

<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-5-123-128>

Иммунобиологические свойства биопленок бактерий рода *Bordetella*

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

ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва

Резюме

Актуальность. Коклюш остается актуальной проблемой здравоохранения во всем мире, в том числе в странах с высоким уровнем вакцинации. Одной из вероятных причин продолжающегося эпидемического процесса коклюшной инфекции являются биопленки *B. pertussis*, отличающиеся от планктонных культур измененным спектром экспрессии генов и обладающие повышенной устойчивостью к условиям внешней среды, антибиотикам, иммунным факторам. **Цель обзора.** Анализ данных литературы о генетических и молекулярно-клеточных механизмах формирования биопленок бактериями рода *Bordetella*, а также о подходах к поиску средств, направленных на подавление роста биопленок и разрушение сформированных биопленок в макроорганизме. **Выводы.** Образование биопленок микробами рода *Bordetella* представляет собой сложный многостадийный процесс, регулируемый генетическими сигнальными системами: Bvg AS системой и 2 нуклеотидной (p) ppGrp системой, а также другими регуляторными белками и полисахаридным комплексом. Матрикс биопленок *B. pertussis* состоит из экстрацеллюлярной ДНК, белков и полисахаридного полимера, играющих важную роль в формировании биопленок в респираторном тракте и на абиотических поверхностях. Генетические и молекулярно-клеточные процессы формирования и поддержания биопленок, а также различные компоненты матрикса биопленки могут служить мишенью для новых противомикробных препаратов и более эффективных коклюшных вакцин, которые будут лучше контролировать весь инфекционный цикл коклюша, включая колонизацию, персистенцию и передачу возбудителя. Одним из подходов к созданию бесклеточных коклюшных вакцин нового поколения является идентификация новых, ассоциированных с биопленками антигенов, способных индуцировать эффективный клеточный и гуморальный ответы. Перспективным является поиск препаратов, способных разрушать биопленки, в том числе веществ, воздействующих на матрикс и облегчающих доступ антибактериальных препаратов к микробным клеткам.

Ключевые слова: коклюш, *Bordetella*, биопленки, генетические сигнальные системы, матрикс, ДНК, белки, экзополисахарид
Конфликт интересов не заявлен.

Для цитирования: Зайцев Е. М., Бажанова И. Г., Брицина М. В. и др. Иммунобиологические свойства биопленок бактерий рода *Bordetella*. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2021;20(5): 123–128. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-5-123-128>.

Immunobiological Properties of Biofilms of Bacteria of the Genus *Bordetella*

EM Zaitsev**, IG Bazhanova, MV Britsina, MN Ozeretskovskaya

«I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», Moscow, Russia

Abstract

Relevance. Whooping cough remains a pressing public health problem worldwide, including in countries with high vaccination rates. One of the probable causes of the ongoing epidemic process of pertussis infection is *B. pertussis* biofilms, which differ from plankton cultures by an altered gene expression spectrum and are highly resistant to environmental conditions, antibiotics, and immune factors. **Aims.** Analysis of literature data on the genetic and molecular - cellular mechanisms of biofilm formation by bacteria of the genus *Bordetella*, as well as approaches to the search for means aimed at suppressing the growth of biofilms and the destruction of formed biofilms in the macroorganism. **Conclusions.** Biofilm formation by microbes of the genus *Bordetella* is a complex multi-stage process regulated by genetic signaling systems: the Bvg AS system and the 2-nucleotide (p) ppGrp system, as well as other regulatory proteins and the polysaccharide complex. The matrix of *B. pertussis* biofilms consists of extracellular DNA, proteins, and a polysaccharide polymer that play an important role in the formation of biofilms in the respiratory tract and on abiotic surfaces. The genetic and molecular-cellular processes of biofilm formation and maintenance, as well as the various components of the biofilm matrix, can serve as targets for new antimicrobial drugs and more effective pertussis vaccines that will better control the entire pertussis infection cycle, including colonization, persistence, and transmission of the causative agent. One of the approaches to the development of new-generation cell-free pertussis vaccines is the identification of new biofilm-associated antigens that can induce effective cellular and humoral responses. The search for drugs that can destroy biofilms, including substances that affect the matrix and facilitate the access of antibacterial drugs to microbial cells, is promising.

* Для переписки: Зайцев Евгений Михайлович, д. м. н., заведующий лабораторией иммуномодуляторов ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д.5а. +7 (495) 916-22-63, pertussis@yandex.ru. ©Зайцев Е. М. и др.

** For correspondence: Evgeny M. Zaitsev, Dr. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Immunomodulators of Scientific Institution «I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 5a Maly Kazenny Pereulok, Moscow, 105064, Russia. +7 (495) 916-22-63, pertussis@yandex.ru. ©Zaitsev EM et al.

Keywords: pertussis, *Bordetella*, biofilms, genetic signaling systems, matrix, DNA, proteins, exopolysaccharide
 No conflict of interest to declare.

For citation: Zaitsev EM, Bazhanova IG, Britsina MV, et al. Immunobiological properties of biofilms of bacteria of the genus *Bordetella*. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2021;20(5): 123-128 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-5-123-128>.

Коклюш остается актуальной проблемой здравоохранения во всем мире, в том числе в странах с высоким уровнем вакцинации. *Bordetella pertussis* продолжает циркулировать среди населения, создавая угрозу для заражения невакцинированных детей младшего возраста [1]. Одной из вероятных причин продолжающегося эпидемического процесса коклюшной инфекции, наряду с генетической изменчивостью возбудителя, могут быть биопленочные формы *B. pertussis*. В настоящее время известно, что большинство бактерий существуют в природе в виде биопленок, представляющих собой сообщества бактериальных клеток, прикрепленных к поверхности и друг к другу и заключенных в полимерный матрикс. Биопленки отличаются от планктонных культур измененным спектром экспрессии генов и обладают повышенной устойчивостью к условиям внешней среды, антибиотикам, иммунным факторам [2,3]. В связи с этим целью настоящего обзора является анализ данных литературы о генетических и молекулярно-клеточных механизмах формирования биопленок бактериями рода *Bordetella*, а также о подходах к поиску средств, направленных на подавление роста биопленок и разрушение сформированных биопленок в макроорганизме.

Род *Bordetella* включают в себя *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. avium*, а также *B. holmsii*, *B. hinzii* и *B. trematum*. Бордетеллы представляют собой мелкие грамтрицательные палочки (коккобактерии), не образующие спор и являющиеся строгими аэробами. Некоторые виды, в том числе *B. bronchiseptica*, обладают подвижностью. *B. pertussis* и *B. parapertussis* неподвижны. *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica* относительно неприхотливы и растут на простых питательных средах. *B. pertussis* относится к прихотливым бактериям и нуждается в обогащенных питательных средах. Микробы рода *Bordetella* (*B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*), как и другие бактерии, обладают способностью к формированию биопленок на биотических и абиотических поверхностях, в связи с чем изучение процессов, препятствующих их росту, является актуальной задачей [4].

Наибольшее клиническое значение имеют биопленки *B. pertussis* – главного возбудителя коклюша [5]. *B. parapertussis* также может вызывать подобные коклюшу болезни, однако крайне редко в тяжелой форме [6]. *B. bronchiseptica* может приводить к заболеванию, главным образом, домашних животных, однако есть данные, что некоторые

высоковирулентные изоляты *B. bronchiseptica* могут вызывать респираторные инфекции и у людей [7]. *B. pertussis* продуцирует целый ряд биологически активных субстанций, определяющих патогенез коклюшной инфекции. Условно их можно разделить на адгезины (фимбрии, пертактин, фактор колонизации трахеи, филаментозный гемагглютинин) и токсины (коклюшный токсин, дермонекротический токсин, трахеальный цитотоксин, аденилатциклаза, липополисахарид). Основным адгезином *B. pertussis* является филаментозный гемагглютинин (ФГА), участвующий в процессах адгезии и колонизации респираторного тракта. В адгезии *B. pertussis* на клетках респираторного тракта принимают участие также фимбриальные белки Fim2 и Fim3, соответствующие агглютиногенам 2 и 3. [8,9].

Образование биопленок микробами рода *Bordetella* представляет собой сложный многостадийный процесс, регулируемый генетическими сигнальными системами, среди которых наиболее изучена Vvg AS-система (двухкомпонентная сигнальная трансдукционная Vvg (*Bordetella verulence* gene) AS-система).

Vvg AS-система переводит сигналы из окружающей среды, такие как температура, никотиновая кислота, сульфаты и другие, на регуляцию экспрессии генов, медируя образование биопленок при статических и динамических условиях. Vvg AS-система существует в трех фазах: Vvg AS⁺ активной, Vvg ASⁱ промежуточной и Vvg AS⁻ неактивной. Vvg AS⁺ регулирует экспрессию генов, кодирующих вирулентные факторы: коклюшный токсин (КТ), ФГА, фимбрии и аденилатциклазный гемолизин (АЦ-ГЛ). При Vvg ASⁱ фазе происходит продукция промежуточного протеина A (VirA), содержащегося только в биопленках и продолжается экспрессия ФГА и фимбрий, но снижается продукция АЦ-ГЛ, который ингибирует образование биопленок, соединяясь с ФГА [10].

Бактерии *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* и *B. parapertussis* образуют прочные биопленки при Vvg AS⁺ и Vvg ASⁱ фазах. Vvg AS медируемый контроль осуществляется на следующем шаге после начального прикрепления микробных клеток *Bordetella* к различным поверхностям [11,12].

При наступлении неблагоприятных условий бактерии *Bordetella* активируют сигнальную систему (p)ppGpp, также регулиующую образование биопленок. Регуляторная система (p)ppGpp представляет собой два специфических нуклеотида: гуанозин тетрафосфат (ppGpp) и гуанозинпентафосфат

(pppGpp), синтезируемых бактериями *Bordetella* с помощью сигнальных белков: синтетазы RelA и синтетазы/гидролазы SpoT. Система (p)ppGpp регулирует образование биопленки на абиотических поверхностях и аутоагрегацию *B. pertussis*, индуцируя экспрессию экстрацеллюлярных филаментозных структур, связанных с патогенностью [13]. Установлено, что система (p)ppGpp способствует длительному выживанию бактерий в условиях аминокислотного дефицита и окислительного стресса. Штамм *B. pertussis* PMK21, не продуцирующий (p)ppGpp, более чувствителен к окислительному стрессу по сравнению с «диким» штаммом. Во время аминокислотного дефицита бактерии *Bordetella* замедляют рост культур и активируют образование филаментозных структур. В этих условиях культуры «дикого» штамма росли медленнее, чем в обычных условиях, в то время как мутантный штамм *B. pertussis* PMK21 характеризовался необычно быстрым ростом, что свидетельствует о потере контроля за ростом культур при отсутствии (p)ppGpp [14].

Отсутствие в мутантном штамме системы (p)ppGpp приводило к уменьшению экспрессии *fim3* и *bsp22* генов, кодирующих *Fim3* и *Bsp 22*, являющихся субъединицами длинных филаментозных структур, необходимых для стабилизации межклеточных связей при формировании биопленочной архитектуры. *Bsp 22* является полипептидом, секретируемым *Bordetella* в культуральную жидкость и принадлежащим семейству комплексных белков TTSS типа, образующих самополимеризующиеся пластичные волокна переменной длины, участвующие в TTSS-медируемом уничтожении эукариотических клеток [15,16].

Большинство вирулентных генов, включая *Fim3* и *Bsp 22*, экспрессируются в *Bvg*⁺ фазе, когда *Bvg* AS-система активирована. Хотя экспрессия *Fim3* и *Bsp 22* в мутантном (p)ppGpp дефицитном штамме *B. pertussis* была снижена, гены, кодирующие ФГА, АЦ-ГЛ и КТ экспрессировались на обычном уровне. Эти данные свидетельствуют об отсутствии связи между экспрессией вирулентных генов и продукцией (p)ppGpp, показывая, что (p)ppGpp определяет патогенность параллельно с *Bvg*-системой. Таким образом, наличие различных систем регулирования экспрессии вирулентных факторов облегчает бактериальное инфицирование [17].

Одним из белков, регулируемых *Bvg*AS-системой, является *OmpQ*-белок порина внешней мембраны. Отсутствие экспрессии *OmpQ* не влияло на кинетику роста и конечную величину биомассы *B. bronchiseptica* в планктонных условиях роста, а также на ранней стадии формирования биопленки. Однако делеция гена *OmpQ* значительно снижала способность *B. bronchiseptica* формировать зрелую биопленку. Кроме этого, сыворотка к *OmpQ* вызывала дозозависимое снижение биомассы биопленки [18].

Бис-(3'-5')-циклический димерный гуанозин-монофосфат (с-di-GMP) является центральным

регулятором различных функций бактерий, включая подвижность, образование биопленки и вирулентность. Установлено, что с-di-GMP регулирует переход между биопленочными и планктонными культурами у большинства бактерий, включая *B. bronchiseptica*. У *B. bronchiseptica* высокий уровень с-di-GMP сопровождается снижением уровня экспрессии флагеллина, что ингибирует подвижность бактерий и способствует образованию биопленки, а также влияет на способность *B. bronchiseptica* колонизировать дыхательные пути мышей. Синтез с-di-GMP и подвижность *B. bronchiseptica* контролируется дигуанилатциклазой *VdcA* [19].

Поли-β(1,6)-N-ацетил-D-глюкозамин (PNAG) является одним из компонентов биопленок многих патогенных бактерий, включая бактерии рода *Bordetella*. Продукция PNAG осуществляется при участии белков, кодируемых опероном *pgaABCD*. Одним из них является *PgaB* – двухдоменный периплазматический белок, содержащий N-концевой домен деацетилазы и C-концевой домен связывания PNAG. Установлено, что C-концевые домены *PgaB* *B. bronchiseptica* (*PgaBBb*) и *E. coli* (*PgaBEc*) функционируют как гликозидгидролазы, разрушающие биопленки, образованные *B. pertussis*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus epidermidis* и *E. coli*, а также потенцируют бактерицидный эффект гентамицина [20].

Компоненты матрикса биопленок играют важную роль в их формировании и созревании.

Матрикс биопленок бактерии рода *Bordetella* в основном состоит из экстрацеллюлярной ДНК (эДНК), белков (ФГА и др.) и экзополисахаридного полимера (ЭПС).

эДНК образуется вследствие аутолиза бактерий и считается одним из главных компонентов матрицы биопленок, способствующих их созреванию и структурной стабильности. В частности, установлено, что β-1.3 глюкан-полисахариды, специфически взаимодействуя с определенными полинуклеотидами eDNA, образуют трехцепочные (нитевые) и спиральные макромолекулярные комплексы, способствующие формированию зрелой биопленки *Bordetella* [21].

Культивирование *B. pertussis* и *B. bronchiseptica* вместе с ДНКазой I значительно ослабляло способность микробных клеток образовывать биопленки. Удаление ДНКазы I из среды культивирования восстанавливало пленкообразующую способность *B. bronchiseptica* и *B. pertussis*. Обработка ДНКазой I носовой полости мышей приводила к деградации биопленок, что свидетельствует о важной роли эДНК в стабильности биопленок в респираторном тракте. Способность ДНКазы I разрушать биопленки открывает новые возможности для разработки методов лечения инфекций людей и животных, ассоциированных с бактериями рода *Bordetella* [22].

Одним из главных белков матрицы биопленки является ФГА, как секретируемый, так и связанный

с поверхностью микробных клеток (поверхностно ассоциированный – паФГА). ПаФГА содержит многочисленные области прикрепления, облегчающие адгезию *Bordetella* к различным типам эукариотических клеток и к внеклеточным структурам респираторного эпителия, а также к абиотическим поверхностям [23].

Установлено значение паФГА для развития трехмерной структуры биопленок *B. pertussis* на абиотических субстратах. Кроме этого, показано, что паФГА необходим для прикрепления планктонных бактерий к сформировавшимся биопленкам. Секретируемый ФГА, взаимодействуя с поверхностно-ассоциированным ФГА, ингибировал прикрепление планктонных клеток к биопленке [24,25].

Клинические изоляты *B. pertussis*, выделенные в США и отличавшиеся увеличенной способностью к образованию биопленок (гипербиопленки), проявляли повышенную адгезию к эпителиальным клеткам в полости носа и трахеи мышей, а также к клеткам альвеолярного эпителия человека *in vitro*. Повышенную адгезию клинических изолятов к клеткам респираторного тракта и высоким уровнем колонизации связывают с увеличенной продукцией ФГА. Предполагается, что выраженная способность к биопленкообразованию циркулирующих в настоящее время штаммов *B. pertussis* способствует их персистенции, передаче и продолжению циркуляции [26]. Клинические изоляты *B. pertussis*, выделенные в Аргентине, также отличались повышенными экспрессией адгезинов и способностью к образованию биопленок по сравнению с референсным штаммом Tohama I [27].

АЦ-ГЛ ингибирует образование биопленок *B. pertussis*, взаимодействуя с ФГА [28]. Высокие адгезивные свойства клинических изолятов *B. pertussis* могут быть связаны с высоким уровнем продукции ФГА и низким уровнем АЦ-ГЛ. Способность к повышенному образованию биопленок также наблюдалась у выделенного от больного с фиброзным циститом изолята *B. bronhiseptica*, который характеризовался высокой экспрессией ФГА *fhaB* геном и отсутствием *суаA* гена, продуцирующего АЦ-ГЛ [29].

ЭПС является важным компонентом матрикса биопленки и фактором вирулентности бактерий рода *Bordetella*, существует несколько генетических локусов, влияющих на продукцию ЭПС и поддержание 3-х мерных структур бактериальных биопленок. Исследование одного из таких *Bordetella* локусов, называемых *bpsABCD* (*bps Bordetella* полисахарид), показало его значение для колонизации слизистых полости носа, трахеи и легких мышей, а также для создания и поддержания комплексной архитектуры биопленок, образуемых *in vitro*. Важная роль ЭПС в адгезии к эпителиальным клеткам подтверждается отсутствием способности мутантных штаммов *B. bronhiseptica*, не продуцирующих ЭПС, образовывать биопленки в носовой полости мышей [30]. Экспрессия локуса *bpsABCD*

подавляется транскрипционным регулятором *BpsR*. Белки *BpsR B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronhiseptica* демонстрируют > 99% идентичность аминокислотных последовательностей. Кроме этого, *BpsR* регулирует ряд генов, связанных с клеточной адгезией, подвижностью клеток, прочностью клеточной стенки, а также внутриклеточным и внеклеточным транспортом. Показано, что *BpsR* контролирует рост *B. bronhiseptica* путем репрессии генов, участвующих в деградации никотиновой кислоты (НА), необходимой для роста многих патогенных видов *Bordetella* в лабораторных условиях. Связывание ДНК с *BpsR* аллостерически регулируется взаимодействием с 6-гидроксиникотиновой кислотой (6HNA), первым продуктом метаболизма никотиновой кислоты. Взаимодействие *BpsR* с 6HNA индуцирует конформационные изменения, предотвращающие его связывание с ДНК [31,32].

Важную роль в биосинтезе ЭПС и формировании биопленок играет *BpsV* – двухдоменный протеин, локализованный в периплазме и наружной мембране *B. bronhiseptica*. Показано, что *BpsV* принимает участие в формировании комплексной архитектуры биопленок [33].

Регулирование образования биопленок бактериями рода *Bordetella* является комплексным и происходит при сочетании *Bvg-AS* зависимых регуляторных белковых факторов с *BpsR* контролем экспрессии полисахаридов, независимым от *Bvg-AS*. При этом АЦ-ГЛ взаимодействует с ФГА, блокируя образование биопленки, а *BpsR*, соединяясь с промотором *bpsABCD* репрессировывает продукцию ЭПС, завершая процесс формирования биопленок. Несмотря на массовую редукцию генов в геномах штаммов *B. pertussis* и *B. parapertussis*, функции генов *bpsA-D* локуса и продукция ЭПС поддерживалась, что свидетельствует о сохранении общей бактериальной стратегии регулирования вирулентности и развития биопленок [32].

В биопленках бактерии становятся резистентными к антибиотикам, окислителям и детергентам. В сравнении с планктонными аналогами, биопленки *B. bronhiseptica* были в 1000 раз более устойчивыми к антибиотикам, включая эритромицин и цiproфлоксацин. Введение антибиотиков зараженным мышам не приводило к разрушению биопленок [12]. Клинические изоляты *B. pertussis*, выделенные в западной Австралии, были менее чувствительны к антибиотикам, чем референсный штамм Tohama I [34].

Показано, что *B. pertussis* образует биопленки в дыхательных путях мышей, однако сведения о биопленках в дыхательных путях людей немногочисленны. В частности, скопления микробных клеток *B. pertussis* были обнаружены на клетках реснитчатого эпителия трахеи и бронхиол детей грудного возраста, заболевших коклюшем [35]. Бактерии *B. pertussis* в виде микроколоний были обнаружены на клетках, выделенных из слизистой

полости носа человека при культивировании *in vitro*. Микробные клетки прикреплялись преимущественно к реснитчатым клеткам, повреждая их, что сопровождалось повышенным образованием слизи [36]. Хотя эти скопления клеток не были классифицированы авторами как биопленки, наблюдаемые структуры напоминали биопленки, формируемые на абиотических поверхностях и в носовой полости и трахеи мышей. Косвенным признаком роста биопленок в респираторном тракте людей является выявление антител к ЭПС у больных коклюшем [37].

Существует корреляция между биопленкообразующей способностью *B. pertussis* и патогенезом коклюшной инфекции. Мутантные штаммы, дефектные в образовании биопленок на искусственных поверхностях, также дефектны в колонизации дыхательных путей мышей и образовании биопленок. Эти данные лежат в основе гипотезы о том, что биопленки *B. pertussis* у человека резистентны к факторам иммунной защиты, что приводит к персистенции, передаче и продолжению циркуляции возбудителя [5]. Разработка методов исследования биопленок *B. pertussis* в респираторном тракте человека позволит изучить значение биопленок в патогенезе коклюшной инфекции.

Генетические и молекулярно-клеточные процессы формирования и поддержания биопленки, а также различные компоненты матрикса биопленки могут служить мишенью для новых противомикробных препаратов и более эффективных вакцин, которые будут лучше контролировать весь инфекционный цикл, включая колонизацию, персистенцию и передачу возбудителя коклюша.

Продолжающийся эпидемический процесс коклюшной инфекции обусловлен новыми генетическими вариантами *B. pertussis* и неадекватной иммунной защитой, формируемой современными бесклеточными вакцинами (БКВ), содержащими антигены, полученные из планктонных культур [38]. Однако ассоциированные с биопленками бактерии *B. pertussis*, значительно отличались от своих планктонных аналогов по уровню продукции целого ряда белков. В связи с этим одним из подходов к созданию БКВ нового поколения является идентификация новых ассоциированных с биопленками антигенов, способных индуцировать эффективный клеточный и гуморальный иммунитет [39]. Протеомный анализ показал, что около 10% белков дифференцированно экспрессируются в биопленочных и планктонных культурах *B. pertussis*. Было идентифицировано 11 белков, уровень продукции которых биопленками был в три раза выше, чем у планктонных культур. Различия между биопленками и планктонными клетками были наиболее выражены по уровню экспрессии промежуточного белка VipA. Экспрессия VipA была выявлена в легких мышей, интраназально зараженных вирулентным штаммом *B. pertussis*. Иммунизация рекомбинантным VipA значительно

уменьшала уровень колонизации легких зараженных мышей. В сыворотках иммунизированных мышей был обнаружен высокий уровень IgG к VipA, эффективно опсонизирующих микробные клетки. IgG к VipA также были выявлены в сыворотках людей – реконвалесцентов коклюша. В совокупности эти данные свидетельствуют о перспективности VipA как потенциального кандидата для включения в БКВ. Также было показано, что иммунизация мышей мембранными белками, выделенными из биопленки изолята *B. pertussis* B1917 с промотором коклюшного токсина P3, доминирующего во многих странах, индуцировала защиту от интраназального заражения *B. pertussis* [40].

Новыми кандидатами для включения в состав БКВ являются также фактор сборки мембранных белков (BamB) и липополисахаридный сборочный белок (LptD). Иммунизация мышей линии BALB/c выделенными из биопленок BamB и LptD стимулировала продукцию IFN- γ и IL-17a клетками селезенки и лимфатических узлов, а также сывороточных IgG1 и IgG2a, реагирующих с бактериями *B. pertussis*. Мыши, вакцинированные BamB и LptD, продуцировали более высокий уровень IFN- γ , IL-17a и IgG2a, чем мыши, вакцинированные только планктонными клетками и коммерческой БКВ. Вакцинация БКВ сопровождалась высоким уровнем IgG1 и низким уровнем IgG2a. У мышей, иммунизированных БКВ в комбинации с BamB и LptD, отмечен более низкий уровень колонизации легких, чем у мышей, вакцинированных только БКВ [41].

Одним из факторов, который вносит значительный вклад в колонизацию *B. pertussis* и образование биопленок в респираторном тракте, является ЭПС. В связи с этим ЭПС также является одним из кандидатов для включения в состав БКВ [42].

Важной задачей становится разработка методов, направленных на подавление роста биопленок и разрушение сформированных биопленок в макроорганизме. Необходимым является поиск препаратов, способных разрушать биопленки, в том числе веществ, воздействующих на матрикса и облегчающих доступ антибактериальных препаратов к микробным клеткам [22]. Перспективным для воздействия на биопленки бактерий рода *Bordetella* является использование бактериофагов. В частности, показано, что литический бактериофаг *B. bronchiseptica* vB_BbrP_BB8 (семейства *Podoviridae*) вызывал полный лизис культур *B. bronchiseptica*, разрушал биопленки и предотвращал гибель личинок сотовой моли *G. Mellonella*, зараженных *B. bronchiseptica* [7].

Заключение

Образование биопленок микробами рода *Bordetella* представляет собой сложный многостадийный процесс, регулируемый генетическими сигнальными системами Bvg AS- системой и 2 нуклеотидной (p)ppGpp системой, а также другими

регуляторными белками и полисахаридным комплексом. Биопленки бактерий рода *Bordetella* отличаются от планктонных культур измененным спектром экспрессии генов и обладают повышенной устойчивостью к условиям внешней среды, антибиотикам и иммунным факторам. Генетические и молекулярно-клеточные процессы формирования и поддержания биопленок, а также

различные компоненты матрикса биопленок потенциально могут служить мишенью для новых противомикробных препаратов, способных разрушать биопленки, и для создания более эффективных противоконъюштных вакцин, которые будут лучше контролировать весь инфекционный цикл коклюша, включая колонизацию, персистенцию и передачу возбудителя.

Литература/References

1. Stefanelli P. Pertussis: identification, prevention and control. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1183:127–136. doi: 10.1007/5584_2019_408.
2. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence.* 2018 Jan 1;9(1):522–554. doi: 10.1080/21505594.2017.1313372.
3. Del Pozo JL. Biofilm-related disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2018 Jan;16(1):51–65. doi: 10.1080/14787210.2018.1417036.
4. Cattelan N, Yantorno OM, Deora R B. Structural Analysis of *Bordetella pertussis* biofilms by confocal laser scanning microscopy. *Bio Protoc.* 2018 Aug 5;8(15):e2953. doi: 10.21769/BioProtoc.2953.
5. Cattelan N, Dubey P, Arnal L, Deora R. *Bordetella pertussis* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *Pathog Dis.* 2016 Feb;74(1):ftv108. doi: 10.1093/femspd/ftv108.
6. Toubiana J, Azarouni S, Bouchez V, Landier A, Guillot S, Matczak S, et al. *Bordetella parapertussis* bacteremia: clinical expression and bacterial genomics. *Open Forum Infect Dis.* 2019 Mar 7;6(4):ofz122. doi: 10.1093/ofid/ofz122.
7. Szymczak M, Grygorowicz B, Karczewska-Golec J, Decewicz P, Pankowski JA, Országh-Szturo H, et al. Characterization of a unique *Bordetella bronchiseptica* vB_BbrP_BB8 bacteriophage and its application as an antibacterial agent. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 19;21(4):1403. doi: 10.3390/ijms21041403.
8. Carbonetti NH. *Bordetella pertussis*: new concepts in pathogenesis and treatment. *Curr Opin Infect Dis.* 2016 Jun;29(3):287–94. doi: 10.1097/QCO.0000000000000264.
9. Scanlon K, Skerry C, Carbonetti N. Role of major toxin virulence factors in *Pertussis* infection and disease pathogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1183:35–51. doi: 10.1007/5584_2019_403.
10. Stockbauer KE, Fuchslocher B, Miller JF, Cotter PA. Identification and characterization of BspA, a *Bordetella* Bvg-intermediate phase protein. *Mol Microbiol.* 2001 Jan;39(1):65–78. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02191.x.
11. Nishikawa S, Shinzawa N, Nakamura K, Abe H, Horiguchi Y. The bvg-repressed gene brtA, encoding biofilm-associated surface adhesin, is expressed during host infection by *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol Immunol.* 2016 Feb;60(2):93–105. doi: 10.1111/1348-0421.12356. *Microbiol Immunol.* 2016 Feb;60(2):93–105. doi: 10.1111/1348-0421.12356.
12. Mishra M, Parise G, Jackson KD, Wozniak DJ, Deora R. The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in *Bordetella*. *J Bacteriol.* 2005 Feb;187(4):1474–84. doi: 10.1128/JB.187.4.1474-1484.2005.
13. Haurlyuk V, Atkinson GC, Murakami KS, Tenson T, Gerdes K. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat Rev Microbiol.* 2015 May;13(5):298–309. doi: 10.1038/nrmicro3448. Epub 2015 Apr 8.
14. Mittenhuber G. Comparative genomics and evolution of genes encoding bacterial (p)ppGpp synthetases/hydrolases (the Rel, RelA and SpoT proteins). *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2001 Oct;3(4):585–600. doi: 10.1089/jmb.2000.00466. eCollection 2020.
15. Kamanova J. *Bordetella Type III secretion injectosome and effector proteins. front cell infect microbiol.* 2020 Sep 4;10:466. doi: 10.3389/fcimb.2020.00466. eCollection 2020.
16. Medhekar B, Shrivastava R, Mattoo S, Gingery M, Miller JF. *Bordetella Bsp22* forms a filamentous type III secretion system tip complex and is immunoprotective in vitro and in vivo. *Mol Microbiol.* 2009 Jan;71(2):492–504. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06543.x. Epub 2008 Dec 5.
17. Sugisaki K, Hanawa T, Yonezawa H, Osaki T, Fukutomi T, Kawakami H, et al. Role of (p)ppGpp in biofilm formation and expression of filamentous structures in *Bordetella pertussis*. *Microbiology (Reading).* 2013 Jul;159(Pt 7):1379–1389. doi: 10.1099/mic.0.066597-0.
18. Cattelan N, Villalba MI, Parise G, Arnal L, Serra DO, Aguilar M, et al. Outer membrane protein OmpQ of *Bordetella bronchiseptica* is required for mature biofilm formation. *Microbiology (Reading).* 2016 Feb;162(2):351–363. doi: 10.1099/mic.0.000224.
19. Belhart K, de la Paz Gutierrez M, Zaccà F, Ambrosio N, Cartelle Gestal M, Taylor D, et al. *Bordetella bronchiseptica* diguanylate cyclase bdca regulates motility and is important for the establishment of respiratory infection in mice. *J Bacteriol.* 2019 Aug 8;201(17):e00011–19. doi: 10.1128/JB.00011-19.
20. Little DJ, Pfoh R, Le Mauff F, Bamford NC, Notte C, Baker P, et al. PgaB orthologues contain a glycosidase domain that cleaves deacetylated poly-beta(1,6)-N-acetylglucosamine and can disrupt bacterial biofilms. *PLoS Pathog.* 2018 Apr 23;14(4):e1006998. doi: 10.1371/journal.ppat.1006998.
21. Sakurai K, Uezu K, Numata M, Hasegawa T, Li C, Kaneko K, Shinkai S. Beta-1,3-glucan polysaccharides as novel one-dimensional hosts for DNA/RNA, conjugated polymers and nanoparticles. *Chem Commun (Camb).* 2005 Sep 21;35:4383–98. doi: 10.1039/b506673p.
22. Conover MS, Mishra M, Deora R. Extracellular DNA is essential for maintaining *Bordetella* biofilm integrity on abiotic surfaces and in the upper respiratory tract of mice. *PLoS One.* 2011 Feb 11;6(2):e16861. doi: 10.1371/journal.pone.0016861.
23. Nash ZM, Cotter PA. *Bordetella* Filamentous Hemagglutinin, a Model for the Two-Partner Secretion Pathway. *Microbiol Spectr.* 2019 Mar;7(2):10.1128/microbiolspec.PSB-0024-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.PSB-0024-2018.
24. Loch C, Bertin P, Menozzi FD, Renaud G. The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent *Bordetella* spp. *Mol Microbiol.* 1993 Aug;9(4):653–60. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01725.x.
25. Serra DO, Conover MS, Arnal L, Sloan GP, Rodriguez ME, Yantorno OM, et al. FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PLoS One.* 2011 Jun 16;6(12):e28811. doi: 10.1371/journal.pone.0028811.
26. Cattelan N, Jennings-Gee J, Dubey P, Yantorno OM, Deora R. Hyperbiofilm formation by *Bordetella pertussis* strains correlates with enhanced virulence traits. *Infect Immun.* 2017 Nov 17;85(12):e00373–17. doi: 10.1128/IAI.00373-17.
27. Arnal L, Grunert T, Cattelan N, de Gouw D, Villalba MI, Serra DO, et al. *Bordetella pertussis* isolates from argentinean whooping cough patients display enhanced biofilm formation capacity compared to tohama i reference strain. *Front Microbiol.* 2015 Dec 8;6:1352. doi: 10.3389/fmicb.2015.01352.
28. Hoffman C, Eby J, Gray M, Heath Damron F, Melvin J, Cotter P, et al. *Bordetella* adenylate cyclase toxin interacts with filamentous haemagglutinin to inhibit biofilm formation in vitro. *Mol Microbiol.* 2017 Jan;103(2):214–228. doi: 10.1111/mmi.13551.
29. Sukumar N, Nicholson TL, Conover MS, Ganguly T, Deora R. Comparative analyses of a cystic fibrosis isolate of *Bordetella bronchiseptica* reveal differences in important pathogenic phenotypes. *Infect Immun.* 2014 Apr;82(4):1627–37. doi: 10.1128/IAI.01453-13.
30. Parise G, Mishra M, Itoh Y, Romeo T, Deora R. Role of a putative polysaccharide locus in *Bordetella* biofilm development. *J Bacteriol.* 2007 Feb;189(3):750–60. doi: 10.1128/JB.00953-06.
31. Booth WT, Davis RR, Deora R, Hollis T. Structural mechanism for regulation of DNA binding of BpsR, a *Bordetella* regulator of biofilm formation, by 6-hydroxyxynicotinic acid. *PLoS One.* 2019 Nov 7;14(11):e0223387. doi: 10.1371/journal.pone.0223387.
32. Conover MS, Redfern CJ, Ganguly T, Sukumar N, Sloan G, Mishra M, et al. BpsR modulates *Bordetella* biofilm formation by negatively regulating the expression of the Bps polysaccharide. *J Bacteriol.* 2012 Jan;194(2):233–42. doi: 10.1128/JB.06020-11.
33. Little DJ, Milek S, Bamford NC, Ganguly T, DiFrancesco BR, Nitz M, et al. The protein BpsB is a poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine deacetylase required for biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *J Biol Chem.* 2015 Sep 11;290(37):22827–40. doi: 10.1074/jbc.M115.672469.
34. Dorji D, Graham RM, Richmond P, Keil A, Mukkur TK. Biofilm forming potential and antimicrobial susceptibility of newly emerged Western Australian *Bordetella pertussis* clinical isolates. *Biofouling.* 2016 Oct;32(9):1141–1152. doi: 10.1080/08927014.2016.1232715.
35. Paddock CD, Sanden GN, Cherry JD, Gal AA, Langston C, Tatti KM, et al. Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. *Clin Infect Dis.* 2008 Aug 1;47(3):328–38. doi: 10.1086/589753.
36. Soane MC, Jackson A, Maskell D, Allen A, Keig P, Dewar A, et al. Interaction of *Bordetella pertussis* with human respiratory mucosa in vitro. *Respir Med.* 2000 Aug;94(8):791–9. doi: 10.1053/rmed.2000.0823.
37. Conover MS, Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Deora R. The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Mol Microbiol.* 2010 Sep;77(6):1439–55. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07297.x.
38. Nieves DJ, Heinger U. *Bordetella pertussis*. *Microbiol Spectr.* 2016 Jun;4(3). doi: 10.1128/microbiolspec.EI10-0008-2015.
39. Dorji D, Moofi F, Yantorno O, Deora R, Graham RM, Mukkur TK. *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.
40. de Gouw D, Serra DO, de Jonge MI, Hermans PW, Wessels HJ, Zomer A, et al. The vaccine potential of *Bordetella pertussis* biofilm-derived membrane proteins. *Emerg Microbes Infect.* 2014 Aug;3(8):e58. doi: 10.1038/emi.2014.58.
41. Dorji D, Graham RM, Singh AK, Ramsay JP, Price P, Lee S. Immunogenicity and protective potential of *Bordetella pertussis* biofilm and its associated antigens in a murine model. *Cell Immunol.* 2019 Mar;337:42–47. doi: 10.1016/j.cellimm.2019.01.006.
42. Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Mishra M, Deora R. The *Bordetella* Bps Polysaccharide is critical for biofilm development in the mouse respiratory tract. *J Bacteriol.* 2007 Nov;189(22):8270–6. doi: 10.1128/JB.00785-07.

Об авторах

- **Евгений Михайлович Зайцев** – д. м. н., заведующий лабораторией иммуномодуляторов ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова, +7 (495) 916-22-63, pertussis@yandex.ru. ORCID ID 0000-0002-4813-9074.
- **Марина Васильевна Брицина** – ведущий научный сотрудник ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова. +7 (495) 916-22-63, britsinamarina@yandex.ru. ORCID ID 0000-0002-3044-0790.
- **Ирина Глебовна Бажанова** – ведущий научный сотрудник ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова. +7 (495) 916-22-63, ibajanowa@yandex.ru. ORCID ID 0000-0002-9072-2538.
- **Мария Николаевна Озерцковская** – ведущий научный сотрудник, ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова. +7 (495) 916-22-63, manja33@yandex.ru. ORCID ID 0000-0001-9809-4217.

Поступила: 25.05.2021. Принята к печати: 16.07.2021.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

About the Authors

- **Evgeny M. Zaytsev** – Dr. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Immunomodulators, Mechnikov NIIVS. +7 (495) 916-22-63, pertussis@yandex.ru. ORCID ID 0000-0002-4813-9074.
- **Marina V. Britsina** – Leading Researcher, Mechnikov NIIVS. +7 (495) 916-22-63, britsinamarina@yandex.ru. ORCID ID 0000-0002-3044-0790.
- **Irina G. Bazhanova** – Leading Researcher, Mechnikov NIIVS. +7 (495) 916-22-63, ibajanowa@yandex.ru. ORCID ID 0000-0002-9072-2538.
- **Maria N. Ozertskovskaya** – Leading Researcher, Mechnikov NIIVS. +7 (495) 916-22-63, manja33@yandex.ru. ORCID ID 0000-0001-9809-4217.

Received: 25.05.2021. Accepted: 16.07.2021.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.