

Всесоюзный ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский противочумный
институт «Микроб»

**ГЕНЕТИКА, МИКРОБИОЛОГИЯ
И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ
МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

А.П. Анисимов, А.В. Карлышев, В.И. Кравченко,
В.М. Красильникова, А.М. Кокушкин

ПОЛУЧЕНИЕ АВИРУЛЕНТНЫХ ВАРИАНТОВ *Yersinia pestis*
с Fra⁺, V⁺, Cad⁺, Fib-Coa⁺, PstI⁺, Pstb⁺ ФЕНОТИПОМ

Оболенск, Саратов

Одним из основных требований к вакцинным штаммам чумного микроба является максимальная близость их морфологических, культуральных, биохимических и серологических характеристик к таковым у типичных вирулентных штаммов [3]. Используемый в настоящее время глицеринегативный штамм EV линии НИИЭГ дефектен по признаку пигментсорбции. В то же время циркулирующие в природных очагах Советского Союза штамму возбудителя чумы относятся к континентальной расе (глицеринопозитивной) и, как правило, обладают пигментсорбирующей активностью [3].

Цель настоящего исследования - конструирование авирулентных глицеринопозитивных пигментсорбирующих вариантов *Y. pestis*.

Штаммы чумного микроба и кишечной палочки представлены в табл. 1, использованные в работе плазмиды - в таблице 2. Определение V-антигена и ФІ проводили в реакции диффузионной преципитации с моноклональными антисыворотками [10].

Таблица 1

Характеристика использованных штаммов

Штаммы	Характеристика	Источник получения
<i>Y. pestis</i> :		
358/12	pFra ⁻ , pCad ⁺ , pPst ⁺ , Pgm ⁺	[1]
358/12-1	pFra ⁻ , pCad ⁻ , pPst ⁻ , Pgm ⁺	Получен авторами
358/12-2	трансформант 358/12-1 плазмидой pCad::Tn601	"
358/12-3	трансформант EV11M pV9	"
358/12-4	трансформант EV11M pPW14	"
358/12-5	трансформант EV11M pVH65	"
358/12-6	трансформант EV11M pVH68	"
358/12-7	pFra ⁻ , pCad ⁺ , pPst ⁻ , Pgm ⁺	МЖК ВНИИПИМ
<i>E. coli</i> HB101	pFra ⁻ , pCad ⁻ , pPst ⁻ , Pgm ⁺	Получен авторами

Ca²⁺-зависимость, синтез пестицина I, плазмокоагулазную и фибринолитическую активности определяли согласно Руководству по профилактике чумы [7]. Клоны, утратившие плазмиду pPst, отбирали по методике, описанной Шведун [9], а клоны, утратившие плазмиду кальцийзависимости - по Portnoy, Falkow [11].

Молекулярное клонирование осуществляли согласно рекомендациям Маниатиса [6]. Криотрансформацию бактерий чумы проводили в мо-

дификации Кокушкина [5]. Беспородных белых мышей (по 4) заражали подкожно двумя дозами - 10⁸ и 10⁴ м.к.

Таблица 2

Характеристика использованных плазмид

Плаزمида	Генетическая характеристика	Источник получения
pCad::Tn601	V ⁺ , Cad ⁺ , Km ^R	ВНИПЧИ "Микроб" А.А. Филиппов
pCDc	Cad ⁺ , Ap ^R , Tc ^R	Получен авторами
pVH65	V ⁺ , PstI ⁺ , Fib-Coa ⁺ , Cm ^R	"
pVF2	Fra ⁺ , V ⁺ , PstI ⁺ , Fib-Coa ⁺ , Cm ^R	"

На основе бескапсульного вирулентного штамме *Y. pestis* 358/12 [1] получен его бесплазмидный авирулентный вариант 358/12-1, в клетки которого методом криотрансформации осуществляли передачу плазмиды pCad::Tn601 и сконструированных нами на основе репликонов pPst и pCad рекомбинантных конструкций. Получение плазмид pCDc и pVH65 описано нами ранее [2]. Бирепликонная плаزمида pVF2 сконструирована путем встраивания в PstI сайт плазмиды pVH65 fra-оперона, клонированного по сайтам EcoRI-PstI на плазмидном векторе pBR322. Наличие совместимых, стабильно наследующихся в *Y. pestis* репликонов и различных маркеров устойчивости, позволило совмещать в микробных клетках плазмиду pCDc с плазмидой pVH65 или pVF2. Результаты оценки вирулентности полученных трансформантов представлены в таблице 3.

Передача в бесплазмидный штамм плазмиды pCad::Tn601 приводила к восстановлению вирулентности, тогда как трансформанты, получившие плазмиду pCDc отдельно или в сочетании с плазмидами pVH65, pVF2, не вызывали гибель белых мышей, зараженных культурой в дозе 10⁸ м.к. Авирулентность полученных вариантов можно объяснить наличием в составе плазмиды pCDc делеции фрагмента ДНК с генами lcrB, lcrD, lcrE, trtB [13], которые, по мнению Yother, Goguen [12], участвуют в регуляции генов вирулентности, расположенных вне этого локуса.

Следует отметить, что полученные нами варианты *Y. pestis* с рекомбинантными плазмидами отличались от типичных вирулентных штаммов отсутствием "мышинного" токсина. Передача tox гена в клетки экспе-

риментальших вакцин нецелесообразна, так как не выявлено зависимости между содержанием фракции II в микробах и их иммуногенностью [4, 8].

Таблица 3

Вирулентность трансформантов штамма *Y. pestis* 358/12, несущих гибридные плазмиды

Штаммы <i>Y. pestis</i>	Характеристика генно-плазмидного профиля	Заражающая доза	Кол-во павших из 4 заражен. животных
358/12-2	V ⁺ , Cad ⁺	10 ⁴	4
		10 ⁸	4
358/12-3	Cad ⁺	10 ⁴	0
		10 ⁸	0
358/12-4	V ⁺ , PstI ⁺ , Fib-Coa ⁺	10 ⁴	0
		10 ⁸	0
358/12-5	Fra ⁺ , V ⁺ , PstI ⁺ , Fib-Coa ⁺	10 ⁴	0
		10 ⁸	0
358/12-6	V ⁺ , Cad ⁺ , PstI ⁺ , Fib-Coa ⁺	10 ⁴	0
		10 ⁸	0
358/12-7	Fra ⁺ , V ⁺ , Cad ⁺ , PstI ⁺ , Fib-Coa ⁺	10 ⁴	0
		10 ⁸	0

Таким образом, получены авирулентные глицеринопозитивные варианты чумного микроба, сохранившие способность к пигментсорбции, а также к синтезу ФI, V-антигена, пестицина I, фибринолизин-плазмокоагулазы и обладающие кальцийзависимостью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акимович В.В., Шанина Л.Н. // Вопр. микробиол. и лаб. диагн. особо опасных инф. - Саратов, 1985.- С. 54-58. - 2. Анисимов А.П. и др. // Конструирование рекомбинантных плазмид, стабильно наследующихся в клетках *Yersinia pestis* (см. наст. сб.). - 3. Гинзбург Н.Н. // Живые вакцины. - М.: Медицина, 1969. - 4. Дудина С.И. // Докл. Иркут. противочумн. ин-та. - Иркутск, 1974.- Вып.10. - С. 263-265.- 5. Кокушкин А.М. //

Мол. биол. и генет. возбудит. особо опасных инф. - Саратов, 1982. - Ч. 1. - С. 28-33. - 6. Маниатис Т., Фрич Э.Ф., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. - М.: Мир. 1984. - 7. Руководство по профилактике чумы (Под ред. Н.И. Николаева). - Саратов, 1972. - 8. Шанина Л.Н. // Пробл. особо опасных инф. - Саратов, 1968. - Вып. 2. - С. 91-95. - 9. Шведун Г.П. // Изучение некоторых физических свойств и биологической активности плазмиды Са²⁺-зависимости у возбудителей чумы и псевдотуберкулеза: Дисс. ... канд. мед. наук. - Саратов.- 1983. - 10. Öuchterlony O //Acta Pathol. Microbiol. Scand. - 1949. - V. 26. N 4. - P. 507-515. - 11. Portnoy D.A., Falkow S. // J. Bacteriol. - 1981. - V. 148, N 3. - P. 877-883. - 12. Yother J., Goguen J.D. // J. Bacteriol. - V. 164. N 2. - P. 704-711. - 13. - Yother J., Chamness T.W., Goguen J.D. // J. Bacteriol. - 1986. - V. 165. N 2. - P. 443-447.