

Лемиш А.П., кандидат ветеринарных наук
Вербицкий А.А., кандидат ветеринарных наук, доцент*
Новик Т.П., кандидат биологических наук**

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслеского», г. Минск

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск

** УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск

ОСНОВНЫЕ ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* И МЕХАНИЗМ ИХ ДЕЙСТВИЯ (ОБЗОР)

Резюме

В статье представлены литературные данные об основных факторах вирулентности *Bordetella bronchiseptica* и механизм их действия.

Summary

The article presents the literary data on the main virulence factors of *Bordetella bronchiseptica* and the mechanism of their action.

Бактерии рода *Bordetella* являются патогенными микроорганизмами, широко распространенными в природе. Данный микроорганизм является этиологическим агентом атрофического ринита и бронхопневмонии свиней. Помимо этого, *B. bronchiseptica* вызывает различные респираторные заболевания у других видов млекопитающих, включая собак и кроликов (1), а также людей (2). *B. pertussis* является возбудителем коклюша у людей, сопровождающимся поражением дыхательных путей, имеет родство с *B. bronchiseptica*. Обе бактерии были классифицированы как подвид одного вида бактерий на основе анализа генов, кодирующих 23Sг RNA. Бактерии рода *Bordetella* вырабатывают различные факторы вирулентности (адгезины, токсины и т.д.), которые в значительной степени влияют на взаимодействие с эукариотическими клетками хозяина и, возможно, с другими бактериями.

В рамках этой статьи мы постараемся раскрыть специфические детерминанты факторов вирулентности *B. bronchiseptica*, понимание которых важно как при диагностике, профилактике, так и при применении различных стратегий лечения.

Адгезины

Факторы, определяющие клетки-мишени, являются общими для большинства патогенов, обитающих на слизистых оболочках (3), и необходимым условием колониза-

ции, позволяя избежать механического воздействия реснитчатого эпителия.

B. bronchiseptica в отличие от *P. multocida* обладает более выраженным сродством и силой связывания с мерцательным эпителием верхних дыхательных путей (4, 5, 6, 7, 8). Большинство антигенов, вырабатываемых *B. bronchiseptica*, таких как гемагглютинин (ГНА) и пертактин (РТХ), вовлечены в качестве посредников в процессы адгезии, хотя их роль в данном процессе еще уточняется.

Фимбрии

Yokomizo и Shimizu (8) впервые продемонстрировали, что штаммы *B. bronchiseptica*, выделенные от свиней, обладали большим количеством фимбрий и большей вирулентностью нежели авирулентные штаммы, которые длительно выращивались на питательных средах в пробирках (in vitro). Дальнейшие исследования при помощи электронного микроскопа подтвердили это предположение и показали прямую взаимосвязь между бактериями и тканью хозяина. Фимбрии состоят из трех различных белковых молекул (9) и предположительно именно они определяют видовую специфичность (10). Недавние исследования показали, что у *B. bronchiseptica* содержится, как минимум, четыре гена *fim2*, *fim3*, *fimX*, и *fimA*, экспрессирующих четыре различные фимбриальные серотипа: *fim 2*, *fim 3*, *FimX* и *FimA* (11, 12). Хотя эти гены не связаны между собой в одной хромо-

соте бактерии, сборка продуктов их экспрессии происходит в одном секреторном аппарате бактерии, кодируемом *fimBCD* локусом [13]. Mattoo с соавторами [13], сконструировав бактерию *B. bronchiseptica* Fim⁻, мутантную по генам, кодирующим фимбрии, установили, что фимбрии в значительной степени повышают бактериальную колонизацию трахеи у крыс.

Нитевидный гемагглютинин (Filamentous Hemagglutinin)

Реакция гемагглютинации является наиболее часто применяемой в лабораторной практике для определения гемагглютинирующих свойств бактерий, что коррелирует со степенью вирулентности бактерии [14]. Semjén и Magyar [15] показали, что высоко-вирулентные изоляты *B. bronchiseptica* агглютинируют эритроциты многих видов животных. Авирулентные субкультуры теряли способность агглютинировать эритроциты. Агглютинин положительные штаммы демонстрировали большее взаимодействие со слизистой оболочкой носового эпителия свиней, в то время как агглютинин негативные штаммы, напротив, такого взаимодействия не проявляли. Таким образом, гемагглютинин *B. bronchiseptica* может проявлять себя как адгезин. Ishikawa and Isayama [16] предположили, что рецептором для гемагглютинина в эукариотических клетках хозяина служит N-ацетилнейраминавая кислота. Использование сиаловой кислоты ингибирует гемагглютинирующую активность *B. bronchiseptica* в отношении эритроцитов крупного рогатого скота [17]. Молекулярная масса гемагглютинина *B. bronchiseptica* составляет около 200 кДа и он структурно идентичен с белком, синтезируемым *B. pertussis*.

Нитевидный гемагглютинин является основным фактором вирулентности *B. pertussis*, а также основным компонентом бактериальных бесклеточных вакцин. Помимо адгезии к эпителиальным клеткам слизистой оболочки носа восприимчивых животных нитевидный гемагглютинин выполняет роль стимулятора, активируя деятельность макрофагов и возможно других лейкоцитов через CR3 интегрин, а также служит фактором взаимодействия между другими бактериями, вызывающими болезни дыхательных путей, способствуя, таким образом, суперинфекции.

Сравнительные испытания штамма *B. bronchiseptica* мутанта по гену FNA⁻ со штаммами, не имеющими данной мутации, показали способность колонизировать слизистую оболочку носа и отсутствие способности колонизировать слизистую оболочку трахеи. Это в очередной раз доказывает, что существует разница между рецепторами клеток в различных анатомических участках слизистой оболочки носа и трахеи, что повышает вероятность колонизации *B. bronchiseptica* слизистых при помощи адгезинов.

Пертактин (Pertactin)

P.68 пертактин является внешним мембранным белком *B. bronchiseptica* и называется так в соответствии со своей молекулярной массой (18). Такой же молекулярной массы продукт синтезируют бактерии, относящиеся к *B. pertussis* [19, 20]. Роль данного белка в адгезии еще предстоит выяснить, однако уже существуют данные, свидетельствующие о том, что пертактин является ключевым белком, отвечающим за неполный фагоцитоз в макрофагах. Таким образом, *B. bronchiseptica* может быть как внеклеточным, так и внутриклеточным паразитом различных эукариотических клеток, в том числе и фагоцитов [21] Forde и др. [22].

Установлена роль P.68 пертактина бактерий *B. bronchiseptica* в иммунопротекции. Активная или пассивная иммунизация мышей и поросят препаратом, содержащим очищенный пертактин, позволяла получить стойкий иммунитет против *B. bronchiseptica* (23).

Токсины

Бордетеллы продуцируют несколько видов токсинов: трахеальный цитотоксин и три белковых токсина – аденилат циклаза (adenylate cyclase toxin), дермонекротический токсин (DNT) и, в случае *B. pertussis*, коклюшный токсин (СТ).

Аденилатциклаза (Adenylate Cyclase)

Аденилатциклаза была обнаружена почти случайно в вакцине против *B. pertussis* (24). Накопление этого токсина в питательной среде происходит при культивировании бактерий (25). Дальнейшие исследования установили, что аденилатциклаза в значительной степени накапливается в экстрацитоплазматическом слое бактерии (26). Помимо этого установлено, что аденилатциклаза стимулирует кальций-связывающий белок кальмодулин (CaM) у эукариотических клеток (27).

Инактивация транспозонов в генах, кодирующих аденилатциклазу, демонстрирует вирулентную активность данного токсина на мышцах и играет ключевую роль в колонизации (28). Аденилатциклаза у некоторых типов клеток может повысить уровень циклического АМФ, который способен приводить к «фагоцитарной импотенции» (29). Клонирование гена *суа*, отвечающего за синтез данного токсина, показало гомологию С-концевой части этого белка с гемолизинем *Escherichia coli*, и в целом RTX (repeats in toxin – повторяющиеся токсины) семейству белковых бактериальных токсинов. К ним относят бактериальные токсины, которые формируют посредством вставки в плазматическую мембрану клеток-хозяина функционирующие трансмембранные поры (каналы), приводящие клетку к лизису. Такие токсины еще называют RTX-семейством из-за наличия в их молекулах большого количества повторов [30].

Аденилатциклаза обеспечивает бордетеллу гемолитическую активность, функция этого токсина основывается на обеспечении переноса и ввода токсических продуктов в эукариотические клетки хозяина. Ген, кодирующий образование аденилатциклазы у *B. bronchiseptica*, на 98% гомологичен с аналогичным геном у *B. pertussis* (31).

Аденилатциклаза у бордетелл вызывает апоптоз макрофагов, нейтрофилов, дендритных клеток как *in vitro*, так и *in vivo* (32), а также влияет на моноциты посредством активации α фактора некроза опухоли и супероксида. Помимо этого показано влияние аденилатциклазы на функцию тромбоцитов посредством ингибирования их агрегации, что оказывает влияние на длительность кровотечений (33).

Антитела к аденилатциклазе способны подавлять инфекцию, в связи с этим было высказано предположение, что данный токсин может быть весьма ценным компонентом вакцин (34).

Дермонекротический токсин (Dermonecrotic Toxin - DNT)

DNT, или термолabile токсин, был первым фактором вирулентности, который был определен у бордетелл (35). Его дермонекротические свойства были установлены после подкожной инъекции. У большинства бактерий он консервативен, является необходимым фактором вирулентности бактериаль-

ных клеток, а гены, кодирующие его синтез, регулируются BVG системой. DNT у *B. bronchiseptica* является основным фактором, вызывающим атрофический ринит у свиней.

DNT в большей степени является токсичным внутриклеточного действия, который поглощается клетками-мишенями (36). DNT действует на белки семейства Rho. Это небольшие GTP-связывающие белки, выполняющие роль молекулярных переключателей, которые взаимодействуют с эффекторными белками и становятся неактивными при гидролизе GTP (Гуанозинтрифосфат) в GDP (Гуанозиндифосфат). Эти белки регулируют многие аспекты клеточных функций, в том числе при формировании цитоскелета и сигнальных путей, связанных с генной экспрессией и делением клетки.

Трахеальный цитотоксин (Tracheal Cytotoxin)

Трахеальный цитотоксин вырабатывается всеми представителями бордетелл и представляет собой дисахарид-тетрапептид как производное пептидогликана клеточной стенки. Относится к белкам семейства мурамилов (37, 38). В отличие от большинства других грамотрицательных бактерий, *B. pertussis* вырабатывает большое количество этого гликопептида в окружающую среду, как правило, в Лаг-фазе своего роста (38). Токсин специфически повреждает клетки реснитчатого эпителия, в результате чего происходит цилиостаз и экструзия (40). Действие токсина экспериментально было подтверждено в опытах на эпителиальных клетках трахеи хомячка. Помимо этого, трахеальный цитотоксин оказывает токсическое действие на другие клетки, например, нарушая функции нейтрофилов. Механизм действия токсина связан с активацией интерлейкина-1 в нейтрофилах (41), который активирует клеточные синтазы (NO), что приводит к высокому уровню свободных радикалов оксида азота (NO) (42). Оксид азота в свою очередь разрушает железо-зависимые ферменты и, в конце концов, ингибирует функции митохондрий и синтез ДНК в эукариотических клетках (42).

Система секреции (Type III Secretion System)

Система секреции Тип III была обнаружена у нескольких видов грамотрицательных бактерий, включая бордетелл. Это си-

стема осуществляет передачу множества бактериальных белков через мембраны бактериальных и эукариотических клеток и, таким образом, облегчает доставку факторов вирулентности непосредственно в клетки-мишени. Эти системы состоят из аппарата секреции и множества белков, формирующих данную структуру. Yuk и соавт. (43) сообщили о наличии кластера генов (*bscIJKLNO*), кодирующих эти белки и показали, что локус *BVG* регулирует экспрессию *bscN*, который, как предполагается, участвует в обеспечении этой системы энергией. Мутация в генах *bscN* приводит к несколь-

ким фенотипическим изменениям, в том числе к снижению цитотоксичности на линиях культур клеток (44).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время все больше раскрывается структура, механизм действия, передачи и синтеза факторов вирулентности бактерий. Понимание этих механизмов позволит конструировать новые современные диагностические тест-системы, средства лечения и профилактики болезней, вызываемых *Bordetella bronchiseptica*.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Goodnow, R. A. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. Microbiol. Rev. 1980; P. 44: 722–738. [PMC free article] [PubMed].
- 2 Woolfrey, B. F., Moody, J. A. Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. Clin. Microbiol. Rev. 1991; P. 4: 243 – 255. [PMC free article] [PubMed].
- 3 Beachey, E. H. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. J. Infect. Dis. 1981; P. 143: 325 – 345. [PubMed].
- 4 Chung, W. B., Collins, M. T., Bäckström, L. R. Adherence of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* to swine nasal ciliated epithelial cells in vitro. APMIS. 1990; P. 98: 453 – 461. [PM].
- 5 Jacques, M., Parent, N., Foiry, B. Adherence of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* to porcine nasal epithelial cells. Can. J. Vet. Res. 1988; P. 52: 283–285. [PMC free article] [PM].
- 6 Magyar, T., Lendvai, N., Semjén, G., Réthy, L. Investigation of the biological activities of *Bordetella bronchiseptica*. II. Adherence to the target cell. Ann. Immunol. Hung. 1983; P. 23: 361–366.
- 7 Nakai, T., Kume, K., Yoshikawa, H., Oyamada, T., Yoshikawa, T. Adherence of *Pasteurella multocida* or *Bordetella bronchiseptica* to the swine nasal epithelial cell in vitro. Infect. Immun. 1988; P. 56: 234–240. [PMC free article] [PM].
- 8 Yokomizo, Y., Shimizu, T. Adherence of *Bordetella bronchiseptica* to swine nasal epithelial cells and its possible role in virulence. Res. Vet. Sci. 1979; P. 27:15–21. [PubMed].
- 9 Lee, S. W., Way, A., Osen, E. G. Purification and subunit heterogeneity of pili of *Bordetella bronchiseptica*. Infect. Immun. 1986; P.51: 586–593. [PMC free article] [PubMed].
- 10 Burns, E. H. Jr., Norman, J. M., Hatcher, M. D., Bemis, D. A. Fimbriae and determination of host species specificity of *Bordetella bronchiseptica*. J. Clin. Microbiol. 1993; P. 31: 1838–1844. [PMC free article] [PubMed].
- 11 Boschwitz, J. S., van der Heide, H. G. J., Mooi, F. R., Relman, D. A. *Bordetella bronchiseptica* expresses the fimbrial structural subunit gene *fimA*. J. Bacteriol. 1997; P. 179: 882–885. [PMC free article] [PubMed].
- 12 Savelkoul, P. H. M., de Kerf D. P. G., Willems, R. J., Mooi, F. R., van der Zeijst B. A. M., Gaastra W. Characterization of the *fim2* and *fim3* fimbrial subunit genes of *Bordetella bronchiseptica*: roles of *Fim2* and *Fim3* fimbriae and flagella in adhesion. Infect. Immun. 1996; P. 64: 5098–5105. [PMC free article] [PubMed].
- 13 Mattoo, S., Miller, J. F., Cotter, P. A. Role of *Bordetella bronchiseptica* fimbriae in tracheal colonization and development of a humoral immune response. Infect. Immun. 2000; P. 68: 2024–2033. [PMC free article] [PubMed].
- 14 Ofek, I., and E. H. Beachey. 1980. Bacterial adherence, P. 3–29. In E. H. Beachey (ed.), Receptors and Recognition, series B6. Chapman and Hall, London, United Kingdom.
- 15 Semjén, G., Magyar, T. A bovine haemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* responsible for adherence. Acta Vet. Hung. 1985; P. 33: 129–136. [PubMed].
- 16 Ishikawa, H., Isayama, Y. Evidence for sialyl glycoconjugates as receptors for *B. bronchiseptica* on swine nasal mucosa. Infect. Immun. 1987; P. 55: 1607–1609. [PMC free article] [PubMed].
- 17 Sakurai, Y., Suzuki, H., Terada E. Purification and characterisation of haemagglutinin from *Bordetella bronchiseptica*. J. Med. Microbiol. 1993; P. 39: 388–392. [PubMed].
- 18 Montaraz, J. A., Novotny, P., Ivanyi, J. Identification of a 68-kilodalton protective protein antigen from *Bordetella bronchiseptica*. Infect. Immun. 1985; P. 47: 744 –751. [PMC free article] [PubMed].
- 19 Brennan, M. J., Li, Z. M., Cowell, J. L., Bisher, M. E., Steven, A. C., Novotny, P., Manclark, C. R. Identification of a 69-kilodalton nonfimbrial protein as an agglutinin of *Bordetella pertussis*. Infect. Immun. 1988; P. 56: 3189–3195. [PMC free article] [PubMed].

article] [PubMed].

20 Charles, I. G., Dougan, G., Pickard, D., Chatfield, S., Smith, M., Novotny, P., Morrissey, P., Fairweather, N. F. Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989; P. 86: 3554–3558. [PMC free article] [PubMed].

21 Forde, C. B., Parton, R., Coote, J. G. Bioluminescence as a reporter of intracellular survival of *Bordetella bronchiseptica* in murine phagocytes. *Infect. Immun.* 1998; P. 66: 3198–3207. [PMC free article] [PubMed].

22 Forde, C. B., Shi, X., Li J., Roberts, M. *Bordetella bronchiseptica*-mediated cytotoxicity to macrophages is dependent on *bvg*-regulated factors, including pertactin. *Infect. Immun.* 1999; P. 67: 5972–5978. [PMC free article] [PubMed].

23 Kobisch, M., Novotny, P. Identification of a 68-kilodalton outer membrane protein as the major protective antigen of *Bordetella bronchiseptica* by using specific-pathogen-free piglets. *Infect. Immun.* 1990; P. 58: 352–357. [PMC free article] [PM].

24 Wolff, J., Cook, G. H. Activity of thyroid membrane adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 1973; P. 248: 350–355. [PubMed].

25 Hewlett, E., Wolff, J. Soluble adenylate cyclase from the culture medium of *Bordetella pertussis*: purification and characterization. *J. Bacteriol.* 1976; P. 127: 890–898. [PMC free article].

26 Hewlett, E. L., Urban, M. A., Manclark, C. R., Wolff, J. Extracytoplasmic adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1976; P. 73: 1926–1930. [PMC free article] [PM].

27 Wolff, J., Cook, G. H., Goldhammer, A. R., Berkowitz, S. A. Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980; P. 77: 3841–3844. [PMC free article] [PM].

28 Goodwin, M. S. M., Weiss, A. A. Adenylate cyclase is critical for colonization and pertussis toxin is critical for lethal infection by *Bordetella pertussis* in infant mice. *Infect. Immun.* 1990; P. 58: 3445–3447. [PMC free article] [PubMed].

29 Confer, D. L., Eaton, J. W. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science*. 1982; P. 217: 948–950. [PubMed].

30 Супотницкий, М. В. Бактериальные токсины. Их природа, механизмы действия, возможности конструирования гибридных и модифицированных токсинов // Биопрепараты. – 2011. – № 1. – С. 6–15. <http://supotnitskiy.ru/stat/stat84.htm>.

31 Betsou, F., Sismeiro, O., Danchin, A., Guiso, N. Cloning and sequence of the *Bordetella bronchiseptica* adenylate cyclase-hemolysin-encoding gene. *Gene*. 1995; P. 162: 165–166. [PubMed].

32 Gueirard, P., Druilhe, A., Pretolani, M., Guiso, N. Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella*

pertussis infection in vivo. *Infect. Immun.* 1998; P. 66: 1718–1725. [PMC free article] [PubMed].

33 Iwaki, M., Kamachi, K., Heveker, N., Konda, T. Suppression of platelet aggregation by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Infect. Immun.* 1999; P. 67: 2763–2768. [PMC free article] [PubMed].

34 Guiso, N., Szatanik, M., Rocancourt, M. Protective activity of *Bordetella* adenylate cyclase-hemolysin against bacterial colonization. *Microb. Pathog.* 1989; P. 11: 423–431. [PubMed].

35 Bordet, J., Gengou, O. Le microbe de la coqueluche. *Ann. Inst. Pasteur*. 1909; P. 20: 731–741.

36 Lacerda, H. M., Pullinger, G. D., Lax, A. J., Rozengurt, E. Cytotoxic necrotizing factor 1 from *Escherichia coli* and dermonecrotic toxin from *Bordetella bronchiseptica* induce p21^{ras}-dependent tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin in Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 1997; P. 272: 9587–9596. [PubMed].

37 Cookson, B. T., Goldman, W. E. Tracheal cytotoxin: a conserved virulence determinant of all *Bordetella* species. *J. Cell. Biochem.* 1987; 11B (Suppl.): P. 124.

38 Goldman, W. E., Cookson B. T. Structure and functions of the *Bordetella* tracheal cytotoxin. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 1988; 13(Suppl.): P. 187–191. [PubMed].

39 Cookson, B. T., Cho, H.-L., Herwaldt, L. A., Goldman, W. E. Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 1989; P. 57: 2223–2229. [PMC free article] [PubMed].

40 Goldman, W. E., Klapper, D. G., Baseman, J. B. Detection, isolation, and analysis of a released *Bordetella pertussis* product toxic to cultured tracheal cells. *Infect. Immun.* 1982; P. 36: 782–794. [PMC free article] [PubMed].

41 Heiss, L. N., Moser, S. A., Unanue, E. R., Goldman, W. E. Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of pertussis. *Infect. Immun.* 1993; P. 61: 3123–3128. [PMC free article] [PubMed].

42 Heiss, L. N., Lancaster, J. J., Corbett, J. A., Goldman, W. E. Epithelial autotoxicity of nitric oxide: role in the respiratory cytopathology of pertussis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994; P. 91: 267–270. [PMC free article] [PubMed].

43 Yuk, M. H., Harvill, E. T., Miller, J. F. The *BvgAS* virulence control system regulates type III secretion in *Bordetella bronchiseptica*. *Mol. Microbiol.* 1998; P. 28: 945–959. [PubMed].

44 Yuk, M. H., Harvill, E. T., Cotter, P. A., Miller, J. F. Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF- κ B activation by the *Bordetella* type III secretion system. *Mol. Microbiol.* 2000; P. 35: 991–1004. [PubMed].