

Микробиология возбудителя ЧУМЫ

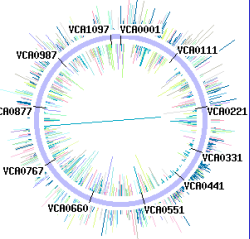
(лекция 2)

Кутырев Владимир Викторович

член-корреспондент РАМН

доктор медицинских наук, профессор

РосНИПЧИ «Микроб», Саратов



Секвенирование геномов возбудителей особо опасных бактериальных инфекций I-II групп патогенности

К 2004 г. - расшифровано ~ 130 бактериальных геномов:

Yersinia pestis

Vibrio cholerae (chromosome I и chromosome II)

Bacillus anthracis

Brucella (chromosome I и chromosome II)

Burkholderia pseudomallei

Burkholderia mallei

Francisella tularensis



Геном *Yersinia pestis*

- **1980 г.** – открытие трех плазмид
- **2001 г.** – полная последовательность генома (штамм CO92, J.Parkhill et al., 2001)* :
хромосома – 4,65Mb (4,653,728 bp)
плазмиды: **pPst (pYP)** – 9,6 kb (вид)
pCad (pYV) – 70,3 kb (род)
pFra (pYT) - 96,2 kb (вид)

* 2002 г. - штамм KIM (W.Deng et al., 2002)

Общие свойства генома

(штамм *Y.pestis* CO92)

| | Хр-ма | pPst | pCad | pFra |
|--|----------------|---------------|---------------|---------------|
| Число копий | | 186 | 4,3 | 1,8 |
| Общий размер (п.н.) | 4653728 | 9612 | 70305 | 92210 |
| Содержание ГЦ | 47,64% | 45,27% | 44,84% | 50,23% |
| Кодирующие последователь- ности | 4012 | 9 | 97 | 103 |
| Псевдогены | 149 | 0 | 8 | 3 |
| Плотность кодирования | 83,8% | 57,2% | 81,4% | 86,8% |
| Средний размер генов (п.н.) | 998 | 611 | 643 | 834 |

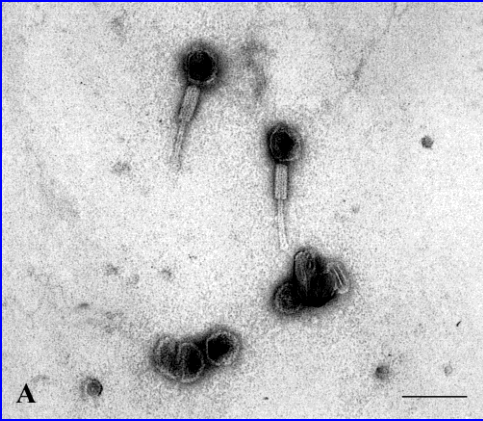
ОСОБЕННОСТИ ГЕНОМА ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ



- Выявление особенностей генома стало возможным после секвенирования генома двух вирулентных штаммов *Y.pestis* (CO92 биовар Orientalis и KM10 биовара Medievalis) и одного авирулентного для человека штамма (91001 биовара Microtus?)

- Наличие трех плазмид вирулентности (pCad, pFra, pPst)
- Присутствие островов патогенности
- Наличие большого числа IS элементов (140, что составляет 3,7% генома)
- Нестабильность генома, обусловленная образованием IS элементами делеции и протяженных инверсий
- Редукция генома *Y.pestis*. В его в хромосоме необычайно высока (149) для бактерий доля псевдогенов – остатков «нейтрализованных» мутациями, но еще не элиминированных генов, которые не нужны для жизненного цикла этого возбудителя

Бактериофагия у *Yersinia pestis*



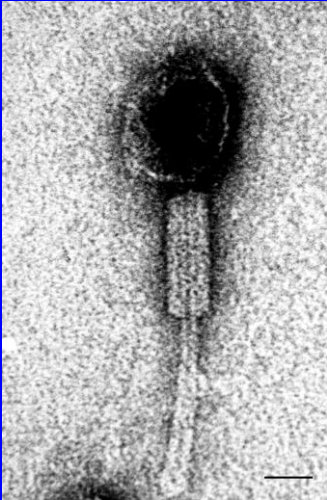
Практически каждый известный в настоящее время вид бактерий является хозяином для одного или нескольких вирусов (бактериофагов)



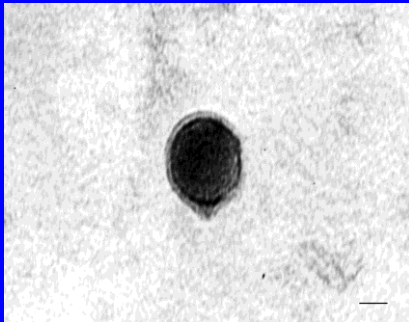
Значение бактериофагии для *Yersinia pestis*

- фундаментальное - эволюция вида
- экспериментальное - инструмент генетического анализа
- медицинское - диагностика

Диагностические бактериофаги

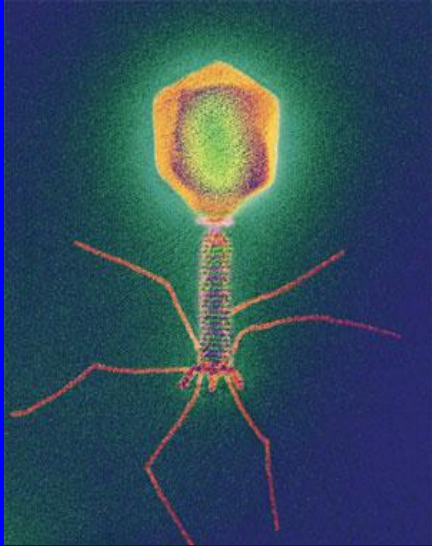


- Д`Эррель (1920) – чумной бактериофаг
- М.П. Покровская (1929) – чумной фаг Покровской
- В.С. Ларина (1970) – фаг Л413 «С» (чумной)



- Д`Эррель (1920) – фаг псевдотуберкулезный

Диагностическое значение



На всех этапах бактериологического анализа специфичность выделяемой культуры *Y. pestis* должна быть подтверждена положительной пробой с чумным бактериофагом

Коммерческие бактериофаги:

- чумной фаг Покровской – высокоспецифичен для *Y. pestis*, но лизирует до 25% штаммов *Y. pseudotuberculosis*, что требует определения ДРТФ
- чумной фаг Л413 «С» - видоспецифичен

Широкое распространение явления бактериофагии у *Y. pestis* обуславливает необходимость применения антифаговой сыворотки при выделении чистых культур при исследовании материала в природном очаге

Бактериоциногенция -

генетический признак, сохраняющийся как потенциальное свойство, проявление которого оказывается летальным для клетки

Бактериоцины — вещества белковой природы, угнетающие рост чувствительных к ним бактерий этого же вида или рода

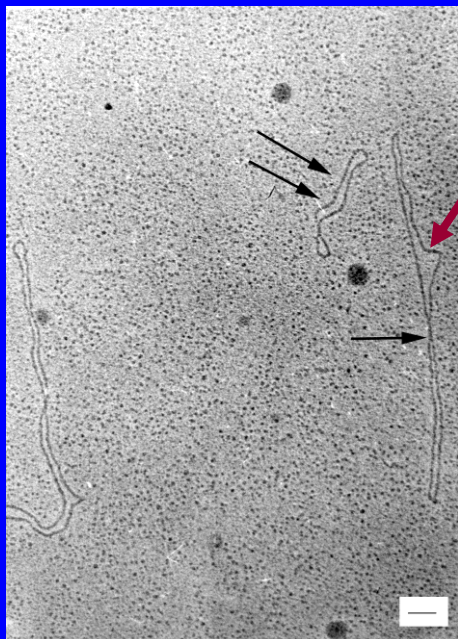
Пестицин

- R. Ben-Gurion (1958)
- Пестицин (*Pst*) – видовой бактериоцин (исключение штаммы кавказского подвида)
- Штаммы *Y. pestis*, продуцирующие пестицин, резистентны к нему
- Индикаторы пестицина: штаммы *Y. pseudotuberculosis* (I серовара), апестициногенные штаммы *Y. pestis*, сохранившие хромосомный ген *psn*

Свойства пестицина

- Полипептид с м.м. 43 Кд, состоит из 17 аминокислот
- Две (а и в) биологически активные конформации, третья (гамма) не активна
- N-ацетилглюкозаминидазная активность – нарушение синтеза бактериальной стенки (образование сферопластов)

Генетическая природа синтеза пестицина



- Плазмида **pPst/pPYP** (9,6 kb) несет 9 кодирующих последовательностей (псевдогенов 0):
 - pst** – пестицина (43 kd)
 - imm** – иммунности к пестицину (13 kd)
 - pla** – активатора плазминогена (34-37 kd) [фибринолитическая (37С) и плазмокоагулирующая (28С и ниже) активности]
- ген **psn** хромосомной области пигментации (Pgm) кодирует рецептор пестицина

АНТИГЕНЫ *Yersinia pestis*

Немного истории...

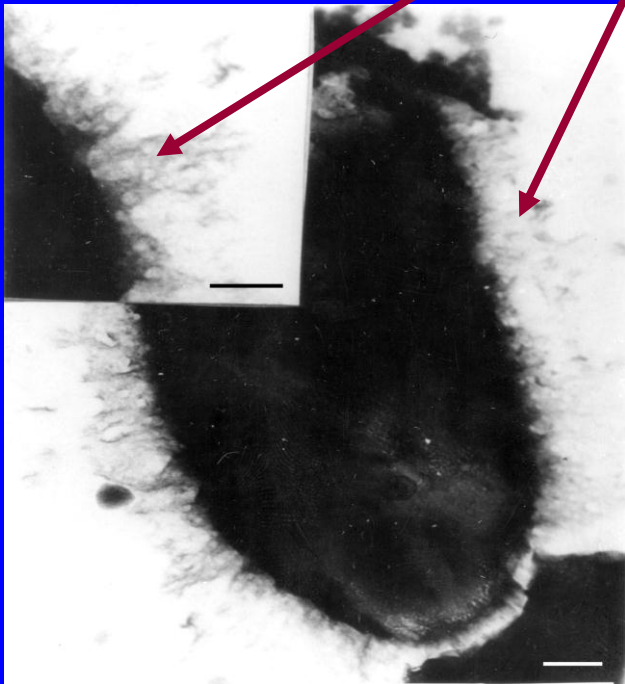
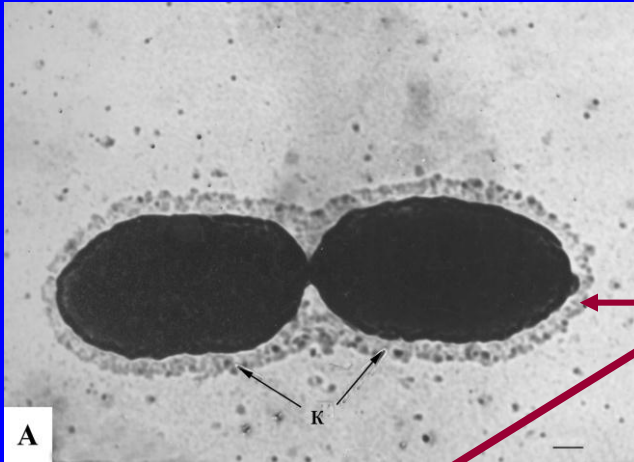
Изучение антигенной структуры началось практически с момента открытия возбудителя

- Schutze (1932) – капсульный и R-соматический АГ
- Н.Н.Жуков-Вережников (1940) – дополнительно: поверхностные соматические АГ и токсины
- Baker (1947,1952) – впервые выделил капсульный АГ (фракция I) и мышиный токсин (фракция II)
- Lawton (1960) – обнаружил 16 АГ, из которых 11 АГ перекрестных с *Y.pseudotuberculosis*
- В.И.Вейнблат (1974) – обнаружил около 100 АГ

Видоспецифичные антигены

- Капсульный антиген – фракция I (FraI)
- Мышиный токсин - Тох (Ymt)
- Активатор плазминогена – Пла
- Пестицин - Pst

Капсульный антиген – Fra (I)

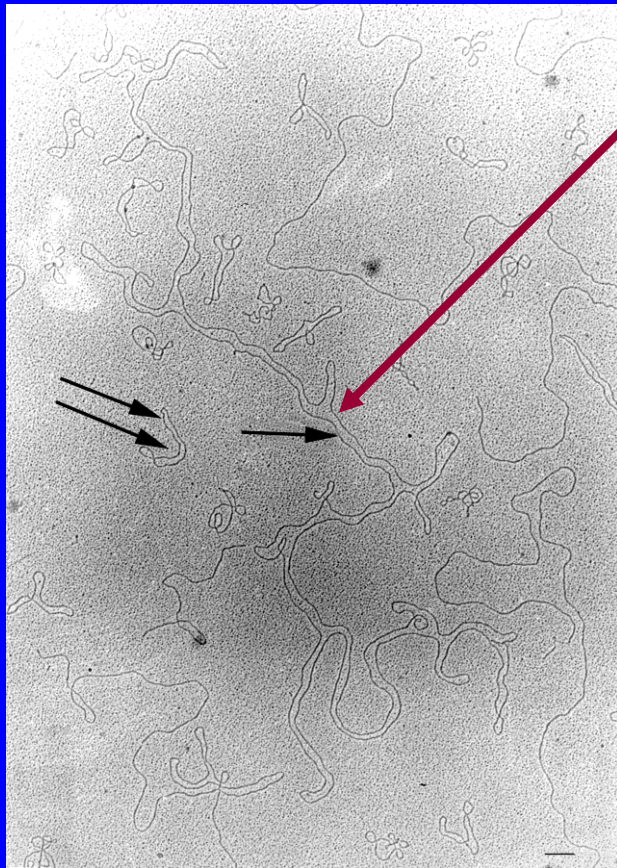


- Видоспецифичный капсульный антиген (Fra) синтезируется клетками *Y. pestis* in vivo и in vitro при t 37C
- Образует вокруг клетки полимерную капсулу или оболочку (м.м. до 2 Mda)
- Практически вся серологическая диагностика *Y. pestis* направлена на выявление АГ Fra или АТ к нему, а определение структурного *cap*-гена – в генной диагностике
- Основной видовой иммуноген
- Недостатки: не выявляется у клеток, выращенных при низких температурах, и у бескапсульных штаммов

Мышиный токсин – Тох (Ymt)

- видоспецифичный антиген со свойствами эндо- и экзотоксина
- синтезируется при $t \leq 28^\circ\text{C}$ и ниже
- имеет белковую природу (м.м. 120-240 kd)
- обладает фосфолипазной и, вероятно, рядом других активностей
- токсичен для мышей и крыс, но не для морских свинок, кроликов, собак, обезьян
- определяет способность возбудителя приживаться в переносчике
- для диагностики практически не используется

Генетическая природа синтеза капсульного антигена и мышинового токсина



- **Плазмида pFra/pYt** (90-110 kb) несет 103 кодирующих последовательности (3 псевдогена), в т.ч. гены синтеза **Fra** и **Ymt**:
- 4 гена **caf-оперона** участвуют в синтезе капсулы (**Fra**):
 - caf1** – субъединица 15,5 kd
 - caf1M** – «шаперон» 28,7 kd
 - caf1A** – «ашер» 93,2 kd
 - caf1R** – 30 kd позитивный активатор
- **ymt** – субъединица 61 kd

Пестицин и активатор плазминогена

Пестицин (Pst, 43кДа):

- синтезируется при t 28С
- не связан с клеточной стенкой
- в серологической диагностике не используется

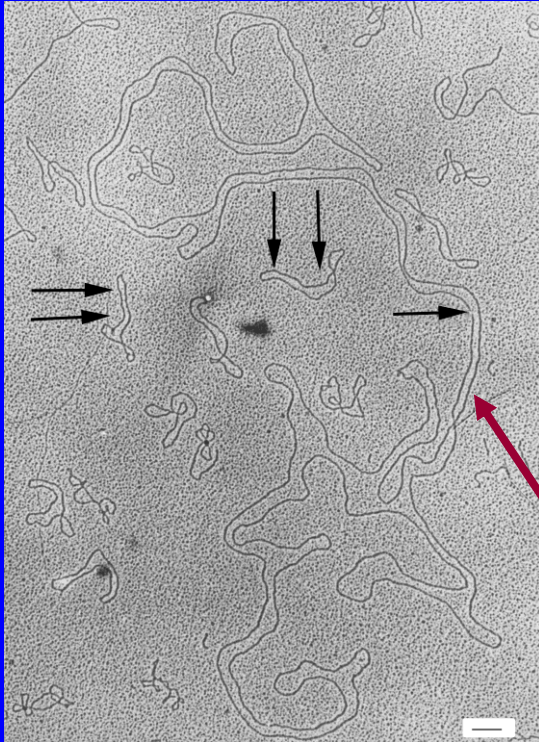
Активатор плазминогена (Pla, 34-37кДа):

- Синтезируется при 37С – фибринолитическая активность, при 28С и ниже – коагулазная
- Белок (ки) внешней мембраны клеточной стенки
- Используется в серологической диагностике (ИДЧЛ) и в генной диагностике (ген pla)

Основные родоспецифичные антигены

- **V антиген** – антиген вирулентности
- **ЛПС** – липополисахарид
- **рН6 –антиген**

V антиген

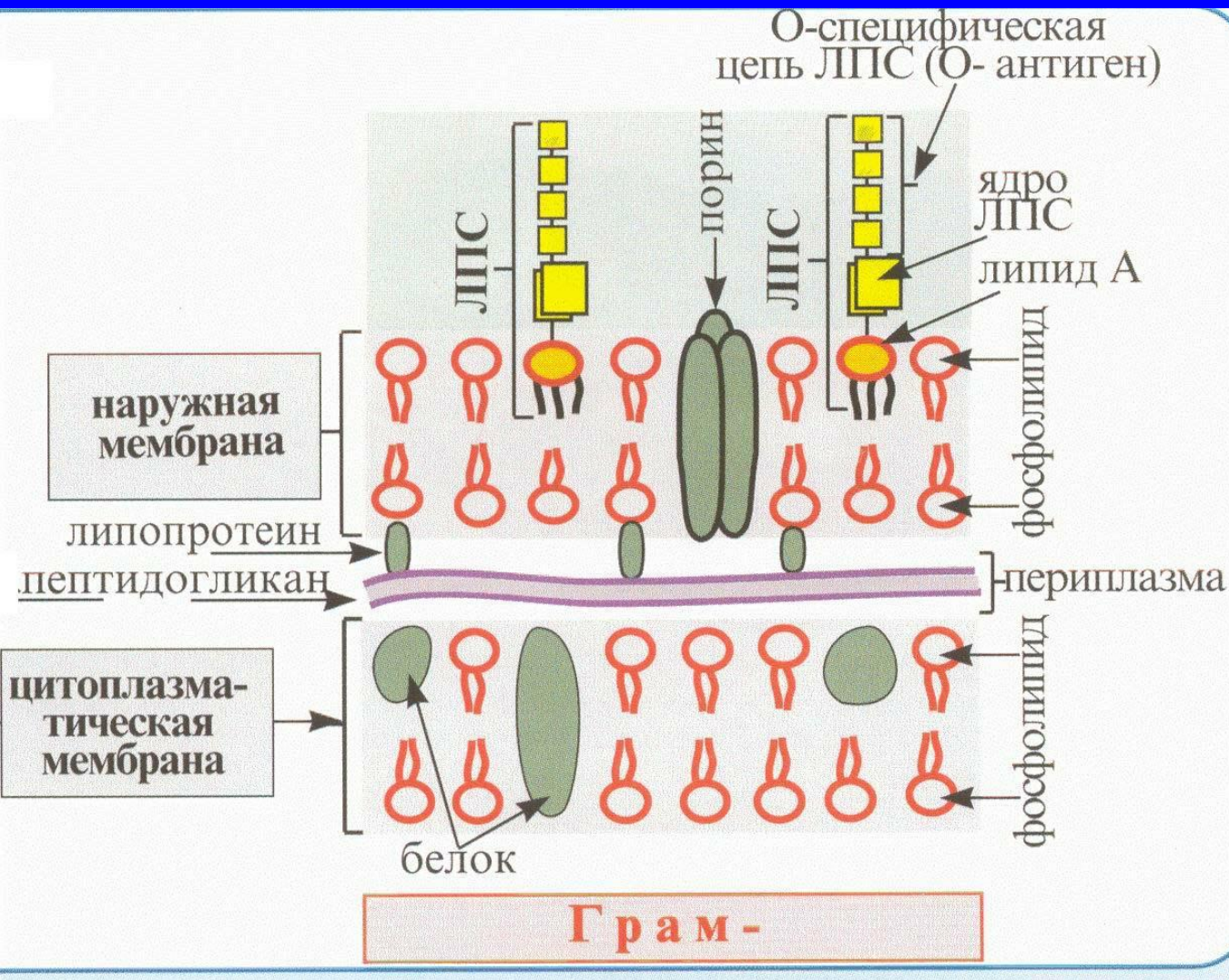


- Обнаружен у вирулентных штаммов трех видов патогенных иерсиний (Burrows, Bacon, 1956)
- *In vitro* синтезируется при 37С в условиях дефицита ионов Са
- Полипептид м.м. 37,3 kd с полифункциональной активностью (регуляторной, супрессорной, эффекторной)
- Генетическая природа:
плазмида pCad/pYV 70-75 kb
ген *lcrV* – синтез белка 37,3 kd
YOP-вирулон

Липополисахарид (ЛПС)

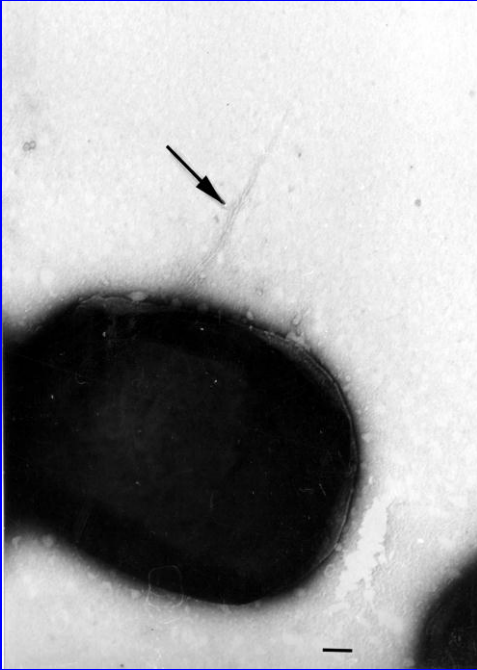
- Строение ЛПС у *Y. pestis* определяет его R форму
- ЛПС – R-соматический антиген (R-гликолипид) с выраженной функцией термостабильного эндотоксина (ядро ЛПС + липид А)
- ОСА – основной соматический антиген с выраженными иммуногенными свойствами (дефектная O-боковая цепь ЛПС ?)

Липополисахарид (ЛПС)



- 5 псевдогенов в кластере хромосомных генов, кодирующих биосинтез ЛПС *Y.pestis*
- нарушен синтез О-боковой цепи ЛПС

рН6 антиген



- **рН6 антиген** – антиген 4, L антиген, пили адгезии – функция адгезии
- Синтез фимбрий *in vitro* при t 37С, рН 6,0 и дефиците ионов Са
- Полипептид м.м. 15 kd
- **Генетическая природа** - хромосомный оперон **psa**:

psaA – полипептид 15 kd
(субъединица)

psaB – 30,6 kd «шаперон»

psaE – транскрипционный регулятор
psaA

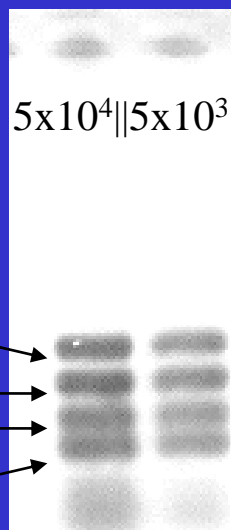
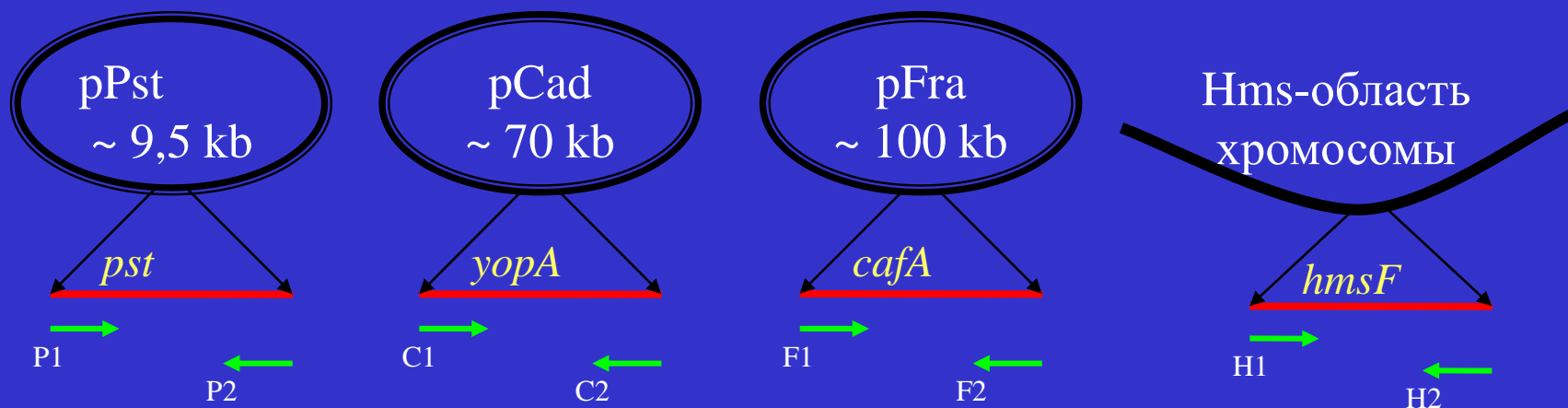


Лабораторная диагностика *Y. pestis*

- микробиологические исследования -
микроскопия (световая и люминесцентная)
культуральные методы, исследования
основных свойств, включая заражение
биопроб
- иммунодиагностика (серология и
иммуноферментный анализ)
- генная диагностика

Мультилокусная ПЦР-тест-система для выявления и характеристики штаммов возбудителя чумы

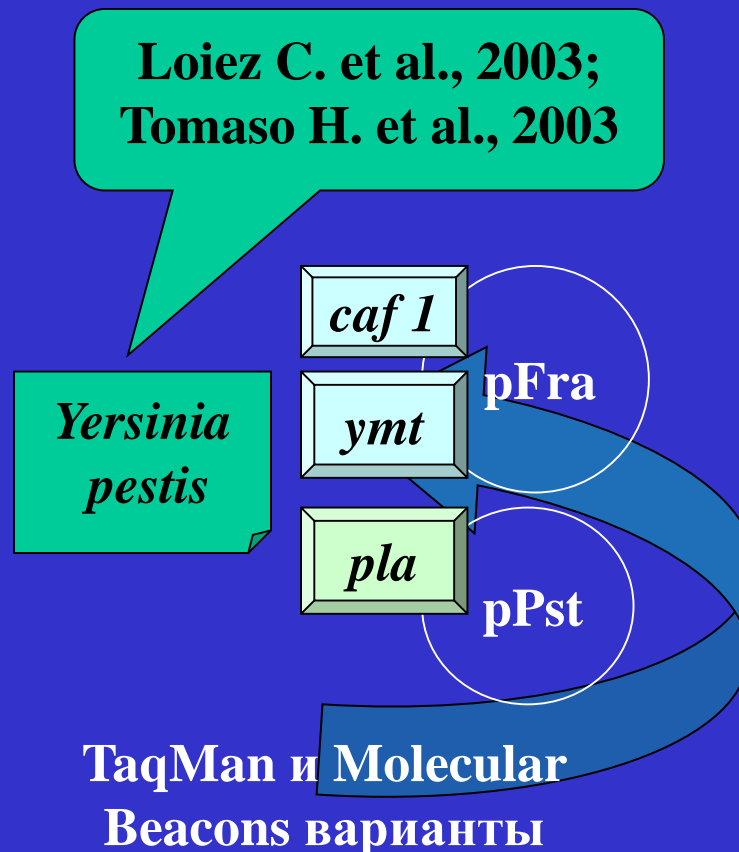
(РосНИПЧИ «Микроб»)



P1-P2 – 304 п.н.
F1-F2 – 219 п.н.
C1-C2 – 151 п.н.
H1-H2 – 100 п.н.

ПЦР-тест-система позволяет выявлять штаммы чумного микроба с чувствительностью 5×10^3 м.к./мл и определять их эпидзначимость по наличию генов, ассоциированных с вирулентностью *Y. pestis*

Применение ПЦР в режиме реального времени для выявления ДНК возбудителя чумы



здравоохранения

Российский научно-исследовательский противочумный
институт «Микроб»

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной
службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей
и благополучия человека
Главный государственный
санитарный врач
Российской

Федерации Г.Г. Онищенко

12 декабря 2007 г.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Практическое руководство

Под редакцией академика РАМН профессора Г.Г.
Онищенко,
член-корреспондента РАМН профессора В.В.
Кутырева

Благодарю за внимание !