалы и методы.* Интенсивность образования биопленок штаммами *B. pertussis* в круглодонных полистироловых 96-луночных планшетах при использовании трех посевных доз микробных клеток (1,25 МОЕ/мл, 2,5 МОЕ/мл, 5,0 МОЕ/мл) оценивали окрашиванием 0,1% раствором генциан-фиолетового. Результаты интерпретировали после измерения оптической плотности (ОП) окрашенного растворителя при длине волны 600 нм. *Результаты.* Наибольшей интенсивностью образования биопленок обладали свежeweыделенный штамм № 211 и вакцинный штамм № 475, оба относящиеся к серовару 1.2.3. Культуры этих штаммов формировали плотные биопленки при всех посевных дозах микробных клеток. Определенные различия по интенсивности биопленкообразования выявлены между свежeweыделенными и вакцинными штаммами сероваров 1.2.0 и 1.0.3, особенно выраженные при использовании посевной дозы в 5,0 МОЕ/мл. Свежeweыделенные штаммы при этой посевной дозе формировали плотные биопленки, в то время как два из трех вакцинных штаммов формировали умеренные биопленки, а один штамм — плотные. *Заключение.* Выявленные различия между штаммами *Bordetella pertussis* по интенсивности образования биопленок могут быть связаны с особенностями экспрессии агглютиногенов, а также других поверхностных структур микробных клеток, участвующих в процессе адгезии на субстрате.

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 47—50

Ключевые слова: штаммы *B. pertussis*, биопленки, агглютиногены, факторы адгезии

E.M.Zaytsev, M.V.Britsina, M.N.Ozeretskoykaya, N.U.Mertsalova, I.G.Bazhanova

THE BIOFILM FORMATION OF FRESHLY ISOLATED AND VACCINE STRAINS OF *BORDETELLA PERTUSSIS* OF DIFFERENT SEROTYPES

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. To study the formation of biofilms by freshly isolated and vaccine strains of *Bordetella pertussis* of different serotypes. *Materials and methods.* The intensity of biofilm formation by *B. pertussis* strains in 96-well round-bottom polystyrene plates by using three sowing doses of microbial cells (1,25 IOU/ml, 2,5 IOU/ml and 5,0 IOU/ml) was estimated by staining with 0,1% gentian-violet solution. The results were interpreted after measuring the optical density (OP) of the colored solvent at a wavelength of 600 nm. *Results.* The highest intensity of biofilm formation was found in the newly isolated strain No. 211 and vaccine strain No. 475, both belonging to serotype 1.2.3. Cultures of these strains formed dense biofilms at all sowing doses of microbial cells. Certain differences in the intensity of biofilm formation were found between freshly isolated and vaccine strains of serotypes 1.2.0 and 1.0.3, especially when using a sowing dose of 5,0 IOU/ml. Freshly isolated strains at this dose formed dense biofilms, while two of the three vaccine strains formed moderate biofilms, and one strain was dense. *Conclusion.* The revealed differences between the strains of *B. pertussis* in the intensity of biofilm formation may be associated with the peculiarities of the expression of agglutinogens, as well as other surface structures of microbial cells involved in the adhesion process on the substrate.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 5, P. 47—50

Key words: *B. pertussis* strains, biofilms, agglutinogens, adhesion factors

ВВЕДЕНИЕ

Коклюшная инфекция продолжает оставаться актуальной проблемой здравоохранения. С начала 1990-х годов во многих странах мира, в том числе в странах с высоким уровнем охвата профилактическими прививками, отмечается рост заболеваемости коклюшем [11].

Одной из вероятных причин роста заболеваемости коклюшем являются мутации в генах возбудителя, кодирующих основные факторы вирулентности *B. pertussis*, что привело к появлению циркулирующих штаммов, отличающихся повышенной вирулентностью [3]. Одним из возможных факторов высокой вирулентности циркулирующих штаммов *Bordetella pertussis* может быть их повышенная способность к формированию биопленок. Образование биопленок является результатом сложного координированного взаимодействия микробных клеток с биотическими и абиотическими субстратами. У неподвижных бактерий, к которым относится *B. pertussis*, закрепление микробных клеток на поверхности происходит с помощью адгезинов [5]. К факторам адгезии *B. pertussis* относятся пертактин, филаментозный гемагглютинин, фактор колонизации трахеи и связанные с фимбриями агглютиногены [6]. В доступной литературе имеются отдельные указания на более высокую, по сравнению с вакцинными штаммами, способность циркулирующих штаммов к образованию биопленок [10], однако способность коклюшного микроба формировать биопленки на биотических и абиотических субстратах, значение факторов адгезии и, в частности, агглютиногенов в этом процессе изучены до настоящего времени недостаточно.

Цель работы заключалась в изучении способности образования биопленок вакцинными и свежевыделенными штаммами *B. pertussis* разных сероваров

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали две группы штаммов *B. pertussis*. Первую группу составили вакцинные штаммы, выделенные от больных коклюшем в 50 — 60 годы XX века, используемые в России для изготовления коклюшных вакцин [1]: штамм № 475 (серовар 1.2.3), штамм № 305 (серовар 1.2.0), штамм № 703 (серовар 1.0.3). В эту группу также был включен штамм Tohama 1 (серовар 1.2.0), выделенный в 50-е годы XX века в Японии и широко используемый в ряде стран при проведении генетических исследований и производства коклюшных вакцин [9]. Вторую группу представляли штаммы, выделенные в РФ от больных коклюшем в 2001 — 2010 гг.: штамм № 178 (серовар 1.2.0), штамм № 162 (серовар 1.0.3) и штамм № 211 (серовар 1.2.3). В качестве инокулята для получения биопленок использовали ночные культуры штаммов, выращенных на плотной питательной среде («Бордетелагар», ФБУН ГНЦПМБ, г.Оболенск). Биопленочные формы культивировали в круглодонных 96-луночных пластиковых планшетах в жидкой синтетической питательной среде в соответствии с ранее описанным методом [4]. Интенсивность образования биопленок при использовании трех посевных доз микробных клеток (1,25 МОЕ/мл, 2,5 МОЕ/мл и 5 МОЕ/мл) оценивали после растворения окрашенных 0,1% раствором генциан-фиолетового биопленок. Результаты показателей ОП окрашенного растворителя по отношению к негативному контролю (0,048) оценивали как плотные (>0,192), умеренные (0,096 > ~ < 0,192), слабые (0,048 < ~ < 0,096), отсутствие биопленок.

Для достоверного подсчета результатов использовали 4 лунки на один опытный образец и рассчитывали среднюю величину оптической плотности опытного образца и удвоенную ошибку. Сравнения проводили по критерию Стьюдента [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено сравнительное изучение способности формирования биопленок культурами вакцинных и свежевыделенных штаммов *B. pertussis* с различными наборами агглютиногенов.

Результаты опытов выявили определенные различия между интенсивностью образования биопленок культурами разных штаммов *B. pertussis*.

Вакцинный штамм Tohama 1 (1.2.0) формировал умеренные биопленки при всех использованных посевных дозах. Вакцинный штамм № 703 (1.0.3) формировал слабые биопленки при посевной дозе 1,25 МОЕ/мл и умеренные при дозах 2,5 и 5,0 МОЕ/мл. Вакцинный штамм № 305 (1.2.0) формировал умеренные биопленки при дозах 1,25 МОЕ/мл и 2,5 МОУ/мл и плотные при дозе 5,0 МОЕ/мл. Вакцинный штамм №475 (1.2.3) формировал плотные биопленки при всем диапазоне посевных доз микробных клеток. Свежевыделенные штаммы №178 (1.2.0) и №162 (1.0.3) формировали умеренные биопленки при дозах 1,25 МОЕ/мл и 2,5 МОЕ/мл а при дозе 5,0 МОЕ/мл — плотные биопленки. Свежевыделенный штамм №211 (1.2.3) формировал плотные биопленки в диапазоне посевных доз от 1,25 МОЕ/мл до 5 МОЕ/мл.

Таким образом, наибольшей интенсивностью образования биопленок отличались вакцинный штамм № 475 и свежевыделенный штамм № 211. Культуры этих штаммов формировали плотные биопленки при всех посевных дозах микробных клеток. Необходимо отметить, что эти штаммы относятся к серовару 1.2.3, то есть имеют все три основных агглютиногена. Агглютиногены являются поверхностными белками микробной клетки, антитела к которым вызывают феномен агглютинации. У *B. pertussis* имеется 10 агглютиногенов: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 13, 15 и 16. Агглютиноген 7 является общим для всех представителей рода *Bordetella*, а агглютиноген 1 видовым для *B. pertussis*. Агглютиногены 1, 2 и 3 используются для идентификации разных штаммов и принадлежности их к определенному серовару. Сочетания этих агглютиногенов определяют три основных серовара возбудителя: 1.2.0, 1.2.3 и 1.0.3 [6, 8]. Микробные клетки *B. pertussis* имеют фимбрии, состоящие из двух основных субъединиц — Fim 2 и Fim3, соответствующих агглютиногенам 2 и 3, и малой субъединицы Fim D. Наряду с филаментозным гемагглютинином и другими адгезинами фимбрии принимают участие в процессе адгезии микробных клеток на субстрате [7]. Высокая интенсивность образования биопленок штаммами № 475 и № 211 может быть связана с наличием у них Fim 2 и Fim3, что обеспечивает более эффективное прикрепление микробных клеток к субстрату.

Определенные различия по интенсивности биопленкообразования выявлены между вакцинными и свежевыделенными штаммами сероваров 1.2.0 и 1.0.3, особенно выраженные при использовании посевной дозы в 5 МОЕ/мл. Свежевыделенные штаммы при этой дозе формировали плотные биопленки, в то время как из трех вакцинных штаммов два штамма формировали при этой посевной дозе умеренные биопленки, а один штамм плотные. Различная интенсивность образования биопленок вакцинными и свежевыделенными штаммами может быть связана с особенностями экспрессии других поверхностных структур микробных клеток, участвующих в процессе адгезии на субстрате и межклеточных взаимодействиях (пертактин, филаментозный гемагглютинин, фактор колонизации трахеи). Полученные данные указывают на целесообразность дальнейших исследований особенностей биопленкообразования штаммами *B. pertussis* с различными генотипическими характеристиками, что может способствовать расширению представлений о патогенезе коклюша и совершенствованию вакцинопрофилактики этой инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева И.А., Чупринина Р.П., Борисевич И.В. и др. Молекулярно-генетическая характеристика производственных штаммов коклюшных бактерий. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2013, 3(70):63-70.
2. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. В кн.: «Статистические методы в микробиологических исследованиях». Л., 1962.
3. Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С. и др. Структура популяции штаммов возбудителя коклюша на территории России. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016, 4(89): 22-28.
4. Зайцев Е.М., Брицина М.В., Озерецковская Н.У. и др. Культивирование биопленок *Bordetella pertussis* на абиотическом субстрате. *Журн. микробиол.* 2019, 1:49-53.
5. 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.
6. Ценева Г.Я., Курова Н.Н. Микробиологическая характеристика возбудителя коклюша и лабораторная диагностика коклюша. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2003, 4(5):329-341.
7. Ashworth L.A.E., Irons L.I., Dowsett A.B. Antigenic relationship between serotype specific agglutinin and fimbriae of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 1982, 37:1278-1281.
8. Bronne-Shanbury C.J., Dolby J.M. The stability of the serotypes of *Bordetella pertussis* with particular reference to serotype 1,2,3,4. *J. Hyg. (Lond)*. 1976, 76(2):277-286.
9. Caro V., Bouchez V., Guiso N. Is the Sequenced *Bordetella pertussis* Strain Tohama I Representative of the Species? *J. of Clinical Microbiology*. 2008, 46 (6):2125-2128.
10. Cattelan N., Jennings-Gee J., Dubey P. et al. Hyperbiofilm Formation by *Bordetella pertussis* Strains Correlates with Enhanced Virulence Traits. *Infect Immun.* 2017, 85(12): e00373-17.
11. Kapil P., Merkel T.J. Pertussis vaccines and protective immunity. *Curr Opin Immunol.* 2019, 8 (59):72-78.

Поступила 22.06.19

Контактная информация: Зайцев Евгений Михайлович, д.м.н.,
105064, Москва, М. Казенный пер, 5а, р.т.(495)916-22-63

ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

В.Г.Акимкин¹, Ю.А.Захарова², Е.П.Игонина³, Е.В.Болгарова²

НОЗОКОМИАЛЬНЫЕ РЕСПИРАТОРНЫЕ ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

¹Центральный НИИ эпидемиологии, Москва; ²Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций;
³Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва

Проведен анализ данных зарубежной литературы из поисковой базы данных PubMed за 10-летний период о распространенности нозокомиальных респираторных вирусных инфекций (НРВИ). Установлена необходимость использования при оценке частоты встречаемости стан-