

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

3•2013

Квартальный  
научно-теоретический журнал

Основан в январе 1983 г.

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. В. КОСТРОВ  
Зам. главного редактора Ю. М. РОМАНОВА  
Ответственный секретарь Т. С. ИЛЬИНА

В. И. АГОЛ, А. Д. АЛЬТШТЕЙН, А. П. АНИСИМОВ, В. А. ГВОЗДЕВ,  
В. Н. ГЕРШАНОВИЧ,  
А. Л. ГИНЦБУРГ, В. В. ДЕМКИН, Н. В. КАВЕРИН, Е. Д. КУЗНЕЦОВА (научный  
редактор), С. А. ЛИМБОРСКАЯ, С. А. ЛУКЬЯНОВ, Н. Ф. МЯСОЕДОВ,  
С. В. НЕТЕСОВ, Е. Д. СВЕРДЛОВ, Г. Б. СМЕРНОВ, Н. И. СМЕРНОВА,  
В. З. ТАРАНТУЛ

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

А. М. БОРОНИН (Пушино-на-Оке), В. И. ВОТЯКОВ (Минск), А. А. ПРОЗОРОВ  
(Москва), Н. В. ТОМИЛИН (Санкт-Петербург), Ю. К. ФОМИЧЕВ (Минск),  
С. В. ШЕСТАКОВ (Москва)

Журнал утвержден в Перечне ведущих научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук (Бюллетень ВАК)

Журнал полностью переводится на английский язык в США издательством ALLERTON PRESS, INC.

Сведения о статьях, публикуемые в журнале, размещаются в следующих международных информационно-справочных изданиях: *Index Medicus*, *Biological Abstracts*, *Chemical Abstracts*, *Current Contents*, *Ulrich's International Periodicals Directory*, а также журнал включен в информационные продукты Thomson Reuters. Начиная с тома 23 (1) 2008 г. издание индексируется и вносится в следующие базы данных:

- Science Citation Index Expanded (известный также как SciSearch®)
- Journal Citation Reports/Science Edition®
- Biotechnology Citation Index®
- Biological Abstracts
- BIOSIS Previews.



МОСКВА «ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"»

## СОДЕРЖАНИЕ

## CONTENTS

### ОБЗОРЫ

- Дентовская С.В., Копылов П.Х., Иванов С.А., Агеев С.А., Анисимов А.П.* Молекулярные основы вакцинопрофилактики чумы ..... 3
- Бондаренко Т.Ю., Терновой В.А., Нетесов С.В.* Вирус гепатита А: структурно-функциональная организация генома, молекулярная диагностика и культивирование ..... 12

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Кормилицына М.И., Мещерякова И.С., Михайлова Т.В.* Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Francisella tularensis*, различающихся по таксономической принадлежности и вирулентности ..... 22
- Салина Т.Ю., Морозова Т.И.* Молекулярно-генетический анализ изониазид-резистентных штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующих на территории Саратовской области ..... 26
- Петрова И.Д., Кононова Ю.В., Чаусов Е.В., Шестопалов А.М., Тишкова Ф.Х.* Генетические варианты вируса крымской-конго геморрагической лихорадки, циркулировавшие в 2009 г. в эндемичных районах южного Таджикистана ..... 29
- Bagheri R., Rabbani B., Mahdieh N., Khanahmad H., Abachi M., Asgari S.* PCR-ELISA: a diagnostic assay for identifying Iranian HIV seropositives ..... 36

### REVIEWS

- Dentovskaya S. V., Kopylov P. Kh., Ivanov S. A., Ageev S. A., and Anisimov A. P.* A Molecular Basis of the Plague Vaccine Development
- Bondarenko T. Yu., Ternovoi V. A., and Netesov S. V.* The Hepatitis A Virus: Structural and Functional Organization of the Genome, Its Molecular Diagnostic Value and Cultivation

### EXPERIMENTAL WORKS

- Kormilitsyna M. I., Meshcheryakova I. S., and Mikhailova T. V.* The Molecular and Genetic Characterization of *Francisella Tularensis* Strains of Different Taxonomic Status and Virulence
- Salina T. Yu. and Morozova T. I.* Molecular Genetic Analysis of the Isoniazid-resistant Strains of *M. tuberculosis* Circulating over the Saratov Region
- Petrova I. D., Kononova Y. V., Chausov E. V., Shestopalov A. M., and Tishkova F. H.* Genetic Variants of the Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Circulating in Endemic Areas of the Southern Tajikistan in 2009
- Bagheri R., Rabbani B., Mahdieh N., Khanahmad H., Abachi M., and Asgari S.* PCR-ELISA: a Diagnostic Assay for Identifying Iranian HIV Seropositives



Адрес редакции:

**Москва, 107140**

**ул. Верхняя Красносельская, д. 17А, стр. 1 Б**

**ОАО «Издательство "Медицина"»**

Редакция журнала "Молекулярная генетика, микробиология и вирусология"

Тел. редакции: (499) 264-36-66

e-mail: molgenetica@yandex.ru

Зав. редакцией И. Х. Измайлова

#### ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел./факс 8-499-264-00-90

E-mail: oao-medsina@mail.ru

**Ответственность за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах, несут рекламодатели.**

Редактор Е. И. Константинова

Художественный редактор  
А. В. Минаичев

Корректор Л. В. Кузнецова

Переводчик С. К. Чаморовский

Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

Сдано в набор 17.04.13

Подписано в печать 30.05.13

Формат 60 × 88%.

Печать офсетная. Печ. л. 5,00.

Усл.-печ. л. 4,90. Уч.-изд. л. 5,50.

Заказ 251.

Подписной тираж номера 191 экз.

ЛР №010215 от 29.04.97 г.

E-mail: meditsina@mtu-net.ru

www.medlit.ru

Отпечатано в типографии ООО "Подольская Периодика",

142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

С. В. Денцовская, П. Х. Копылов, С. А. Иванов, С. А. Агеев, А. П. Анисимов

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ ЧУМЫ

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Московская обл.

В обзоре освещены молекулярные механизмы патогенеза и особенности формирования специфического иммунитета при чуме. Описаны история и современное состояние вакцинопрофилактики инфекции. Особое внимание уделено перспективам в области разработки противочумных вакцин, рассмотрены возможные пути совершенствования вакцинных препаратов.

**Ключевые слова:** *Yersinia pestis*, патогенез, иммунитет, вакцинопрофилактика.

## Введение

Чума – наиболее опасная из бактериальных инфекций. «Юстинианова чума» (531–580 гг. н. э.), «черная смерть» (1347–1407 гг. н. э.) и третья пандемия чумы (1894 г. – настоящее время), унесшие более 200 млн человеческих жизней [112], были вызваны возбудителем чумы [54]. Эпидемии чумы нередко приводили к падению государств и разрушению древних цивилизаций. В отдельных странах погибало до 90 % населения [14, 66, 112].

Чистую культуру чумного микроба *Yersinia pestis* выделил А. Yersin в 1894 г. во время эпидемии чумы в Гонконге [158]. Этот микроорганизм относится к роду *Yersinia* семейства Enterobacteriaceae, который в настоящее время включает 17 видов [79, 103, 104]. Два других патогенных для человека вида – *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* – вызывают передающиеся алиментарным путем кишечные заболевания, как правило, легкой или средней тяжести со склонностью к подострому течению. Заболевание, вызываемое *Y. pestis*, значительно отличается от псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза по эпидемиологическим особенностям и патогенезу. Основными путями распространения *Y. pestis* являются передача инфицированными блохами и аэрогенный. При отсутствии лечения летальность при bubонной форме чумы достигает 60 %, а при септической и легочной – 100%. От момента заражения до гибели чувствительного к чуме теплокровного животного проходит, как правило, не более 1 нед [43, 112].

## Молекулярные механизмы патогенеза чумы

Бактерии *Y. pestis* [158] для постоянной циркуляции в экосистемах природных очагов чумы должны проникнуть в организм хозяина, успешно противостоять врожденному иммунитету грызуна и размножиться для индукции бактериемии, необходимой для дальнейшей передачи блохами новому хозяину [76, 155]. Каждый из этих этапов циклического существования обеспечивается множеством факторов патогенности и генов "домашнего хозяйства" *Y. pestis*, которые могут действовать совместно или индивидуально. Каждый из этих факторов в свою очередь может участвовать в различных стадиях инфекционного процесса или передачи патогена. Биомолекулы и ор-

ганеллы микроорганизма, обеспечивающие патогенез инфекции, принято относить к факторам патогенности [2, 3, 31, 33].

В середине прошлого века Т. Burrows [47–49] определил набор признаков, присутствующий у всех изученных им вирулентных штаммов *Y. pestis*, – классические "детерминанты вирулентности". К их числу он относил способность клеток сорбировать экзогенные красители и гемин ( $\text{Pgm}^+$ ), зависимость роста при 37 °С от наличия в среде ионов  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^-$ ), синтез V- и W-антигенов, "мышинного" токсина ( $\text{Tox}^+$ ) и капсульного антигена FI ( $\text{Fra}^+$  или F1), сочетанный синтез пестицина ( $\text{Pst}^+$ ), фибринолизина ( $\text{Fb}^+$ ) и плазмокоагулазы ( $\text{Cg}^+$ ), пуринонезависимость или способность синтезировать эндогенные пурины ( $\text{Pur}^+$ ). После пяти десятилетий исследований и дискуссий, прошедших с момента постулирования "детерминант вирулентности", некоторые из них, такие как W-антиген, пестицин и способность к синтезу эндогенных пуринов в настоящее время уже не рассматривают как факторы патогенности [2, 31, 112].

Основной фактор патогенности иерсиний – это комплекс свойств, кодируемых плазмидой pCad, обязательной для проявления вирулентности возбудителем чумы. Этот комплекс признаков – вирулон Yop – система, позволяющая внеклеточно расположенным бактериям обезвреживать клетки, участвующие в иммунном ответе хозяина, разрушающая их связи и вызывающая апоптоз путем инъекции бактериальных эффекторных протеинов. Эта система состоит из белков Yop и аппарата их секреции 3-го типа, названного Ysc. Аппарат Ysc состоит из 25 белков. По своим функциям большая часть Yop-белков может быть разделена на 2 группы. Часть из них является внутриклеточными эффекторами (YopE, YopN, YpkA/YopO, YopP/YopJ, YopM, YopT), тогда как другие (YopB, YopD, LcrV) формируют аппарат транслокации, который разворачивается на поверхности бактерии для доставки эффекторов через плазматическую мембрану внутрь эукариотических клеток. Секреция Yop-белков запускается при контакте с эукариотическими клетками и контролируется белками вирулона, включая YopN, YpeA, LcrG, которые закрывают бактериальный секреторный канал предположительно в виде затвора. Для точного функционирования системы необходимы также шапероны, названные белками Ysc, которые находятся в бактериальном цитозоле. Транскрипция генов контролируется температурой и активностью аппарата секреции [147]. В последние годы выявлен ряд новых факторов патогенности, часть из которых наряду с классическими представлена в таблице.

**Некоторые факторы, обеспечивающие жизнедеятельность *Y. pestis* в организме теплокровного хозяина (модифицировано из статьи [31] с учетом материалов [32, 41, 57, 67, 129, 142, 160])**

Фактор	Функция или активность	Степень снижения вирулентности у нокаутных мутантов, Ig		
		> 4	4–2	2–0
Факторы патогенности				
Стимулон, кодируемый плазмидой pCad, и реагирующий на низкую концентрацию Ca <sup>2+</sup> (low-calcium response - LCR) и включающий ассоциированную с вирулентностью бактерии систему секреции III типа (type III secretion system – T3SS), а также эффекторные белки внешних мембран иерсиний (Yersinia outer membrane proteins – Yop), а именно: V антиген (LcrV)	Система, позволяющая внеклеточно расположенным иерсиниям противостоять неспецифическому иммунному ответу за счет противодействия фагоцитозу, сигнальной активности макрофагов и индукции апоптоза фагоцитарных клеток (доставка токсических бактериальных Yop белков из внеклеточно расположенных бактерий в цитозоль эукариотической клетки)	+	–	–
YopD	Транслокация Yop белков; ингибция хемотаксиса нейтрофилов; супрессия синтеза γ-интерферона и фактора некроза опухолей α-цитокинов, необходимых для неспецифической активации профессиональных фагоцитов и образования продуктивных гранул, за счет опосредованной взаимодействием с Толл-подобным рецептором 2 (TLR2) стимуляции продукции ИЛ-10 репрессора указанных выше цитокинов; ингибция индуцированной сахаридом ЛПС продукции в макрофагах интерлейкина 1β	+	–	–
YopE	Транслокация Yop белков	Нд*	Нд	Нд
YopH	Противодействие фагоцитозу; деполимеризация актина; инактивация Rho-белков	+	–	–
YopM	Противодействие фагоцитозу; протеин-тирозин-фосфатаза; индуктор апоптоза; ингибирование пролиферации лимфоцитов	+	–	–
YopJ/YopP	Нарушение взаимодействия тромбина с тромбоцитами и препятствие их агрегации, необходимой для формирования кровяных сгустков	+	–	–
YopT	Снижение воспалительного ответа макрофагов, эпителиальных и эндотелиальных клеток за счет блокирования активации митогенактивированной протеинкиназы и ядерного фактора κB	–/+**	–	+
YpkA/YopO	Противодействие фагоцитозу; инактивация Rho-белков; деполимеризация актиновых стрессовых волокон	Нд	Нд	Нд
YscF	Противодействие фагоцитозу; инактивация Rho-белков; аутофосфорилирующаяся сериновая/треониновая киназа	Нд	Нд	Нд
Активатор плазминогена (Pla) (кодируется плазмидой pPst)	Формирование внешней "иглы" T3SS; участие в секреции эффекторных белков вирулентности, их транслокации через эукариотические мембраны, прикреплении бактерии к эукариотической клетке и регуляция работы T3SS в зависимости от концентрации Ca <sup>2+</sup>	Нд	Нд	Нд
Муреиновый липопротеин Брауна (Lpp)	Фактор распространения, обеспечивающий генерализацию инфекции; протеаза, определяющая фибринолитическую (37 °C) и плазмокоагуляционную (28 °C) активность чумного микроба; посттрансляционный гидролиз Yop белков; гидролиз катионных антимикробных пептидов дыхательных путей; адгезивная и инвазивная активность	+	+	+***
Липопротеин NlpD	Совместно с ЛПС индуцирует эндотоксический шок	–	–	+
pH6-антиген (PsaA)	Фактор распространения, обеспечивающий генерализацию инфекции	+	–	–
Капсульный антиген "фракция I" (FI, F1; CafI) (кодируется плазмидой pFra)	Противодействие фагоцитозу; адгезивная активность	+	+	+
Ail	Противодействие фагоцитозу; адгезивная активность; защита от катионных антимикробных пептидов дыхательных путей	+	+	+
"Мышиный токсин" (Tox, Ymt) (кодируется плазмидой pFra)	Адгезивная активность; устойчивость к бактерицидному действию комплемента сыворотки	–	+	–
ЛПС	Развитие токсического шока (у мышей и крыс); потенцирование эндотоксического шока у млекопитающих	–	–	+
	Развитие эндотоксического шока; устойчивость к бактерицидному действию антимикробных катионных пептидов и комплемента сыворотки; адгезивная активность; обеспечение энзиматически активного фолдинга молекулы Pla	+	–	–
Факторы, ответственные за питание бактерии, и гены "домашнего хозяйства"				
Синтез и транспорт сидерофора –иерсиниабактина	Сидерофорзависимая система транспорта в бактериальную клетку железа	+	–	–
Сорбция гемина (hemin storage –Hms)	Сорбция гемина на поверхности бактериальных клеток	–	–	+
Ферменты биосинтеза пуринов	De novo синтез пуринов	+	–	–
Dam	Метилирование аденина ДНК	–	+	–
Двухкомпонентная регуляторная система PhoP/Q	Активация устойчивости бактерий к факторам врожденного иммунитета	–	–	±

Примечание. \*Нд – нет данных; \*\* – замена в клетках *Y. pestis* собственного эффекторного белка YopJ, характеризующегося сниженной способностью к транслокации в эукариотические клетки, на функционально полноценный гомолог YopP из *Y. enterocolitica* приводит к образованию клеток чумного микроба, цитотоксичных в отношении макрофагов и снижающих вирулентность при подкожном заражении на 7 порядков; \*\*\* – несколько знаков + или знак ± свидетельствуют о противоречивых данных, полученных различными группами исследователей.

Как было отмечено выше, возбудитель чумы циркулирует в популяциях грызунов и/или лагоморфов и передается через укусы паразитирующих на них блох [17, 76, 155]. Менее 10 бактерий *Y. pestis* достаточно для смертельной инфекции у грызунов и приматов при внутрикожном, подкожном или внутривенном заражении [3, 17, 31, 112]. Кроме того, возможно заражение при поедании трупов/мяса погибших от чумы животных [2, 17, 50, 112] и/или вдыхании аэрозолзированных выделений больных с легочной формой инфекции [2, 17, 64, 112]. Величины  $LD_{50}$  при аэрозольном и алиментарном заражении возрастают до  $10^2$ – $10^4$  и  $10^5$ – $10^9$  бактериальных клеток соответственно [3, 17, 33, 50, 56].

В зависимости от стадии существования в организме пойкилотермной блохи или теплокровного млекопитающего на *Y. pestis* действуют внешние сигналы, прежде всего температура экологической ниши [2], определяющие спектр экспрессирующихся в данный момент генов и соответственно антигенный состав, характерный для векторной и/или гостальной фазы существования бактерии [72, 102]. Так, при температуре 21–28°C, свойственной условиям пребывания *Y. pestis* в пищеварительном тракте блохи, в клетках чумного микроба синтезируется гексаацильный липополисахарид (ЛПС) с 6 жирнокислотными остатками [86], являющийся мощным индуктором системы врожденного иммунитета млекопитающих [12, 82] за счет распознавания и связывания Toll-подобным рецептором 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)–MD2–CD14 [100, 101].

Сразу после укуса инфицированной блохи и проникновения *Y. pestis* в организм теплокровного хозяина бактерии с гексаацильным ЛПС распознаются рецепторным комплексом TLR4–MD2–CD14 [100, 101], легко фагоцитируются и гибнут в нейтрофилах [52] (а при первичной легочной чуме – в  $D11c^+$ -клетках легких [40]), но выживают и размножаются в макрофагах [52]. Чумной микроб размножается в фаголизосомах макрофагов [134], содержимое которых характеризуется низкими значениями pH, а также значительным содержанием реактивных форм кислорода и азота, антимикробных пептидов и протеаз [115], вероятно, за счет способности *Y. pestis* нейтрализовывать низкие значения pH фаголизосомы [116]. Показано, что *Y. pestis* способна ингибировать и продукцию окиси азота [115]. Установлено, что для выживания иерсиний в макрофагах необходимо функционирование плейотропной регуляторной двухкомпонентной системы грамотрицательных бактерий PhoP/PhoQ. В экспериментах с использованием *phoP*-мутантов *Y. pestis in vitro* показано, что система PhoP/PhoQ необходима для существования в условиях низких значений pH, окислительного стресса и низкого содержания  $Mg^{2+}$  [109]. Оказалось, что нокаутные мутанты *Y. pestis* по гену *phoP* [77], регулирующему и оперон *arn* (*pmrHFIJLM*), отвечающий за присоединение катионного моносахарида 4-амино-4-дезоксид-арабинозы (Ara4N) к фосфатным группам липида А ЛПС, или по гену *arnT* (*pmrK*) [11, 85], кодирующему Ara4N-трансферазу, чувствительны к катионным антимикробным пептидам.

Позднее было показано, что *Y. pestis* размножается не только в макрофагах ( $CD11b^+/CD11c^-$ ), но и в ден-

дритных клетках ( $CD11c^+/CD11b^-$ ), а также в моноцитах ( $Gr-1^+$ ) [95]. Оказалось, что активатор плазминогена Pla *Y. pestis* взаимодействует с используемым для захвата и презентации антигенов лектиновым рецептором типа C – DEC-205 ( $CD205$ ), присутствующим на поверхности макрофагов и дендритных клеток. Любые нарушения образования комплекса Pla-DEC-205 снижали степень диссеминации клеток *Y. pestis* в организме мышей [162]. Таким образом, повышенная при температуре теплокровного хозяина продукция и удельная активность активатора плазминогена Pla [94] – основного фактора распространения чумного микроба [132] – способствуют проникновению бактерий, расположенных внутри антигенпрезентирующих клеток хозяина, с током лимфы из места укуса блохи в регионарные лимфатические узлы. Кроме того, Pla, гидролизуя плазминоген хозяина, переводит его в плазмин, результатом чего являются неконтролируемый протеолиз и повреждение тканей макроорганизма, способствующее дальнейшей диссеминации *Y. pestis* [88, 89]. Проникнув в регионарный лимфатический узел, микроб продолжает размножаться, вызывая воспалительный процесс, захватывающий все соседние лимфатические узлы и прилегающую к ним подкожную клетчатку.

Для последующего этапа уже внеклеточной диссеминации возбудитель чумы должен противостоять таким компонентам иммунной системы, как захват профессиональными фагоцитами, секреция цитокинов и комплементопосредованный лизис бактерий. В ходе размножения в макрофагах при температуре 37°C и выше у *Y. pestis* начинает функционировать вирулон Yop, а затем синтезируются F1- и рН6-антигены (см. таблицу), обеспечивающие бактерии после выхода из разрушенных макрофагов устойчивостью к поглощению любыми типами фагоцитарных клеток [52, 55, 78, 147]. Синтез V-антигена угнетает врожденный иммунитет за счет стимуляции синтеза интерлейкина-10 (ИЛ-10), противовоспалительного цитокина, подавляющего синтез  $\gamma$ -интерферона и фактора некроза опухоли  $\alpha$ , участвующих в индукции воспалительного процесса [45]. Было показано, что полное удаление ИЛ-10 из организма лабораторных животных (в результате мутации или применения моноклональных антител к ИЛ-10), зараженных *Y. pestis*, приводило к повышению устойчивости к заражению [113].

Кроме того, при температуре 37°C и выше у *Y. pestis* происходит синтез тетраацильного ЛПС [86], который в отличие от гексаацильного не распознается рецепторным комплексом TLR4–MD2–CD14 [101], в результате клетки возбудителя чумы начинают уже неконтролируемое организмом хозяина размножение [52]. Если инфекционный процесс не останавливается в стадии бубонной формы заболевания, развивается вторичная септицемия, сопровождающаяся проникновением чумного микроба в другие органы [31, 112].

При первичной септической форме заболевания после укуса блохи бактерии сразу попадают в кровь, минуя лимфатическую систему и проходя этап первоначального размножения в макрофагах непосредственно в кровяном русле [128]. Повышенный при температуре 37°C и выше синтез непицевого адгезина Ail из семейства Ail/Lom-белков внешних мем-