

УДК 616-002.5-615.371

Вирулентность *Mycobacterium bovis*-BCG (обзор литературы)

Б.И. Вишнеvский

Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии

Virulence of *Mycobacterium bovis*-BCG (review)

B. Vishnevskiy

St. Petersburg Research Institute of Phthisopulmonology

© Б.И. Вишнеvский, 2018 г.

Резюме

Изложена краткая история создания вакцины БЦЖ как искусственно созданного мутанта вирулентного штамма *M. bovis*. Показано, что в основе модификации БЦЖ находится утрата вследствие многократного пассирования на неблагоприятной питательной среде многочисленных генетических факторов вирулентности. В частности, один из основных факторов вирулентности патогенных микобактерий видовой регион различия RD1 отсутствует у всех субштаммов БЦЖ. Имеющиеся поствакцинальные осложнения объясняются остаточной вирулентностью вакцины, так же как и особенностями иммунитета человеческого макроорганизма. Для объяснения остаточной вирулентности вакцины большое значение имеет открытие L-трансформации БЦЖ в организме вакцинированных детей (Шмелев Н.А., Дорожкова И.Р., Земскова З.С., 1976), которая позволяет L-формам длительно персистировать в лимфоузлах, но при неблагоприятных для макроорганизма условиях реверсировать в клеточные формы и вызывать поствакцинальные осложнения различной тяжести.

Ключевые слова: БЦЖ искусственный мутант *M. bovis*, осложнения вакцинации, утрата факторов

вирулентности, остаточная вирулентность, L-трансформация БЦЖ

Summary

The short history of creation of BCG vaccine as artificially created mutant of the virulent strain of *M. bovis* is stated. It is shown that the base of modification of BCG is a loss of numerous genetic factors of virulence owing to repeated passaging on an adverse medium. In particular, one of major factors of virulence of pathogenic micobacteria the specific region of difference of RD1 is absent at all substrains of BCG. Existent postvaccinal complications are explained by residual virulence of vaccine, also as well as special features of immunity of a human macroorganism. For the explanation of the residual virulence of vaccine the great importance has the discovery of L-transformation of BCG in an organism of the vaccinated children (N.A. Shmelyov, I.R. Dorozhkova, H. S. Zemskova, 1976) which allows the long persistence of L-forms in lymph nodes, but under adverse conditions for a macroorganism L-forms can reverse in cellular forms and cause postvaccinal complications of various gravity.

Keywords: BCG artificial mutant *M. bovis*, vaccination complications, loss of virulence factors, residual

Вакцина *M. bovis*-BCG (БЦЖ) была создана французскими микробиологами А. Кальметтом и К. Гереном из вирулентного штамма микобактерий туберку-

леза (МБТ) бычьего вида путем длительного пересева (230 последовательных пассажей в течение 13-летнего периода 1909–1921 гг.) на неблагоприятной для

роста МБТ картофельной среде с добавлением глицерина и бычьей желчи. Авторы начали пассажи штамма в 1908 г. Они установили, что через 4 года штамм потерял вирулентность для рогатого скота и морской свинки, а через 13 лет (после 230-й генерации) и для других животных (кролика и обезьяны). Вместе с тем подопытные животные стали резистентными к последующему заражению МБТ [1].

Все существующие ныне вакцинные штаммы имеют происхождение от первоначального изолята *M. bovis*, который Кальметт и Герен пассировали через многочисленные циклы. Существует большое число штаммов БЦЖ, хотя на французский пастеровский штамм 1173 Р2, датский штамм 1331, штамм фирмы «Глаксо» 1077 и токийский штамм 172 приходится около 90% вакцинаций БЦЖ в мире. В России производство собственной вакцины БЦЖ из французского пастеровского штамма 1173 Р2 налажено А.И. Тогуновой в 1921 г. В плане эффективности ни один штамм БЦЖ не обладает явными преимуществами перед другими штаммами и не существует глобального консенсуса относительно того, какой штамм БЦЖ является оптимальным для общего использования [2].

Вакцина БЦЖ обладает так называемой остаточной вирулентностью, которая позволяет персистировать в организме человека, вегетировать главным образом в лимфатических узлах, вызывая ограниченные специфические морфологические изменения с последующим их рассасыванием и сохранением повышенной резистентности к вирулентной туберкулезной инфекции [1, 2]. Для лучшего понимания остаточной вирулентности БЦЖ большое значение имеет открытие L-трансформации БЦЖ в организме вакцинированных детей (Шмелев Н.А., Дорожкова И.Р., Земскова З.С. «L-трансформация *Mycobacterium bovis*-BCG», Диплом на открытие № 180, 1976). При сохранении поствакцинальной аллергии клеточные формы БЦЖ довольно быстро перестают обнаруживаться в организме. Но, как показали авторы открытия, БЦЖ в виде L-форм могут длительно персистировать в лимфоузлах, поддерживая аллергическую реакцию, а при неблагоприятных для макроорганизма условиях реверсировать в клеточные формы, вызывающие поствакцинальные осложнения различной тяжести.

Исследование вирулентности БЦЖ и ее механизмов имеет актуальное значение для изучения патогенеза поствакцинального иммунитета и уточнения ее роли в возможных осложнениях вакцинации. Кроме того, изучение факторов вирулентности БЦЖ важно для разработки новых рекомбинантных вакцин БЦЖ, но этот вопрос требует отдельного рассмотрения.

По данным ВОЗ осложнения после вакцинации БЦЖ наблюдаются редко: частота летальной диссеминации БЦЖ оценивается в 0,19–1,56 на 1 млн вакцини-

рованных лиц, и ее жертвами почти исключительно становятся непреднамеренно иммунизированные лица с тяжелыми нарушениями клеточного иммунитета. Значительные местные реакции, например, обширное местное изъязвление и регионарный лимфаденит наблюдаются у <1:1000 и в большинстве случаев (>90%) среди лиц с иммунодефицитом. Редко наблюдаются БЦЖ-оститы, причем, как правило, они были связаны с использованием определенных партий вакцины [3].

В России общее количество осложнений после вакцинации БЦЖ, по данным литературы, составляет 0,02–1,2%, после ревакцинации 0,003% [4]. В той же публикации проведен анализ поствакцинальных осложнений в Северо-Западном регионе РФ. В структуре осложнений основное место (68,2%) занимали БЦЖ-лимфадениты, осложнения со стороны костно-суставной системы наблюдались в 18,2% случаев.

Всемирная организация здравоохранения относит негенерализованные БЦЖ-ассоциированные костные осложнения к поствакцинальным осложнениям 2-й категории («проявления персистирующей БЦЖ-инфекции без летального исхода»), при этом большинство (почти 90%) из них составляют локальные очаговые формы (оститы) [5].

В этом плане очень важна дифференциальная диагностика костно-суставного туберкулеза и БЦЖ-оститов у детей, поскольку установка того или иного диагноза требует различного подхода к противоэпидемическим мероприятиям, юридическим и материально-правовым действиям.

Вирулентность инфекционного агента в конечном итоге является результатом взаимодействия микро- и макроорганизма. Помимо известного факта, что тяжелые поствакцинальные осложнения в большинстве встречаются у лиц с иммунодефицитом [4], в течении БЦЖ-инфекции существенное значение имеет NADPH оксидаза — мультикомплексный фермент, участвующий в миграции эндотелиальных клеток, — которая играет ключевую роль в процессе восстановления тканей при повреждениях, ангиогенезе и заживлении ран. В экспериментах на мышах показано, что недостаток NADPH оксидазы приводит к заметному утяжелению БЦЖ-инфекции [6].

Говоря о вирулентности микобактерий туберкулезного комплекса (МТС), в который входит и БЦЖ, следует иметь в виду, что МТС отличаются высокочерезвычайно последовательности генома (сходство >99%), но имеют резко различные фенотипы [7]. Хотя была показана генетическая стабильность субштаммов БЦЖ в сравнении с исходной вакциной, полученной Кальметтом и Гереном [8], было обнаружено, что во время распространения в 22 регионах субштаммов БЦЖ в период 1924–1966 гг. были утрачены 52 гена.

Генетическими различиями из-за давления отбора и выявления микроэволюционных специфических признаков можно объяснить изменчивость в иммуногенности и остаточной вирулентности каждой вакцины субштаммов БЦЖ [9].

Известно, что большую роль в реализации вирулентности МБТ играют миколовые кислоты, их производные и другие липиды стенки микобактерий [10], в частности широко известный «корд-фактор», который отсутствует у БЦЖ [11].

Существенным отличием БЦЖ от *M. tuberculosis* является также отсутствие гомологов гена *Rv0394c*, кодирующего белок со свойствами гиалуронидазы и хондросульфатазы, которые обеспечивают инвазию вирулентных микобактерий в клетки макроорганизма-хозяина [12].

Помимо миколовых кислот и их производных, а также прочих липидов, существуют другие системы, позволяющие микобактериям колонизировать организм хозяина и сосуществовать с ним.

Мутанты с нарушениями в этих системах в той или иной мере теряют вирулентность [13]. Первым эмпирически полученным мутантом был штамм БЦЖ с ослабленной вирулентностью. В то время генетики микобактерий еще не существовало, и причины модификации БЦЖ были выяснены только через 70 лет. Выяснилось, что различные линии БЦЖ отличались по структуре генома от исходного штамма по определенным участкам. Одна из таких основных для вирулентности областей различия (RD1, region of difference) отсутствовала у всех линий БЦЖ, но имела у всех вирулентных штаммов микобактерий. В регионе различия RD1 имеется также полигенная система, получившая название ESX_системы секреции типа VII, ответственная за синтез и выход за пределы клетки низкомолекулярных белков ESAT_6/CFP_10, являющихся ключевыми факторами вирулентности [14].

Таким образом, самым важным маркером, связанным с амортизацией вирулентных *M. bovis* как родоначальника вакцины, является потеря области RD1, отсутствие которой наблюдается во всех субштаммах БЦЖ.

Более того, включение генетического региона RD1, ответственного за экспрессию низкомолекулярных белков ESAT6/CFP10 как основных факторов вирулентности МБТ в клетки БЦЖ, приводит к повышению вирулентности и иммуногенности микобактерий [15]. Характерным признаком БЦЖ является также частичная делеция секреторной системы ESX-1 типа VII, которая ингибирует слияние фагосомы и лизосомы в инфицированном макрофаге, препятствуя внутриклеточному киллингу [16].

Помимо этого, сравнительные геномные анализы выявили еще ряд регионов различия (RD) между микобактериальными видами. В частности, геномный

регион различия RD4, имеющийся в вирулентном штамме МБТ H37Rv, отсутствует в тесно связанных видах *M. bovis* и *M. bovis*-BCG. С другой стороны, обнаружено, что *M. marinum* имеет расширенный RD4, который включает ряд генов, участвующих в синтезе липоолигосахаридов. В ходе эволюции произошел постепенный распад RD4 в геномах микобактерий в порядке *M. marinum* — *M. tuberculosis* — *M. bovis* (включая *M. bovis*-BCG). Чтобы оценить влияние RD4 на микобактериальную вирулентность, был клонирован в интегрирующий вектор полный и частичный регион RD4 из *M. marinum* и введен в БЦЖ. Отмечено, что вирулентность БЦЖ с введенным полным RD4 была аналогична родительскому штамму, а с частичным — несколько ослаблена [17].

Выяснено также, что микобактериальный геномный межвидовой регион различия 2 (Region of Difference — RD 2) был потерян в ходе продолжающегося распространения БЦЖ в мире в период 1927–1931 гг. Имеются данные о том, что геномный регион RD2 играет существенную роль в микобактериальной вирулентности, и его удаление из МБТ приводит к снижению роста микобактерий в макрофагах при экспериментальном туберкулезе мышей [18].

В экспериментах на мышах, зараженных мутантным по гену *etha-ethR* штаммом БЦЖ, высказано предположение, что этот локус является новым фактором, участвующим в модуляции вирулентности микобактерий, поскольку он связан с метаболизмом миколовых кислот, способствующих микобактериальной персистенции [19]. Также в экспериментальных исследованиях на мышах было показано, что гистон-подобные белки MDP1 из БЦЖ играют важную роль в персистенции микобактериальной инфекции, снижая интенсивность репликации бактериальных клеток в человеческих макрофагах и, кроме того, влияя на уровень продукции цитокинов [20].

БЦЖ, как и некоторые другие непатогенные микобактерии, используются как модели для лучшего понимания биологии МБТ и патогенеза туберкулеза. В частности, экспериментальные модели помогают выяснить, как на молекулярном уровне функционируют секреторные системы, играющие существенную роль в вирулентности МБТ [21].

Обнаружено, что связанные с метаболизмом липидов клеточной стенки эндогенные и экзогенные бактериальные мембранные пептиды, такие как KdpF, принадлежащий к недавно открытым регуляторным бактериальным молекулам, обладают антивирулентными свойствами. Показано, что повышенная продукция KdpF, а также введение экзогенного пептида увеличивает чувствительность БЦЖ к окислительному нитрозилирующему стрессу и снижает репликацию в макрофагах вследствие нарушения формирования клеточной

стенки [22]. Таким образом, опыты на модели БЦЖ обосновывают возможность использования KdpF для снижения вирулентности патогенных микобактерий [23].

Заключение

Современные молекулярно-генетические исследования выявили причины снижения вирулентности БЦЖ, полученной Кальметтом и Гереном в результате многократного пассирования на неблагоприятной питательной среде вирулентного штамма *M. bovis*. В основе этого лежит потеря многих генетических факторов вирулентности, главным из которых является отсутствие у всех субштаммов БЦЖ видового региона различия RD1, включающего полигенную систему секреции ESX типа VII, ответственную за выход из клетки низкомолекулярных белков ESAT_6/CFP_10, являющихся ключевыми факторами вирулентности микобактерий туберкулезного комплекса. Кроме того, во время распространения в мире субштаммов БЦЖ

в период 1924–1966 гг. были утрачены еще 52 гена. Этими генетическими различиями можно объяснить изменчивость в иммуногенности и остаточной вирулентности каждой вакцины субштаммов БЦЖ. Для объяснения остаточной вирулентности вакцины большое значение имеет открытие L-трансформации БЦЖ в организме вакцинированных детей (Шмелев Н.А., Дорожкова И.Р., Земскова З.С., 1976), которая позволяет L-формам длительно персистировать в лимфоузлах, но при неблагоприятных для макроорганизма условиях реверсировать в клеточные формы и вызывать поствакцинальные осложнения различной тяжести. Адаптация к условиям макроорганизма-хозяина — это одна из обязательных сторон вирулентности микроба, и L-трансформация является идеальной формой персистенции, поскольку метаболизм L-форм резко снижен, а отсутствие клеточной стенки, а значит пептидогликана — основной мишени механизмов иммунитета, делает микроорганизм «невидимым» для факторов иммунитета.

Список литературы

1. Митинская Л.А. 80 лет применения вакцины БЦЖ // Пробл. туб. 2001. № 1. С. 53–55. *Mitinskaya L.A. 80 let primeneniya vakciny BCZH // Probl. tub. 2001. N 1. S. 53–55.*
2. Вишневецкий Б.И., Маничева О.А., Яблонский П.К. Вирулентность *Mycobacterium tuberculosis* // Инфекция и иммунитет. 2014. Т. 4, № 4. С. 319–330. *Vishnevskij B.I., Manicheva O.A., Jablonskiy P.K. Virulentnost' Mycobacterium tuberculosis // Infekcija i immunitet. 2014. T. 4, N 4. S. 319–330.*
3. Позиция ВОЗ в отношении вакцин БЦЖ (январь 2004). WHO position concerning the BCG vaccine (January 2004). www.who.int/immunization/documents/vaccinepositionpapers/ru.
4. Исаева Н.Ю., Гудырева В.А., Стариков В.А. и др. Осложнения вакцинации BCG — современный взгляд на проблему // Медицинский альянс. 2014. № 2. С. 19–26. *Isaeva N.U., Gudyreva V.A., Staricov V.A. et al. Oslozhneniya vakcinacii BCG — sovremennij vzglyad na problemu // Meditsinskiy alyans. 2014. N 2. S. 19–26.*
5. Мушкин А.Ю., Першин А.А., Советова Н.А. Туберкулез костей и суставов у детей: алгоритмирование диагностики и принципы лечения // Медицинский альянс. 2015. № 4. С. 36–45. *Mushkin A.U., Pershin A.A., Sovetova N.A. Tuberkulez kostej i sustavov u detej: algoritmirovaniye diagnostiki i principy lecheniya // Meditsinskiy alyans. 2015. N 4. S. 36–45.*
6. Deffert C., Schäppi M.G., Pache J.C. et al. Bacillus calmette-guerin infection in NADPH oxidase deficiency: defective mycobacterial sequestration and granuloma formation // *PLoS Pathog.* 2014. Sep. 4. T. 10 (9). e1004325. doi: 10.1371/journal.ppat.1004325. eCollection 2014.
7. The Bioinformatics Analysis of Comparative Genomics of *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MTBC) Provides Insight into Dissimilarities between Intraspecific Groups Differing in Host Association, Virulence, and Epitope Diversity // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017. Mar. 21, T. 7, N 88. doi: 10.3389/fcimb.2017.00088. eCollection 2017.
8. Trovero A., Argüelles C., Cataldi A. Preparation of a working seed lot of BCG and quality control by PCR genotyping // *Rev. Argent. Microbiol.* 2010. Jan.-Feb. Vol. 42 (1). P. 4–10. doi: 10.1590/S0325-75412010000100002.
9. Krysztopa-Grzybowska K., Lutyńska A. Microevolution of BCG sub-strains // *Postepy Hig. Med. Dosw.* (Online). 2016. Dec. 21. Vol. 70. P. 1259–1266.
10. Forrellad M.A., Klepp L.I., Gioffré A. et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex // *Virulence.* 2013. Vol. 4, N 1. P. 3–66.
11. Rajni Rao N., Meena L.S. Biosynthesis and Virulent Behavior of Lipids Produced by *Mycobacterium tuberculosis*: LAM and Cord Factor: An Overview // *Biotechnol. Res. Int.* 2011. Vol. 2011. P. 274693. doi: 10.4061/2011/274693.
12. Yuan X., Chen L., Deng X. et al. Characterization of Rv0394c gene encoding hyaluronidase and chondrosulfatase from *Mycobacterium tuberculosis* // *Tuberculosis.* 2013. Vol. 93, N 3. P. 296–300.
13. Прозоров А.А., Федорова И.А., Беккер О.Б., Даниленко В.Н. Факторы вирулентности *Mycobacterium tuberculosis*: генетический контроль, новые концепции // *Генетика.* 2014. Т. 50, № 8. С. 885–908. *Prozorov A.A., Fedorova I.A., Bekker O.B., Danilenko V.N. Faktory virulentnosti Mycobacterium tuberculosis: geneticheskij kontrol', novye koncepcii // Genetika. 2014. Vol. 50, N 8. P. 885–908.*
14. Champion P., Cox I.S. Protein secretion system in mycobacteria // *Cell Microbiol.* 2007. Vol. 9, N 6. P. 1376–1384.
15. Guo S., Xue R., Li Y. et al. The CFP10/ESAT6 complex of *Mycobacterium tuberculosis* may function as a regulator of macrophage cell death at different stages of tuberculosis infection // *Med Hypotheses.* 2012. Mar. Vol. 78 (3). P. 389–392. doi: 10.1016/j.mehy.2011.11.022. Epub 2011. Dec. 21.
16. Gröschel M.I., Sayes F., Shin S.J. et al. Recombinant BCG Expressing ESX-1 of *Mycobacterium marinum* Combines Low Virulence with Cytosolic Immune Signaling and Improved TB Protection // *Cell Rep.* 2017. Mar. 14. Vol. 18 (11). P. 2752–2765. doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.057.
17. Ru H., Liu X., Lin C. et al. The Impact of Genome Region of Difference 4 (RD4) on *Mycobacterial* Virulence and BCG Efficacy // *Front Cell Infect. Microbiol.* 2017. Jun. 8. Vol. 7. P. 239. doi: 10.3389/fcimb.2017.00239. eCollection 2017.
18. Jiang Y., Liu H., Wang X. et al. Genetic diversity of immune-related antigens in Region of Difference 2 of *Mycobacterium tuberculosis* strains // *Tuberculosis (Edinb).* 2017. May. Vol. 104. P. 1–7. doi: 10.1016/j.tube.2016.05.002. Epub 2016. May 6.

19. Ang M.L., Zainul Rahim S.Z., Shui G. et al. An ethA-ethR-deficient *Mycobacterium bovis* BCG mutant displays increased adherence to mammalian cells and greater persistence *in vivo*, which correlate with altered mycolic acid composition // *Infect. Immun.* 2014. May. Vol. 82 (5). P. 1850–1859. doi: 10.1128/IAI.01332-13. Epub 2014. Feb. 24.
20. Kunisch R., Kamal E., Lewin A. The role of the mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) from *Mycobacterium bovis* BCG in host cell interaction // *BMC Microbiol.* 2012. Aug. 3. Vol. 12. P. 165. doi: 10.1186/1471-2180-12-165.
21. Shiloh M.U., Champion P.A. To catch a killer. What can mycobacterial models teach us about *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis? // *Curr. Opin. Microbiol.* 2010. Feb. Vol. 13 (1). P. 86–92. doi: 10.1016/j.mib.2009.11.006. Epub 2009. Dec. 23.
22. Gannoun-Zaki L., Alibaud L., Carrère-Kremer S. et al. Overexpression of the KdpF membrane peptide in *Mycobacterium bovis* BCG results in reduced intramacrophage growth and altered cording morphology // *PLoS One.* 2013. Vol. 8 (4). P. e60379. doi: 10.1371/journal.pone.0060379. Epub 2013. Apr. 5.
23. Rosas O.M., Vivès E., Molle V. et al. Endogenous and Exogenous KdpF Peptide Increases Susceptibility of *Mycobacterium bovis* BCG to Nitrosative Stress and Reduces Intramacrophage Replication // *Front Cell Infect Microbiol.* 2017. Apr. 6. Vol. 7. P. 115. doi: 10.3389/fcimb.2017.00115. eCollection 2017.

Поступила в редакцию 16.12.2017 г.

Сведения об авторе:

Вишневецкий Борис Израилевич — доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии; 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2–4; e-mail: bivish@rambler.ru.

на правах некоммерческой рекламы

ADVANCED TRADING
ЭДВАНСД ТРЕЙДИНГ

ФТИЗАМАКС

МАКРОЗИД
ЕКОКС
МАКОКС
ФОРКОКС
ЭТОМИД
ПРОТОМИД
КАПОЦИН
КОКСЕРИН
ТЕРИЗИДОН-МАК
МАК-ПАС
ОФЛОМАК
МАКЛЕВО

ТУБОСАН

www.atcl.ru