

**Министерство здравоохранения Российской Федерации**  
**«Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб"**  
**Министерства здравоохранения Российской Федерации»**

На правах рукописи

**АНИСИМОВ Андрей Павлович**

**Молекулярно-генетические механизмы образования и  
функциональная значимость капсулы *Yersinia pestis***

03.00.07 - микробиология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Саратов, Оболенск - 1999

	Стр.
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ .....	8
ВВЕДЕНИЕ .....	14
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	27
1.1. УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ К ЗАЩИТНЫМ МЕХАНИЗМАМ МАКРООРГАНИЗМА .....	27
1.1.1. ПЕРСИСТЕНЦИЯ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ В ОРГАНИЗМЕ ХОЗЯИНА .....	27
1.1.2. УСТОЙЧИВОСТЬ <i>Y. pestis</i> К ЗАЩИТНЫМ МЕХАНИЗМАМ ХОЗЯИНА .....	29
1.2. КАПСУЛЬНЫЙ АНТИГЕН <i>Y. pestis</i> .....	37
1.2.1. ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ, УСЛОВИЯ БИОСИНТЕЗА, ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА .....	37
1.2.2. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА .....	44
1.2.3. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ПРОДУКЦИИ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА .....	50
1.2.4. РОЛЬ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА В ПАТОГЕНЕЗЕ .....	54
1.2.5. ВЛИЯНИЕ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА НА БЛОКООБРАЗОВАНИЕ .....	58
1.2.6. ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА .....	62
1.2.7. ИЗМЕНЧИВОСТЬ СИНТЕЗА КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА <i>Y. pestis</i> КАК ЧАСТНЫЙ СЛУЧАЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ .....	67
1.3. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РОДСТВО КЛАСТЕРА ГЕНОВ <i>fra</i> ОПЕРОНА	

И ПРОДУКТОВ ЭТИХ ГЕНОВ С АНАЛОГИЧНЫМИ СТРУКТУРАМИ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИМИ БИОГЕНЕЗ ПИЛЕВЫХ И НЕПИЛЕВЫХ АДГЕЗИНОВ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ .....	74
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....	77
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	77
2.1. ШТАММЫ МИКРООРГАНИЗМОВ .....	77
2.2. ПЛАЗМИДЫ .....	84
2.3. БАКТЕРИОФАГИ .....	85
2.4. СРЕДЫ И УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ .....	85
2.5. ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ .....	86
2.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКЦИИ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА .....	86
2.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ИССЛЕДОВАННЫХ ШТАММОВ .....	89
2.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ НАСЛЕДОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД .....	89
2.9. ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЕ МАНИПУЛЯЦИИ .....	90
2.10. КОНСТРУИРОВАНИЕ ИНТЕГРАТИВНЫХ ПЛАЗМИД, ДЕФЕКТНЫХ ПО ОТДЕЛЬНЫМ ГЕНАМ <i>fra</i> ОПЕРОНА .....	90
2.11. НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ ПЛАЗМИДЫ pFra ЗА СЧЕТ ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ С ИНТЕГРАТИВНЫМИ ВЕКТОРАМИ И СЕЛЕКЦИЯ $Fra^-$ ИЛИ <i>cafIM</i> МУТАНТОВ <i>Y. pestis</i> .....	93
2.12. КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ <i>Y. pestis</i> , ЛИШЕННЫХ ПЛАЗМИДЫ pFra .....	94
2.13. ЗАРАЖЕНИЕ ЖИВОТНЫХ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ ШТАММОВ <i>Y. pestis</i> .....	94

2.14. "АНИМАЛИЗАЦИЯ" РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ <i>Y. pestis</i> ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ КЛОНОВ, СОХРАНИВШИХ ВИРУЛЕНТНОСТЬ НА УРОВНЕ ИСХОДНЫХ ШТАММОВ .....	96
2.15. ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ НА БИОЛОГИЧЕСКИХ МОДЕЛЯХ	97
2.16. ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	99
2.17. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В СВОБОДНОМ ПОТОКЕ .....	99
2.18. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА МИКРОБНЫХ КЛЕТОК .....	99
2.19. ВЫЯВЛЕНИЕ КАПСУЛЫ .....	100
2.20. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА .....	100
2.21. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ ...	101
2.22. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОБЛОТИНГА .....	101
Глава 3. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ <i>fra</i> ОПЕРОНА .....	102
3.1. КОНСТРУИРОВАНИЕ ПЛАЗМИД, ДЕФЕКТНЫХ ПО ОТДЕЛЬНЫМ ГЕНАМ <i>fra</i> ОПЕРОНА .....	103
3.2. ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ ИНСЕРЦИОННЫХ И ДЕЛЕЦИОННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПЛАЗМИДЫ pFS1 ОПРЕДЕЛЯТЬ СИНТЕЗ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА И ОБРАЗОВАНИЕ КАПСУЛЫ .....	106
3.3. ОБСУЖДЕНИЕ .....	110
Глава 4. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УТРАТЫ СПОСОБНОСТИ К СИНТЕЗУ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА НА ВИРУЛЕНТНОСТЬ <i>Y. pestis</i> .....	125
4.1. КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ <i>Y. pestis</i> , ДЕФЕКТНЫХ ПО ГЕНАМ <i>caf1</i> , <i>caf1M</i> И <i>caf1A</i> ОПЕРОНА <i>fra</i> .....	127
4.2. КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ <i>Y. pestis</i> , ЛИШЕННЫХ ПЛАЗМИДЫ pFra .....	133

4.3. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ИЗОГЕННЫХ ШТАММОВ <i>Y. pestis</i> , ЛИШЕННЫХ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ .....	134
4.3.1. ВИРУЛЕНТНОСТЬ ИЗОГЕННЫХ ШТАММОВ <i>Y. pestis</i> , ЛИШЕННЫХ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ, ДЛЯ ИНТАКТНЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ .....	134
4.3.2. ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ИЗОГЕННЫХ ШТАММОВ <i>Y. pestis</i> , ЛИШЕННЫХ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ, ПРЕОДОЛЕВАТЬ ИММУНИТЕТ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ .....	138
4.4. ОБСУЖДЕНИЕ .....	140
Глава 5. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ШТАММОВ <i>Y. pestis</i> , ОБРАЗУЮЩИХ АТИПИЧНЫЕ КАПСУЛЫ .....	149
5.1. КОНСТРУИРОВАНИЕ pFra <sup>+</sup> ШТАММОВ <i>Y. pestis</i> , ДЕФЕКТНЫХ ПО ГЕНУ <i>caf1M</i> ОПЕРОНА <i>fra</i> .....	149
5.2. ЭЛЕКТРОПОВЕРХНОСТНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ПО СПОСОБНОСТИ ОБРАЗОВЫВАТЬ КАПСУЛУ <i>Y. pestis</i> .....	153
5.3. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ПО СПОСОБНОСТИ ОБРАЗОВЫВАТЬ КАПСУЛУ <i>Y. pestis</i> .....	161
5.4. ИЗУЧЕНИЕ ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ШТАММОВ <i>Y. pestis</i> , ОПИСАННЫХ КАК Fra <sup>-</sup> И Fra <sup>±</sup> , НО ОБРАЗУЮЩИХ АТИПИЧНЫЕ ВАРИАНТЫ КАПСУЛЫ .....	161
5.5. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БЕЛКОВ КАПСУЛЫ ИЗ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ С АТИПИЧНЫМИ КАПСУЛАМИ И ИССЛЕДОВАНИЕ ЭТИХ ШТАММОВ С ПОМОЩЬЮ ИММУНОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРО-	

СКОПИИ .....	165
5.6. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ ШТАММОВ <i>Y. pestis</i> , ОБЛАДАЮЩИХ АТИПИЧНЫМИ КАПСУЛАМИ, С ИХ ИЗОГЕННЫМИ "КЛАССИЧЕСКИМИ" И БЕСКАПСУЛЬНЫМИ ВАРИАНТАМИ .....	183
5.7. ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У ИНТАКТНЫХ И ИММУННЫХ БЕЛЫХ МЫШЕЙ, ЗАРАЖЕННЫХ ВАРИАНТАМИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ, ОТЛИЧАЮЩИМИСЯ ПО СПОСОБНОСТИ СИНТЕЗИРОВАТЬ КАПСУЛЬНЫЙ АНТИГЕН .....	186
5.8. ОБСУЖДЕНИЕ .....	189
Глава 6. КОНСТРУИРОВАНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА С УЧЕТОМ ДАННЫХ О СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ <i>fra</i> ОПЕРОНА <i>Y. pestis</i> .....	207
6.1. КОНСТРУИРОВАНИЕ НА ОСНОВЕ ПЛАЗМИДЫ ЧУМНОГО МИКРОБА <i>pPst</i> РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ СТАБИЛЬНОЕ НАСЛЕДОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА <i>Y. pestis</i> В РЕЦИПИЕНТНЫХ КЛЕТКАХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ ..	211
6.2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СКОНСТРУИРОВАННЫХ ШТАММОВ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ ПО УРОВНЮ ПРОДУКЦИИ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА .....	215
6.2.1. ПРОДУЦЕНТЫ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА НА МОДЕЛИ <i>Escherichia coli</i> .....	215
6.2.2. ПРОДУЦЕНТЫ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА НА МОДЕЛИ <i>Salmonella spp.</i> .....	218
6.2.3. ПРОДУЦЕНТЫ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА НА ОСНОВЕ <i>Y. pestis</i> ..	221
6.2.4. ПРОДУЦЕНТЫ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА НА ОСНОВЕ <i>Yersinia</i>	

<i>enterocolitica</i> .....	226
6.2.5. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПРЕПАРАТОВ РЕКОМБИНАНТНОГО КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА И КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА ИЗ ШТАМ- МА <i>Y. pestis</i> EV ЛИНИИ НИИЭГ .....	227
6.3. ОБСУЖДЕНИЕ .....	229
Глава 7. ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ - СУПЕРПРОДУЦЕНТОВ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА <i>Y. pestis</i> .....	238
7.1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ВАКЦИННЫЙ ШТАММ НА ОСНОВЕ <i>Y. pestis</i> .....	239
7.2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ВАКЦИННЫЙ ШТАММ НА МОДЕЛИ <i>Y. enterocolitica</i> .....	240
7.3. ОБСУЖДЕНИЕ .....	240
Глава 8. КЛАССИФИКАЦИЯ ФАКТОРОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ПЕРСИСТЕН- ЦИЮ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ В ПРИРОДЕ .....	248
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	254
ВЫВОДЫ .....	266
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	272

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И  
ТЕРМИНОВ

(согласно M. Demerec *et al.*, 1966 и R. Novik *et al.*, 1976)

- Авидность - "функциональная аффинность" - суммарная энергия взаимодействия антигенсвязывающих центров антитела с антигенными детерминантами поливалентного антигена
- АППО - антиген "панкреатического перевара оболочки" (pancreatic envelope digest antigen) [445]
- Атипичные кап-сулы - в контексте настоящего исследования термин "атипичные" капсулы используется для обозначения совокупности морфологических структур идентичных по данным световой или электронной микроскопии "классической" капсуле *Y. pestis*, образованной из агрегатов CafI, но отличающихся от нее по данным иммунологических тестов
- Аффинность - "внутренняя аффинность" - сумма межмолекулярных сил притяжения и отталкивания, возникающих при взаимодействии антигенсвязывающего центра антитела и гомологичной антигенной детерминанты
- Ашер - "usher" - белок, обеспечивающий транслокацию из периплазмы через внешнюю мембрану комплекса периплазматический шаперон-структурная субъединица пилевого адгезина и закрепление пилей адгезии на клеточной поверхности
- ВНИИ ПМ (ГосНИИПМ, ГНЦ ПМ) - Всесоюзный НИИ прикладной микробиологии (Государственный НИИ прикладной микробиологии, Государственный научный центр прикладной микробиологии)
- ГЗТ - гиперчувствительность замедленного типа
- ГИСК - Государственный институт стандартизации и контроля медицинских

биологических препаратов

ГосКПБ	- <u>Г</u> осударственная <u>к</u> оллекция <u>п</u> атогенных <u>б</u> актерий
ИИ	- <u>и</u> ндекс <u>и</u> ммунитета (индекс резистентности)
ИФА	- <u>и</u> ммуно <u>ф</u> ерментный <u>а</u> нализ
Капсульный ан-тиген	- компоненты капсулы, вызывающие образование антител
КОЕ (cfu)	- <u>к</u> олоние <u>о</u> бразующая <u>е</u> диница ( <u>c</u> olony <u>f</u> orming <u>u</u> nit)
ЛПС	- <u>л</u> ипо <u>п</u> оли <u>с</u> ахарид
м.к.	- <u>м</u> икробная <u>к</u> летка
м.т.	- <u>м</u> икробное " <u>т</u> ело"
МЖК	- <u>м</u> узей <u>ж</u> ивых <u>к</u> ультур
мРНК	- <u>м</u> атричная <u>р</u> ибо <u>н</u> уклеиновая <u>к</u> ислота
МФЛА	- <u>м</u> оно <u>ф</u> осфорил- <u>л</u> ипид <u>А</u>
ПААГ	- <u>п</u> оли <u>а</u> крила <u>м</u> идный <u>г</u> ель
НД	- <u>н</u> ет <u>д</u> анных
НИ	- <u>н</u> астоящее <u>и</u> сследование
Персистенция	- в контексте настоящего исследования под этим термином подразумевается способность бактерий сохранять свою жизнеспособность в организмах хозяина, переносчика и окружающей среде
пн (bp)	- <u>п</u> ара <u>н</u> уклеотидов ( <u>b</u> ase <u>p</u> air)
ПЦР	- <u>п</u> олимеразная <u>ц</u> епная реакция
РА	- реакция <u>а</u> гглютинации
РДИД	- реакция двойной <u>и</u> ммунодиффузии (диффузионной преципитации) в агаре или агарозе по O. Öuchterlony [522]
РНAt	- реакция <u>н</u> ейтрализации <u>а</u> нтител

РНГА	- реакция <u>н</u> епрямой (пассивной) <u>г</u> ема <u>г</u> глютинации
тпн (kb)	- <u>т</u> ысяча <u>п</u> ар нуклеотидов ( <u>k</u> ilo <u>b</u> ase)
Фолдинг	- "folding" – сворачивание белков во вторичную и третичную структуры
Шаперон	- "chaperon" – "белок-помошник", обеспечивающий фолдинг другого белка в нативную конформацию, препятствующий протеолизу последнего и его непродуктивной агрегации
ЭДТА	- <u>э</u> тилендиамин <u>т</u> етра <u>а</u> цетат натрия
ЭКП	- <u>э</u> лектро <u>к</u> инетический ( $\zeta$ - дзета) <u>п</u> отенциал
Эпитоп	- антигенная детерминанта
ЭФСП	- <u>э</u> лектро <u>ф</u> орез в <u>с</u> вободном <u>п</u> отоке
<i>amp</i>	- ген, определяющий устойчивость к ампициллину
$Ap^R(S)$	- устойчивость (или чувствительность) к ампициллину
<i>CafI (YcaF)</i>	- белковая субъединица капсульного антигена
<i>cafI (ycaF)</i>	- структурный ген, кодирующий субъединицу капсульного антигена ( <u>c</u> apsular <u>a</u> ntigen <u>f</u> raction I; <i>Yersinia pestis</i> <u>c</u> apsular <u>a</u> ntigen <u>f</u> raction I)
<i>cafIA</i>	- ген, кодирующий белок "usher" (привратник) капсульного антигена ( <u>c</u> apsular <u>a</u> ntigen <u>f</u> raction I <u>a</u> ssembly)
<i>cafIM (ycaA)</i>	- ген, кодирующий периплазматический шаперон капсульного антигена ( <u>c</u> apsular <u>a</u> ntigen <u>f</u> raction I <u>m</u> ediator; <i>Yersinia pestis</i> <u>c</u> apsular <u>a</u> ntigen <u>p</u> rotein <u>A</u> )
<i>cafIR</i>	- ген-регулятор <i>fra</i> оперона ( <u>c</u> apsular <u>a</u> ntigen <u>f</u> raction I <u>r</u> egulator)
<i>cat</i>	- ген, кодирующий хлорамфениколацетилтрансферазу
$Cm^R(S)$	- устойчивость (или чувствительность) к хлорамфениколу
Dcl (LD <sub>100</sub> )	- абсолютно летальная доза ( <u>d</u> osis <u>c</u> erta <u>l</u> etalis)
Dlm	- минимальная летальная доза ( <u>d</u> osis <u>l</u> etalis <u>m</u> inima)

FI (F1, ΦI, Φ1)	- капсульный антиген - "фракция I" ( <u>f</u> raction <u>I</u> ) по E.E. Baker [381, 382]
FI-1, FI-2 и т.д.	- введенное нами обозначение различных серовариантов атипичных капсул
<i>fra</i> ( <i>f1</i> , <i>caf</i> )	- оперон, обеспечивающий образование капсулы <i>Y. pestis</i> , сформированной из субъединиц Caf1
Fra <sup>-</sup>	- отсутствие способности к синтезу капсульного антигена "фракция I" и образованию капсулы
Fra <sup>+</sup>	- продукцию капсульного антигена выявляют только в препаратах разрушенных клеток, что связывают с нарушением его секреции, т.к. в процессе обработки ультразвуком или ацетоном и последующего высушивания внутриклеточные антигены выходят из разрушенных бактерий и становятся доступными для антител [271, 400]
Fra <sup>+</sup>	- способность к синтезу капсульного антигена "фракция I" и образованию капсулы
Hms (Psb)	- аккумуляирование гемина ( <u>h</u> em <u>i</u> n <u>s</u> torage) или пигментсорбция <sup>1</sup>
ImD <sub>50</sub>	- доза вакцинного штамма, предохраняющая от гибели 50 % экспериментальных животных
<i>imm</i> ( <i>pim</i> )	- ген, определяющий иммунитет к пестицину
<i>kan</i>	- ген, кодирующий канамицинацетилтрансферазу
kDa	- килодальтон <sup>2</sup>
Km <sup>R(S)</sup>	- устойчивость (или чувствительность) к канамицину
Lcr	- ( <u>l</u> ow <u>c</u> alcium <u>r</u> esponse) потребность в ионах кальция для роста <i>in vitro</i> при температуре 37 °C в сочетании со способностью продуцировать при

<sup>1</sup> Термин "Psb" нельзя признать удачным для обозначения пигментсорбции, т.к. в английском словосочетании "pigment sorption" букве кириллицы "б" соответствует буква латиницы "p" а не "b".

<sup>2</sup> Согласно Международной системе СИ молекулярная масса измеряется в атомных единицах массы (а. е. м.); 1 а. е. м. ≈ 1,66057×10<sup>-27</sup> кг. В биохимии молекулярную массу макромолекул принято выражать в дальтонах; 1 дальтон = 1 а. е. м.

этой же температуре V антиген и белки внешних мембран

<i>lcrV</i>	- структурный ген V антигена
LD <sub>50</sub>	- доза летальная для 50 % животных ( <u>dosis letalis 50</u> )
MDa	- мегадальтон
<i>mob</i>	- область, ответственная за способность плазмиды к переносу конъюгативными плазмидами ( <u>mobilization</u> )
ORF4'	- "ашер" белок рН6 антигена
<i>ori</i>	- область, ответственная за начало репликации ( <u>origin</u> )
pCad (pLcr)	- 45-47 MDa плазида, определяющая температурную зависимость роста иерсиний от ионов кальция, синтез V антигена и белков внешней мембраны
pFra (pYT)	- 60-65 MDa плазида, кодирующая синтез капсульного антигена фракция I и "мышинного" токсина
pFra/pFBK7	- гибридная плазида, полученная в результате рекомбинации интактной плазмиды pFra с интегративным вектором pFBK7
Pgm	- сочетанное проявление фенотипов Hms и Pst <sup>S</sup>
рН6 (4, I)	- рН6 антиген, образующий пили адгезии
<i>pla</i>	- структурный ген активатора плазминогена
Pla	- активатор плазминогена, определяющий фибринолитическую и плазмокоагулазную активности возбудителя чумы
pPst	- 6 MDa плазида, кодирующая синтез пестицина, активатора плазминогена и определяющая иммунность к пестицину
<i>psaA</i>	- структурный ген антигена рН6 ( <u>pH Six antigen</u> )
<i>psaB</i>	- ген, кодирующий периплазматический шаперон антигена рН6
<i>psaE</i>	- регуляторный ген оперона <i>psa</i>

<i>pst</i>	- структурный ген, кодирующий синтез пестицина
Pst	- признак продукции пестицина
Pst <sup>R(S)</sup>	- резистентность (чувствительность) к пестицину
SDS	- додецилсульфат натрия
Tc <sup>R(S)</sup>	- устойчивость (или чувствительность) к тетрациклину
<i>tet</i>	- ген, определяющий устойчивость к тетрациклину
Tox (FII, Ymt)	- признак синтеза "мышинного" токсина (" <u>fraction II</u> ", <u><i>Yersinia murine toxin</i></u> )
Yops	- белки внешних мембран иерсиний ( <u><i>Yersinia outer membrane proteins</i></u> )

## ВВЕДЕНИЕ

## АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ.

Сведения о механизмах реализации патогенности микроорганизмов и, в первую очередь, факторах, определяющих способность приживаться в тканях организма хозяина, а также размножаться в них, вызывая патологические изменения, лежат в основе разработки эффективных методов профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Совокупность генотипических особенностей микроорганизмов, детерминирующих патогенность, фенотипически проявляется вирулентностью. В настоящее время полидетерминированность вирулентности патогенных микроорганизмов и, в частности, возбудителя чумы - *Y. pestis* - является общепризнанной. При этом каждая из биомолекул (факторов патогенности) может обладать несколькими активностями, направленными на преодоление различных звеньев системы защиты макроорганизма. Реализация патогенных свойств *Y. pestis* в организме восприимчивого хозяина требует присутствия у возбудителя чумы целого набора факторов патогенности различной функциональной направленности и систем регуляции, обеспечивающих их координированную экспрессию. Абсолютизирование роли любого отдельно взятого из указанных факторов - некорректно [236, 395, 398, 399]. Однако детальный анализ каждого из этих факторов лежит в основе системного подхода при изучении патогенности и вирулентности *Y. pestis*.

Один из "классических" факторов патогенности *Y. pestis* - капсульный антиген FI - обладает целым рядом свойств, традиционно связываемых со способностью бактерий к персистенции [58, 434, 435]. Капсула, образованная из FI [406, 407], защищает клетки *Y. pestis* от захвата интактными нейтрофилами хозяина [399, 403]. Это согласуется с общепризнанной ролью бактериальных капсул, препятствующих поглощению бактерий фагоцитарными клетками макроорганизма [582]. С одной стороны, капсулы экранируют пептидогликан или ЛПС бактериальной клетки, препятствуя инициации альтернативного

пути активации комплемента [512], с другой стороны, повышение устойчивости к фагоцитозу обычно коррелирует с увеличением отрицательного заряда микробной клетки, способствующего электростатическому отталкиванию от одноименно заряженных фагоцитов [582]. Но FI истощает систему комплемента за счет избирательной активации C<sup>2</sup> и C<sup>4</sup> компонентов системы комплемента и таким образом препятствует комплемент-опосредованной опсонизации бактерий [599], а синтез капсулы, сопровождался снижением отрицательного заряда клеточной поверхности [132, 184]. Более того, отсутствие FI у некоторых штаммов *Y. pestis* обуславливало снижение эффективности захвата бактерий макрофагами морских свинок, но не белых мышей [96]. В то же время известно, что размножение клеток *Y. pestis* внутри макрофагов является обязательным этапом патогенеза чумы [403], а вирулентность чумного микроба коррелирует не столько с устойчивостью к захвату фагоцитами, сколько со способностью выживать и размножаться в фаголизосомах фагоцитарных клеток за счет подавления антибактериальных функций фагоцитов [66, 183, 194, 195, 354, 404]. Показано, что FI способна образовывать в двухслойных фосфолипидных мембранах поры, проницаемые для воды [544]. Высказано предположение, что это приводит к нарушению осмотической регуляции и последующей гибели клетки-мишени теплокровного животного. Показано, что высокомолекулярный капсульный антиген обладал гемагглютинирующей активностью за счет способности специфически связываться с D-галактозамином-HCl и глюкуроновой кислотой [300], что может объяснить гипотетическое участие капсульного антигена в образовании клейких скоплений микробов и образовании блока в преджелудке блохи [480].

Интересно, что в подавляющем большинстве исследований бескапсульные варианты, в отличие от полноценных штаммов, обладали избирательной вирулентностью, что проявлялось в резком снижении их вирулентности в отношении морских свинок, но не белых

мышей [201, 266, 290-292, 329, 398-400, 574, 589, 590]. В Или-Каратальском междуречье<sup>3</sup> выделены Fga<sup>-</sup> штаммы, авирулентные для белых мышей и морских свинок, слабо вирулентные для краснохвостых и гребенщиковых, но высоко вирулентные для больших песчанок [191]. В то же время описаны Fga<sup>-</sup> штаммы 358/12 [6] и И-2422 [198], обладающие универсальной вирулентностью для лабораторных животных. Таким образом, вопрос о корреляции Fga<sup>+</sup> признака с вирулентностью *Y. pestis* требует дальнейшего изучения.

О.А. Проценко с соавт. [271] показали, что гены, ответственные за синтез FI, локализованы на плазмиде pFga. *Fra* оперон, кодирующий капсульный антиген, был впервые клонирован из *EcoRI* банка "больших" плазмид *Y. pestis* А.В. Карлышевым, В.М. Красильниковой и П.А. Черепановым в 1984 году (цитируется по П.А. Черепанову с соавт. [346]). Секвенирование и определение структурно-функциональной организации *fra* локуса, клонированного в составе этой плазмиды, независимо друг от друга проводилось группами А.В. Карлышева [442, 443, 476-478] и П.А. Черепанова [350] и не дало однозначных результатов. До настоящего времени нет единого мнения о функциях отдельных генов *fra* оперона в секреции структурной субъединицы на поверхность клетки и образовании капсулы чумного микроба [91, 186, 350, 442, 443, 476-478, 567]. Относительно недавно показано, что в рекомбинантных клетках *Escherichia coli*, дефектных по гену *cafIM* оперона *fra*, происходит образование капсульного антигена, выявляемого с помощью коммерческих иммунодиагностикомов в реакции иммунодиффузии в геле по О. Öuchterlony и РНАт, но не в РНГА [350]. Большинство исследователей считает, что в CafIM<sup>-</sup> энтеробактериях происходит лишь нарушение секреции капсульного антигена и не происходит образования капсулы [198, 442, 476, 527, 534].

Классическая иммунодиагностика чумы построена на выявлении капсульного антигена FI или анти-FI-антител [120, 243, 288, 289, 380, 397, 527]. Капсульный антиген *Y. pestis* является важнейшим составным компонентом подавляющего большинства

---

<sup>3</sup> Южное Прибалхашье.

современных коммерческих и экспериментальных чумных вакцин. Показана его ведущая роль в создании напряженного иммунитета у белых мышей, морских свинок, приматов и человека [61, 89, 110, 341, 368, 382, 492, 507, 508, 567, 597 и др.]. В настоящее время для получения FI *Y. pestis* - основного компонента чумных диагностических и вакцинных препаратов, используют вакцинный штамм чумного микроба EV линии НИИЭГ. Этот штамм обладает повышенной субстратной специфичностью и при этом невысокой скоростью роста при оптимальной температуре для синтеза капсульного антигена - 37 °С. Методами генной инженерии на основе подбора оптимальных реципиентных штаммов получены продуценты капсульного антигена на модели *E. coli* XL1-blue [567], K802 [165, 268] и HB101 [99, 101, 102, 163], *Salmonella minnesota* R595 [101, 102]. Вышеперечисленные гибридные штаммы, хотя и продуцировали капсульный антиген в достаточных количествах, однако нестабильно наследовали плазмидные репликоны, несущие в своем составе *fra* оперон чумного микроба, что, в свою очередь, неблагоприятно влияло на протективность этих рекомбинантных штаммов и выявлялось при испытании их на биологических моделях. Все вышеперечисленное создает значительные ограничения для применения указанных штаммов в технологических процессах. Ряд исследователей столкнулся и с затруднением экспрессии *fra* оперона, клонированного в клетках *E. coli* [91, 111, 152, 358]. Высказано предположение, что капсульный антиген может оказывать токсический эффект на клетки штамма-продуцента, приводящий к накоплению в популяции микроорганизмов с дефектами *fra* оперона, вызванными встройками в его структуру IS-элементов [111].

Исследование молекулярно-генетических механизмов образования капсулы возбудителя чумы с привлечением комплекса методов бактериологии, генной инженерии, биохимии, биофизики, иммунологии и электронной микроскопии позволит получить новые сведения о сборке бактериальных органелл, роли *fra* оперона в целом и отдельных его генов в патогенезе и иммуногенезе чумы. Это создаст основу для разработки методологии получения стабильных (технологичных) штаммов-продуцентов с максимальным уровнем

синтеза и секреции "классического" капсульного антигена, необходимую для конструирования экспериментальных вакцинных штаммов нового поколения и суперпродуцентов капсульного антигена, способных осуществлять температурнезависимый синтез и секрецию конечного продукта на "небогатых" питательных средах, что позволит значительно упростить и, соответственно, удешевить производство капсульного антигена.

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ** - получение новых сведений о молекулярно-генетических механизмах образования капсулы *Y. pestis*, ее функциональной значимости в патогенезе и иммуногенезе чумы, а также механизмах изменчивости антигенной специфичности капсулы возбудителя чумы; конструирование стабильных штаммов-суперпродуцентов капсульного антигена.

#### **ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:**

1. Разработать новые и усовершенствовать имеющиеся методы генетического анализа факторов патогенности и иммуногенности на модели *fra* оперона *Y. pestis* (методология направленного "выключения" определенных генов *fra* оперона, селекция рекомбинантных клонов и стабилизация генетической информации в клетках *Y. pestis*).

2. Создать коллекции изогенных штаммов энтеробактерий, отличающихся способностью к образованию капсулы, и на их основе получить эффективную систему для комплексной сравнительной оценки свойств полученных штаммов энтеробактерий.

3. Провести молекулярно-генетический анализ *fra* оперона и определить значение этого локуса для реализации патогенности *Y. pestis*, а также роль его отдельных генов в образовании и изменчивости антигенной специфичности капсулы.

4. Разработать, с учетом полученных данных о молекулярно-генетических механизмах образования капсулы *Y. pestis*, методологию получения стабильных штаммов-суперпродуцентов "классического" капсульного антигена и на ее основе сконструировать экспериментальные вакцинные штаммы.

5. Провести анализ и обобщение собственных экспериментальных исследований и литературных данных, относящихся к изучению факторов возбудителя чумы, обеспечивающих его персистенцию в природе.

#### НАУЧНАЯ НОВИЗНА.

Приоритет в конструировании рекомбинантной плазмидной ДНК, кодирующей капсульный белок - антиген FI чумного микроба, и штамма бактерий *E. coli* - продуцента белка - антигена FI чумного микроба защищен авторским свидетельством (А.с. № 327782).

Впервые показано, что на модели белых мышей рекомбинантный капсульный антиген, синтезируемый в клетках *E. coli*, обладает выраженной протективной активностью в отношении вирулентных штаммов *Y. pestis* "дикого" типа.

Впервые с помощью комплекса иммунохимических, биофизических методов и световой микроскопии получены экспериментальные доказательства образования капсулы, сформированной из серологически атипичного капсульного антигена, в клетках энтеробактерий, несущих оперон *fra*, дефектный по генам *cafIR* или *cafIM*. Выявлено, что перемещение субъединиц капсульного антигена CafI на поверхность микробной клетки может проходить и без участия шаперона CafIM. Впервые показано, что "серологический" вариант капсульного антигена в CafIM<sup>-</sup> бактериях определяется особенностями клеточной поверхности штамма-продуцента и, в первую очередь, формой его ЛПС. Определены минимальные размеры фрагментов плазмиды pFra, необходимые для полноценной экспрессии локуса *fra* в составе гибридных плазмид в клетках *E. coli*, *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* и *Salmonella* spp.

Впервые доказано, что направленное "выключение" генов, ответственных за синтез капсульного антигена FI, не приводит к снижению вирулентности для белых мышей и морских свинок высоковирулентных штаммов "дикого" типа независимо от их происхождения. Установлено, что Fra<sup>-</sup> клетки *Y. pestis* обладают селективными преимуществами не только в организмах белых мышей, предварительно иммунизированных

штаммами "дикого" типа или "классическим" капсульным антигеном, но и в организмах морских свинок, переболевших экспериментальной чумой, вызванной штаммами "дикого" типа, но не в организмах морских свинок, однократно вакцинированных живой чумной вакциной.

Приоритетные данные получены в результате изучения вирулентных штаммов *Y. pestis*, образующих атипичные капсулы. На модели белых мышей показано, что указанные атипичные штаммы преодолевают иммунитет, индуцированный вакцинным штаммом EV. Препараты капсульных белков или "убитая" вакцина, приготовленные на основе этих штаммов, практически не защищают иммунизированных животных от последующего заражения штаммом, на основе которого были приготовлены эти препараты. У интактных и иммунных белых мышей, павших от экспериментальной чумы, вызванной штаммами с атипичными капсулами, патоморфологические изменения внутренних органов принципиально не отличались от таковых у животных, погибших в результате их заражения исходным штаммом "дикого" типа.

Впервые показано влияние экспрессии интактного или дефектного по гену *cafIM* оперона *fra* возбудителя чумы на электрокинетический потенциал клеток чумного микроба и других энтеробактерий. Выявлено что в клетках *cafIM* бактерий изменение величины  $\xi$ -потенциала связано с формой ЛПС штамма-продуцента.

Впервые сконструированы продуценты капсульного антигена на основе *Yersinia* spp., обладающие по данным РНГА в  $10^3$ - $10^4$  раз большей серологической активностью, чем природные штаммы *Y. pestis*. Установлено, что в регуляции синтеза капсульного антигена принимают участие неидентифицированные пока хромосомные гены иерсиний, отсутствующие у *E. coli*. Увеличение копийности *fra* оперона в клетках *Yersinia* spp., но не *E. coli*, приводит к температурнезависимому синтезу капсульного антигена.

Достоверно показана принципиальная возможность повышения протективности живых чумных вакцин за счет суперпродукции основного иммуногена *Y. pestis* - FI.

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ.

Сформулирована гипотеза, объясняющая механизмы устойчивости  $Fra^-$  штаммов *Y. pestis* к ряду антибиотиков *in vivo*. Учитывая, что возбудитель чумы является факультативным внутриклеточным паразитом, а капсульный антиген способен встраиваться в двухслойные фосфолипидные мембраны, образуя в них поры, проницаемые для воды, *a priori* высказано предположение, что *in vivo* индуцированные капсульным антигеном "водяные" поры могут быть основной причиной проникновения антибиотиков в макрофаг и его фаголизосомы, обеспечивающей чувствительность к антибиотикам клеток *Y. pestis* "дикого" типа.

На основании анализа доступных литературных сведений и данных собственных экспериментов предложена классификация факторов *Y. pestis*, обеспечивающих его персистенцию в природе.

Определены перспективные направления изучения факторов, определяющих вирулентность, блокообразующую активность и эпидемиологическую значимость различных экотипов возбудителя чумы на основе разработанных методических подходов и созданных коллекций изогенных штаммов.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ДИССЕРТАЦИИ.

Впервые разработана простая и надежная методология направленного конструирования неревертирующих  $Fra^-$ , *cafIM* или  $pFra^-$  мутантов *Y. pestis*, сочетающая локализованный мутагенез *in vitro*, гомологичную рекомбинацию *in vivo*, селекцию рекомбинантных клеток в организме иммунного животного и позволяющая получать достоверные данные о роли признака капсулообразования в проявлении патогенных и иммуногенных свойств возбудителя чумы. Разработанный способ локализованного мутагенеза *Y. pestis*, позволяющий направленно "выключать" гены факторов патогенности, защищен двумя авторскими свидетельствами (А.с. № 293939 и А.с. № 1754779).

Оптимизированы способы стабилизации наследования и экспрессии генетической информации в клетках *Y. pestis* и подобраны векторы, обеспечивающие стабильную суперпродукцию капсульного антигена в клетках энтеробактерий. Разработана методика прямой электрофоретической селекции трансформантов, содержащих последовательности ДНК, кодирующие поверхностные структуры бактерий. На основе аттенуированных штаммов иерсиний сконструированы суперпродуценты, обеспечивающие эффективную секрецию капсульного антигена в культуральную среду при температурах  $(25\pm 3)^\circ\text{C}$ , соответствующих минимальным питательным потребностям *Y. pestis*. Штаммы *Y. pestis* KM277 (EV11MpFSK3) и *Y. enterocolitica* KM33pFSK3 способны продуцировать капсульный антиген на голодных средах в количествах, равных или превышающих уровень продукции вакцинного штамма EV, выращиваемого на богатых питательных средах.

Сконструированный штамм *Y. pestis* KM276 (KM217pFSK3) с синтезом основного протективного антигена возбудителя чумы - фракции I, повышенным относительно уровня продукции других - "балластных" антигенов, может служить основой для разработки новой вакцины живой чумной.

В ГосКПБ "Микроб" депонирована коллекция, состоящая из 2 охраноспособных и 11 авторских штаммов - эффективных продуцентов белковых продуктов *fra* оперона и производных природных изолятов *Y. pestis*, представляемых как авторские в связи с их способностью образовывать атипичные варианты капсулы.

Сконструированные высоковирулентные  $\text{Fra}^-$  и *cafIM* штаммы *Y. pestis* рекомендуются для оценки эффективности коммерческих и экспериментальных чумных вакцин в отношении атипичных вариантов возбудителя чумы.

Результаты проведенных исследований послужили основой или были учтены при составлении ниже перечисленных документов:

- Методика лабораторная "Стерилизация F и I антигенов, выделяемых из вакцинных штаммов чумного микроба". Оболенск, 1990 (учрежденческий уровень внедрения).

- Методика лабораторная "Криотрансформация вакцинных штаммов чумного микроба плазмидными ДНК". Оболенск, 1990 (учрежденческий уровень внедрения).
- Пособие для научных сотрудников "Применение электрофореза в свободном потоке для отбора рекомбинантных бактериальных клеток, содержащих последовательности ДНК плазмиды pFga *Y. pestis*, экспрессирующие генетические детерминанты поверхностных биополимеров". Саратов, 1998 (учрежденческий уровень внедрения).
- Инструкция по изготовлению и контролю тест-заражающих культур вирулентных штаммов возбудителя чумы сухих. (Инструкция). - Москва, Саратов, Киров, 1999 (федеральный уровень внедрения).
- Методические указания "Основные критерии оценки вакцинных штаммов чумного микроба". Москва, Саратов, Киров, 1999 (федеральный уровень внедрения).

Разработанные методические приемы, сконструированные плазмиды и штаммы в настоящее время применяются в микробиологических, генетических, молекулярно-биологических, иммунологических и других исследованиях ряда лабораторий ГНЦ прикладной микробиологии (Оболенск, Московская обл.), АООТ "Институт инженерной иммунологии" РАО "Биопрепарат" (Любучаны, Московская обл.), РосНИПЧИ "Микроб", ГИСК им. Л.А. Тарасевича и НИИ микробиологии МО РФ (Киров). Список документов по внедрению научных достижений в практику приведен в конце автореферата.

#### ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:

1. Разработан комплекс методических приемов, позволивший создать уникальную коллекцию генетически маркированных штаммов, которые являются основой для проведения микробиологического, биофизического, биохимического и генетического изучения роли признака капсулообразования в патогенезе и иммуногенезе чумы, эпидемиологической значимости штаммов *Y. pestis*, отличающихся по способности образовывать капсулу.

2. Избирательное "выключение" синтеза капсульного антигена не приводит к снижению вирулентности мутантных штаммов *Y. pestis* в отношении белых мышей и морских свинок.  $Fra^-$  бактерии *Y. pestis* имеют селективные преимущества в организме морских свинок, выживших после заражения штаммами "дикого" типа.

3. Капсула *Y. pestis* представляет собой сложную надмолекулярную структуру, состоящую из целого ряда белков и ЛПС. Основным компонентом "классической" капсулы штаммов возбудителя чумы "дикого" типа, выращиваемых при температуре 37 °C и pH 7,2 *in vitro*, является капсульный антиген FI. При закислении среды культивирования при температуре 37 °C *in vitro* образуется капсула, состоящая в основном из антигена рН6. В *caf1M* штаммах при температуре 37 °C *in vitro* образуется атипичная капсула, в состав которой входит целый спектр белков, большая часть которых не идентифицирована. Биофизические, серологические и протективные свойства различных вариантов капсулы определяются составляющими их компонентами.

4. Генно-инженерная конструкция рFSK3, несущая в своем составе *fra* оперон чумного микроба, стабильно наследуется в штаммах *E. coli*, *Y. pestis* и *Y. enterocolitica* без селективного давления, обеспечивая экспрессию кластера генов *fra*. Штаммы *Y. pestis* и *Y. enterocolitica*, несущие рекомбинантную плазмиду рFSK3 и выращенные на полноценных питательных средах проявляют в гемагглютинационных реакциях на три-четыре порядка большую серологическую активность, чем вакцинный штамм EV. Штаммы *Y. pestis* KM277 (EV11MrFSK3) и *Y. enterocolitica* KM33pFSK3, обладающие гибридной плазмидой рFSK3, продуцируют на голодных питательных средах капсульный антиген в количествах равных или превышающих уровень продукции вакцинного штамма EV на полноценных питательных средах.

5. Экспериментальный генно-инженерный чумной штамм KM276 (KM217pFSK3), обеспечивает за счет суперпродукции капсульного антигена, обладающего повышенной

серологической активностью, протективность в 27 раз большую, чем маточная культура коммерческой вакцины живой чумной (штамм EV линии НИИЭГ).

6. Классификация факторов *Y. pestis*, обеспечивающих его персистенцию в природе.

#### АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Материалы диссертации доложены и представлены на: итоговых научных конференциях ГосНИИ ПМ (Оболенск, 1986, 1987, 1989, 1990); итоговых научных конференциях РосНИПЧИ "Микроб" (Саратов, 1994, 1995); межведомственной научной конференции "Актуальные вопросы профилактики опасных инфекционных заболеваний" (Киров, 1991); XIV научно-практической конференции ГосНИИ ПМ "Новые технологии и биосистемы. Достижения и перспективы" (Оболенск, 1991); IV Всероссийском съезде микробиологов, эпидемиологов и паразитологов (Нижний Новгород, 1991); Российской научной конференции "Генетика и биохимия вирулентности возбудителей особо опасных инфекций" (Волгоград, 1992); Российской научной конференции "Иммунология и специфическая профилактика особо опасных инфекций" (Саратов, 1993); межгосударственной научной конференции, посвященной 100-летию открытия возбудителя чумы "Профилактика и меры борьбы с чумой" (Алматы, 1994); I съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Саратов, 1994); межгосударственной научно-практической конференции, посвященной 100-летию открытия возбудителя чумы "Актуальные вопросы профилактики чумы и других инфекционных заболеваний" (Ставрополь, 1994); международной конференции "Гомеостаз и инфекционный процесс" (Саратов, 1996); International Symposium on Optical Science, Engineering, and Instrumentation. SPIE's Annual Meeting (Denver, Colorado, USA, 1996); VII съезде Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 1997); научно-практической конференции, посвященной 100-летию образования противочумной службы России (Саратов, 1997); совместном Американо-Российском семинаре в USAMRIID (Fort Detrick, USA, 1997); 7<sup>th</sup> International Congress on *Yersinia* (Nijmegen, the Netherlands, 1998); XVII

Российской конференции по электронной микроскопии (Черноголовка, 1998); 4<sup>th</sup> John Humphrey Advanced Summer Programme in Immunology (Пушино, 1998); юбилейной научной конференции, посвященной 70-летию НИИ микробиологии МО РФ (Киров, 1998); научной конференции учреждений по борьбе и изучению природно-очаговых инфекций Министерства Здоровья и Социальной Защиты (Улан-Батор, Монголия, 1999).

Диссертация обсуждена и одобрена на межлабораторной научной конференции РосНИПЧИ "Микроб" 10 декабря 1999 г. протокол № 96.

#### ПУБЛИКАЦИИ.

Основное содержание работы отражено в 75 научных публикациях, в том числе в 3 авторских свидетельствах. Список публикаций приведен в автореферате.

#### СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ.

Работа состоит из введения; 1 главы обзора литературы; 7 глав собственных исследований, включающих описание материалов и методов исследований, экспериментальную часть, анализ факторов возбудителя чумы, обеспечивающих его персистенцию в природе, по литературным данным и собственным наблюдениям; заключения; выводов; списка литературы, включающего 617 цитируемых работ. Общий объем диссертации составляет 325 страниц. Текст иллюстрирован 23 таблицами и 47 рисунками.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ К ЗАЩИТНЫМ МЕХАНИЗМАМ МАКРООРГАНИЗМА

#### 1.1.1. ПЕРСИСТЕНЦИЯ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ В ОРГАНИЗМЕ ХОЗЯИНА

Способность патогенных микроорганизмов проникать в свою экологическую нишу (организм хозяина) и переживать в ней - одна из наиболее интересных и интенсивно разрабатываемых проблем современной микробиологии. В последнее время все чаще появляются публикации по изучению персистентных характеристик микроорганизмов, направленных на преодоление защиты хозяина (антилизоцимная, антикомплементарная, антиглобулиновая, антигистонная и другие активности). На обширной эмпирической основе известных способов переживания патогенных бактерий в макроорганизме в последнее десятилетие был принят ряд попыток разработки классификации механизмов персистенции бактерий [58, 252, 434, 435].

Персистирование патогенных микробов в макроорганизме принято рассматривать как стратегию выживания вида. Но любая стратегия порождает разнообразие тактики, и смена экологической ниши бактериальной клеткой с ее переходом от сапрофитизма к паразитизму, при котором организм хозяина используется в качестве источника питания и среды обитания, причем микро- и макроорганизмы находятся в антагонистических взаимоотношениях, будет сопровождаться появлением новых биологических характеристик у бактерий, облегчающих адаптацию патогена к новым условиям существования. При этом следует иметь в виду, прежде всего, те структурно-функциональные перестройки у бактерий, которые они приобрели в процессе эволюции и постоянной адаптации к меняющейся экологической среде [58].

Принято считать, что клеточная стенка бактерий, в частности пептидогликан, должен быть экранирован, либо "сброшен", чтобы не индуцировать иммунный ответ хозяина. Это

связано с тем, что пептидогликан бактерий - уникальное образование клетки, формирующее ее жесткий каркас, является отличной иммунологической мишенью в организме, так как присутствует в прокариотических клетках и отсутствует у эукариот. Следует отметить, что у грамотрицательных бактерий пептидогликан "прикрыт" наружной мембраной, в верхнем слое которой находится такой сложный амфипатический биополимер, как ЛПС, который, как и пептидогликан, обладает выраженной способностью индуцировать альтернативный путь активации комплемента [107, 136, 137].

Поэтому, чтобы удержаться в организме хозяина, бактериальной клетке необходимо осуществить защиту пептидогликана и (или) ЛПС либо за счет дополнительных экранирующих структур, либо путем продукции различных секретируемых факторов, направленных против механизмов защиты организма, либо посредством "антигенной мимикрии" - схожести антигенных детерминант паразита и хозяина. Наконец, возможна просто утрата бактерией этих компонентов клеточной стенки в условиях образования ею "бесклеточных" (дефектных) L-форм. Исходя из этих посылок О.В. Бухарин [58] предложил следующую классификацию механизмов персистенции патогенных бактерий:<sup>4</sup>

- 1) факторы, "экранирующие" клеточную стенку бактерий;**
- 2) "антигенная мимикрия" - наличие общих гетерогенных антигенов в системе "паразит-хозяин";**
- 3) секретируемые факторы бактериальной природы, инактивирующие защитные механизмы хозяина;**
- 4) образование форм с отсутствием (дефектом) клеточной стенки бактерий: L-формы, микоплазмы.**

---

<sup>4</sup> Попытки классификации свойств, определяющих отличия патогенных бактерий от сапрофитов предпринимались и ранее. Так, по мнению В.Г. Петровской [262], "наиболее четким" разграничением "трех основных атрибутов патогенности (вирулентности)" являются "инфективность, инвазивность, или инвазионность, и токсигенность, или токсичность". И.Н. Моргунов еще в 1964 г. [240] отмечал, что "до недавнего сравнительно времени вирулентность микробов объясняли наличием у них инвазивности, агрессивности и инфекционности. Они отражали свойство проникать в организм, подавлять неспецифические механизмы защиты и развиваться (размножаться) в нем. Но, в сущности, эти понятия ничего не разъясняли".

Очевидно, что этот перечень необходимо дополнить

**5) факторами, обеспечивающими переживание и даже размножение патогенных бактерий внутри эукариотических клеток**, т.к. внутриклеточная локализация препятствует контакту микробов с клеточными элементами и гуморальными факторами иммунной системы хозяина [511].

Нам кажется целесообразным также включить в эту классификацию еще несколько пунктов из обзорных статей В.В. Finlay & S. Falkow [434, 435]:

**6) фимбрии или пили адгезии, обеспечивающие присоединение патогенов к клеткам хозяина;**

**7) факторы, обеспечивающие инвазивные свойства патогенных бактерий;**

**8) антигенная изменчивость бактерий, препятствующая эффективной работе иммунной системы.**

Правомочно дополнить рассматриваемую классификацию еще двумя пунктами:

**9) факторы, обеспечивающие антагонистическую активность бактерий в конкуренции за экологическую нишу [192];**

**10) факторы, обеспечивающие питательные потребности микроорганизма [222, 263].**

### 1.1.2. УСТОЙЧИВОСТЬ *Y. pestis* К ЗАЩИТНЫМ МЕХАНИЗМАМ ХОЗЯИНА

Возбудителем чумы - острой инфекционной болезни, характеризующейся явлениями тяжелой общей интоксикации, воспалительными процессами в лимфатических узлах, легких и других органах, - является *Yersinia pestis* - грамотрицательная бактерия, впервые описанная А. Yersin [605, 606].

В соответствии с описанной в предыдущем разделе классификацией кратко рассмотрим факторы, обеспечивающие *Y. pestis* возможность переживания в организме теплокровно-

го хозяина.

1) Клетки *Y. pestis* "дикого" типа при температуре 37 °С способны формировать капсулу [550, 561, 562], образованную капсульным антигеном FI [406, 407].

Плазмокоагулирующая способность может являться фактором, который в какой-то мере экранирует клеточную стенку бактерии за счет образования вокруг микробной клетки фибринового сгустка [118, 119];

pH6 антиген (I антиген, антиген 4, PsaA или пили адгезии) связывает 500-kDa аполипопротеин B100 из неиммунной сыворотки крови человека и животных [410] и реагирует с субъединицами Fc иммуноглобулинов человека подклассов G1, G2 и G3 [362, 607], что может приводить к образованию капсулоподобного слоя, покрывающего поверхность бактерии. Передача кодирующего его образование оперона *psa* в клетки кишечной палочки придавала последним способность к образованию капсулы, состоящей из антигена pH6 [347]. По данным иммуноэлектронной микроскопии клетки возбудителя чумы, выращенные при температуре 37 °С и кислых значениях pH среды, были покрыты капсулоподобной полимерной структурой подобной капсуле, образованной капсульным антигеном FI [411].

Наличие на поверхности клеток возбудителя чумы белка, образующего S слой (от surface - поверхность), коррелирует с устойчивостью бактерий к переваривающей активности фагоцитарных клеток [376].

2) Выявлено антигенное сходство у клеток *Y. pestis* с эритроцитами [53, 95, 145], тканями сердца человека [95], тканями селезенки и печени морской свинки [145]. Показано, что 45-kDa и, по-видимому, 14-kDa белки, кодируемые плазмидой pCad *Y. pestis*, являются перекрестно-реагирующими антигенами, общими для возбудителя чумы и клеток печени и селезенки человека [77]. В тканях грызунов с различной естественной резистентностью к чуме в ряде иммунных реакций выявлен различный спектр антигенов мимикрии с *Y. pestis* [45].

3) Клетки *Y. pestis* секретируют во внешнюю среду целый ряд факторов, противодействующих защитным механизмам хозяина:

а) капсульный или оболочечный антиген "фракция I" (подробно рассмотрен в разделе 1.1.3);

б) "мышинный" токсин ("фракция II") оказывает летальное действие на мышей и крыс, но не на других хозяев [397]; угнетает окислительно-восстановительные процессы в митохондриях сердца и печени чувствительных животных [399], функционируя, как адренэргический антагонист [394]; подавляет окислительный взрыв перитонеальных лейкоцитов белых мышей и приводит к снижению эффективности фосфорилирования высокомолекулярных белков в этих эукариотических клетках [33]; обладает фосфолипазной [238, 273] фосфотазной, аутокиназной, фосфодиэстеразной, деаминазной и NAD-гликогидразной активностями [238]; его суперантигенные свойства проявляются при низких ( $10^{-6}$  г) концентрациях - в условиях резкого снижения синтеза при температуре 37 °C [238];

в) V антиген ингибирует хемотаксис нейтрофилов [592], супрессирует синтез таких цитокинов как  $\gamma$ -интерферон и фактор некроза опухолей  $\alpha$  [513] за счет стимуляции продукции интерлейкина-10 - репрессора указанных выше цитокинов [516];

г) белки внешней мембраны (Yop) кодируются плазмидой pCad, наличие которой в клетке необходимо для проявления вирулентности возбудителя чумы [175, 533]. YopM, реагируя с тромбином, препятствует агрегации тромбоцитов [540]. YpkA обладает Ser/Thr-фосфокиназной активностью [441]. YopN и YopE ингибируют фагоцитоз [546-548]. Полагают, что YopN дефосфорилирует клеточные структуры хозяина за счет тирозинфосфатазной активности [450], а YopE обладает цитотоксичностью за счет способности деполимеризовать сеть актиновых микрофиламентов фагоцитарной клетки [547]. В настоящее время комплекс признаков, кодируемых плазмидой pCad, рассматривают как вирулон Yop - единую систему, позволяющую внеклеточно расположенным бактериям обезвреживать клетки, участвующие в иммунном ответе хозяина, разрушать их связи и вызывать их апоптоз путем инъекции бактериальных эффекторных протеинов. Эта система состоит из белков Yop и аппарата их сек-

реции III типа, названного Ysc. Аппарат Ysc состоит из 25 белков, включая секретин. По своим функциям большая часть белков Yops может быть разделена на две группы. Некоторые из них являются внутриклеточными эффекторами (YopE, YopH, YpkA/YopO, YopP/YopJ, YopM, YopT), тогда как другие (YopB, YopD, LcrV) формируют аппарат транслокации, который разворачивается на поверхности бактерии для доставки эффекторов внутрь эукариотических клеток через плазматическую мембрану. Секреция белков Yops запускается при контакте с эукариотическими клетками и контролируется белками вирулона, включая YopN, YueA, LcrG, которые закрывают бактериальный секреторный канал предположительно в виде затвора. Для точного функционирования системы необходимы также шапероны, названные белками Syc, которые находятся в бактериальном цитозоле. Транскрипция генов контролируется температурой и активностью аппарата секреции [413, 414];

д) активатор плазминогена (фибринолизин-плазмокоагулаза, Pla) отвечает за фибринолитическую активность *Y. pestis*, способен гидролизовать C3 компонент комплемента [568] и такие цитокины как фактор некроза опухолей  $\alpha$ ,  $\gamma$ -интерферон, интерлейкин 8 и протеин 1 хемотаксиса моноцитов [557]; высказано предположение о его Ig-протеазной активности [554];

е) рН6 антиген обладает цитотоксичностью в отношении моноцитов [390], альвеолярных макрофагов [311, 312], вызывает выраженное нарушение переваривающей функции макрофагов [80], приводит к снижению количества антителообразующих клеток, ингибирует реакцию митогензависимой бласттрансформации клеток селезенки и реакцию смешанной культуры лимфоцитов, подавляет рост клеток в системе интерлейкин-2 зависимой пролиферации Т-бластов [85];

4) Показана возможность выделения *Y. pestis* в L-форме в природных очагах чумы от грызунов [157], морфологические проявления, свойственные нестабильным L-формам бактерий, выявлены у возбудителя чумы, переживающего в блохах [182].

5) Клетки *Y. pestis* способны переживать и размножаться в моноцитах чувствительных животных [403]. За инактивацию компонентов кислородзависимой системы бактерицидности могут отвечать различные ферменты. Так, у возбудителя чумы выявлен антиген 5, отвечающий за каталазную активность [395, 397, 399], превышающую таковую у целого ряда других бактерий [401]; показано, что высокая каталазная активность может коррелировать с вирулентностью [543], но есть и данные, противоречащие этому наблюдению [115, 401]. Супероксиддисмутазная активность *Y. pestis* при температуре 37 °С была в 2-10 раз выше, чем при 28 °С [123, 357]. Также выявлена и охарактеризована пероксидаза чумного микроба [222].

6) Пили адгезии *Y. pestis* [79, 80] образованы рН6 антигеном [497] и отвечают за агглютинацию эритроцитов [390]. Эти пили способны связывать фибронектин, муцин и ганглиозид [78].

Передача *pla* локуса, кодирующего продукцию активатора плазминогена, в клетки кишечной палочки придавала последним адгезивную способность в отношении ряда эукариотических клеток [483] за счет способности активатора плазминогена связываться с экстрацеллюлярным матриксом и ламинином [490].

Высокомолекулярный капсульный антиген обладал гемагглютинирующей активностью за счет способности специфически связываться с D-галактозамином-НСI и глюкуроновой кислотой [300].

7) В качестве фактора инвазии *Y. pestis* принято рассматривать протеазу - активатор плазминогена [568, 591].<sup>5</sup>

8) Принято считать, что возбудитель чумы, в отличие от других представителей рода *Yersinia*, лишен сероваров и, соответственно, антигенной изменчивости [120, 397, 418], одна-

---

<sup>5</sup> При патологоанатомических исследованиях в органах погибших от чумы животных и людей отмечается "полное или почти полное отсутствие фибрина". Это позволило сделать предположение о том, что активатор плазминогена "не только участвует в локальном фибринолизе в очагах воспаления, но играет также роль "фактора распространения" [119].

ко недавно было показано, что в "полевочьих" штаммах *Y. pestis* V антиген представлен вариантом характерным для *Y. enterocolitica* O:3 серовара [603]. Оба серовара V антигена обладали выраженной протективной активностью в отношении штаммов с гомологичным вариантом V антигена, но не обеспечивали защиты животных при заражении штаммами *Y. pestis* другого серовара [449, 545].

9) *Y. pestis* продуцирует бактериоцин - пестицин, гидролизующий пептидогликан чувствительных бактерий [430]. Спектр его активности ограничивается несколькими атипичными штаммами *E. coli*, сероварами IA и IB *Yersinia pseudotuberculosis*, сероваром O:8 *Y. enterocolitica* и непестициногенными, но Pgm<sup>+</sup> вариантами *Y. pestis* [395]. По-видимому, пестицин обеспечивает селективные преимущества клеткам *Y. pestis* в конкуренции с другими патогенными представителями рода *Yersinia*, обладающими сходными механизмами поглощения неорганического железа и гема [526], т.к. мутантные клетки, утратившие чувствительность к пестицину за счет 5-bp делеции в гене пестицинового рецептора (*psn*) авирулентны и обладают сниженными способностями в отношении поглощения железа [499].

10) Гемолитическая активность обеспечивает бактериям *Y. pestis* дополнительный источник железа в виде гемоглобина из разрушенных эритроцитов. Она проявляется при температуре 37 °C и выше, но не при 28 °C и определяется геном *pla* плазмиды pPst [56].

До последнего времени в большинстве публикаций [119, 174, 198, 263, 303, 395, 427, 453, 526, 527, 537, 585] к "обязательным" факторам патогенности возбудителя чумы, как впрочем, и других представителей рода *Yersinia*, помимо кодируемой плазмидой кальцийзависимости системы секреции III-го типа, относят и продукты хромосомного кластера железо-регулируемых генов, обозначенного - HPI (high-pathogenicity island). Полная потеря этого "острова" ведет к значительному снижению вирулентности HPI<sup>-</sup>мутантов в отношении мышей [467]. Установлено, что часть "острова высокой патогенности" отвечает за продукцию

сидерофора, обеспечивающего поглощение клетками иерсиний железа [453],<sup>6</sup> являющегося необходимым фактором роста эукариотических и прокариотических клеток [303]. Однако, как справедливо отмечали Л.Н. Классовский и В.С. Петров [167], "любая утрата бактериями способности синтезировать" или получать "необходимое для развития клеток соединение, отсутствующее или имеющееся в недостаточном количестве в организме хозяина, должно или, во всяком случае, может приводить к утрате вирулентности". По мнению В.М. Степанова [305], факторы питания на вирулентность *Y. pestis* "могут действовать двояко: с одной стороны, они обеспечивают условия для синтеза или проявления детерминант вирулентности, а с другой - ограничивая размножение обладающих всеми детерминантами клеток, или, способствуя их размножению, определяют возможность проявления вирулентности возбудителя".

Таким образом, если система поглощения железа признана фактором патогенности возбудителя чумы, то необходимо "восстановить в правах" и такой классический "детерминант вирулентности" как независимость от дополнительной потребности в пуринах<sup>7</sup> [399] и второй механизм поглощения железа, начинающийся с сорбции гемина [526, 527, , 573].<sup>8</sup> На наш взгляд, системы, обеспечивающие питательные потребности микроорганизмов необходимо четко дифференцировать от собственно факторов патогенности.<sup>9</sup> Следует отметить, что уже Т.В. Wiggows [399] выделял факторы питания в отдельную группу факторов вирулентности. К факторам, обеспечивающим питательные потребности *Y. pestis* в организме теплокровного хозяина, помимо системы поглощения железа следует отнести способность чумно-

<sup>6</sup> Показано, что избирательное отсутствие экспрессии только генов, отвечающих за признак пигментсорбции и локализованных в составе этого "острова", не приводит к снижению вирулентности Hms<sup>-</sup> мутантов возбудителя чумы [3, 200, 203, 214, 226].

<sup>7</sup> Следует отметить, что в последней монографии И.В. Домарадского [119] способность синтезировать пурины, как и способность к синтезу пептицина, все еще рассматривается в качестве фактора вирулентности.

<sup>8</sup> Интересно, что во время ответов на вопросы после своего выступления на 7<sup>th</sup> International Congress on *Yersinia* (Nijmegen, the Netherlands, 1998) А. Ракин [536] признал, что продукция сидерофора не может расцениваться фактором патогенности в строгом смысле этого термина, о чем и свидетельствуют кавычки в названии его выступления.

<sup>9</sup> К истинным факторам патогенности следует относить лишь те уникальные свойства патогенных микробов, которые обеспечивают их персистенцию в паразитарных системах и отсутствуют у неболезнетворных и условно-патогенных микроорганизмов.

го микроба при температуре 37 °С прекращать эндогенный синтез ряда аминокислот (валина, изолейцина, цистеина) [32, 116] и значительно увеличивать поглощение аминокислот из среды культивирования [242]. Это должно значительно сокращать его энергетические затраты, т.к. на модели кишечной палочки показано, что синтез одной молекулы гистидина требует 41 молекулу АТФ, а транспорт в клетку уже готовой аминокислоты - только 1-2 молекулы АТФ [364]. К этой же категории факторов относят и способность к синтезу ароматических аминокислот, т.к. они в клетках млекопитающих не синтезируются [263]. Интересно, что авирулентные для морских свинок *aroA* мутанты возбудителя чумы сохраняли вирулентность для мышей на уровне исходного штамма, хотя сроки жизни погибших животных увеличивались примерно на двое суток [524].

Необходимо отметить, что хотя представленный выше перечень уже установленных и предполагаемых факторов, обеспечивающих переживание *Y. pestis* в организме хозяина, является далеко не полным (не рассматривались вопросы, связанные с устойчивостью к действию сыворотки [527], продукцией нейраминидазы и аденилатциклазы [236], уреазной [257] и антилизоцимной [297] активностями, синтезом 32-kDa протеина внешней мембраны, имеющегося у всех вирулентных для морских свинок и человека экотипов<sup>10</sup> *Y. pestis*, но отсутствующий у штаммов выделенных от полевок (*Microtus brandti*) и их блох [612, 613], регуляцией экспрессии указанных выше факторов [466, 523, 527, 573]), на его примере отчетливо видна полидетерминированность вирулентности возбудителя чумы. Более того, каждая из биомолекул может обладать несколькими активностями, направленными на преодоление различных звеньев системы защиты макроорганизма, обеспечение персистенции *Y. pestis* в организме блохи и окружающей среде [238, 370, 431].

---

<sup>10</sup> Введенный И.Л. Мартиневским термин "экотип" отражает отличие ряда свойств выделенных в разных природных очагах штаммов возбудителя чумы, обусловленные географической разобщенностью очагов чумы с выраженными экологическими различиями в условиях существования микроорганизма. Следует отметить, что этот термин не соответствует требованиям Международного кодекса номенклатуры бактерий [116, 119].

## 1.2. КАПСУЛЬНЫЙ АНТИГЕН *Y. pestis*

### 1.2.1. ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ, УСЛОВИЯ БИОСИНТЕЗА, ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА

Наличие капсулы у возбудителя чумы было установлено еще А. Yersin [605, 606]. Более детально феномен капсулообразования у *Y. pestis* описан S. Rowland [550] и Н. Schütze [561, 562], которые наблюдали, что при росте на искусственных питательных средах при температуре 37 °С и в организме теплокровных животных чумной микроб синтезирует желатиноподобное вещество, окружающее в виде капсулы бактериальные клетки и постепенно диффундирующее в окружающую среду. А.И. Желтенков [142] отмечал, что капсула состоит из "гомогенного вещества слизистой консистенции, плохо окрашивающегося анилиновыми красками. В некоторых случаях толщина оболочечной субстанции (капсулы) может в несколько раз превосходить толщину самой бактериальной клетки. Довольно часто оболочечная субстанция окружает не каждого микроба в отдельности, а целые группы их, что указывает на секреторное происхождение ее". Для выделения оболочечного антигена Н. Schütze [561, 562] выращивал культуру возбудителя чумы на агаре в течение 48 ч при температуре 37 °С, затем суспендировал бактериальные клетки в физиологическом растворе и нагревал суспензию при температуре 60 °С 90 мин. После центрифугирования супернатант состоял в большей своей массе из оболочечного антигена и в меньшей части из соматического антигена. Н.Н. Жуков-Вережников и Т.И. Липатова [146] получали капсульную субстанцию при помощи отмывания ее от бактерий, выращенных в течение 36 ч при температуре 37 °С на средах с рН 6,4-6,6, "физиологическим раствором, слегка подщелоченным КОН. После 1-2-часовой обработки в Schüttel-apparat`e, как показывает мазок, капсулы уже совершенно исчезают, сами же тела бактерий остаются вполне неповрежденными и число их не сокращается (подсчет по Райту)".

Практически все последующие работы по изучению физико-химических и иммуно-химических свойств капсульного антигена были выполнены на основе препаратов фракции I, выделенных из водно-солевого экстракта ацетонвысушенных клеток по способу, разработанному E.E. Baker *et al.* [381, 382].

При температуре 37 °С образуется в 800-1000 раз больше капсульного антигена, чем при 28 °С [382]. Штаммы с высоким уровнем синтеза продуцируют "от 128 мкг и более F<sub>1</sub> на 1 мг сухих клеток" [161]. Синтезируемый при температуре 28 °С антиген F<sub>1</sub> находится в виде комплекса с другими компонентами и не может диффундировать в среду, а при температуре 37 °С только около 13 % капсульного антигена прочно связано с бактериальной клеткой [426]. По другим данным в среду культивирования переходит 30-50 % синтезируемого антигена [368]. Принято считать, что в клетках, выращенных при температуре 28 °С, капсула не образуется, а фракция I может быть выявлена после дезинтеграции клеток [436]. Однако использование высокочувствительных методов позволило обнаружить у клеток чумного микроба, выращенных при температуре 28 °С, капсульный антиген, расположенный на поверхности клетки [48]. "Результаты ТИФА с типичными штаммами *Y. pestis* показали, что МКА способны определять Ф<sub>1</sub> на поверхности и внутри клетки, а также в культуральной жидкости бактерий, выращенных как при 28 °С, так и при 37 °С. Однако в последнем случае на наружной мембране выявлялось в 26 раз больше антигена, чем при культивировании бактерий при 28 °С. В то же время соотношение концентраций *caf*-пептида внутри и снаружи клетки мало зависело от температуры роста микробов, превышая в 1.4 и 2.4 раза соответственно количество антигена, локализованного на поверхности микроорганизмов, выращенных при 28 °С или 37 °С. Кроме того, количество секретируемой Ф<sub>1</sub> в среду культивирования по сравнению с клеточной стенкой бактерий, выращенных при 37 °С, оказалось больше в 2.5 раза" [333].

Продукция фракции I возможна в широком диапазоне рН с максимальным выходом

капсульного антигена в интервале рН от 6,3 до 7,3 [529].

На уровень синтеза фракции I чумного микроба влияет не только температура, но и состав питательной среды. Для высокого уровня синтеза FI питательная среда должна содержать аргинин, триптофан,  $\alpha$ -аминомасляную кислоту, тирозин, глицин, орнитин, гистидин, пантотенат кальция, глюконат кальция и витамин B1. Отсутствие в среде одного из данных веществ приводит к резкому снижению (от 40 до 83,6 %) выработки фракции I [331].

Классическая методика выделения фракции I по E.E. Baker *et al.* [381, 382] заключается в следующем. Штамм *Y. pestis* "дикого" типа выращивают при температуре 37 °C на плотной питательной среде в течение трех суток. Клетки смывают физиологическим раствором и двукратно обезвоживают охлажденным ацетоном. Капсульный антиген экстрагируют из ацетонвысушенных клеток 2,5 % раствором NaCl в течение суток при комнатной температуре. Выделение капсульного антигена из солевого раствора проводят с помощью переосаждения насыщенным раствором сульфата аммония (рН 7,5).<sup>11</sup> Препарат, преципитирующий при насыщении 0,25-0,3, был обозначен как FIA, а при 0,3-0,33 - FIB. Указанные субфракции были серологически идентичны, но фракция IA помимо белка содержала полисахаридный компонент, в то время как фракция IB - чистый белок.

Метод выделения FI из ацетонвысушенных клеток был усовершенствован В.И. Вейнблатом с соавт. [68, 69], которые для более полного извлечения антигена из водно-солевого раствора предложили его экстракцию трихлоруксусной кислотой. Это позволило получить дополнительные фракции IC и ID, серологически идентичные фракциям IA и IB по результатам РНАт и РДИД. Однако, в отличие от фракций IA, IB и IC, фракция ID не реагировала в РНГА. Было высказано предположение, что это "связано с более глубокой гаптенизацией препарата". По своему химическому составу фракции IC и ID оказались белковонуклеополисахаридными комплексами, поскольку содержали 60-69 % белка, 28-31 % полисахарида, 1-

2 % нуклеиновых кислот.

Исходя из того, что капсульный антиген непрочно связан с микробной клеткой и легко переходит в среду культивирования [144, 368, 426], в последнее время его чаще всего выделяют из культуральной жидкости. Интересно, что препарат FI, полученный путем фракционирования культуральной жидкости сульфатом аммония, превосходил по своей иммунохимической активности препараты, полученные по оригинальной методике E.E. Baker *et al.* [70, 71, 538]. В 1983 г. М.М. Титенко с соавт. [326] предложили метод выделения FI из культуральной жидкости осаждением в изоэлектрической точке, что позволило значительно сократить сроки и увеличить выход конечного продукта. Л.Н. Сердобинцевым [299] был разработан метод выделения FI из культуральной жидкости с использованием колоночной хроматографии на молекулярных ситах.

Интересно, что препараты FI, выделенные из жидкой среды выращивания, были лишены полисахаридных примесей и представляли собой монокомпонентную белковую систему [70, 71, 326, 299]. В то же время есть данные, что даже препараты FI, выделенные из супернатанта культур, выращенных на жидких средах, содержат примеси ЛПС [301, 313, 368]. Комплексное исследование капсулообразования с помощью иммунологических и электронно-микроскопических методов показало, что гелеподобная капсула *Y. pestis* образована FI антигеном, постепенно переходящим в окружающую среду в процессе культивирования [156, 180, 181, 397, 406, 407, 415, 584]. Хотя после указанных выше экспериментов, клонирования и определения первичной нуклеотидной последовательности *fra* оперона [350, 351, 443], кодирующего капсулообразование у *Y. pestis*, и конструирования бескапсульных вариантов возбудителя чумы за счет делеции части структурного гена *cafI* [162], тот факт, что структурный компонент капсулы *Y. pestis* состоит из белка, получил практически всеобщее признание, периодически появляются публикации, свидетельствующие о качественно иной

---

<sup>11</sup> Основным недостатком этого метода получения капсульного антигена FI является то, что для выделения антигена использовали не собственно вещество капсулы *Y. pestis*, а экстракт из разрушенных ацетоном бакте-

структуре "субстанции", ответственной за антигенную и биологическую активность капсульного материала [159, 428, 445, 527]. На наш взгляд, основой для этого заблуждения послужила работа R. Glosnicka, E. Gruszkiewicz [445], которые в качестве источника выделения антигена "панкреатического перевара оболочки" (pancreatic envelope digest antigen) использовали ацетонвысушенные клетки штамма EV, выращенные в течение 48 ч при температуре 37 °С. Антигены экстрагировали 0,9 %-ным раствором NaCl, а надосадочную жидкость использовали в последующих экспериментах. Неочищенный "экстракт капсульной оболочки" содержал 32 % белков, 2 % углеводов и **значительное количество нуклеиновых кислот**. Наличие в препарате последних свидетельствует о разрушении клеток в процессе подобной обработки и, на наш взгляд, термин "экстракт капсульной оболочки" неправомерен, т.к. помимо антигенов, находящихся на клеточной поверхности, в нем присутствуют и экстрагированные внутриклеточные компоненты.<sup>12</sup> Последующее использование ферментативного переваривания панкреатином, хроматографии на колонках, содержащих смесь мембран эритроцитов человека с целитом, и рехроматографии на сефадексе G-200, позволило получить однородный препарат АППО, обладающий высокой специфичностью в серологических реакциях и рецепторной активностью по отношению к фагу чумного микроба. Изучение химических и физических свойств антигена продемонстрировало его липополисахаридную природу. Показано, что углеводная часть препарата состояла из галактозы и фукозы. Липидная фракция содержала фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин. По предварительным данным, ЛПС АППО отличался от ЛПС клеточной оболочки *Y. pestis* отсутствием глюкозы, гексозаминов и наличием этаноламина. Чтобы подчеркнуть различия ЛПС АППО и эндотоксина возбудителя чумы, он был обозначен термином "галактолипид". Было высказано мнение, что за антигенную специфичность галактолипида ответственна его полисахаридная часть

---

риальных клеток, содержащий также компоненты клеточной стенки и протоплазмы.

<sup>12</sup> Аналогичного мнения придерживается И.В. Домарадский [119], который отмечает, что "водно-солевой экстракт содержит, **помимо FI и FII**, полисахаридно-липидный комплекс". Его полисахаридная часть "состоит из галактозы и фукозы, а" в липидную - входят "фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин".

[445]. Другой группой исследователей из препарата капсульного антигена, полученного осаждением сульфатом аммония по E.E. Baker *et al.* [381, 382], методом Вестфалья-Людерица выделен ЛПС, обладающий значительной вязкостью и не вызывающий летального шока у мышей при внутрибрюшинном введении в дозах 1-2 мг [159], что дополнительно, по мнению авторов работы, подтверждало белково-липополисахаридную организацию фракции I чумного микроба. Однако попытка воспроизведения экспериментов, подтверждающих эту точку зрения [98], свидетельствует о некорректности выводов, сделанных цитированными выше авторами. Препарат FI, полученный по методу E.E. Baker *et al.* [381, 382], с концентрацией белка 2 мг/мл экстрагировали горячим фенольным методом. ЛПС осаждали 70 % этанола, высушивали и разводили до концентрации 1 мг/мл. Полученный препарат не реагировал с моноклональными антителами к FI. Эти данные были подтверждены обработкой препарата FI различными ферментами. Обработка протеиназой K приводила к снижению титров РНГА с 1:64000 до 1:128. Обработка препарата липазой, ДНК-азой и РНК-азой не влияла на активность реакции. Эти данные соответствуют классической работе E.E. Baker *et al.* [382], в которой FIA и FIB после обработки трипсином теряли свою иммунохимическую активность.<sup>13</sup> Кроме того, простое строение галактолипида, представляющего собой по сути гаптен, не позволяет рассчитывать на его высокую иммуногенность, но он может индуцировать синтез антител к минимальным количествам примесей белка, сохранившимся в виде примесей в липидных мицеллах, являясь, по сути, липидным адъювантом.

Фракции IA и IB, полученные по методу E.E. Baker *et al.* [382], а также фракции IC и ID, выделенные по способу В.И. Вейнבלата с соавт. [69] представляли собой серии молекулярных агрегатов с молекулярными массами от 300 kDa до 1,5 MDa [69, 368, 388, 451]. Выделение капсульного антигена более щадящими методами из культуральной жидкости, ис-

---

<sup>13</sup> Следует отметить, что есть данные и о высокой устойчивости препарата FIA к специфическому действию трипсина, химотрипсина, протеазы V8, протеиназы K. Лишь прогревание FIA в растворе при 95 °C в течение 5 мин делало его доступным действию протеаз, воздействие которых закономерно приводило к существенному снижению иммунохимической активности антигена [327].

ключаящими этапы обработки ацетоном и высушивания, позволяет получать агрегат субъединиц с молекулярной массой до 2,0 MDa [299, 368].

Определение изоэлектрической точки FI показало, что ее величина для фракции IA составляла 4,5, а для IB - 4,7 [382], или 4,6 и 4,8, соответственно [388]. Следует отметить, что эти данные характеризуют препараты фрагментированного капсульного антигена, выделенного в достаточно жестких условиях. Значения pI для препаратов выделенных из культуральной жидкости с помощью гелевой фильтрации или изоэлектрической преципитации составляло  $3,95 \pm 0,05$  [299, 326],  $4,0 \pm 0,05$  [317] или  $4,1 \pm 0,05$  [71, 131, 133]. Изоэлектрическая точка для препаратов, полученных из культуральной жидкости высаливанием сульфатом аммония с последующей очисткой от эндотоксина с помощью хроматографии на иммобилизованном полимиксине В, находилась в диапазоне 4,3-4,5 [368]. Эти отличия могут свидетельствовать об изменении, и, может быть, определенной степени нарушения структуры и конформации макромолекул антигена, выделенного из ацетонвысушенных клеток, и влиянии на величину pI примесей липополисахарида. Интересно, что изоэлектрическая точка FI, рассчитанная на основе данных о первичной нуклеотидной последовательности его субъединицы составляет 4,3 [350, 443].

При исследовании FI методами вискозиметрии и спектров рассеяния было показано, что для нативного капсульного антигена характеристическая вязкость равна  $476 \text{ см}^3/\text{г}$ , молекулярная масса по Тенфорду - 3,6 MDa, для препарата подвергнутого кипячению -  $56,7 \text{ см}^3/\text{г}$  и 43 MDa, соответственно. Температура диссоциации FI зависит от растворителя и лежит в интервале 50-85 °C [247].

### 1.2.2. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА

В исследованиях с применением сканирующей электронной микроскопии Т.Н. Chen, S.S. Elberg [406] показали, что капсульный антиген образует на поверхности бактерий грану-

ляционный слой, который постепенно диффундирует в окружающую среду. Н.П. Коннов [180] при негативном контрастировании клеток *Y. pestis* установил, что капсула отстояла на 0,125 нм от клеточной стенки и имела четкие контуры. Однако при достаточно интенсивном отмывании зона капсульного вещества истончалась, и образовывались участки, полностью лишенные капсулы. Совместное использование иммуноферритинового метода и электронной микроскопии позволило А.Г. Золотареву и соавт. [156] подтвердить эти данные. Капсула на электронных микрофотографиях представлена в виде обрывков фибриллярного материала (диаметр отдельных фибрилл около 3 нм) [164] или внеклеточного фибриллярного матрикса [180, 407]. Однако в большинстве случаев капсула *Y. pestis* определялась как аморфное вещество, и только при достаточном увеличении на снимках можно было видеть элементы ячеистой структуры капсулы и отдельные "фимбриеподобные тяжи" длиной порядка 0,25-15 нм, расходящиеся в разные стороны от поверхности бактерии [180, 300]. Интересно, что капсулы некоторых энтеротоксигенных или способных вызывать септицемию штаммов *E. coli* образованы белковым антигеном CS31A, представляющим собой фимбрии диаметром 2 нм [444], а структурная субъединица этих пилей - C1pG филогенетически родственна структурной субъединице капсульного антигена Caf1 [389].

В отношении молекулярной организации капсульного антигена, большинство авторов поддерживают точку зрения о том, что FI состоит из большого числа субъединиц. Было показано, что ген *caf1* (*ycaF*) кодирует белок Caf1 (YcaF) с молекулярной массой 17,6 kDa, состоящей из 170 аминокислот. При удалении сигнального пептида из Caf1 образуется 15,5-kDa зрелый белок [350, 443].

На основании данных об одинаковой иммунохимической активности в РДИД как исходного так полностью диссоциированного капсульного антигена было сделано предположение о том, что антигенные детерминанты FI определяются структурой субъединицы и не зависят от конформации надмолекулярного образования [388].

Блокирование аминокислотных групп капсульного белка тринитробензосульфокислотой не сни-

жало иммунохимической активности FIA, что является аргументом против определяющего участия N-концевого аланина, а также аминокислот, содержащих боковые аминокислотные группы, в формировании антигенных детерминант. Было высказано предположение, что наиболее вероятным способом организации основного антигенного эпитопа является структура, образованная связанными между собой в определенном порядке субъединицами FIA [327]. Однако та же группа исследователей в том же году публикует материалы свидетельствующие о том, что в коммерческих противочумных сыворотках установлено наличие антител, как к агрегированной, так и диссоциированной формам FI [328].

В результате исследования гипериммунных сывороток, полученных к интактной FI и к капсульному антигену, структура которого была нарушена температурной обработкой, в том числе в присутствии SDS, было сделано заключение, "что секвенциальные антигенные детерминанты FI не являются иммунодоминантными и не определяют известных свойств диагностических сывороток. Высокие титры противочумных диагностических сывороток определяются конформационнозависимыми эпитопами агрегированной формы фракции I" [286].

В результате компьютерного анализа аминокислотной структуры субъединицы CafI было установлено, что она состоит из двух  $\beta$ -структурных доменов, соединенных между собой гидрофильной неструктурированной петлей, которая соответствует основному В-клеточному эпитопу данного белка (аминокислотные остатки 72-95). Высказано предположение, что эта гидрофильная петля расположена на поверхности субъединицы напротив С-концевой последовательности, которая, возможно, отвечает за агрегацию субъединиц белка, не препятствуя экспозиции В-клеточных эпитопов на поверхности образующихся агрегатов. Два Т-клеточных эпитопа расположены в С-концевых областях доменов (аминокислотные остатки 51-71 и 129-149) [113, 610]. Аналогичные результаты были получены при тестировании синтетических пептидов, соответствующих отдельным участкам этого белка, с помощью

реакции ГЗТ и ИФА [215]. Синтезированные пептиды, соответствующие аминокислотным последовательностям 51-69 и 129-149, вызывали реакцию ГЗТ, тогда как пептиды 71-95 и 116-130 этими свойствами не обладали. Наиболее выраженная реакция ГЗТ развивалась под влиянием пептида 51-69.

Модификация Саf1 по аминокислотному остатку Тир-71 приводила к снижению способности такого белка вызывать реакцию ГЗТ и бластную трансформацию лимфоцитов [64, 65]. Наиболее выраженным В-клеточным эпитопом является аминокислотная последовательность 71-95, соответствующая неструктурированной петле зрелой субъединицы белка.

Тестирование пяти перекрывающихся олигопептидов, включающих полную аминокислотную последовательность зрелого белка Саf1, методом ИФА с помощью трех различных чумных гипериммунных сывороток и четырех моноклональных антител специфичных в отношении F1 проводили с целью выявления линейных В-клеточных эпитопов [517]. Установлено, что как минимум два линейных В-клеточных эпитопа расположены на С-концевом участке F1. Тот факт, что один из клонов IgG не реагировал ни с одним из олигопептидов, но вступал в реакцию с полной последовательностью F1, свидетельствует о наличии у капсульного антигена как минимум одного конформационного В-клеточного эпитопа.

Компьютерное сравнение аминокислотной последовательности капсульного антигена с первичными структурами других известных белков выявило несколько гомологичных участков. Установлена гомология Саf1 с сегментами константных доменов рецептора Т-лимфоцитов, с  $\beta$ -структурным оболочечным белком вируса иммунодефицита обезьян, а также с сегментом гемолизина холерного вибриона и предшественником аденилатциклазы возбудителя коклюша. Предполагается, что найденные гомологичные фрагменты сравниваемых белков обладают близкими структурными, а возможно, и функциональными свойствами [113].

Диссоциация агрегатов F1 на субъединицы происходила при прогревании образцов,

содержащих 0,1 % меркаптоэтанола и 0,25 % SDS, в течение 5 мин при температуре 95 °С. Устранение SDS из препаратов белка приводило к реассоциации субъединиц в серию агрегатов, отличающихся по молекулярной массе [388]. Позднее Л.Н. Сердобинцевым [299] было показано, что под влиянием денатурирующих факторов, таких как температура, додецилсульфат натрия и мочевины происходила диссоциация агрегированной формы капсульного антигена. Так, прогревание капсульного антигена при 100 °С в течение трех минут вызывало его диссоциацию до тетрамера с молекулярной массой 55 kDa. Лиофилизированный препарат капсульного антигена под влиянием SDS частично распадался, образуя набор олигомеров с различными молекулярными массами. Прогревание FI в буфере, содержащем 0,1 % SDS, при 100 °С в течение трех минут приводило к образованию субъединичной формы антигена. Присутствие 0,1 % SDS в растворе капсульного антигена не влияло на иммунохимическую активность препарата. Прогревание капсульного антигена в буфере с 7 М мочевиной приводило к диссоциации до димера с молекулярной массой 25 kDa. Удаление денатурирующих агентов из раствора приводило к ассоциации субъединиц в тетрамеры. С течением времени происходила реассоциация субъединиц в олигомеры большей молекулярной массы. Характер денатурирующего воздействия температуры, вызывающей абсолютное преобладание в растворе тетрамера, указывает на то, что данная структура обладает конформационным оптимумом и обеспечивает максимальное взаимодействие комплементарных поверхностей субъединиц. Процесс формирования тетрамеров фракции I происходит в результате образования водородных связей между отдельными димерами, а формирование димеров происходит, в основном, за счет гидрофобных взаимодействий.

В исследованиях Л.Н. Сердобинцева [299] показано, что в объединении субъединиц в единую надмолекулярную структуру решающая роль принадлежит комплементарным участкам, расположенным на поверхности отдельных субъединиц. Формирование специфической структуры данных участков находится в абсолютной зависимости от конформационного состояния белковой глобулы субъединицы. Изменение ее пространственной упаковки, вызван-

ное каким либо фактором, приводит к нарушению специфичности "липких" участков и последующей диссоциации агрегата. Процесс диссоциации исходной макроструктуры капсульного антигена имеет существенные особенности. Воздействия, приводящие к нарушению специфического профиля молекулярной поверхности субъединицы в результате изменения поверхностного заряда или теплового разворачивания глобулы, изменяют общее структурное состояние субъединицы таким образом, что в новых условиях термодинамически выгодным становится их ассоциация в систему из четырех единиц. Таким образом, вещество капсульного антигена переходит из высокоагрегированного состояния в тетрамер. По-видимому, внутренняя энергия структурного ансамбля тетрамеров находится в термодинамическом равновесии с энергией среды, что определяет его относительную устойчивость. При охлаждении раствора тетрамер становится неустойчивой системой и распадается.

С помощью направленной химической модификации А.М. Васильевым с соавт. [65] было установлено, что аминокислотные остатки Тир-23, Тир-51 и Тир-138 в белке CafI принимают участие в процессе агрегации и формировании капсулы чумного микроба. Они выполняют функции основных ориентиров при стыковке субъединиц и формировании гидрофобных ядер в структуре надмолекулярного образования. Наличие гидрофильной перетяжки между двумя доменами делает структуру агрегата субъединиц CafI рыхлой и ячеистой.

В нативном состоянии антиген FI является сложноорганизованной надмолекулярной структурой с молекулярной массой около 2 MDa [72, 299, 317, 368, 584].

О пространственной структуре агрегатов субъединиц капсульного антигена есть следующие предположения: молекула FI в водных растворах имеет форму вытянутого эллипсоида вращения и может быть отнесена к асимметричным белкам с хаотически скрученными высокосольватированными полипептидными цепями [72]; по данным спектров рассеяния, структурная организация FI не может соответствовать модели жесткой асимметричной частицы, а четвертичная структура может быть собрана непосредственно из тетрамеров [344]. В составе капсульного антигена отсутствует цистеин. Таким образом, вторичная, третичная и

четвертичная структуры капсульного белка образуются без участия дисульфидных связей [68, 69, 350, 443].

Гель капсульного антигена является "обратимой, неограниченно набухающей структурой с непрерывными фазами белка и растворителя, формирующей твердофазное образование по типу полупроницаемой мембраны". Гели FI могут существовать в коагуляционном, конденсационном и кристаллизационном виде. Отмечена способность белка FI к существованию в виде твердофазных образований различной морфологии (пленки, дендритные и фибриллярные кристаллические образования) после удаления из его кристаллизационных гелей растворителя [299].

### 1.2.3. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ПРОДУКЦИИ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА

О.А. Проценко с соавт. [271] показали, что гены, ответственные за синтез FI и "мышинного" токсина, локализованы на внехромосомном репликоне. В результате передачи реципиентным клеткам *Y. pestis* плазмиды с молекулярной массой около 60 MDa трансформанты приобретали способность к продукции антигена FI и "мышинного" токсина. Плазида, считавшаяся до этого криптической была обозначена pFra/Tox (позднее название было сокращено до pFra).<sup>14</sup>

Молекулярная масса репликона, кодирующего синтез FI вариабельна и может достигать у полевоцых штаммов 80 MDa [94, 152, 338, 339], а у отдельных штаммов основного подвида - 190 MDa [338, 339]. Описан также штамм Dodson с редуцированной формой плазмиды - < 40 MDa [527]. Показана возможность обратимой интеграции плазмиды pFra в различные участки хромосомы *Y. pestis* [174, 202, 275, 437, 534, 590].

Изучение генетических механизмов, контролирующих функционирование pFra *Y. pestis* в гетерологичных хозяевах показало, что эта плазида стабильно наследуется в клетках *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, обеспечивая синтез FI [185, 187, 207, 208]. Однако выявлено отсутствие синтеза антигена FI и нестабильность pFra в клетках кишечной палочки [152]. Ряд исследователей столкнулся с затруднением экспрессии клонированного в составе векторных молекул ДНК кластера генов *fra* оперона в клетках *E. coli* [91, 111, 358], отмечая отсутствие продукции FI в клетках кишечной палочки при использовании плазмидных векторов pBR322<sup>15</sup> или pBR327. Высказано предположение, что капсульный антиген может оказывать токсическое действие на клетки штамма-продуцента, что, в свою очередь, приводит к накоплению в популяции микроорганизмов с дефектами *fra* оперона, вызванными встраиванием в его структуру IS-элементов

---

<sup>14</sup> Как ни странно, до последнего времени некоторые чумологи считают, что вопрос о локализации генов, отвечающих за синтез FI окончательно решенным считать нельзя [119, 186]. Представленный в настоящем разделе обзор публикаций, на наш взгляд, свидетельствуют об обратном.

[111].

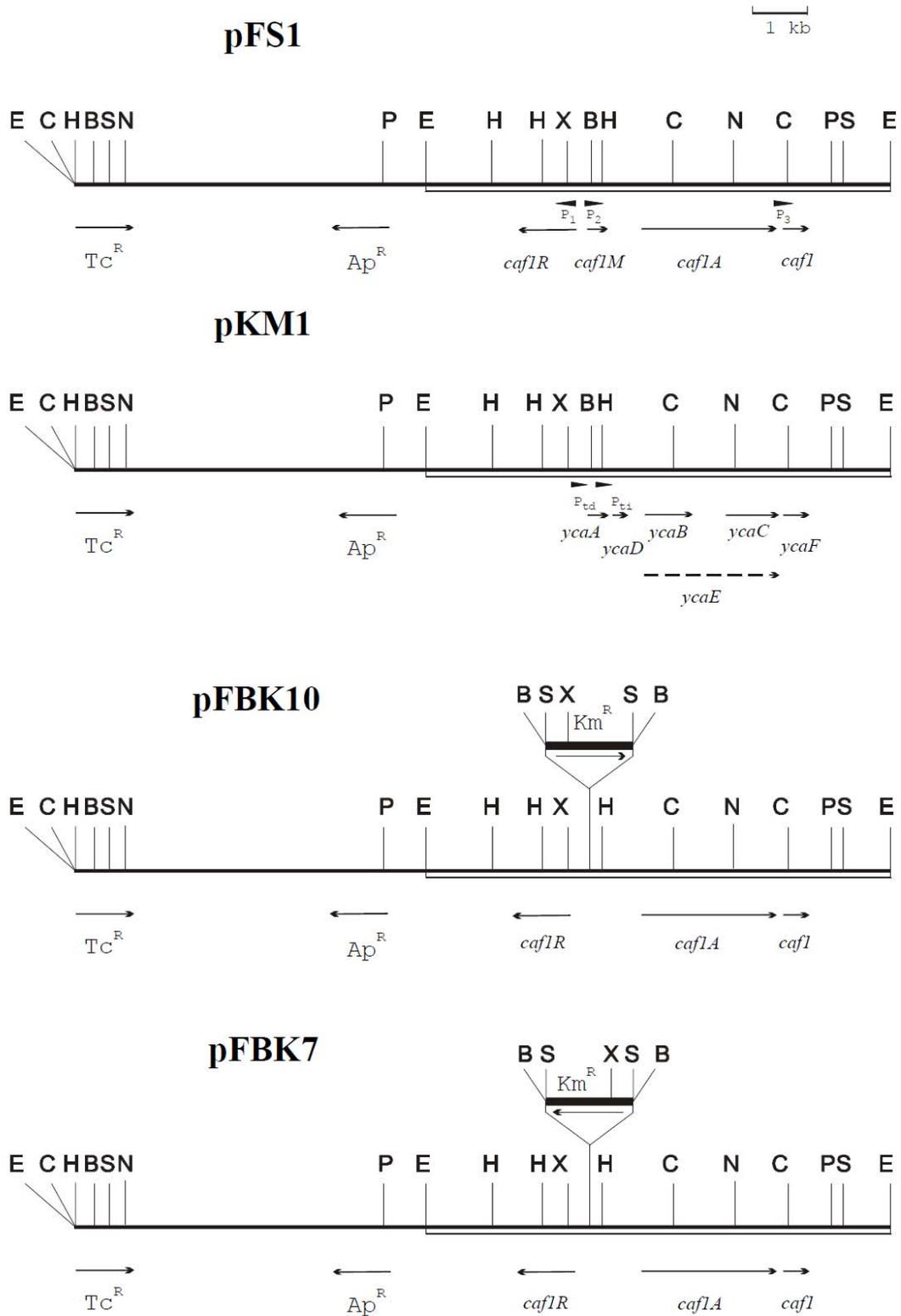
А.Ю. Гончаровым с соавт. [91-93] проведено физическое картирование плазмиды pYT из штамма *Y. pestis* EV76/3 для 6 рестриктаз, О.А. Кириллиной [165] построена карта плазмиды pFra из штамма *Y. pestis* A1122, а Ю.И. Ящечкиным с соавт. [363] рестрикционная карта плазмиды из штамма *Y. pestis* 231. В 1998 г. опубликованы полная нуклеотидная последовательность плазмиды pFra из штамма *Y. pestis* KIM5 [460, 496] и полная нуклеотидная последовательность генома штамма *Y. pestis* CO-92 [479].

*Fra* оперон, кодирующий продукцию капсульного антигена, был впервые клонирован из *EcoRI* банка больших плазмид *Y. pestis* А.В. Карлышевым с соавт. в 1984<sup>16</sup> году (цитируется по П.А. Черепанову с соавт. [346]) в составе космидного вектора pHC79 в клетках *E. coli*. Не позднее 1987 года аналогичные работы были проведены в НИИ микробиологии МО РФ (цитируется по И.В. Дармову с соавт. [111]), а также в 1988 году в РосНИПЧИ "Микроб" О.Г. Шишкиной с соавт. [358].

По данным А. Karlyshev *et al.* [476] структурная субъединица капсульного антигена кодируется геном *cafI* размером в 510 нуклеотидных пар (рис. 1, pFS1). Белок-предшественник антигена FI состоит из 170 аминокислотных остатков. Участок отщепления сигнальной последовательности расположен между 21-м и 22-м остатками аланина. Второй ген отвечает за синтез белка CafIM. Данный белок является периплазматическим шапероном. CafIM состоит из двух иммуноглобулино-подобных доменов и имеет гомологию с периплазматическим шапероном PapD *E. coli*. Третий ген кодирует "usher" белок CafIA, обеспечивающий, закрепление капсульного антигена на поверхности бактериальной клетки. Бел-

<sup>15</sup> Интересно, что G.P. Andrews *et al.* [368] напротив успешно использовали pBR322 в качестве среднекопийного вектора для стабилизации экспрессии *fra* оперона в клетках *E. coli* HB101. Селективное давление обеспечивали добавлением в среду культивирования ампициллина (100 мкг/мл).

<sup>16</sup> На самом деле клонирование было осуществлено в конце 1982 г., а в 1984 г. вышел заключительный отчет по молекулярному клонированию основных факторов патогенности и иммуногенности возбудителя чумы.



B - *Bam*HI; C - *Cla*I, E - *Eco*RI, H - *Hind*III, N - *Nru*I, S - *Sal*GI, X - *Xho*I. Плазмида pHC79 изображена одинарной полосой средней толщины; локус *fra* из плазмиды pFga - двумя линиями; толстая линия обозначает  $Km^R$  локус из плазмиды pUC4K. *ycaA*=*caflM*. *ycaF*=*cafl*.

pFS1.  $P_1$ ,  $P_2$  и  $P_3$  - расположение промоторов [476].

pKM1. В начале оперона и в районе кодирующей области *ycaA* расположены два промотора:  $P_{td}$  - температурозависимый (temperature-dependent) и  $P_{ti}$  - температурнезависимый (temperature-independent) [350].

Рисунок 1. Рестрикционные и генетические карты плазмид pFS1 [476], pKM1 [350], pFBK10 и pFBK7.

ки Caf1M и Caf1A также обладают сигнальными последовательностями. Четвертый ген *fra* оперона кодирует белок Caf1R, который отвечает за регуляцию процесса капсулообразования.

П.А. Черепанов с соавт. [350] также определили первичную нуклеотидную последовательность *fra* оперона. На основании ее анализа выявлено пять протяженных открытых рамок считывания, способных кодировать белки YcaA (Caf1M [442]) - 28,8 kDa, YcaB - 28,75 kDa, YcaC - 33,55 kDa, YcaD - 11,36 kDa, YcaF (Caf1 [443]) - 17,66 kDa [350]. Соответствия и различия в данных этих двух групп исследователей представлены на рисунке 1. В структуре предполагаемых белков YcaA и YcaF на N-конце обнаружены потенциальные сигнальные пептиды. В публикации отмечено, что область, включающая цистроны *ucaB* и *ucaC*, которые находятся в одной трансляционной рамке, может кодировать 77,03-kDa белок YcaE (аналог Caf1A), но внутри этого района имеется единственный стоп-кодон, терминирующий белок YcaB. Высказано предположение, что "этот кодон появился за счет случайной мутации в клоне, отобранном для секвенирования".

Отсутствие в клетках *E. coli*, несущих дефектный по гену *caf1M* оперон *fra*, детектируемых количеств FI позволило предположить, что для экспрессии и секреции капсульного антигена необходим продукт гена *caf1M*, обладающий гомологией с периплазматическим шапероном PapD из *E. coli*. В данной серии экспериментов тестирование продукции FI проводили с помощью ИФА и РНГА [442]. Однако в работе П.А. Черепанова с соавт. [350] было показано, что фрагмент ДНК, ограниченный сайтами *XhoI-PstI*, содержит кластер генов, достаточный для образования капсулы. Делеция *XhoI-BamHI* фрагмента (около 600 bp) приводила к температурнезависимому синтезу в клетках *E. coli* капсульного антигена, обладавшего необычными иммунохимическими свойствами. Такой капсульный антиген тестировался в РДИД против анти-FI-сыворотки, но не в РНГА. Капсульный антиген, синтезирующийся в клетках *E. coli*, содержащих гибридные плазмиды, несущие более протяженные делеции - *XhoI-HindIII* (около 850 bp) и *XhoI-NruI* (около 3 kb), обладал аналогичными иммунохимиче-

скими свойствами, но его синтез шел только при наличии чужеродного промотора. Основной регулируемый промотор был выявлен перед сайтом связывания рибосомы и открытой рамкой считывания гена *usaA* (*cafIM*). Второй промотор локализован между сайтами *Bam*HI и *Hind*III в районе кодирующей области *usaA* (*cafIM*) [350]. В ряде других экспериментов было также показано, что фрагмент ДНК, ограниченный сайтами *Bam*HI, *Eco*RI и дефектный по гену *cafIM*, обеспечивал в клетках *E. coli* синтез капсульного антигена, выявляемого с помощью ИФА [567] или РДИД [91, 92].

#### 1.2.4. РОЛЬ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА В ПАТОГЕНЕЗЕ

Реализация патогенных свойств *Y. pestis* в организме восприимчивого хозяина требует присутствия у возбудителя чумы целого набора факторов патогенности различной функциональной направленности и системы регуляции, обеспечивающей их координированную экспрессию. Абсолютизирование роли любого отдельно взятого из указанных факторов - некорректно [9, 236, 262, 370, 395]. Однако детальный анализ каждого из этих факторов лежит в основе системного подхода при изучении патогенности и вирулентности *Y. pestis*.

Роль капсульного антигена в патогенезе чумы неоднозначна. Капсула, образованная из FI, защищает клетки *Y. pestis* от захвата интактными нейтрофилами хозяина [334, 399, 403, 469]. Это согласуется с общепризнанной ролью бактериальных капсул, препятствующих поглощению бактерий фагоцитарными клетками макроорганизма [582]. С одной стороны, они экранируют пептидогликан или ЛПС бактериальной клетки, препятствуя инициации альтернативного пути активации комплемента [512], но FI, напротив, истощает систему комплемента за счет избирательной активации C`2 и C`4 компонентов системы комплемента сыворотки человека и таким образом препятствует комплемент-опосредованной опсонизации бактерий [599]. С другой стороны, повышение устойчивости к фагоцитозу обычно коррелирует с увеличением отрицательного заряда микробной клетки, способствующего электростатическому отталкиванию от одноименно заряженных фагоцитов [582]. Но в клетках *Y. pestis*

синтез капсулы, напротив, сопровождается снижением отрицательного заряда клеточной поверхности [131, 132, 184]. Более того, отсутствие FI у некоторых штаммов *Y. pestis* обуславливало снижение эффективности захвата бактерий макрофагами морских свинок, но не белых мышей [96]. В то же время известно, что размножение клеток *Y. pestis* внутри макрофагов является обязательным этапом патогенеза чумы [403], а вирулентность чумного микроба коррелирует не с устойчивостью к захвату фагоцитами [469], но со способностью выживать и размножаться в фаголизосомах фагоцитарных клеток за счет подавления антибактериальных функций фагоцитов [66, 67, 183, 194, 195, 354, 404].<sup>17</sup> Интересно, что высокоочищенные препараты FI ингибируют завершенность фагоцитоза чумных бактерий макрофагами [195, 279, 328]. Одинаковый ингибирующий эффект проявляется у препаратов FI, выделенных из клеток *Y. pestis* и рекомбинантного штамма *E. coli* HB101pFS2, при фагоцитозе как зимозана, так и вакцинного штамма EV. При длительном воздействии антигенов на макрофаги (в течение 36 ч) отмечен выраженный цитопатический эффект [317].

На модели лабораторных животных [158] и диких грызунов [232] было показано, что антиген FI неспецифически активизирует фагоциты. Так как активированные фагоциты являются короткоживущими клетками, то в ряде случаев, за счет одновременного действия FII, ингибирующей дыхание митохондрий [160], и FI этот процесс может способствовать последующему истощению барьерной функции фагоцитов [232]. Препараты чистой FI в широком диапазоне доз (от 10 до 100 мкг/мл) значительно подавляли хемилюминисценцию перитонеальных макрофагов мышей при фагоцитозе различных частиц: латекса, зимозана или убитого формалином стафилококка. Чем активнее были макрофаги, тем сильнее подавлялся их кислородный метаболизм. Такой же эффект FI оказывала и на нейтрофилы и моноциты че-

---

<sup>17</sup> В последнее время некоторые исследователи, под впечатлением от успехов в изучении кодируемой плазмидой pCad системы секреции III-го типа, обеспечивающей агрессию внеклеточно расположенных бактерий *Y. pestis* в отношении макрофагов, склонны если не полностью отрицать значимость внутриклеточной стадии развития возбудителя чумы, то ограничивать ее лишь начальным этапом инфекционного процесса при бубонной форме чумы [413, 414]. При этом они игнорируют цитированные выше исследования на модели *Y. pestis*, опираясь на электронно-микроскопическое исследование патоморфологии экспериментального псевдотуберкулеза [566].

ловека [82, 320]. Также показано, что антиген FI усиливал окислительный взрыв перитонеальных лейкоцитов белых мышей, но подавлял активность лейкоцитов морских свинок [33]. Доказано, что капсульный антиген угнетал активность рецепторного аппарата Т-хелперов, на основании чего высказано предположение, что это может иметь отношение к иммунопаралитическому действию FI [66].

Установлено, что при парентеральном введении мышам производных аттенуированного штамма *S. typhimurium* SL3261, несущих рекомбинантные плазмиды с полным *fra* опероном, которые неспособны стабильно наследоваться *in vitro*, в организме животных происходит селекция клеток, сохраняющих и экспрессирующих гены, ответственные за продукцию капсульного антигена. Из печени и селезенки умерщвленных на 1-7-ые сутки с момента заражения животных удавалось высевать только  $Fra^+$  рекомбинантные клетки [448, 577]. Рекомбинантные клетки *E. coli*, способные образовывать капсулу *Y. pestis*, были устойчивы к фагоцитозу мышинными перитонеальными макрофагами [437].

Капсульный антиген FI способен образовывать в двухслойных фосфолипидных мембранах поры, проницаемые для воды [544]. Интересно, что в основе цитотоксического действия лимфоцитов на раковые клетки лежит аналогичная способность продуцировать белок перфорин, который "встраивается" в оболочку злокачественной клетки и делает в ней перфорацию. Это приводит к нарушению осмотической регуляции и последующей гибели "целевой" клетки. Подобным же образом действуют дефензины - пептиды нейтрофилов и макрофагов, обладающие широким спектром антимикробной активности [475]. Высказано предположение, что FI действует аналогичным образом на клетки-мишени теплокровного животного [544].

G.P. Andrews *et al.* [365] для объяснения гибели отдельных иммунизированных животных, обладающих высокими титрами антител к FI, предположили, что секретируемый бактериями в окружающую среду капсульный антиген связывает значительные количества иммуноглобулинов, препятствуя таким образом опсонизации бактерий. По их мнению, воз-

можно также и слушивание с фрагментами капсулы уже прикрепившихся к ней антител.

Исходя из экспериментальных данных, свидетельствующих о высоком аффинитете молекулярного ашера Caf1A не только к структурной субъединице капсульного антигена Caf1, но и к человеческому интерлейкину  $1\beta$ , В.П. Завьялов с соавт. [608] сделали предположение, что FI может вступать в конкуренцию с интерлейкинами  $1\alpha$ ,  $1\beta$  и  $1\gamma$  за связывание с рецепторами на лимфоидных клетках, препятствуя развитию адекватного иммунного ответа. В свою очередь молекулярный ашер Caf1A может сорбировать интерлейкины, препятствуя их контакту с макрофагами.

Штаммы возбудителя чумы, дефектные по продукции капсульного антигена, сохраняя, как правило, высокую вирулентность для мышей, проявляют резко сниженную вирулентность для морских свинок [257, 266, 397, 398, 421]. Однако описан лабораторный штамм 358/12 [354] и "природный" изолят И-2422<sup>18</sup> [198], утратившие признак Fga, но сохранившие исходную вирулентность не только для белых мышей, но и для морских свинок.

Описаны также Fga<sup>±</sup> штаммы возбудителя чумы. Продукцию FI у них можно выявить только в препаратах разрушенных клеток, что связывают с нарушением его секреции, т.к. в процессе обработки ультразвуком или ацетоном и последующего высушивания внутриклеточные антигены выходят из разрушенных бактерий и становятся доступными для антител [271, 400]. Подобные штаммы *Y. pestis* были выделены от погибших от чумы людей [400, 602].

### 1.2.5. ВЛИЯНИЕ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА НА БЛОКООБРАЗОВАНИЕ

Еще в конце прошлого века М. Ogata [521] и P.L. Simond [565] показали, что чума передается трансмиссивным путем. Специфический механизм передачи *Y. pestis* описали A.W.

<sup>18</sup> Описанный В.В. Кутыревым [198] высоковирулентный Fga<sup>-</sup> "природный" изолят *Y. pestis subsp. uleica* И-2422, выделенный от блох монгольских пищух в Монголии, на самом деле, по данным паспорта, сразу после выделения был охарактеризован как Fga<sup>+</sup>, а утрата способности синтезировать FI произошла при его хранении.

Васот и С. J. Martin [379]. В соответствии с их представлениями, "инфицирование"<sup>19</sup> переносчиков заболевания - блох происходит в процессе кровососания, при наличии бактериемии у теплокровного хозяина. Эффективность дальнейшей передачи зависит от феномена блокообразования, заключающегося в закупорке преджелудка блохи конгломератом бактериальных клеток и продуктов переваривания крови. При этом голодная "блокированная" блоха пытается сосать кровь хозяина, но из-за непроходимости пищеварительного тракта<sup>20</sup> поглощенная кровь, омыв сгусток микробов, отрыгивается насекомым в кровеносный сосуд. Как правило, содержащихся в этой порции крови бактерий достаточно для развития у чувствительных животных инфекции с предагональной бактериемией.

После проведения экспериментов по изучению роли плазмы, лейкоцитов, эритроцитов, дефибрированной и гемолизированной крови в образовании чумного блока у блох было установлено, что блокообразование зависит от эритроцитов, поступающих в желудочно-кишечный тракт блохи в неразрушенном состоянии [173]. Однако, по данным других исследователей, блокообразование отмечалось и при кормлении блох препаратами крови или кровезаменителями, не содержащими форменных элементов, но при наличии в них гемоглобина. Гемоглобин способствовал и образованию конгломератов клеток *Y. pestis* в жидких питательных средах [42]. Блокообразование усиливалось при повышении сахара в крови животных - прокормителей [166] или увеличении дозы поглощенных бактерий [46]. Интересно, что при питании кровью животных, невосприимчивых к чуме, блохи *Xenopsylla cheopis* быстро освобождались от возбудителя чумы [172].

Существует несколько концепций, объясняющих механизм блокообразования, которые соответственно конкретной роли сочленов эпизоотической триады были подразделены на три группы [227]:

---

В публикациях Иркутского ПЧИ исходный Fra<sup>+</sup> вариант сохранил наименование И-2422, а его Fra<sup>-</sup> вариант получил название И-2422Fra<sup>-</sup> [36].

<sup>19</sup> Использование термина "инфицирование" не совсем корректно, т.к. до сих пор нет единого мнения о способности *Y. pestis* вызывать инфекционный процесс у блох [120, 178].

- \* особенности анатомо-физиологической структуры преджелудка различных видов блох (наличие акантов<sup>21</sup> и клапанного аппарата),
- \* особенности биохимического состава крови различных видов грызунов - прокормителей,
- \* особенности инфицирующего штамма *Y. pestis*.<sup>22</sup>

Более подробно остановимся на связи блокообразования со штаммовыми отличиями возбудителя чумы. В ряде случаев приобретение дополнительной потребности в факторах роста оказывает влияние на реализацию *Y. pestis* блокообразующей способности. Так, ксантин-, гистидин- и особенно урацилзависимые мутанты резко снижали частоту образования блока у блох, причем появление блоков регистрировалось в более поздние сроки [307].

Показано, что варианты *Y. pestis*, несорбирующие пигмент, как правило, не вызывают блока преджелудка блох [47, 487]. По ряду данных, ответственным за блокообразование и гибель блох является локус *hms* [456, 457]. Высказано предположение, что "одной из ведущих причин блокообразования у блох" являются электростатические и стерические силы "взаимодействия адсорбированного пигмента и некоторых молекул крови" [131]. В то же время описаны и пигментнесорбирующие штаммы, способные к блокообразованию и эффективной трансмиссивной передаче [87, 260], или пигментнесорбирующие варианты, способные к эффективной трансмиссивной передаче без блокообразования [176].<sup>23</sup> В последнем случае (при трансмиссивной передаче чумы неблокированными блохами) большое значение имела специфичность эктопаразитов для прокормителя. При изучении штаммов *Y. pestis*, выделенных в Кызылкумах, было установлено, что в группе блох, зараженных Pgm<sup>+</sup> штам-

<sup>20</sup> Полная закупорка пищеварительного тракта приводит, в конце концов, к гибели насекомого [531].

<sup>21</sup> Выросты в преджелудке блохи в виде зубцов или щетинок [541].

<sup>22</sup> Необходимо учитывать, что в ходе эволюции произошла адаптация различных популяций *Y. pestis* к определенным видам и даже популяциям основных носителей и основных переносчиков [120, 288, 289], что проявляется в "избирательной" вирулентности в отношении теплокровных животных и способности вызывать у них интенсивную бактериемию [191, 199, 399, 402, 613], в различной способности приживаться и образовывать блок в организме блох разных видов [212]. Последнее обстоятельство может объяснить противоречивость данных о значимости отдельных факторов *Y. pestis* для блокообразования.

<sup>23</sup> Интересно, что в организме неэффективного переносчика (*Ctenophthalmus teres*) не выявлено селективного

мами образование стойких блоков произошло в 45,3 % случаев, а число блоков у насекомых, зараженных Pgm<sup>-</sup> культурами *Y. pestis*, наблюдалось всего в 2,1 %. При этом блоки были нестойкие и размывались при первом же кормлении [229].

Высказано предположение, что "способность колонизации при формировании блока преджелудка у блохи" может быть связана с продукцией антигена рН6 [180], обладающего гемагглютинирующей активностью [390], однако нам не удалось найти публикации, посвященные экспериментальному изучению этого вопроса.

Отсутствие в клетках чумного микроба плазмиды pPst, характерное для вариантов из "полевочьих" очагов [338], коррелирует со снижением частоты блокообразования по сравнению с полноценными штаммами [177]. Возможно, что влияние продуктов этой плазмиды на образование блока преджелудка блохи объясняется адгезивной способностью кодируемого ей активатора плазминогена в отношении ряда эукариотических клеток [483] или его плазмокоагулирующей активностью<sup>24</sup> [120]. Также показано, что варианты *Y. pestis* с геном *pla*, "выключенным" транспозоном Tn801, через четыре дня после заражения блох вызывали их гибель в 26 % случаев, в то время как варианты *Y. pestis*, несущие инсерции Tn801 в других локусах pPst, приводили к гибели 53-64 % насекомых. Было высказано предположение, что их гибель коррелирует с блокообразованием [504]. Однако в других случаях "апестициногенные варианты чумы" по блокообразующей способности не отличались от полноценных штаммов, а в ряде случаев превосходили их [176].

В плане настоящего исследования интересно, что низкая способность к блокообразованию характерна для вариантов *Y. pestis*, обладающих Fra<sup>-</sup> или Fra<sup>±</sup> фенотипом [154], утративших плазмиду pFra или несущих мутацию *fra* оперона [5, 176, 177]<sup>25</sup>. Известно, что в ор-

---

преимущества Pgm<sup>+</sup> перед Pgm<sup>-</sup> клетками, тогда как в эффективном переносчике (*X. cheopis*) происходит накопление Pgm<sup>+</sup> вариантов [41].

<sup>24</sup> Высокая фибринолитическая активность при 37 °С делает практически невозможным проявление коагуляционной активности в организме теплокровного животного. В то же время, резкое угнетение до полного исчезновения фибринолитической активности при температурах ниже 28 °С может обеспечивать эффективное проявление коагуляционной активности в организме блохи [120].

<sup>25</sup> Следует отметить, что во время выступления на 7<sup>th</sup> International Congress on *Yersinia* (Nijmegen, the Nether-

ганизме блох *Y. pestis* не синтезирует FI [403], что связано с пойкилотермностью блох - их температура ниже 37 °С. Тем не менее, было высказано предположение об участии капсульного антигена в образовании клейких скоплений микробов и образовании блока в преджелудке блохи [480]. Это можно объяснить тем, что высокомолекулярный капсульный антиген обладает гемагглютинирующей активностью за счет способности специфически связываться с D-галактозамином-HCl и глюкуроновой кислотой [300]. Позднее было показано, что синтез капсульного антигена при переходе в организм блохи прекращается не сразу. С помощью люминесцентных антител к FI, последнюю удавалось обнаруживать в блохах в течение пятидесяти дней после их заражения. Такого срока, по-видимому, вполне достаточно, чтобы капсульный антиген обеспечил первоначальное закрепление микроба в пищеварительном тракте блохи [114, 461].<sup>26</sup> Тот факт, что бескапсульные штаммы не стали повсеместно доминировать в Или-Каратальском междуречье, где они циркулируют в популяциях больших песчанок [191], объясняют ограничением их циркуляции за счет снижения блокообразующей активности по сравнению с полноценными штаммами [179].

Однако в ряде других исследований с использованием генетически неохарактеризованных вариантов *Y. pestis* с фенотипом  $\text{Fra}^- \text{Tox}^+$  или  $\text{Fra}^- \text{Tox}^-$  было показано, что, по способности вызывать блокообразование, они не отличались от типичных штаммов [188, 189, 206]. Отсутствие же трансмиссивной передачи бескапсульных вариантов штамма 231 находилось в явной связи с величинами  $\text{LD}_{50}$  для серых крыс. Блохи были неспособны передать достаточного для инфицирования животных количества клеток  $\text{Fra}^-$  вариантов *Y. pestis*, вирулентность которых для крыс была в 100 и более раз ниже, чем у исходного  $\text{Fra}^+$  штамма

---

lands, 1998) A. Forsberg сообщил, что по его данным способность к блокообразованию была связана лишь с продукцией  $\text{Ymt}$ , а другие и, в том числе, такой общепризнанный фактор как  $\text{Hms}$  не влияли на этот процесс. Косвенно, об участии "мышинного" токсина в блокообразовании свидетельствуют более ранние эксперименты, в которых было показано, что только штаммы с  $\text{Fra}^- \text{Tox}^-$  фенотипом (но не  $\text{Fra}^- \text{Tox}^+$ ) не обеспечивают блокирования насекомых [5, 174, 179].

<sup>26</sup> Интересно, что в организме эффективного переносчика (*X. cheopis*) при температуре 20-22 °С чумной микроб сусликовой разновидности быстро терял FI, а полевочьей разновидности сохранял дольше (9-10 дней). Снижение температуры содержания блох увеличивало сроки сохранения FI. В неэффективном переносчике (*Ct. teres*) FI *Y. pestis* обеих разновидностей сохранялась 13-35 дней (в зависимости от температуры) и исчезала в одни и

[206, 594]. Использование же высоковирулентного природного "бескапсульного" штамма M-493<sup>27</sup> [188] или Fra<sup>+</sup> штамма 825 [204] в опытах на больших песчанках показало, что подобные варианты возбудителя чумы могут циркулировать в природе за счет трансмиссивной передачи.

Противоречивость результатов исследований о роли капсульного антигена в процессе блокообразования свидетельствует о необходимости проведения дополнительных экспериментов с использованием различных видов блох и генетически определенных изогенных мутантов разных экотипов *Y. pestis* для окончательного решения этого вопроса.

#### 1.2.6. ИММУНОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА

Изучение антигенов возбудителя чумы было начато Н. Schütze [561, 562], который показал, что содержащийся в "оболочке" (капсуле) "оболочечный" (капсульный) антиген является иммунодоминантным. В настоящее время капсульный антиген *Y. pestis* принято считать видоспецифичным, и иммунодиагностика чумы построена на выявлении FI или анти-FI-антител [120, 243, 288, 289, 380, 397, 527].

Интересно, что в иммунохимических реакциях с коммерческими антительными моно- и поликлональными диагностикумами производства Среднеазиатского ПЧИ препараты FI, выделенные по Е.Е. Baker *et al.* [382], после обработки SDS обладали общими эпитопами с белково-полисахаридными комплексами, выделенными по аналогичной методике из клеток *K. pneumoniae* и *C. freundii*.<sup>28</sup> Конформационно-зависимая детерминанта являлась специфичной лишь для препаратов FI, не обработанных SDS. Препараты из штаммов *Y. pestis*, лишенные капсулы, способствовали выработке у животных антител к неконформационно-зависимым эпитомам FI и детерминантам антигенов, выделенных по Е.Е. Baker *et al.* из аце-

---

те же сроки [41].

<sup>27</sup> В целом ряде публикаций он описан как Fra<sup>+</sup> [271, 333, 534].

<sup>28</sup> Указанные иммунодиагностические препараты были разрешены к коммерческому производству после проведения Государственных испытаний, показавших их **высокую специфичность** - отсутствие реакции с бакте-

тонвысушенных клеток *K. pneumoniae* и *C. freundii* [185-187].<sup>29</sup> Однако, несмотря на наличие общих антигенных детерминант и близкую молекулярную массу субъединиц, антигены из *fra* оперон-несодержащих энтеробактерий обладали гидрофильными свойствами и не образовывали агрегированных структур [186], в то время как формирование макромолекул капсульного антигена *Y. pestis* происходит, в основном, за счет гидрофобных взаимодействий [299]. Компьютерный анализ нуклеотидной последовательности структурного гена капсульного антигена также свидетельствует о гидрофобных свойствах субъединицы FI [443]. По поводу цитированных выше публикаций Л.В. Коссе с соавт. [185-187] хочется сделать несколько замечаний.

\* Во-первых, моноклональные антитела характеризуются своей способностью реагировать с одним определенным эпитопом определенного антигена.<sup>30</sup> Малейшая модификация антигена или изменение его конформации приводит к отсутствию реакции с моноклональными антителами [196, 216].

\* Во-вторых, использованные в данном исследовании антитела, по видимому, не являлись моноклональными (возможно это связано с отсутствием в процессе конструирования гибридом этапа субклонирования, необходимого для получения "чистой" линии моноклона).

\* В-третьих, поликлональные анти-FI-антитела теоретически могут распознавать эпитопы, общие для CafI и субъединиц пилевых адгезинов (см. раздел 1.3), широко представленных в клетках всех изученных энтеробактерий и обладающих гомологией ами-

---

риями, не продуцирующими капсульный антиген *Y. pestis*, при использовании "рабочих" разведений диагностикумов и бактерий.

<sup>29</sup> На основании данных собственных экспериментов и ссылок на работы, опубликованные до 1987 г., Л.В. Коссе с соавт. [186] пишут, что "пока нет единого мнения о генетическом контроле синтеза и продукции FI". Но в этой же работе приведена ссылка на данные о клонировании *fra* оперона [443], которые, напротив, однозначно свидетельствуют, что гены, расположенные на 8,6-kb *EcoRI* фрагменте плазмиды pFra, обеспечивают образование капсулы *Y. pestis* в *E. coli*. Более того, аминокислотная последовательность субъединицы CafI, рассчитанная на основании сиквенса структурного гена *cafI* [443], совпала с результатами определения аминокислотного состава FI [30, 388].

<sup>30</sup> Однако следует отметить, что были получены гомогенные миеломные антитела, в ряде случаев связывающие не одну, а несколько разных гаптенных детерминант, причем такое связывание носило конкурентный характер [319].

нокислотных последовательностей с субъединицей CafI [463].

Интересно, что недавно были опубликованы данные, позволившие предположить, что указанные выше ложноположительные результаты вызваны неизвестными "физико-химическими событиями", так как использование в качестве стабилизаторов иммунохимических реакций детергентов позволило устранить гипердиагностику [345].

Каждый микроорганизм содержит множество различных антигенов. Во время инфекционного процесса иммунный ответ развивается на большинство из них. Однако резистентность к инфекции зависит, главным образом, от иммунного ответа на небольшое число антигенов, располагающихся на поверхности микроорганизмов [84].

Покрывающий поверхность микробных клеток капсульный антиген *Y. pestis* - важнейший составной элемент всех современных чумных вакцин. Показана его ведущая роль в создании напряженного иммунитета у белых мышей, крыс, приматов и человека [61, 89, 110, 174, 261, 322, 324, 341, 368, 382, 399, 492, 567, 597 и др.].

Однако при изучении иммунизирующей активности FI на морских свинках была выявлена способность препарата FI вызывать в "миллиграммовых" дозах у этого вида животных состояние иммунопаралича, но в микрограммовых количествах с адъювантом препараты FI стимулировали протективный ответ [38, 492, 570, 587]. По данным других авторов [324, 325] двукратная иммунизация малыми дозами, как при коротком интервале между инъекциями, так и при длительном, приводили не только к поголовной гибели морских свинок, зараженных вирулентным штаммом *Y. pestis*, но и к значительному сокращению средней продолжительности жизни по сравнению с контрольными животными. Интересно, что в опытах по изучению фагоцитарной активности "иммунных" перитонеальных макрофагов морских свинок показана преобладающая роль FI в активировании макрофагов по сравнению с "мышинным" токсином [194].

FI индуцировала выработку макрофагами интерлейкина-1 и фактора некроза опухоли; наибольшим защитным действием обладал препарат FI, содержащий углеводный ком-

понент, причем лучший эффект оказывала агрегированная форма капсульного антигена [141, 261, 270, 279]. Кроме того, формирование более выраженного по силе и протективности тимусзависимого иммунного ответа происходит, вероятно, в организме теплокровного животного или человека в случае попадания в него FI, агрегированной с тимусзависимыми детерминантами других белков чумного микроба или при введении очищенного препарата FI в организм, ранее контактировавший с возбудителем чумы [233]. В то же время Т-клеточные эпитопы, индуцирующие клеточное звено иммунного ответа, присутствуют и в собственной структуре субъединицы капсульного антигена [113]. Следует отметить, что основное значение в формировании иммунитета к чуме принадлежит именно клеточным иммунным процессам и главным образом Т-системе лимфоцитов [243].

Представленные выше данные подтверждают, что большинство факторов патогенности являются хорошими иммуногенами, а защитные механизмы против целого ряда инфекционных заболеваний основываются на гуморальном и (или) клеточном иммунитете, индуцированном этими факторами. В свою очередь, варьирование антигенной специфичности указанных факторов препятствует элиминации патогенных бактерий из макроорганизма [136, 434, 435]. Взаимодействие иммунной системы хозяина и противоиммунных факторов микроорганизма обеспечивает саморегуляцию и непрерывность эпизоотического и эпидемического процессов [43, 171, 219, 233, 234].

Интересно, что до последнего времени у возбудителя чумы, сохраняющегося в природных очагах инфекции, не было выявлено серовариации (за исключением существования двух серовариантов V антигена [449, 545, 603] - см. раздел 1.1.2), характерной для других патогенных бактерий и, в том числе, для других представителей рода *Yersinia* [120, 397, 418, 545]. В настоящее время ряд исследователей склоняется к тому, что поддержание эпизоотического процесса может обеспечиваться атипичными формами чумного микроба, "уклоняющимися" от индикации и идентификации [179, 253]. Одним из наиболее лабильных свойств возбудителя чумы является синтез FI. Данный признак находится в прямой зависимости от

характера эпизоотийного процесса: по мере угасания эпизоотий происходит увеличение числа культур со сниженной способностью синтезировать капсульный антиген, вплоть до полной его утраты. Это коррелирует с нарастанием числа животных, серо-позитивных в отношении FI [154, 276, 281, 290-292, 329]. Широкая "проиммунизация" чувствительных животных в ходе эпизоотии чумы приводит к формированию у них длительного бактерионосительства, способного вызывать в отдаленные сроки острый инфекционный процесс [264, 329]. У подавляющего большинства выделявшихся в этот период штаммов с резко подавленной способностью синтезировать FI оказалась снижена и вирулентность для белых мышей и морских свинок [329]. Таким образом, до недавнего времени было принято считать, что антигенная вариабельность *Y. pestis* связана лишь с различной степенью экспрессии иммуногенных факторов (в первую очередь FI), но не с изменчивостью собственно антигенных эпитопов протективных белков. Современные представления об изменчивости возбудителя чумы в широком смысле этого понятия кратко представлены в следующем разделе.

#### 1.2.7. ИЗМЕНЧИВОСТЬ СИНТЕЗА КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА *Y. pestis* КАК ЧАСТНЫЙ СЛУЧАЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

Изменчивость микроорганизмов принято изучать на уровне популяций - однородных групп клеток, имеющих общее происхождение от одной родительской [83]. Одной из основных характеристик природных популяций микроорганизмов является их гетерогенность и динамическая изменчивость. Популяция, существующая в изменяющейся среде, должна реагировать на нее, нейтрализовать ее воздействия и, таким образом, обеспечить выживание своим составляющим элементам. Степень гетерогенности популяции микроорганизмов, скорость и диапазон изменений в ее структуре зависят от вида микроба, изолированности от других популяций, давления факторов отбора [43, 44].

Популяция бактерий подвергается изменениям, вызванным действием внешних и внутренних факторов, влияющих на скорость популяционной изменчивости. К внутренним

факторам относят частоту образования мутаций, а также скорость роста и жизнеспособность в конкретных условиях клеток мутантов и родительского штамма [54]. Кроме обычных относительно редких и случайных мутаций, "значительная доля наследственной изменчивости вызывается особыми генетическими структурами - перемещающимися элементами": транспозонами, IS-элементами, некоторыми бактериофагами и эписомами - сложными плазмидами, способными к самостоятельной репликации и к интеграции в хромосому [343].

Установлено, что геном возбудителя чумы содержит не менее двух IS-элементов, IS100 [533] и IS285 [336, 337, 432], способных вызывать мутации кальцийнезависимости [533, 337]. В плазмиде pFga *Y. pestis* резидентная копия IS285 локализована в непосредственной близости от оперона капсулообразования (281 пн от стоп-кодона гена *caf1R*). Установлено, что мутантный "бескапсульный" штамм М-493 несет делецию в 9-ом *HindIII* фрагменте плазмиды pFga длиной около 2 тпн, включающую уникальный *BamHI* сайт рестрикции, расположенный в составе гена *caf1M* [534]. Эта делеция "стартует" на конце IS285 и захватывает гены *caf1R* и *caf1M* [336].

Специфичные в отношении *Y. pestis* вирулентные и умеренные фаги выделены из чумного микроба, из органов грызунов - носителей чумы, от блох, от зараженных чумой лабораторных животных, от переболевших чумой людей [355, 531]. Показано их влияние на изменчивость возбудителя чумы и высказано предположение об их роли в саморегулирующейся системе энзоотии чумы [258]. Из различных природных очагов наряду с типичными штаммами возбудителя чумы, несущими плазмиды pPst, pCad и pFga, выделены штаммы, как лишенные отдельных плазмид, так и несущие дополнительные репликоны или плазмиды с измененной молекулярной массой [37, 174, 338, 339, 433]. Показана возможность обратимой интеграции плазмиды pFga в различные участки хромосомы *Y. pestis* [174, 275, 437, 527, 534, 590]. Интересно, что в природных очагах Северного Прикаспия выделено до 10 % штаммов, у которых одна или несколько плазмид интегрированы в хромосому, что в ряде случаев со-

проводилось утратой экспрессии расположенных на них генов. Эти данные послужили основой для предположения, что "механизм интеграции собственных плазмид в хромосому и их выход в автономное состояние может служить регулятором активности эпизоотических проявлений" [174].

К внешним факторам следует отнести температуру, влажность, состав питательной среды и, что наиболее важно для патогенных бактерий, организм хозяина [62]. Л.Н. Классовский и В.С. Петров [168] предложили следующую классификацию проявлений изменчивости возбудителя чумы.

**Ненаследственная изменчивость** подразделяется на

- \* **фенотипическую в пределах нормы** (в рамках постоянного по хранимой информации генотипа)<sup>31</sup> и
- \* **патологическую** (за пределами нормы реакции).

**Наследственная изменчивость** - на

- \* **географо-экологическую;**
- \* **изменчивость, ведущую к возникновению лекарственно-устойчивых форм *Y. pestis*;**
- \* **изменчивость лабораторных популяций;**
- \* **изменчивость, ведущую к возникновению атипичных штаммов в природных условиях.**<sup>32</sup>

**Примером фенотипической изменчивости в пределах нормы** является существование в природе популяций возбудителя чумы в виде двух частей:

<sup>31</sup> Так как фенотипическая изменчивость возникла "эволюционно не как механизм генерации разнообразия и дальнейшей дивергенции, а как способ стабилизации вида, для него предложено название "метастабильность фенотипа" [88]. К механизмам метастабильности фенотипа отнесены разнообразные обратимые внутригеномные перестройки, включая перемещения IS-элементов, интеграцию в хромосому плазмид и бактериофагов, мутации со сдвигом рамки регуляторного гена и т.д.

<sup>32</sup> По мнению Г.П. Апарина и Е.П. Голубинского [31], следует "модифицировать указанную схему, исключив из нее разделы: географо-экологическая изменчивость, изменчивость, ведущая к возникновению лекарственно-устойчивых форм, и, добавив разделы: L-формы, экспериментальная изменчивость". С их аргументацией можно ознакомиться в цитированной монографии.

- \* гостальной (в организме теплокровного хозяина) и
- \* векторной (в организме блохи),

отличающихся по антигенному составу [31].

**Из факторов вызывающих патологическую изменчивость**, на наш взгляд, наиболее значимым является пребывание бактерий в организме нетипичного хозяина, приводящее, как правило, к снижению их вирулентности [124].

**Географо-экологическая изменчивость** отражает существование внутривидовых популяций (подвидов<sup>33</sup>) возбудителя чумы, обусловленных географической разобщенностью очагов чумы с выраженными экологическими различиями в условиях существования микроорганизма в них и характеризующихся различными свойствами бактерий из разных очагов [224]. Так, штаммы, выделенные в различных очагах, различаются по плазмидному составу [37, 174, 338, 339, 433], а на основании способности возбудителя чумы ферментировать глицерин, рамнозу, восстанавливать нитраты, зависеть от лейцина, аргинина и т.п. установлено не менее 20 различных экологических групп, циркулирующих в строго определенных природных очагах чумы [225].

**Описано несколько случаев выделения антибиотико-резистентных штаммов *Y. pestis*** в природных очагах Монголии, Мадагаскара и Южного Вьетнама [31, 439, 596]. Каузистичность выделения подобных вариантов возбудителя чумы в природных очагах И.В. Домарадский [120] объясняет двумя причинами. Во-первых, чума у людей встречается в настоящее время относительно редко и, как правило, протекает в острой форме. Во-вторых, чума относится к "кровяным" инфекциям, при которых заражение человека происходит преимущественно трансмиссивным путем, снижающим вероятность контакта возбудителя чумы с природным резервуаром R плазмид.

---

<sup>33</sup> На совещании специалистов противочумных учреждений Советского Союза, состоявшемся в Саратове в апреле 1985 г., было рекомендовано классифицировать все варианты возбудителя чумы, выделяющиеся на территории СССР, на следующие подвиды: *Y. pestis subsp. pestis*, *Y. pestis subsp. altaica*, *Y. pestis subsp. caucasica*, *Y. pestis subsp. hissarica*, *Y. pestis subsp. ulegeica* [31].

Однако Е.Д. Самоходкиной с соавт. [555, 556] было показано, что лечение экспериментальной чумы, вызванной бескапсульными штаммами *Y. pestis*, оказалось неэффективным при использовании тетрациклина, бета-лактамовых антибиотиков и хинолонов в средних терапевтических дозах, оказывающих выраженный лечебный эффект в отношении инфекции, вызванной полноценными штаммами. Аналогичная антибиотикорезистентность выявлялась и *in vitro* в культуре макрофагов, но не на питательных средах. Объяснение данного феномена в указанных публикациях не приводится.

Показано, что клетки *Y. pestis* способны переживать и даже размножаться в фаголизосомах макрофагов [403]. В то же время известно, что указанные антибиотики не способны проникать в фагоциты в активной форме [551]. Похоже, что капсула *Y. pestis* может влиять на уровень проницаемости этих антибиотиков через плазматическую мембрану макрофагов.

Антиген FI, образующий капсулу *Y. pestis*, способен встраиваться в двухслойные фосфолипидные мембраны, образуя в них поры, проницаемые для воды. Это, по мнению С.С. Rodrigues *et al.* [544], лежит в основе цитопатического действия *Y. pestis* на фагоцитарные клетки. Также известно, что после обработки канал-формирующими токсинами мембраны клеток становятся проницаемыми для целого ряда молекул [475]. Учитывая все вышеизложенное, мы можем предположить *a priori*, что *in vivo* индуцированные FI "водяные" поры могут быть основной причиной проникновения антибиотиков в макрофаг и его фаголизосомы и, таким образом, обеспечивать чувствительность к антибиотикам клеток *Y. pestis* "дикого" типа [372].

**В лабораторных популяциях *Y. pestis*** наиболее часто отмечается снижение вирулентности штаммов, связанное с утратой способности к пигментсорбции с частотой  $10^{-5}$  на генерацию [396] или возникновению кальцийнезависимых вариантов -  $10^{-4}$ - $10^{-3}$  на генерацию [455]. Анализ клонов из лиофилизированных культур и культур, хранящихся на агаре Хоттингера, показал, что в 10-30 % случаев появлялись клоны с утраченной плазмидой pFga,

в 8-25 % клонов выявлялось увеличение молекулярной массы этой плазмиды, а 8-10 % клонов имели помимо трех плазмид репликон с молекулярной массой большей, чем у плазмиды рFга "дикого" типа. Пассажи гетерогенной агаровой культуры через организм белой мыши приводили к элиминации атипичных клонов из популяции изолятов чумного микроба [275]. Показано, что штаммы улэгейского подвида резко снижают продукцию FI при их хранении на питательных средах. Это не сопровождалось элиминацией плазмиды рFга и было расценено как проявление фенотипической изменчивости - переход во Fga<sup>±</sup> форму, неспособную, по мнению авторов публикации, к секреции капсульного антигена [75].

В серии экспериментов на предварительно иммунизированных морских свинках, белых крысах и диких грызунах (*Rombomys opimus*, *Citellus pygmaeus*) было показано, что после их заражения вирулентным штаммом возбудителя чумы в популяции последнего с высокой частотой выявляются ауксотрофные мутанты ( $4,2 \times 10^{-3}$ - $5,3 \times 10^{-5}$ ), варианты с резко сниженной вирулентностью, Hms<sup>-</sup> мутанты и клоны, отличающиеся по уровню продукции FI. Последующие эксперименты с фагоцитарными клетками иммунных животных *in vitro* позволили предположить, что именно мутагенная активность фагоцитарных клеток в отношении *Y. pestis* является ведущим механизмом изменчивости возбудителя чумы в природе [378].

**В естественных условиях изменчивость, ведущая к возникновению атипичных штаммов *Y. pestis*, коррелирует с фазами эпизоотического процесса [179, 306, 329].** Интересно, что частота возникновения измененных форм микробов отличается в различных природных очагах чумы. Наиболее низкой была изменчивость в Волго-Уральском степном очаге (1,58 %) и Зауральском степном очаге (3,3 %). В Гиссарском и Среднеазиатском пустынных очагах этот показатель составлял 6,59 и 6,55 %, соответственно. В Волго-Уральском песчаном очаге измененные формы не были выявлены. В Зауральском степном очаге атипичные культуры выявляли во все фазы эпизоотического процесса примерно с равной частотой. В Волго-Уральском степном и Гиссарском очагах такие штаммы выявлены только в фазу ост-

рой эпизоотии. Материалы по Среднеазиатскому пустынному очагу свидетельствуют об отсутствии различий в частоте находок в фазе начала и в период острой разлитой эпизоотии. В фазу затухания процент измененных культур возрастает [306].

При исследовании способности продуцировать FI штаммами возбудителя чумы из различных очагов бывшего СССР, бесфракционные штаммы обнаруживались не только в Южном Прибалхашье, а практически на всей территории Среднеазиатского пустынного природного очага [4]. В Муюнкумском автономном очаге в различных популяциях большой песчанки циркулировало различное количество штаммов с атипичными свойствами. Наибольшее количество измененных штаммов выделяли в Батышкудукской (18,6 %) и Северной Карачардинской (18,4 %), а наименьшее - в Коскудукской (1,4 %) и Южной Карачардинской (1,8 %) популяциях больших песчанок.  $Fra^-$  варианты составляли в среднем 15,8 % от числа всех атипичных штаммов. Особенно часто культуры, дефектные по продукции FI, изолировали от песчанок Жуантобинской, Камкалинской и Саумаккольской популяций, что, вероятно, связано "с определенными физиологическими особенностями больших песчанок из разных популяций" [292].

В Урало-Эмбенском очаге наибольшее количество измененных форм (6,5 %) выявляется в фазу острой эпизоотии: 24,4 % от числа измененных штаммов имели отличия по биохимической активности, 17,6 % - поражение бактериофагами, 13,5 % - изменение потребностей в факторах роста, 14,27 % - преобладание  $Hms^-$  вариантов, 16,75 % - со сниженной вирулентностью, 9,93 % - не продуцировали FI, 7,14 % - кальцийнезависимых, 2,36 % - апестигиногенных, 0,4 % - фагоустойчивых вариантов. Наиболее низкая частота изменчивости наблюдалась при практически непрерывном течении эпизоотий [155]. По другим данным [74] штаммы со сниженной вирулентностью в большинстве очагов составляли от 3-7 % до 16-48 %, авирулентные - до 3-10 %, лишённые плазмиды  $rFra$  - от 0,2 % до 1,2 %, кальцийнезависимые - 0,2-8,4 %.

В Центральных Кызылкумах в межэпизоотический по чуме период из органов и крови 0,2 % больших песчанок на средах, содержащих в качестве ингибитора роста посторонней микрофлоры теллурид калия,<sup>34</sup> были выделены культуры, формирующие на питательных средах прозрачные уплощенные колонии с мутным центром и неровными краями [35]. В мазках были видны грамположительные клетки в виде длинных нитей.<sup>35</sup> Наличие капсульного антигена и других видоспецифических *Y. pestis* признаков определить не удалось. Подобные культуры после четырех-семи пассажей на биопробных животных<sup>36</sup> реверсировали в типичную форму возбудителя чумы. Высказано предположение, что обнаруженные варианты *Y. pestis* являются одной из форм существования возбудителя чумы в природе.

### 1.3. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РОДСТВО КЛАСТЕРА ГЕНОВ *fra* ОПЕРОНА И ПРОДУКТОВ ЭТИХ ГЕНОВ С АНАЛОГИЧНЫМИ СТРУКТУРАМИ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИМИ БИОГЕНЕЗ ПИЛЕВЫХ И НЕПИЛЕВЫХ АДГЕЗИНОВ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ

Как было отмечено в разделе 1.2.3, на основе анализа первичной нуклеотидной последовательности *fra* оперона было установлено его филогенетическое родство с кластерами генов, кодирующих пилевые и непилевые адгезины энтеробактерий. Остановимся на этом вопросе более подробно.<sup>37</sup>

Образование бактериальных органелл является одним из основных процессов в жизнедеятельности клетки. Сборка микротубул центриолей, образование цитоскелета и образование структур, отвечающих за клеточное деление, являются примерами такой макромоле-

<sup>34</sup> Изначально выделенные культуры были высокочувствительны к генцианвиолету.

<sup>35</sup> Следует отметить, что образование возбудителем чумы длинных, извитых нитей ("инволюционных" форм) под воздействием различных факторов внешней среды: в организме животных и людей с хронической формой инфекции, в загнивших трупах животных, под влиянием антибиотиков *in vitro* и т.д., отмечалось и другими исследователями [29, 222, 248, 285] и расценивалось как выражение приспособительного механизма, направленного на сохранение популяции *Y. pestis* при развитии в неблагоприятных условиях.

<sup>36</sup> При проведении первых пассажей для выделения культуры животных забивали на пятые-шестые сут от момента заражения.

кулярной сборки. На молекулярном уровне "рост" органелл определяется каскадами последовательных белок-белковых взаимодействий. Наиболее изучены эти процессы в отношении образования бактериальных пилевых и непилевых адгезинов, и, естественно, изучение биогенеза бактериальных пилей используется в качестве модели для решения одной из наиболее фундаментальных проблем молекулярной биологии - как протеины складываются в домены, служащие в качестве строительных модулей для сборки органелл [462].

Образование органелл на поверхности клетки происходит из субъединиц синтезированных внутриклеточно, а внешние мембраны грамотрицательных бактерий являются барьером для большинства макромолекул и пропускают за счет простой или облегченной диффузии лишь маленькие гидрофильные молекулы (<600 дальтон) [518]. Трансмембранный перенос белков, принимающих участие в образовании структур клеточной оболочки или секретируемых во внешнюю среду, осуществляется специализированными транспортными системами [535, 553]. Так, структурные компоненты бактериальных фимбрий синтезируются в виде предшественников с N-концевой сигнальной последовательностью, которая отщепляется в процессе переноса через внутреннюю мембрану. Этот перенос обеспечивается "нормальной" экспортной системой *E. coli* [420, 535]. В настоящее время принято считать, что за дальнейший перенос из периплазмы на клеточную поверхность через внешнюю мембрану отвечают специфичные для экспорта и сборки фимбрий системы, включающие в себя находящиеся в периплазме молекулярные шапероны и расположенные на клеточной поверхности молекулярные ашеры. Эти протеины не являются компонентами органелл. Гены, кодирующие подобные специфичные для биосинтеза фимбрий шапероны и ашеры, выявлены во всех кластерах генов, кодирующих эти органеллы [485]. Интересно, что аналогичный кластер генов (*fra* оперон) выявлен и у возбудителя чумы. Он отвечает за синтез белковой капсулы, представляющей собой гомоагрегат субъединиц капсульного антигена. Структурные субъ-

---

<sup>37</sup> Интересно, что в клетках возбудителя чумы одновременно присутствует два филогенетически родственных кластера генов, кодирующих антигены FI и rH6 [463].

диницы, кодируемые геном *cafI*, синтезируются в виде предшественника с лидерной (сигнальной) последовательностью протяженностью в 21 аминокислотный остаток. Сравнение аминокислотных последовательностей протеина CafI с некоторыми субъединицами фимбрий показало, что С-концевые участки этих белков высококонсервативны и могут отвечать за "узнавание" периплазматическими шаперонами. Ген *cafIM* кодирует шаперон, обладающий значительной гомологией с шаперонами семейства PapD. Ген *cafIA* отвечает за синтез белка, гомологичного фимбриальным ашерам: FaeD, FimD, MrkD, PapC. Ген *cafIR*, обеспечивающий позитивную терморегуляцию капсулообразования, кодирует протеин гомологичный представителям семейства XylS/AraC регуляторов трансляции [476].

Принято считать, что иммуноглобулиноподобные периплазматические шапероны взаимодействуют со структурными субъединицами адгезинов в периплазматическом пространстве по принципу антитело-антиген, предохраняя последние от протеолитической деградации и преждевременной агрегации в периплазме, и затем "эскортируют" структурные элементы органелл к следующему компоненту секреторной системы - ашеру, расположенному на внешней мембране. Молекулярный ашер, в свою очередь, служит в качестве высокоспецифичного канала, обеспечивающего секрецию комплекса периплазматический шаперон-структурная субъединица, и платформы, обеспечивающей правильную сборку структурных субъединиц в органеллы после ашер-опосредованного отсоединения их от шаперонов [463]. Показано, что отсутствие в бактериальных клетках периплазматических шаперонов FocC и FimC или молекулярных ашеров FocD и FimD участвующих в биогенезе органелл, приводило к полному прекращению образования пилей [485]. "Выключение" гена, кодирующего периплазматический шаперон CfpE, вызывало резкое снижение секреции структурных элементов [389]. Для секреции структурной субъединицы капсульного антигена *Y. pestis* не был необходим ашер CafIA, и было достаточно периплазматического шаперона CafIM, но в этом случае не происходило образование органелл на клеточной поверхности, а структурные субъединицы CafI переходили в среду культивирования [442, 478]. В отсутст-

вие же шаперона Caf1M секрeция не выявлялась. Следует отметить, что заключение об отсутствии секрeции было сделано на основе одностороннего изучения экспериментальных штаммов бактерий. Так, Е.Е. Galyov (A.V. Karlyshev) *et al.* и Y. Bertin *et al.* ограничились применением лишь серологических методов, а P. Klemm *et al.*, напротив, отказались от их использования.

## СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ<sup>38</sup>

## 2.1. ШТАММЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Видовые и родовые названия основных штаммов микроорганизмов, использованных в работе и источники их получения представлены в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика штаммов, использованных в работе

Номер штамма (особое название)	Характеристика	Источник получения и (или) ссылка на литературу
1	2	3
<i>Yersinia pestis</i>		
10087	Fra <sup>+</sup> (pFra <sup>-</sup> )	ГосКПБ "Микроб" (выделен в 1966 г. от большой песчанки в Среднеазиатском пустынном очаге)
1146-Арм	Pst <sup>S</sup> (pPst <sup>-</sup> )	ГосКПБ "Микроб" (выделен в 1968 г. от обыкновенной полевки в Закавказском высокогорном очаге)
115-Ур	pFra <sup>-</sup>	ГосКПБ "Микроб" (выделен в 1992 г. от блох малого суслика в Волго-Уральском степном очаге)

<sup>38</sup> Все исследования представленные в настоящей работе проводились в соответствии с: "Инструкцией о противоэпидемическом режиме работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителями инфекционных заболеваний. - Саратов, 1979", "Инструкцией по режиму работы с аэрозолями возбудителей особо опасных и других бактериальных инфекций. - Саратов, 1977", "Инструкцией по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного и холерного микробов. - Саратов, 1982", санитарными правилами СП 1.2.011 - 94, "Руководством по биологической безопасности в лабораторных условиях" [287] и санитарно-противоэпидемическими правилами "Безопасность работы с рекомбинантными молекулами ДНК". Москва, 1989.

1	2	3
128-Ур	pFra <sup>-</sup>	ГосКПБ "Микроб" (выделен в 1992 г. от блох гребенчиковой песчанки в Волго-Уральском степном очаге)
16-К	Fra <sup>-</sup> (pFra <sup>+</sup> )	ГосКПБ "Микроб" (выделен в 1983 г. от полуденной песчанки в Среднеазиатском пустынном очаге)
231 (708)	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный	ГосКПБ "Микроб" (выделен в 1947 г. от сурка в Среднеазиатском горном очаге)
KM278 (231/830)	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> pH6 <sup>-</sup> , <sup>39</sup> вирулентный (Km <sup>R</sup> )	Е.А. Панферцев
231pCad <sup>-</sup>	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный	НИ
KM281 (231pCad <sup>-</sup> pFra/pFBK10)	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный (Km <sup>R</sup> )	НИ
KM260(3) (231pFra <sup>-</sup> )	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный	- " -
231pFra <sup>-</sup> pCad <sup>-</sup> pPst <sup>-</sup>	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>-</sup> Pla <sup>-</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный	ГосКПБ "Микроб"
231pFra <sup>-</sup> pCad <sup>-</sup> pPst <sup>-</sup> pFSK3	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный (Km <sup>R</sup> )	НИ
KM260(7) (231pFra <sup>-</sup> pPst <sup>-</sup> )	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>-</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный	- " -
KM282 (231pFra <sup>-</sup> pPst <sup>-</sup> pFSK3)	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный	- " -
KM280 (231pFra/pFBK10)	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный (Km <sup>R</sup> )	- " -
KM279 (231pFra/pFBK7)	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный (Km <sup>R</sup> )	- " -
KM254 (231pFra/pFS23)	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный (Km <sup>R</sup> )	- " -
KM260(1) (231pPst <sup>-</sup> )	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>-</sup> Pla <sup>-</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный	- " -
KM260(14) (231pPst <sup>-</sup> pFra/pFS23)	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>-</sup> Pla <sup>-</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный (Km <sup>R</sup> )	- " -
KM130 (231Psb <sup>-</sup> )	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Hms <sup>-</sup> Pst <sup>S</sup> , вирулентный	В.В. Кутырев
KM252 (231Psb <sup>-</sup> pFra/pFS23)	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Hms <sup>-</sup> Pst <sup>S</sup> , вирулентный (Km <sup>R</sup> )	НИ

<sup>39</sup> Все остальные использованные в работе штаммы *Y. pestis* обладали pH6<sup>+</sup> фенотипом.

1	2	3
252 (Пос)	Fra <sup>-</sup> (pFra <sup>+</sup> )	ГосКПБ "Микроб" (выделен в 1982 г. от полуденной песчанки в Среднеазиатском пустынном очаге)
296	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный	МЖК Иркутского ПЧИ
296pFra/pFS23	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный (Km <sup>R</sup> )	НИ
305(1694)	Fra <sup>+</sup> (pFra <sup>+</sup> )	ГосКПБ "Микроб" (выделен в 1963 г. от блох обыкновенной полевки в Закавказском высокогорном очаге)
927 (358)	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный	ГосКПБ "Микроб" (выделен в 1955 г. от погибшего от бубоносептической чумы человека в Среднеазиатском пустынном очаге)
358/12	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный	Л.Н. Шанина
358/12P <sup>-</sup>	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный	- " -
358/12P <sup>-</sup> pFBK7	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	НИ
358/12P <sup>-</sup> pFS1	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный (Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
358pFra <sup>-</sup>	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный (аналог штамма 358/12)	- " -
358pFra <sup>-</sup> pCad <sup>-</sup> pPst <sup>-</sup>	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , авирулентный	ГосКПБ "Микроб"
358pFra <sup>-</sup> pCad <sup>-</sup> pPst <sup>-</sup> pFSK3	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , авирулентный (Km <sup>R</sup> )	НИ
358pFra <sup>-</sup> pPst <sup>-</sup>	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный	- " -
358pFra/pFBK10	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный (Km <sup>R</sup> )	- " -
358pFra/pFBK7	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный (Km <sup>R</sup> )	- " -
358pFra/pFS23	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный (Km <sup>R</sup> )	- " -
KM265 (358pPst <sup>-</sup> )	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>-</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный	- " -
358pPst <sup>-</sup> pFra/pFS23	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>-</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный (Km <sup>R</sup> )	- " -
622	pFra <sup>+</sup>	ГосКПБ "Микроб" (выделен в 1967 г. от большой песчанки в Среднеазиатском пустынном очаге)
EV линии НИИЭГ (EV76)	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>-</sup> , вакцинный	ГИСК им. Л.А. Тарасевича
EV100	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>-</sup> Pla <sup>-</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный	П.А. Черепанов

1	2	3
EV100pFra/pFS23	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>-</sup> Pla <sup>-</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный (Km <sup>R</sup> )	НИ
EV100pFra/pFSX	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>-</sup> Pla <sup>-</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный (Km <sup>R</sup> )	- " -
EV11M <sup>40</sup>	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>-</sup> Pla <sup>-</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный, S-форма ЛПС	МЖК ГНЦ ПМ
KM272 (EV11MpFBK10)	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>-</sup> Pla <sup>-</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	НИ
KM271 (EV11MpFBK7)	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>-</sup> Pla <sup>-</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
KM270 (EV11MpFS1)	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>-</sup> Pla <sup>-</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный (Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
KM277 (EV11MpFSK3)	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный (Km <sup>R</sup> )	- " -
EV11MpHC79	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>-</sup> Pla <sup>-</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный (Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
KM227 (EVpCad <sup>-</sup> )	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный	О.А. Проценко
EVpFra <sup>-</sup> pCad <sup>-</sup> pPst <sup>-</sup>	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>-</sup> Pla <sup>-</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный	- " -
EVpFra <sup>-</sup> pCad <sup>-</sup> pPst <sup>-</sup> pFSK3	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный (Km <sup>R</sup> )	НИ
KM217 (EVpFra <sup>-</sup> pPst <sup>-</sup> )	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>-</sup> Pla <sup>-</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный	О.А. Проценко
KM276 (EVpFra <sup>-</sup> pPst <sup>-</sup> pFSK3)	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный (Km <sup>R</sup> )	НИ
EVpFra/pFBK10	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный (Km <sup>R</sup> )	- " -
EVpFra/pFBK7	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный (Km <sup>R</sup> )	- " -
EVpFra/pFS23	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный (Km <sup>R</sup> )	- " -
Harbin	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>-</sup> Pla <sup>-</sup> , авирулентный	ГосКПБ "Микроб"
HarbinpFSK3	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> , авирулентный (Km <sup>R</sup> )	НИ
Java	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>-</sup> Pla <sup>-</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный	МЖК ГНЦ ПМ
Java8	Fra <sup>-</sup> (pFra <sup>+</sup> )	ГосКПБ "Микроб" (выделен от блох черной крысы на острове Ява)
JavapFBK7	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>-</sup> Pla <sup>-</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	НИ
JavapFS1	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>-</sup> Pla <sup>-</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный (Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
JavapHC79	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>-</sup> Pla <sup>-</sup> Pgm <sup>-</sup> , авирулентный (Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
M-493	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный	ГосКПБ "Микроб"
KM283 (M-493pCad <sup>-</sup> )	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>-</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , авирулентный	НИ

<sup>40</sup> МЖК ГНЦ ПМ получил этот штамм из ГосКПБ "Микроб". Вероятно он является производным от сконструированного Н.М. Соколовой штамма *Y. pestis* EV<sub>M</sub> [304], для которого была свойственна SR-форма диссоциации.

1	2	3
М-509 (5467-Турк)		ГосКПБ "Микроб" (выделен в 1966 г. от полуденной песчанки в Сред- неазиатском пус- тынном очаге)
М-510 (2560-Турк)		ГосКПБ "Микроб" (выделен в 1966 г. от большой пес- чанки в Среднеази- атском пустынном очаге)
М-512 (2005-Турк)		- " -
М-513 (2002-Турк)		- " -
М-521 (533-Турк)		ГосКПБ "Микроб" (выделен в 1968 г. от большой пес- чанки в Среднеази- атском пустынном очаге)
М-522 (3262-Турк)	pFra <sup>+</sup>	- " -
М-957 (186-Ур)	pFra <sup>-</sup>	ГосКПБ "Микроб" (выделен в 1964 г. от полуденной песчанки в Волго- Уральском песча- ном очаге)
М-962 (947-Ур)	pFra <sup>+</sup>	ГосКПБ "Микроб" (выделен в 1977 г. от лалого суслика в Прикаспийском песчаном очаге)
М-974 (2069-Чикм)	Fra <sup>-</sup> (pFra <sup>-</sup> )	ГосКПБ "Микроб" (выделен в 1989 г. от большой пес- чанки в Среднеази- атском пустынном очаге)
X <sup>41</sup>	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный	МЖК ГНЦ ПМ
XpFra/pFS23	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный (Km <sup>R</sup> )	НИ

<sup>41</sup> X - высоковирулентный штамм *Y. pestis*, используемый в исследованиях сотрудников НИИ микробиологии МО РФ [61].

1	2	3
И-2422FraI <sup>-</sup>	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>-</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный (утратил pFra в процессе музейного хранения)	ГосКПБ "Микроб" (исходный штамм И-2422 (263) был выделен в 1974 г. от блох монгольской пищухи в Монголии)
И-2638	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный	МЖК Иркутского ПЧИ
И-2638pFra/pFS23	Fra <sup>-</sup> Tox <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> , вирулентный (Km <sup>R</sup> )	НИ
<b><i>Yersinia enterocolitica</i></b>		
KM33	Lcr <sup>+</sup>	ГосКПБ "Микроб"
KM33pFSK3	Fra <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> , (Km <sup>R</sup> )	НИ
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
DH1	F <sup>-</sup> , λ <sup>-</sup> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), <i>supE44</i> , <i>recA1</i> ?	ГосКПБ "Микроб"
DH1pFPK1	<i>cafIR</i> <sup>+</sup> <i>cafIM</i> <sup>-</sup> <i>cafIA</i> <sup>+</sup> <i>cafI</i> <sup>+</sup> <i>pla</i> <sup>+</sup> <i>pst</i> <sup>+</sup> <i>imm</i> <sup>+</sup> , (Km <sup>R</sup> )	НИ
DH1pFSK1	<i>cafIR</i> <sup>+</sup> <i>cafIM</i> <sup>-</sup> <i>cafIA</i> <sup>+</sup> <i>cafI</i> <sup>+</sup> , (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
DH1pFSK2	<i>cafIR</i> <sup>+</sup> <i>cafIM</i> <sup>-</sup> <i>cafIA</i> <sup>+</sup> <i>cafI</i> <sup>+</sup> , (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
KM104 (DH1pFSK3)	<i>cafIR</i> <sup>+</sup> <i>cafIM</i> <sup>-</sup> <i>cafIA</i> <sup>+</sup> <i>cafI</i> <sup>+</sup> <i>pla</i> <sup>+</sup> <i>pst</i> <sup>+</sup> <i>imm</i> <sup>+</sup> , (Km <sup>R</sup> )	- " -
DH1pFSK4	<i>cafIR</i> <sup>+</sup> <i>cafIM</i> <sup>-</sup> <i>cafIA</i> <sup>+</sup> <i>cafI</i> <sup>+</sup> <i>pla</i> <sup>+</sup> <i>pst</i> <sup>+</sup> <i>imm</i> <sup>+</sup> , (Km <sup>R</sup> )	- " -
DH1pFXK1	<i>cafIR</i> <sup>-</sup> <i>cafIM</i> <sup>-</sup> <i>cafIA</i> <sup>+</sup> <i>cafI</i> <sup>+</sup> <i>pla</i> <sup>+</sup> <i>pst</i> <sup>+</sup> <i>imm</i> <sup>+</sup> , (Km <sup>R</sup> )	- " -
F470	Ra-хемотип ЛПС	G. Schmidt
F470pFBK7	<i>cafIR</i> <sup>+</sup> <i>cafIM</i> <sup>-</sup> <i>cafIA</i> <sup>+</sup> <i>cafI</i> <sup>+</sup> , (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	НИ
F470pFS1	<i>cafIR</i> <sup>+</sup> <i>cafIM</i> <sup>-</sup> <i>cafIA</i> <sup>+</sup> <i>cafI</i> <sup>+</sup> , (Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
F470pHC79	(Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
F515	Re-хемотип ЛПС	G. Schmidt
F515pFBK7	<i>cafIR</i> <sup>+</sup> <i>cafIM</i> <sup>-</sup> <i>cafIA</i> <sup>+</sup> <i>cafI</i> <sup>+</sup> , (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	НИ
F515pFS1	<i>cafIR</i> <sup>+</sup> <i>cafIM</i> <sup>-</sup> <i>cafIA</i> <sup>+</sup> <i>cafI</i> <sup>+</sup> , (Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
F515pHC79	(Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
F583	Rd <sub>2</sub> -хемотип ЛПС	G. Schmidt
F583pFBK7	<i>cafIR</i> <sup>+</sup> <i>cafIM</i> <sup>-</sup> <i>cafIA</i> <sup>+</sup> <i>cafI</i> <sup>+</sup> , (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	НИ
F583pFS1	<i>cafIR</i> <sup>+</sup> <i>cafIM</i> <sup>-</sup> <i>cafIA</i> <sup>+</sup> <i>cafI</i> <sup>+</sup> , (Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
F583pHC79	(Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
F588	Rd <sub>1</sub> -хемотип ЛПС	G. Schmidt
F588pFBK7	<i>cafIR</i> <sup>+</sup> <i>cafIM</i> <sup>-</sup> <i>cafIA</i> <sup>+</sup> <i>cafI</i> <sup>+</sup> , (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	НИ
F588pFS1	<i>cafIR</i> <sup>+</sup> <i>cafIM</i> <sup>-</sup> <i>cafIA</i> <sup>+</sup> <i>cafI</i> <sup>+</sup> , (Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
F588pHC79	(Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
HB101	F <sup>-</sup> , λ <sup>-</sup> , <i>hsdS20</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), <i>recA13</i> , <i>ara14</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> (Sm <sup>R</sup> ), <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>supE44</i>	МЖК ГНЦ ПМ
HB101pΔC1	<i>cafIR</i> <sup>+</sup> <i>cafIM</i> <sup>-</sup> <i>cafIA</i> <sup>+</sup> <i>cafI</i> <sup>-</sup> , (Ap <sup>R</sup> )	НИ
HB101pFBK10	<i>cafIR</i> <sup>+</sup> <i>cafIM</i> <sup>-</sup> <i>cafIA</i> <sup>+</sup> <i>cafI</i> <sup>+</sup> , (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
HB101pFBK7	<i>cafIR</i> <sup>+</sup> <i>cafIM</i> <sup>-</sup> <i>cafIA</i> <sup>+</sup> <i>cafI</i> <sup>+</sup> , (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
HB101pFHK1	<i>cafIR</i> <sup>+</sup> <i>cafIM</i> <sup>-</sup> <i>cafIA</i> <sup>+</sup> <i>cafI</i> <sup>+</sup> , (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
HB101pFHK2	<i>cafIR</i> <sup>+</sup> <i>cafIM</i> <sup>-</sup> <i>cafIA</i> <sup>+</sup> <i>cafI</i> <sup>+</sup> , (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
HB101pFHK3	<i>cafIR</i> <sup>+</sup> <i>cafIM</i> <sup>-</sup> <i>cafIA</i> <sup>+</sup> <i>cafI</i> <sup>+</sup> , (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -

1	2	3
HB101pFPK1	<i>cafIR<sup>+</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>+</sup></i> , (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	НИ
HB101pFPK2	<i>cafIR<sup>+</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>+</sup></i> , (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
HB101pFS1	<i>cafIR<sup>+</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>+</sup></i> , (Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
KM39 (HB101pFS2)	<i>cafIR<sup>+</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>+</sup></i> , (Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
HB101pFS21	<i>cafIR<sup>+</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>-</sup></i> , (Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
HB101pFS23	<i>cafIR<sup>+</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>-</sup></i> , (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> )	- " -
HB101pFSK1	<i>cafIR<sup>+</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>+</sup></i> , (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
HB101pFSK2	<i>cafIR<sup>+</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>+</sup></i> , (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
HB101pFSX	<i>cafIR<sup>-</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>-</sup></i> , (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
HB101pFXK1	<i>cafIR<sup>-</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>+</sup></i> , (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
HB101pHC79	(Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
HB101pPW14	<i>pla<sup>+</sup>pst<sup>+</sup>imm<sup>+</sup></i> , (Cm <sup>R</sup> )	- " -
HB101pVF2	<i>cafIR<sup>+</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>+</sup>lcrV<sup>+</sup>pla<sup>+</sup>pst<sup>+</sup>imm<sup>+</sup></i> , (Cm <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
HB101pVH65	<i>lcrV<sup>+</sup>pla<sup>+</sup>pst<sup>+</sup>imm<sup>+</sup></i> , (Cm <sup>R</sup> )	- " -
JM83	F <sup>-</sup> , <i>ara</i> , Δ ( <i>pro-lac</i> ), <i>rpsL</i> , <i>thi</i> , ( <i>φ80dlacZM15</i> ), λ <sup>-</sup>	МЖК ГНЦ ПМ
JM83pFBK7	<i>cafIR<sup>+</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>+</sup></i> , (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	НИ
JM83pFS1	<i>cafIR<sup>+</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>+</sup></i> , (Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
JM83pHC79	(Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
KM120 (JM83pIG824)	pH6 <sup>+</sup> , (Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	П.А. Черепанов
KM13 (K802pAF10-23)	<i>cafIR<sup>+</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>+</sup></i> , (Ap <sup>R</sup> )	О.А. Кириллина
<b><i>Salmonella enteritidis</i></b>		
PM1	Вирулентный для мышевидных грызунов	МЖК ГНЦ ПМ
PM1pFBK7	<i>cafIR<sup>+</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>+</sup></i> , (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	НИ
PM1pFS1	<i>cafIR<sup>+</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>+</sup></i> , (Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
PM1pHC79	(Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
<b><i>Salmonella minnesota</i></b>		
R595	Re-хемотип ЛПС	В.Г. Лиходед
KM139 (R595pAE1)	<i>cafIR<sup>+</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>+</sup></i> , (Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> )	НИ
R595pFBK10	<i>cafIR<sup>+</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>+</sup></i> , (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
R595pFBK7	<i>cafIR<sup>+</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>+</sup></i> , (Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
KM1 (R595pFS1)	<i>cafIR<sup>+</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>+</sup></i> , (Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
R595pHC79	(Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -
<b><i>Salmonella typhi</i></b>		
Tu21a	вакцинный	МЖК ГНЦ ПМ
Tu21apFS1	<i>cafIR<sup>+</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>+</sup></i> , (Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	НИ
<b><i>Salmonella typhimurium</i></b>		
TT9914		J. Roth
TT9916		J. Roth
TT9914pFS1	<i>cafIR<sup>+</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>+</sup></i> , (Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	НИ
TT9916pFS1	<i>cafIR<sup>+</sup>cafIM<sup>-</sup>cafIA<sup>+</sup>cafI<sup>+</sup></i> , (Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> )	- " -

## 2.2. ПЛАЗМИДЫ

Таблица 2. Список использованных в работе плазмид

Плазмида	Маркеры антибиотикоустойчивости	Гены <i>Y. pestis</i> , расположенные на плазмиде	Источник получения и (или) ссылка на литературу
1	2	3	4
pΔC1	Ap <sup>R</sup>	<i>caf1R</i> <sup>+</sup> , <sup>42</sup> <i>caf1M</i> <sup>+</sup> , <i>caf1A</i> <sup>+</sup> , <i>Δcaf1</i> <sup>43</sup>	НИ
pAE1	Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	<i>caf1R</i> <sup>+</sup> , <i>caf1M</i> <sup>+</sup> , <i>caf1A</i> <sup>+</sup> , <i>caf1</i> <sup>+</sup> , <i>pla</i> <sup>+</sup> , <i>pst</i> <sup>+</sup> , <i>imm</i> <sup>+</sup>	НИ
pAF10-23	Ap <sup>R</sup>	<i>caf1R</i> <sup>+</sup> , <i>caf1M</i> <sup>+</sup> , <i>caf1A</i> <sup>+</sup> , <i>caf1</i> <sup>+</sup>	О.А. Кириллина
pBR322	Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	–	[500]
pBR325	Ap <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	–	[500]
pFBK10	Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	<i>caf1R</i> <sup>+</sup> , <i>caf1M</i> <sup>+</sup> :: <i>kan</i> , <sup>44</sup> <i>caf1A</i> <sup>+</sup> <i>caf1</i> <sup>+</sup>	НИ
pFBK7	Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	<i>caf1R</i> <sup>+</sup> , <i>caf1M</i> <sup>+</sup> :: <i>kan</i> , <i>caf1A</i> <sup>+</sup> <i>caf1</i> <sup>+</sup>	- " -
pFHK1	Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	<i>caf1R</i> <sup>+</sup> , <i>caf1M</i> <sup>+</sup> , <i>caf1A</i> <sup>+</sup> , <i>caf1</i> <sup>+</sup>	- " -
pFHK2	Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	<i>caf1R</i> <sup>+</sup> :: <i>kan</i> , <i>caf1M</i> <sup>+</sup> , <i>caf1A</i> <sup>+</sup> , <i>caf1</i> <sup>+</sup>	- " -
pFHK3	Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	<i>caf1R</i> <sup>+</sup> , <i>caf1M</i> <sup>+</sup> :: <i>kan</i> , <i>caf1A</i> <sup>+</sup> , <i>caf1</i> <sup>+</sup>	- " -
pFPK1	Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	<i>caf1R</i> <sup>+</sup> , <i>caf1M</i> <sup>+</sup> , <i>caf1A</i> <sup>+</sup> , <i>caf1</i> <sup>+</sup>	- " -
pFPK2	Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	<i>caf1R</i> <sup>+</sup> , <i>caf1M</i> <sup>+</sup> , <i>caf1A</i> <sup>+</sup> , <i>caf1</i> <sup>+</sup>	- " -
pFS1	Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	<i>caf1R</i> <sup>+</sup> , <i>caf1M</i> <sup>+</sup> , <i>caf1A</i> <sup>+</sup> , <i>caf1</i> <sup>+</sup>	[162, 163]
pFS2	Ap <sup>R</sup>	<i>caf1R</i> <sup>+</sup> , <i>caf1M</i> <sup>+</sup> , <i>caf1A</i> <sup>+</sup> , <i>caf1</i> <sup>+</sup>	[162, 163]
pFS21	Ap <sup>R</sup>	<i>caf1R</i> <sup>+</sup> , <i>caf1M</i> <sup>+</sup> , <i>Δcaf1A-caf1</i>	НИ
pFS23	Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	<i>caf1R</i> <sup>+</sup> , <i>caf1M</i> <sup>+</sup> :: <i>kan</i> , <i>Δcaf1A-caf1</i>	- " -
pFSK1	Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	<i>caf1R</i> <sup>+</sup> , <i>caf1M</i> <sup>+</sup> , <i>caf1A</i> <sup>+</sup> , <i>caf1</i> <sup>+</sup>	- " -
pFSK2	Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	<i>caf1R</i> <sup>+</sup> , <i>caf1M</i> <sup>+</sup> , <i>caf1A</i> <sup>+</sup> , <i>caf1</i> <sup>+</sup>	- " -
pFSK3	Km <sup>R</sup>	<i>caf1R</i> <sup>+</sup> , <i>caf1M</i> <sup>+</sup> , <i>caf1A</i> <sup>+</sup> , <i>caf1</i> <sup>+</sup> , <i>pla</i> <sup>+</sup> , <i>pst</i> <sup>+</sup> , <i>imm</i> <sup>+</sup>	- " -
pFSK4	Km <sup>R</sup>	<i>caf1R</i> <sup>+</sup> , <i>caf1M</i> <sup>+</sup> , <i>caf1A</i> <sup>+</sup> , <i>caf1</i> <sup>+</sup> , <i>pla</i> <sup>+</sup> , <i>pst</i> <sup>+</sup> , <i>imm</i> <sup>+</sup>	- " -
pFSX	Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	локусы фланкирующие <i>fra</i> оперон ( <i>Δcaf1R-caf1</i> :: <i>kan</i> ) <sup>45</sup>	- " -
pFXK1	Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	<i>caf1R</i> <sup>+</sup> :: <i>kan</i> , <i>caf1M</i> <sup>+</sup> , <i>caf1A</i> <sup>+</sup> , <i>caf1</i> <sup>+</sup>	- " -
pHC79	Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	–	[458]
pPst	–	<i>pla</i> <sup>+</sup> , <i>pst</i> <sup>+</sup> , <i>imm</i> <sup>+</sup> , <i>mob</i> <sup>+</sup>	<i>Y. pestis</i> EV
pPW14	Cm <sup>R</sup>	<i>pla</i> <sup>+</sup> , <i>pst</i> <sup>+</sup> , <i>imm</i> <sup>+</sup>	НИ
pUC19	Ap <sup>R</sup>	–	[500]
pUC4K	Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	–	[583]
pVF2	Cm <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	<i>caf1R</i> <sup>+</sup> , <i>caf1M</i> <sup>+</sup> , <i>caf1A</i> <sup>+</sup> , <i>caf1</i> <sup>+</sup> , <i>lcrV</i> <sup>+</sup> , <i>pla</i> <sup>+</sup> , <i>pst</i> <sup>+</sup> , <i>imm</i> <sup>+</sup>	НИ
pVH65	Cm <sup>R</sup>	<i>lcrV</i> <sup>+</sup> , <i>pla</i> <sup>+</sup> , <i>pst</i> <sup>+</sup> , <i>imm</i> <sup>+</sup>	- " -

<sup>42</sup> Знак “+” следующий за обозначением гена свидетельствует о его присутствии в описываемой плазмиде.

<sup>43</sup> Знак “Δ” перед обозначением гена(ов) свидетельствует о его(их) полной или частичной делеции в описываемой плазмиде.

<sup>44</sup> Знак “::*kan*” следующий за обозначением гена свидетельствует о встраивании в его последовательность фрагмента ДНК с маркером Km<sup>R</sup>.

<sup>45</sup> Знак “*Δcaf1R-caf1*::*kan*” свидетельствует о замене фрагмента ДНК, включающего 55 тпн, кодирующих N-конец *Caf1R*, и гены *caf1M*, *caf1A*, *caf1*, на последовательность, кодирующую маркер Km<sup>R</sup>.

### 2.3. БАКТЕРИОФАГИ

В работе использовали бактериофаги диагностические чумные Л-413С и Покровской [288, 289] в соответствии с инструкциями по их применению.

### 2.4. СРЕДЫ И УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Микроорганизмы выращивали на жидких или плотных питательных средах Хоттингера (различные серии лабораторного приготовления НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи или РосНИПЧИ "Микроб") или LB (Luria Bertani broth medium - триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 10 г/л), pH 7,2. В ряде экспериментов использовали бульон и агар Хоттингера, pH 5,8 или pH 8,0 (лабораторного приготовления РосНИПЧИ "Микроб"), мясо-пептонный агар, pH 7,2 (лабораторного приготовления НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи), и агар на основе панкреатического гидролизата кильки, pH 7,2 (производства АО "Питательные среды", Махачкала). Селекцию клеток, содержащих рекомбинантные плазмиды, вели на средах с добавлением соответствующих антибиотиков в концентрациях: ампициллин - 50 мкг/мл, канамицин - 20 мкг/мл, хлорамфеникол - 10 мкг/мл, тетрациклин 10 мкг/мл. Для выделения ДНК в препаративных количествах клетки чумного микроба выращивали при температуре 28 °С, кишечной палочки - при температуре 37 °С, в течение 18-20 ч на жидких питательных средах в условиях аэрации.

Клоны, утратившие плазмиду pPst, отбирали после пяти-шести пассажей на плотных питательных средах LB или Хоттингера при температуре 4 °С [493], а лишённые плазмиды pCad, выявляли среди колоний, выросших на магниевом-оксалатном агаре [455] при температуре 37 °С.

Для определения продукции капсульного антигена штаммы чумного микроба выращивали в течение 42-48 ч, штаммы кишечной палочки и сальмонелл - 20 ч на жидких или плотных питательных средах при температурах 37 °С и 28 °С.

Для выделения капсульного антигена в препаративных количествах культивирование бактерий проводили в малообъемных экспериментах при температуре 28 °С или 37 °С с использованием бифазных систем агар-бульон [340] на средах Хоттингера.

Для определения ЭКП бактериальных клеток штаммы энтеробактерий выращивали в течение 20 ч на агаре Хоттингера (рН 7,2) при температурах 37 °С и 28 °С.

Время генерации микробных клеток определяли по Г. Шлегелю [359].

## 2.5. ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

В работе использовали более 4000 беспородных белых мышей массой (19±2) г, более 2000 беспородных морских свинок массой (275±25) г, 12 кроликов породы шиншилла массой (2,5±0,5) кг из вивариев РосНИПЧИ “Микроб” и ГНЦ ПМ в соответствии с требованиями к качеству лабораторных грызунов и условиям их содержания [209].

## 2.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКЦИИ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА

Продукцию антигена FI определяли согласно “Руководству по профилактике чумы” [288, 289] при помощи серологических реакций: РДИД с сыворотками чумными лошадиными гипериммунными поликлональными (“Зарница”, “Рудный” - РосНИПЧИ “Микроб”), адсорбированными моноспецифическими (адсорбцию проводили как описано ниже), и кроличьими моноспецифическими (ГНЦ ПМ) анти-FI-сыворотками; РНГА ставили с коммерческим диагностикумом эритроцитарным чумным моноклональным антикапсульным иммуноглобулиновым (Среднеазиатский ПЧИ); РНАт с чумным коммерческим эритроцитарным антигенным диагностикумом (Среднеазиатский ПЧИ); ИФА с коммерческой моноклональной тест-системой для детекции FI (Среднеазиатский ПЧИ). В отличие от описанных стандартных методик, выявляющих наличие фракции I чумного микроба [288], в качестве исходного разведения использовали микробную взвесь в концентрации  $10^9$  м.к./мл, а не

$4 \times 10^6$  м.к./мл.<sup>46</sup> В ряде экспериментов микробную взвесь перед постановкой иммунохимических реакций лизировали в растворе: ЭДТА (20 мМ), тритон X-100 (0,1 %), лизоцим (0,5 мкг/мл), после завершения лизиса (через 10-20 мин) к образцам добавляли ДНКазу I (10 мкг/мл) и  $MgCl_2$  (50 мМ). Ацетонвысушенные клетки готовили согласно E.E. Baker *et al.* [381, 382]. Для постановки иммунохимических реакций ацетонвысушенные клетки разводили изотоническим раствором NaCl (0,9 %) до концентрации  $10^9$  м.к./мл, что соответствует 10 единицам стандарта мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича (ОСО 42-28-59-85П).

Антисыворотки к атипичным капсулам получали путем однократной подкожной иммунизации кроликов клетками штаммов *Y. pestis* EVpFra/pFBK7 и *S. minnesota* R595pFBK7 в дозе  $10^9$  КОЕ или инактивированными обработкой 70 %-ным этанолом в течение четырех часов, а затем отмытыми в изотоническом растворе NaCl (0,9 %) клетками штамма *Y. pestis* 231pFra/pFBK10 в дозе  $10^{10}$  м.к./мл на животное. Через семь дней для "бустерной" иммунизации использовали полученные из этих штаммов с помощью двукратной изоэлектрической преципитации препараты белков капсулы (см. раздел 2.10), тщательно смешанные с равными объемами "adjuvant complete Freund" (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA). Полученную эмульсию вводили кроликам по 0,1 мл под кожу каждой конечности с внутренней стороны, по 0,1 мл под кожу спины, по 0,1 мл в мышцы бедер и 0,1 мл (без адьюванта) внутривенно. Через две недели кроликам повторно делали внутривенную инъекцию 0,5 мл препарата без адьюванта. Если сыворотка, полученная еще через две недели (30-50 мл крови брали из ушной вены), не содержала антител к использованным для иммунизации препаратам, проводили дополнительные "бустерные" введения антигена, вплоть до их появления в достаточных для исследований титрах. Общая доза при проведении иммунизации составила в среднем 1,2 мг белков капсулы на животное (без учета белков, входивших в состав цельноклеточных препаратов, использованных для первичной иммунизации). Отдельные антикапсуль-

---

<sup>46</sup> При постановке РНГА и РНАт микрометодом указанные реакции должны выявлять  $\leq 5 \times 10^5$  м.к./мл, что в наших исследованиях соответствовало обратным титрам 2048 и более.

ные сыворотки содержали до четырех дополнительных преципитинов, направленных против антигенов Fra<sup>-</sup> вариантов *Y. pestis*.<sup>47</sup> Эти антитела устраняли адсорбцией лиофилизированными клетками Fra<sup>-</sup> штамма *Y. pestis* EVpFra/pFS23 (25 мг/мл сыворотки). Адсорбцию проводили при аккуратном перемешивании суспензии в течение 30 мин при температуре 37 °С, а затем оставляли на ночь в холодильнике (4 °С). Комплексы антиген-антитело и клеточный дебрис удаляли центрифугированием (20000 × g в течение 1 ч).

РДИД в геле ставили с использованием метода О. Öuchterlony [522]. Клеточные суспензии, лизированные или ацетонвысушенные клетки исследуемых клонов (50-100×10<sup>9</sup> м.к./мл) наносили в радиально расположенные лунки агаровой пластины в количестве 20 мкл, а в центральную лунку вносили 20 мкл антифракционной сыворотки. Агаровые пластины инкубировали в течение 24-36 ч при температуре 37 °С, после чего проводили учет результатов.

При работе с бульонными культурами клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 8000 × g в течение 15 мин. Наличие антигена определяли в надосадочной жидкости и осадке. Параллельно определяли чувствительность диагностикумов с помощью двух серий препаратов “фракции I”, разведенных до рабочей концентрации 1 мг/мл. Используемые в качестве контрольных препараты капсульного антигена были любезно предоставлены С.М. Дальвадянцем и И.А. Дятловым (РосНИПЧИ “Микроб”, Саратов). Чувствительность метода в данной серии опытов составляла 0,0625 мкг FI на мл. Затем пересчитывали количество капсульного антигена в контрольных пробах на 1 мл питательной среды для антигена, секретлируемого в среду выращивания и антигена, связанного с микробными клетками.

При работе с агаровыми культурами клетки смывали с чашек, содержащих 25 мл агаризованной среды, 5 мл 0,9 %-ного раствора хлорида натрия (элюирующий раствор), разво-

---

<sup>47</sup> Это согласуется с известными данными о том, что в “смывах” с клеток возбудителя чумы помимо FI содержится от 6 до 11 водорастворимых антигенов [143].

дили этим же раствором до конечного объема 25 мл. Суспензии бактерий перемешивали в течение 30 мин. Дальнейшие манипуляции проводили, как описано выше для бульонных культур.

Количество белка определяли по О.Н. Lowry *et al.* [498].

## 2.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ИССЛЕДОВАННЫХ ШТАММОВ

Определение основных фенотипических характеристик исследованных штаммов проводили согласно “Наставлению по изучению свежевыделенных штаммов возбудителя чумы” [169]. Способность синтезировать "мышинный" токсин, V и рН6 антигены определяли в РДИД с монорецепторными кроличьими сыворотками полученными в отделе генетики ГНЦ ПМ.

## 2.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ НАСЛЕДОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД

Для определения частоты образования в популяции рекомбинантных бактерий клеток, утративших гибридные плазмиды, был использован метод пассирования микробных культур на бульоне Хоттингера без соответствующих антибиотиков с аэрацией при температуре оптимальной для продукции капсульного антигена в течение 100-120 генераций. Через каждые 20 генераций осуществляли высев бактерий на агар Хоттингера. После 48 ч культивирования при температуре 28 °С (*Y. pestis*) или 24 ч - при температуре 37 °С (остальные энтеробактерии) 100 произвольно выросших колоний “перекалывали” на чашки, содержащие агар Хоттингера с соответствующим антибиотиком. Количество клонов, не выросших на среде с антибиотиком, принимали за процент клеток, утративших рекомбинантную плазмиду.

## 2.9. ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЕ МАНИПУЛЯЦИИ

Наличие плазмид определяли с помощью их скрининга [391] и ПЦР с использованием праймеров на гены *cafI* и *pla* [519, 559].

Для получения препаративных количеств плазмидной ДНК из штаммов *E. coli* и *Y. pestis* использован щелочной метод Н.С. Birnboim & I. Doly [391].

Рестрикционно-лигазную технику выполняли по руководству Т. Maniatis *et al.* [500]. Использовали ферменты производства НПО “Фермент” (Вильнюс, Литва).

Передачу рекомбинантных плазмид в штаммы *E. coli* осуществляли “кальциевым” методом трансформации по S.N. Cohen & A.C.Y. Chang [412], а в клетки *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* и *Salmonella* spp. методами криотрансформации в модификации А.М. Кокушкина [175] или электростимулируемой трансформации [139].

## 2.10. КОНСТРУИРОВАНИЕ ИНТЕГРАТИВНЫХ ПЛАЗМИД, ДЕФЕКТНЫХ ПО ОТДЕЛЬНЫМ ГЕНАМ *fra* ОПЕРОНА

Схемы конструирования плазмид pFBK7 и pFBK10, pFS23, pFSX представлены на рис. 1, 2, 3, соответственно. Конструктивной особенностью всех этих репликонов является наличие фрагмента ДНК, содержащего маркер антибиотикоустойчивости, необходимый для последующей селекции рекомбинантных клонов, и фланкированного нуклеотидными последовательностями, гомологичными аллельному оперону "дикого" типа. Эти участки гомологии и должны обеспечивать гомологичную рекомбинацию.

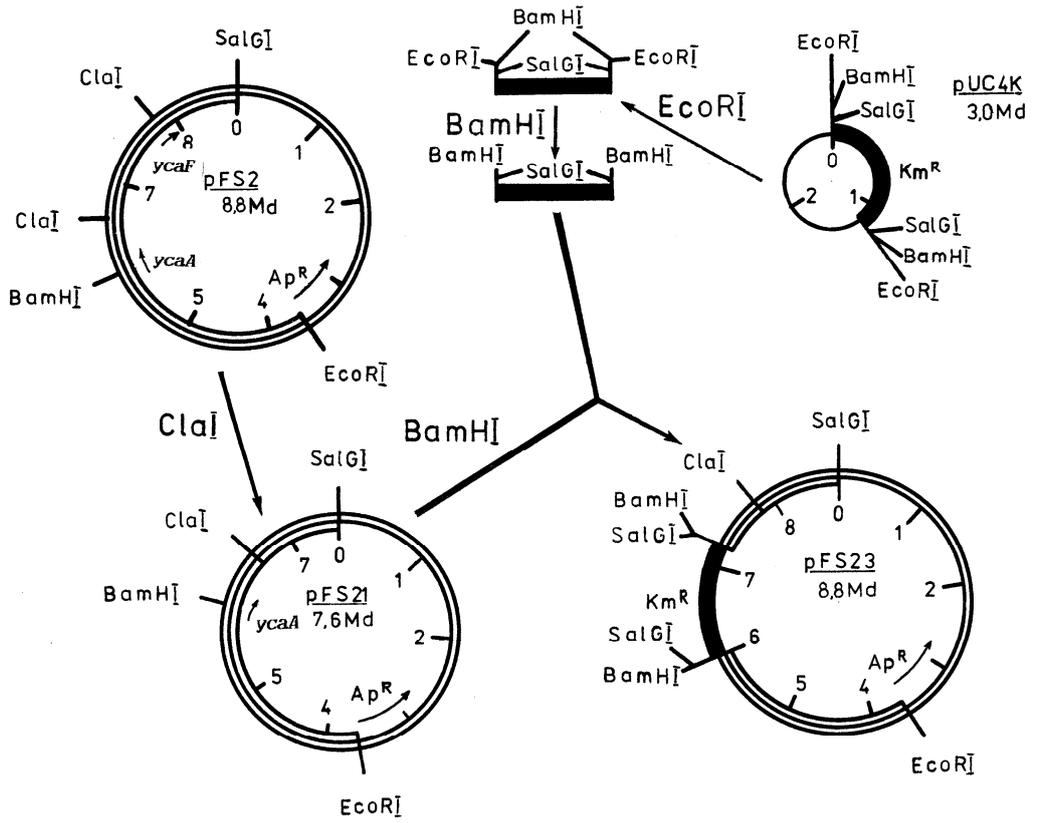


Рисунок 2. Схема конструирования плазмиды pFS23.

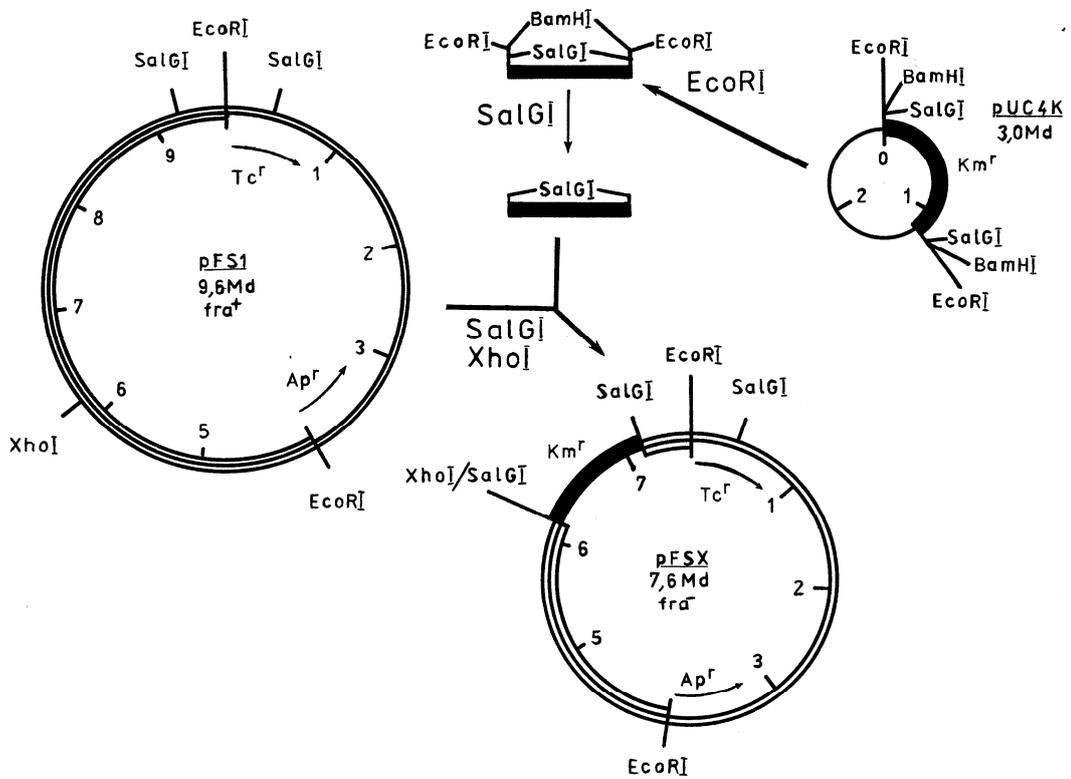


Рисунок 3. Схема конструирования плазмиды pFSX.

Плазмиды pFBK7 и pFBK10 получали путем неполного гидролиза плазмиды pFS1, содержащей 8,6-тпн *EcoRI* фрагмент репликона pFga в составе космидного вектора pHC79, рестриктазой *BamHI* и последующего встраивания в противоположных ориентациях *BamHI* фрагмента плазмиды pUC4K, содержащего ген *kan* ( $Km^R$ ). Полученные конструкции несли инсерции в *BamHI* сайте гена *caf1M*. "Лигатами" трансформировали клетки *E. coli* HB101 и проводили селекцию по маркерам  $Km^R$  и  $Tc^R$ , что позволяло избавиться от клонов, несущих рекомбинантные плазмиды со вставками  $Km^R$  локуса в гене *tet*.

Плазмиду pFS23 конструировали следующим путем. Плазмиду pFS2, полученную из репликона pFS1 путем делеции меньшего *SalGI* фрагмента, гидролизовали рестриктазой *Clal* и концы большего фрагмента "зашивали сами на себя", получив таким образом конструкцию pFS21. Отбор клонов трансформантов *E. coli* HB101, содержащих искомую гибридную плазмиду, проводили по фенотипу  $Fra^-$ , определяемому иммунохимически и сочетающемуся с наличием маркера  $Ap^R$ . Затем в уникальный сайт *BamHI* сайт плазмиды pFS21 встраивали *BamHI* фрагмент, содержащий маркер  $Km^R$ . Последующую селекцию трансформантов проводили по маркерам  $Km^R$  и  $Ap^R$ .

Плазмиду pFSX получали путем гидролиза плазмиды pFS1 рестриктазой *XhoI*, неполного гидролиза *SalGI* и последующего встраивания *SalGI* фрагмента плазмиды pUC4K, содержащего ген *kan*. После проведения лигирования полученной смесью гибридных молекул ДНК трансформировали клетки *E. coli* HB101 и проводили селекцию по маркерам  $Km^R$  и  $Tc^R$ , что позволяло избавиться от клонов, утративших *SalGI-EcoRI* фрагмент из pFga, примыкавший к делетированному *XhoI-SalGI* фрагменту.

## 2.11. НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ ПЛАЗМИДЫ pFra ЗА СЧЕТ ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ С ИНТЕГРАТИВНЫМИ ВЕКТОРАМИ И СЕЛЕКЦИЯ $Fra^-$ ИЛИ *caf1M* МУТАНТОВ *Y. pestis*<sup>48</sup>

Использованный в нашем исследовании подход основан на способности мультикопийных плазмид, несущих протяженные вставки хромосомной ДНК, вызывать мутации, являющиеся следствием аллельного обмена с хромосомой [482], и с высокой частотой элиминировать из клеток реципиентного штамма [472].

Векторные части плазмид pFS23, pFSX, pFBK7 и pFBK10 представлены космидой pHC79 [458], несущей гены *amp* и *tet* ( $Ap^R$  и  $Tc^R$ ) и *ori* - область, ответственную за начало репликации, из плазмиды ColE1. Ранее нами было показано [17], что локус *ori* из ColE1 не способен обеспечивать стабильное наследование в клетках *Y. pestis* в неселективных условиях сконструированных на его основе рекомбинантных плазмид. Клонированная вставка ДНК представляет из себя *EcoRI* фрагменты плазмиды pFra, фланкирующие вставку гена *kan* ( $Km^R$ ) из плазмиды pUC4K [583]. Наличие областей гомологии у сконструированных нами интегративных векторов с аллельной плазмидой pFra “дикого” типа должно было, по нашему мнению, обеспечить при передаче этих векторов в клетки *Y. pestis* образование рекомбинантных молекул ДНК pFra, в которых исходная последовательность *fra* локуса была бы заменена на аллельные векторные последовательности, дефектные по определенным генам *fra* оперона, но несущие маркер  $Km^R$ , обеспечивающий позитивную селекцию. Последующее выращивание рекомбинантных клеток в неселективных условиях (первый вариант негативной селекции) должно было бы способствовать элиминации *fra* оперона “дикого” типа в составе коинтеграта с рекомбинантной молекулой ДНК, несущей *ori* из плазмиды ColE1 и маркеры  $Tc^R$  и  $Ap^R$ . Это, в свою очередь, должно приводить к обогащению клеточной популяции вариантами с  $Km^R Tc^S Ap^S$  фенотипом.

---

<sup>48</sup> Первое описание использования разработанного нами способа приводится в публикации С.В. Самойловой с соавт. [295].

Отбор мутантных клонов проводили как описано ниже.  $Km^R$  клоны трансформантов реципиентного штамма *Y. pestis* “перекалывали” на плотные питательные среды с тетрациклином для поиска  $Km^R Tc^S$  (или  $Km^R Ap^S$ ) вариантов. Второй вариант негативной селекции - предварительное подкожное заражение смесью  $Km^R$  трансформантов ( $10^8$  КОЕ на животное) белых мышей, иммунизированных подкожно препаратами “классического” капсульного антигена без адьюванта (15 мкг на животное) за 21 сут до заражения, значительно увеличивал процент искомых мутантов, получившихся в результате гомологичной рекомбинации.

Полученные  $Km^R Tc^S$  (или  $Km^R Ap^S$ ) варианты *Y. pestis* анализировались в иммунохимических тестах и микроскопически.

## 2.12. КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ *Y. pestis*, ЛИШЕННЫХ ПЛАЗМИДЫ pFra

Рекомбинантные штаммы *Y. pestis*, несущие в составе “коинтеграта” pFra/pFS23 ген *kan*, выращивали при температуре 28 °С на плотной питательной среде, содержащей канамицин в субингибирующих концентрациях, которые эмпирически определялись для каждого штамма (1-10 мкг/мл). На одну чашку высевали до 300 КОЕ. Утрата маркера  $Km^R$  сопровождалась задержкой роста. На 3-5 сут культивирования на пластинках агара можно было различить два типа колоний: 0,5-1,5 и 2,0-3,5 мм в диаметре. Наиболее мелкие колонии повторно тестировали на чувствительность к канамицину (50 мкг/мл).  $Km^S$  субкультуры изучали с помощью скрининга плазмид [391] и ПЦР с использованием праймеров на ген *cafI* [519, 559].

## 2.13. ЗАРАЖЕНИЕ ЖИВОТНЫХ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ ШТАММОВ *Y. pestis*

Для генерализации чумной инфекции, вызванной производными авирулентного штамма EV, белым мышам перед заражением вводили внутривентально по 0,4 мг  $FeSO_4$  в 0,2 мл  $H_2O$ . Животных заражали внутривентально двухсуточными 28-градусными культурами в дозе  $10^8$  КОЕ на животное.

Бактерии вирулентных штаммов *Y. pestis* выращивали в течение 48 ч при температуре 28 °С или 37 °С и использовали для подкожного, внутрибрюшинного или аэрогенного заражения.

Подкожное заражение проводили введением под кожу бедра, а внутрибрюшинное - введением десятикратных "разводок" культуры *Y. pestis* в изотоническом растворе NaCl (0,9 %) в объеме 0,2 мл на животное. По нашим данным величины LD<sub>50</sub> при внутрибрюшинном заражении в 3-4 раза превышают таковые при подкожном заражении, однако, при внутрибрюшинном заражении отмечается меньший "разброс" результатов.

Ингаляционное заражение проводили в аэродинамической камере РосНИПЧИ "Микроб". Бактерии суспендировали до концентрации 10<sup>7</sup> КОЕ/мл в 10 %-ном водном растворе лактозы. Заражающая доза определялась различным временем экспозиции (2, 4, 8 и 16 мин). Распыление проводили с помощью прямоточного пневматического распылителя эжекционного типа, создававшего аэрозоль, основная масса которого (90,3 %) состояла из частиц с диаметром менее 2 мкм. Размер частиц аэрозоля определяли по методу К.Р. Мау, Н.А. Друэт [502]. В течение сеансов заражения производили отбор проб аэрозоля аспирационно-фильтрационным способом с помощью импинжеров, заполненных изотоническим раствором NaCl (0,9 %). По окончании сеанса заражения бактериологическим методом определяли биологическую концентрацию аэрозоля, представляющую собой количество КОЕ на 1 л воздуха камеры. На основании полученных данных высчитывали аспирационную дозу, полученную морской свинкой за время заражения по формуле:

$$АД = Сб \times V \times t, \quad (1)$$

где АД – аспирационная доза, КОЕ;

Сб – биологическая концентрация аэрозоля, КОЕ/л;

V - минутный объем дыхания, принятый равным у морских свинок 0,1 л/мин;

t - время заражения, мин.

Наблюдение за зараженными животными проводили в течение 30 сут. Погибших животных вскрывали и подвергали бактериологическому исследованию. Вычисление величин LD<sub>50</sub> и доверительного интервала (для вероятности 95 %) проводили по методу Kärber в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [34].

#### 2.14. "АНИМАЛИЗАЦИЯ" РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ *Y. pestis* ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ КЛОНОВ, СОХРАНИВШИХ ВИРУЛЕНТНОСТЬ НА УРОВНЕ ИСХОДНЫХ ШТАММОВ

Для отбора из популяций рекомбинантов или клеток, утративших собственные плазмиды *Y. pestis*, клонов, обладающих вирулентностью на уровне исходных штаммов "дикого" типа использовали несколько подходов.

Первый применяли только при поклональном анализе небольшого количества (до 25-50) колоний исследуемых вариантов возбудителя чумы. Выросшие при температуре 28 °С 1,5-2-суточные колонии *Y. pestis* диаметром 1-2 мм снимали с агара стерильными стеклянными палочками, имеющими оплавленный шарообразный конец диаметром 1-1,5 мм. Отдельную колонию и, соответственно, палочку использовали для конъюнктивального заражения одной белой мыши. Культуры, выделенные из селезенок погибших в наиболее ранние сроки животных, использовали для дальнейшей "анимализации" по одному из следующих способов.

При втором методическом подходе проводили двукратное определение величин LD<sub>50</sub> вначале на белых мышах, а затем на морских свинках, причем в каждый следующий опыт брали культуры, выделенные от животных погибших в наиболее ранние сроки от наименьших заражающих доз.

Третий вариант "анимализации" использовался, в основном, исследователями лаборатории прикладной генетики РосНИПЧИ "Микроб" [294]. "Анимализируемую" культуру бактерий вводили подкожно пяти белым мышам в дозе  $10^8$  КОЕ. Животных, павших в наиболее ранние сроки, вскрывали, брали одну "петлю" тканей головного мозга и суспендировали забранный петлей материал в 1 мл. 0,1 мл полученной суспензии, содержащей около 200 КОЕ *Y. pestis*, вводили подкожно пяти белым мышам. Аналогичным способом процедуру повторяли еще один раз на мышах. Затем - двукратно на морских свинках, но для каждого пассажа брали по три свинки.

Во всех экспериментах с вирулентными штаммами возбудителя чумы использовали культуры, пересевавшиеся не более двух раз с момента выделения от животных.

## 2.15. ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ НА БИОЛОГИЧЕСКИХ МОДЕЛЯХ

Определение иммуногенной активности экспериментальных вакцинных штаммов проводили на беспородных белых мышах в соответствии с методическими указаниями "Основные критерии отбора вакцинных штаммов чумного микроба" [57]. Аналогичные подходы использовали и для оценки иммуногенной активности экспериментальных "убитых цельноклеточных" и субъединичных вакцинных препаратов.

Для определения **протективной активности** ( $ImD_{50}$ ) испытуемых штаммов *Y. pestis* суспензиями их двухсуточных культур, приготовленных в 0,9 %-ном растворе NaCl, подкожно иммунизировали мышей дозами  $10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $2,5 \times 10^4$ ,  $1,25 \times 10^5$  КОЕ на животное (по тридцать мышей на одну дозу).<sup>49</sup> Через 21 сут после иммунизации мышей подкожно заражали аналогично приготовленной суспензией штамма *Y. pestis* 231 из расчета  $10^5$  КОЕ ( $2,9 \times 10^3$  LD<sub>50</sub>) на животное. Наблюдение за мышами осуществляли в течение месяца с момента заражения. Вычисление величин  $ImD_{50}$  и доверительного интервала проводили по ме-

тоту Kärber в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [34]. Доверительный интервал вычисляли для вероятности 95 %.

Для определения **протективной активности** рекомбинантного штамма *Y. enterocolitica* (продуцента FI) в отношении вирулентного штамма *Y. pestis* 231 использовали оральный способ иммунизации беспородных белых мышей. Животных вакцинировали орально в дозе от  $10^5$  до  $10^9$  КОЕ, при этом культуру непосредственно перед иммунизацией наносили на кусочки хлеба размером  $(0,5 \times 0,5 \times 0,5)$  см, которые вносили в банки, в каждой из которых находилось по одной белой мыши. После того, как хлеб был съеден, животных, обработанных одинаковыми дозами, пересаживали в общие банки. Через 21 день проводили заражение штаммом *Y. pestis* 231 в дозе 5 Dcl. Наблюдение за мышами осуществляли в течение месяца.

**Напряженность** противочумного иммунитета (ИИ), т.е. способность вакцинного препарата предохранять животное от заражения массивными дозами вирулентной культуры, определяли по величине заражающей дозы, выраженной в  $LD_{50}$  вирулентного штамма для интактных животных, при заражении которой на 21-е сутки выживает не менее 50 % животных определяли по формуле:

$$ИИ = \frac{LD_{50_{имм}}}{LD_{50_{инт}}}, \quad (2)$$

где ИИ – индекс иммунитета;

$LD_{50_{имм}}$  -  $LD_{50}$  для животных, иммунизированных вакцинным штаммом EV линии

НИИЭГ в дозе  $10^4$  КОЕ за 21 сут до заражения, КОЕ;

$LD_{50_{инт}}$  -  $LD_{50}$  для интактных животных, КОЕ.

---

<sup>49</sup> В качестве контроля во всех экспериментах по иммунизации животных использовали маточную культуру вакцинного штамма EV линии НИИЭГ (ГИСК им. Л.А. Тарасевича), используемую для приготовления коммерческой вакцины чумной живой сухой.

## 2.16. ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кусочки органов погибших животных (регионарные лимфатические узлы, селезенка, печень, легкое, почка, надпочечник) фиксировали в течение 24 ч в 10 %-ном формалине при комнатной температуре, дегидратировали с помощью этанола и заливали парафином. Парафиновые срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилин-эозином и азур-эозином. Препараты микроскопировали под иммерсией в проходящем свете.

## 2.17. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В СВОБОДНОМ ПОТОКЕ

ЭФСП проводили на приборе Elphor-Var5 (Germany), позволяющем разделять исследуемые образцы на 90 фракций, согласно инструкции. Концентрацию микробных клеток во фракциях определяли измерением оптической плотности образцов с помощью спектрофотометра СФ-26.

## 2.18. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА МИКРОБНЫХ КЛЕТОК

ЭКП микробных клеток определяли на приборе "Zetasizer-20" (Malvern, UK) методом лазерной доплеровской спектроскопии. Клетки суспендировали в фосфатно-цитратном буфере с ионной силой 0,02 [109] до концентрации  $5 \times 10^8$  м.к./мл.

Клетки вирулентного штамма *Y. pestis* 231 и его производных предварительно инактивировали обработкой 70 %-ным этанолом в течение четырех часов, а затем дважды отмывали в фосфатно-цитратном буфере с ионной силой 0,02.

## 2.19. ВЫЯВЛЕНИЕ КАПСУЛЫ

Наличие капсулы определяли с помощью световой или электронной микроскопии.

При световой микроскопии использовали фазово-контрастный метод выявления капсул по Гинсу-Бури [321].

Электронную микроскопию проводили на электронном микроскопе Hitachi HU-12A (75 кВ). Клетки с капсулами выявляли с помощью негативного контрастирования [393] в модификации Н.П. Коннова с соавт. [181]. Иммуноэлектронную микроскопию проводили с использованием стандартных методик [495] 1) с мышинными моноклональными антителами к F1 (З.Л. Девдариани, РосНИПЧИ "Микроб", Саратов), использованными в конечной концентрации 800 мкг/мл, и конъюгатом белка А с коллоидным золотом - "GAM-gold" (Bio-Rad, catalog No. 170-6526) в разведении 1:25; 2) с кроличьими поликлональными моноспецифичными антителами к рН6 антигену (АООТ "Институт инженерной иммунологии" РАО "Биопрепарат", Любучаны, Московская обл.), использованными в конечной концентрации 800 мкг/мл и конъюгированными с коллоидным золотом (конъюгат приготовлен Л.А. Дыкманом в ИФБРМ АН РФ, Саратов) в разведении 1:20; 3) с кроличьими поликлональными антителами к белкам S-слоя *Y. pestis* (О.А. Антонова, РосНИПЧИ "Микроб", Саратов), использованными в конечной концентрации 800 мкг/мл, и конъюгатом антикроличьих антител с коллоидным золотом (конъюгат приготовлен Л.А. Дыкманом в ИФБРМ АН РФ, Саратов) в разведении 1:20.

## 2.20. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА

Выделение и очистку капсульного антигена проводили методом изоэлектрической преципитации [326], для *cafIM* производных штамма EV линии НИИЭГ проводили предварительное отделение капсулы от клеточной поверхности 0,02 М фосфатным буфером

(рН 8,5). Суммарные секретируемые белки *Y. pestis* получали осаждением из культуральной жидкости 2,5 объемами этанола.

Присутствие в препаратах примесей ЛПС определяли по J. Janda & E. Work [468].

## 2.21. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ

Электрофоретическое разделение белков в системе ПААГ с 0,1 % SDS осуществляли по методу U.K. Laemmli [489]. Препараты белков для фореа готовили как описано L.G. Bennett & T.G. Tornabene [388]. В качестве маркеров молекулярных масс использовали А-белки фирмы Pharmacia – LMW Calibration kit, В, С – биотинилированные маркеры фирмы Sigma.

## 2.22. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОБЛОТИНГА

Иммуноблотинг проводили по методу H. Towbin *et al.* [578]. Для проявления биотинилированных маркеров использовали конъюгат стрептавидин-пероксидаза (Sigma).

Капсульный антиген выявляли с использованием кроличьих поликлональных моноспецифичных антител к F1 антигену (ГНЦ ПМ, Оболенск, Московская обл.; АООТ "Институт инженерной иммунологии", Любучаны, Московская обл.); рН6 антиген выявляли с помощью кроличьих поликлональных моноспецифичных антител к рН6 антигену (АООТ "Институт инженерной иммунологии"); белки S-слоя – с помощью кроличьей поликлональной моноспецифичной сыворотки к белкам S-слоя *Y. pestis* (приготовлена О.А. Антоновой, РосНИПЧИ "Микроб").

Глава 3. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ *fra* ОПЕРОНА

Первым и важнейшим этапом изучения молекулярно-генетических механизмов образования и функциональной значимости бактериальных органелл является структурный и функциональный анализ генов, обеспечивающих их биогенез<sup>50</sup>. После определения полной нуклеотидной последовательности генома *Y. pestis* на модели штамма CO-92 [479] может создаться впечатление, что все проблемы генетики возбудителя чумы уже решены. В последующем достаточно изучать "геном *in silico*",<sup>51</sup> используя базы данных (например - EMBL<sup>52</sup>) и компьютерный анализ известных последовательностей ДНК и их продуктов, нажимать, сидя за дисплеем, на клавиши и получать "распечатки" предполагаемой конформации, эпитопной структуры и других предусмотренных используемой программой характеристик "изучаемых" генов и белков [113, 509]. "Значительная часть кодирующих областей хромосомы бактерий, геном которых был изучен *in silico*, идентифицирована именно таким образом" [269]. Однако один и тот же белок может осуществлять много различных функций, большинство из которых нельзя предугадать компьютерными программами [558], а структурная гомология биомолекул не является строгим доказательством их функциональной гомологии. Для выяснения таких сложных процессов как биогенез бактериальных органелл необходимо наряду с определением структуры генов, кодирующих эти процессы, использовать два взаимодополняющих методических подхода: метод "потери функции"<sup>53</sup> - выключение гена в организме "дикого" типа и метод "приобретения функции"<sup>54</sup> - введение функционирующего гена, производящего некий продукт, в гетерологичный организм, для которого этот продукт не характерен. Полученные таким образом мутантные клетки должны быть всесторонне охарактеризованы с помощью максимального количества доступных методов, так как все воз-

---

<sup>50</sup> В контексте настоящего исследования термин "биогенез" используется для обозначения совокупности процессов образования бактериальных органелл, начиная с транскрипции, трансляции и заканчивая фолдингом белков и их сборкой на клеточной поверхности в надмолекулярные структуры.

<sup>51</sup> "Геном *in silico*" - геном, изучаемый с помощью силиконового, кремниевого кристалла (компьютера).

<sup>52</sup> The EMBL Nucleotide Sequence Database. E-mail: datalib@ebi.ac.uk.

можные эффекты, возникшие в результате потери или приобретения функции, не могут быть предсказаны заранее [298]. Указанные подходы и были использованы в настоящем исследовании.

Как уже было отмечено в обзоре литературы, О.А. Проценко с соавт. [271] показали, что гены, ответственные за синтез FI и образование капсулы, локализованы на плазмиде pFga. С учетом этих данных, *fra* оперон был впервые клонирован из *EcoRI* банка “больших” плазмид *Y. pestis* сотрудниками отдела генетики ВНИИ ПМ в 1982 году в составе космидного вектора pHC79 в клетках *E. coli* HB101 [163, 346]. После субклонирования, показавшего, что 8,6-тпн *EcoRI* фрагмент ДНК достаточен для полноценной экспрессии *fra* оперона в клетках *E. coli*, и детального рестрикционного картирования этого локуса последующие секвенирование и определение структурно-функциональной организации *fra* оперона, клонированного в составе этой плазмиды, проводились группами А.В. Карлышева [162, 163, 442, 443, 476-478] и П.А. Черепанова [350, 351] независимо и не дали однозначных результатов. В следующем разделе представлены результаты исследований, начальный этап которых был выполнен автором диссертации во время работы в составе группы А.В. Карлышева [162, 163], а затем исследования и оценка их результатов проводились автором самостоятельно.

### 3.1. КОНСТРУИРОВАНИЕ ПЛАЗМИД, ДЕФЕКТНЫХ ПО ОТДЕЛЬНЫМ ГЕНАМ *fra* ОПЕРОНА

Для структурно-функционального анализа клонированного *EcoRI* фрагмента ДНК, содержащего полный набор генов, необходимых для воспроизведения феномена капсулообразования в клетках *E. coli*, было решено использовать метод потери функции. Одним из традиционных подходов, используемых для его реализации и при изучении генома возбудителя чумы, является инсерционный мутагенез с помощью транспозонов [150, 152, 532] или фагов [447, 589]. Возникающие при этом трудности, связаны со способностью этих подвиж-

---

<sup>53</sup> Loss of function.

ных элементов к неконтролируемому экспериментатором встраиванию в различные сайты интеграции и возможному самопроизвольному перемещению [343]. Поэтому в наших экспериментах было решено использовать для инсерционного мутагенеза ген канамицинофототрансферазы ( $Km^R$  или *kan*) из плазмиды pUC4K.  $Km^R$  локус в этой плазмиде фланкирован с обеих сторон полилинкерами для рестриктаз: *EcoRI*, *BamHI* и *SalGI*. В ряде случаев использовали аналогичный  $Km^R$  ген-блок, несущий во фланкирующих полилинкерах дополнительный сайт узнавания для эндонуклеазы *HindIII*.<sup>55</sup> Серия конструкций, полученных путем встраивания маркера  $Km^R$  в различные сайты 8,6-тпн фрагмента плазмиды pFra, клонированного в составе репликона pFS1, и делеционных производных этой плазмиды представлена на рис. 4.<sup>56</sup>

Следует отметить, что наличие в составе рекомбинантных плазмид фрагмента ДНК, содержащего ген *kan*, фланкированный последовательностями гомологичными аллельному участку плазмиды pFra *Y. pestis*, делает эти плазмиды удобным инструментом для проведения локализованного мутагенеза в клетках чумного микроба “дикого” типа (см. главы 4 и 5).

---

<sup>54</sup> Gain of function.

<sup>55</sup> Любезно предоставлен Г.А. Каримовой (ГНЦ ПМ, Оболенск).

<sup>56</sup> Направление считывания гена *kan* указано только в тех случаях, когда специально определялось. Двойная линия – фрагмент плазмиды pFra; пунктирная – космидный вектор pHC79; тройная – ген-блок  $Km^R$  из плазмиды pUC4K.

Название плазмиды	Схема плазмиды	Наличие капсулы	Наличие капсульного антигена по данным		
			РНГА	РНАт	РДИД
pFS1		+	+	+	+
pFS2		+	+	+	+
pFHK1		+	+	+	+
pFHK2		+	+	+	+
pFXK1		+	-	+	+
pFBK7		+	-	+	+
pFBK10 <sup>57</sup>		+	-	+	+
pFHK3		-	-	-	-
pFSX		-	-	-	-
pFS23		-	-	-	-
pFS21		-	-	-	-
pΔC1		-	-	-	-
pFPK1		+	+	+	+
pFPK2		+	-	+	+
pFSK1		+	+	+	+
pFSK2		+	-	+	+
pHC79		-	-	-	-

Рисунок 4. Влияние различных дефектов *fra* оперона рекомбинантных плазмид на способность определять капсулообразование и иммунохимическую активность нелизирванных клеток реципиентных штаммов *E. coli*

<sup>57</sup> Плазмиды pFBK10, в отличие от конструкции pFBK7, обеспечивала образование капсулы и выявляемого в РДИД антигена не только при температуре 37 °С, но и при 28 °С.

### 3.2. ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ ИНСЕРЦИОННЫХ И ДЕЛЕЦИОННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПЛАЗМИДЫ pFS1 ОПРЕДЕЛЯТЬ СИНТЕЗ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА И ОБРАЗОВАНИЕ КАПСУЛЫ

Исследование способности производных плазмиды pFS1 определять синтез капсульного антигена и образование капсулы проводили с помощью РДИД, РНГА, РНАт и световой микроскопии по Гинсу-Бури.

Таблица 3. Характеристика использованных в работе плазмид по способности определять капсулообразование и иммунохимическую активность реципиентных клеток

#### *E. coli* HB101

Рекомбинантная плазида	Наличие капсулы		РДИД		Обратные титры в:				Серовар капсульного антигена
	28 °С	37 °С	28 °С	37 °С	РНГА		РНАт		
					28 °С	37 °С	28 °С	37 °С	
pFS1	–	+	–/– <sup>58</sup>	+/+	4/32	4096/4096	8/64	8192/8192	FI
pFS2	–	+	–/–	+/+	4/32	4096/8192	4/32	8192/8192	FI
pFHK1	–	+	–/–	+/+	2/16	4096/4096	8/32	8192/8192	FI
pFHK2	–	+	–/–	+/+	4/16	4096/4096	8/64	8192/8192	FI
pFXK1	–	+	–/–	+/+	–/32	–/512	–/32	2/512	FI-1
pFBK7	–	+	–/–	+/+	–/16	–/256	16/64	32/512	FI-1
pFBK10	+	+	+/+	+/+	–/512	–/512	–/512	2/512	FI-1
pFHK3	–	–	–/–	–/–	–/–	–/–	–/–	–/–	–
pFSX	–	–	–/–	–/–	–/–	–/–	–/–	–/–	–
pFS21	–	–	–/–	–/–	–/–	–/–	–/–	–/–	–
pFS23	–	–	–/–	–/–	–/–	–/–	–/–	–/–	–
pΔC1	–	–	–/–	–/–	–/–	–/–	–/–	–/–	–
pFPK1	–	+	–/–	+/+	4/32	4096/4096	8/64	8192/8192	FI
pFPK2	–	+	–/–	+/+	–/8	–/256	–/16	8/256	FI-1
pFSK1	–	+	–/–	+/+	4/16	4096/8192	8/64	8192/8192	FI
pFSK2	–	+	–/–	+/+	–/8	–/512	–/8	16/512	FI-1
pHC79	–	–	–/–	–/–	–	–	–	–	–

Обратные титры разведения исследованных препаратов соответствуют следующим концентрациям бактерий: 2 –  $5,0 \times 10^8$  КОЕ; 4 –  $2,5 \times 10^8$  КОЕ; 8 –  $1,25 \times 10^8$  КОЕ; 16 –  $6,2 \times 10^7$  КОЕ; 32 –  $3,1 \times 10^7$  КОЕ; 64 –  $1,6 \times 10^7$  КОЕ; 128 –  $7,8 \times 10^6$  КОЕ; 256 –  $3,9 \times 10^6$  КОЕ; 512 –  $1,9 \times 10^6$  КОЕ; 1024 –  $9,8 \times 10^5$  КОЕ; 2048 –  $4,9 \times 10^5$  КОЕ; 4096 –  $2,4 \times 10^5$  КОЕ; 8192 –  $1,22,4 \times 10^5$  КОЕ.

<sup>58</sup> В числителе приведены данные иммунохимических реакций с цельными, а в знаменателе – с лизированными клетками.

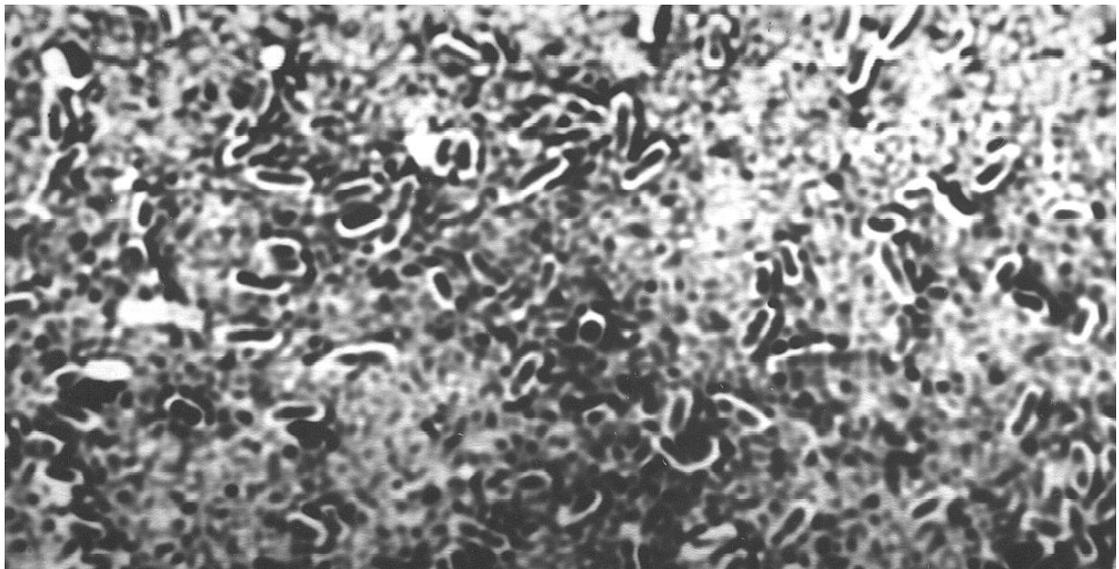
Как видно из рисунка 4 и таблицы 3 конструкции на основе pFS1, в которых фрагмент ДНК с геном, кодирующим канамицинфосфотрансферазу, из плазмиды pUC4K был встроены в уникальные сайты *Pst*I (pFПК1) и *Sal*GI (pFSK1), а также в первый и второй сайты *Hind*III (pFHK1 и pFHK2, соответственно), по данным РНГА, РНАт и РДИД, обеспечивали продукцию фракции I, а по данным световой микроскопии, обеспечивали несущим их реципиентным клеткам *E. coli* способность образовывать капсулу (рис. 5, 6). Аналогичная картина наблюдалась при делеции меньшего *Sal*GI фрагмента плазмиды pFS1 (pFS2).

Как выяснилось, на способность продуцировать иммунохимически тестируемую капсулу оказывает влияние направление вставки гена *kan*. Так, при совпадении направлений считывания гена *caf*IR и гена *kan* (pFSK1, pFПК1) отмечался синтез фракции I, тестируемый в РНГА, РНАт и РДИД (рис. 6), а при противоположных ориентациях направления действия их промоторов (pFSK2, pFПК2) в случае использования целых клеток продукцию FI выявить удавалось лишь в РДИД и РНАт, хотя в клеточных лизатах удавалось определить следовые количества капсульного антигена и с помощью РНГА. Клетки, продуцирующие такой атипичный капсульный антиген, были окружены отчетливо видимыми капсулами. Типичный капсульный антиген был обозначен как "FI", а обладающий измененной иммунохимической активностью – как "FI-1". Образование капсул FI-1 серовара отмечали и в клетках, несущих плазмиды со вставками ген-блока *kan* в уникальных сайтах рестрикции *Xho*I и *Vam*HI (рис. 7, 8). Интересно, что во всех конструкциях, за исключением плазмиды pFBK10, экспрессия генов *fra* оперона носила температурозависимый характер, свойственный экспрессии этого кластера генов в клетках возбудителя чумы. Плазмиды pFBK10 и pFBK7 обеспечивали в клетках *E. coli* синтез серологически атипичного капсульного антигена при температурах (28-37) °C и 37 °C соответственно. Различие в температурозависимости синтеза связано, вероятно, с направлением промотора гена *kan* [583] (рис. 1). При совпадении направления действия промотора гена *kan* с направлением собственного P<sub>ti</sub> промотора *fra* оперона капсуль-



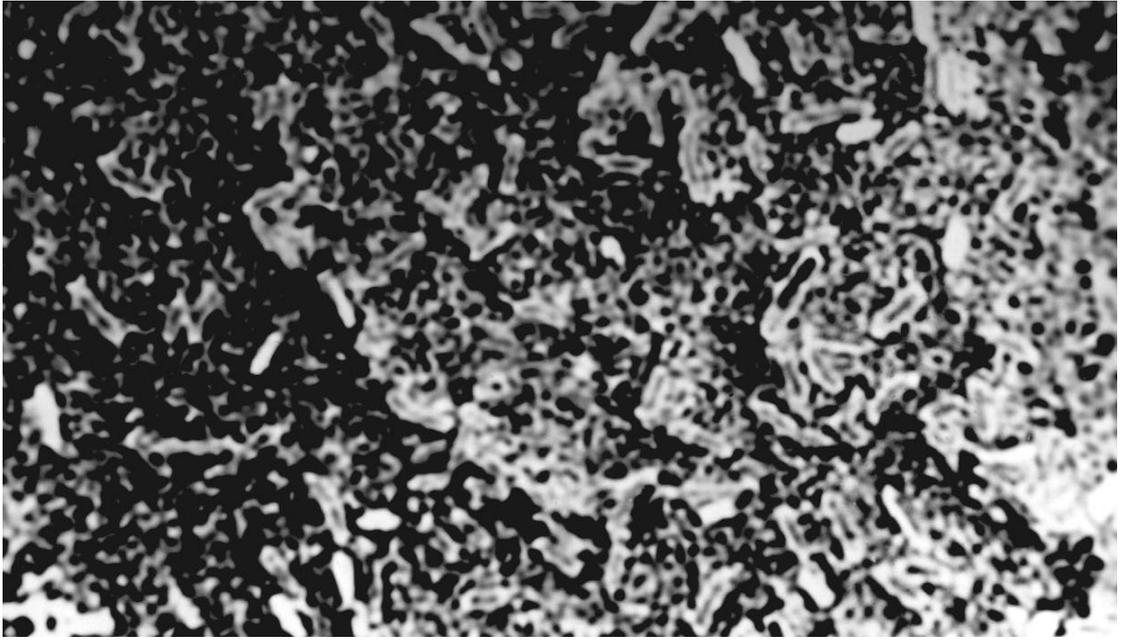
Световая микроскопия по Гинсу-Бури.  $\times 1350$ . Аналогичная картина видна при микроскопии реципиентных штаммов *E. coli* и их производных с плазмидами pFHK3, pFSX, pFS21, pFS23 и pDC1.

Рисунок 5. Фотография клеток штамма *E. coli* HB101pHC79.



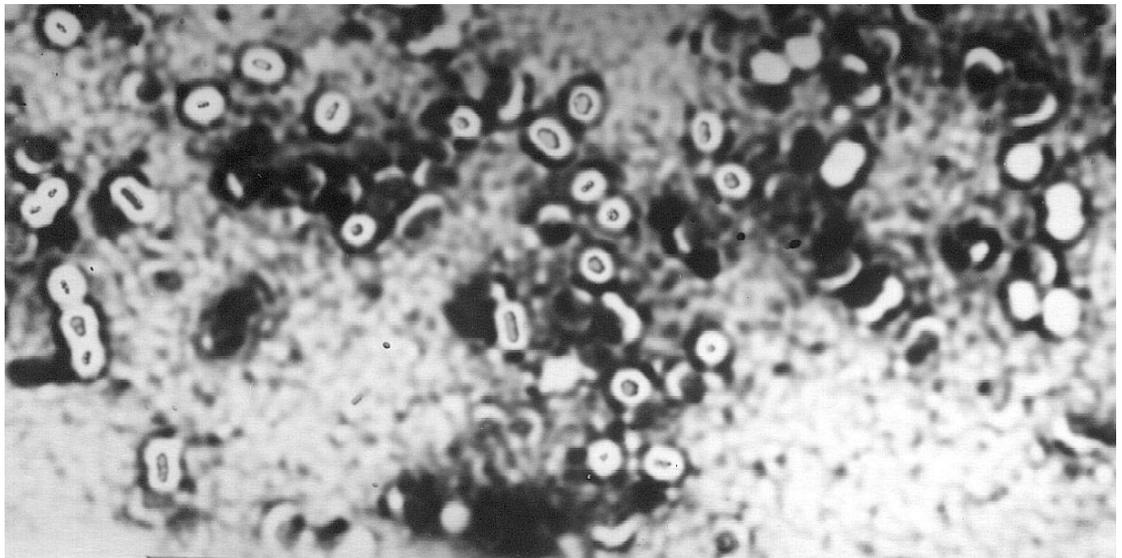
Световая микроскопия по Гинсу-Бури.  $\times 1350$ .

Рисунок 6. Фотография клеток штамма *E. coli* HB101pFSK1.



Световая микроскопия по Гинсу-Бури.  $\times 1350$ .

Рисунок 7. Фотография клеток штамма *E. coli* NB101pFXK1.



Световая микроскопия по Гинсу-Бури.  $\times 1350$ .

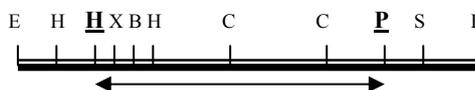
Рисунок 8. Фотография клеток штамма *E. coli* NB101pFBK7.

ный антиген синтезировался конститутивно, при обратном направлении промотора гена *kan* значительный синтез отмечался лишь при температуре 37 °С.

### 3.3. ОБСУЖДЕНИЕ

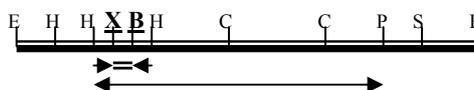
Эксперименты, представленные в настоящем разделе, в основном, были проведены еще до определения полной нуклеотидной последовательности *fra* оперона, но для их корректной интерпретации, по мере необходимости, будут использоваться данные сиквенса. Анализ результатов наших исследований позволил разделить все изученные конструкции на четыре группы:

- 1. Отрицательный контроль.** Вектор рНС79, передача которого в клетки *E. coli* не обеспечивала продукции капсульного антигена и не приводила к образованию капсулы (рис. 4, 5).
- Конструкции, обеспечивающие образование в клетках *E. coli* иммунохимически полноценной капсулы *Y. pestis*, т.е. несущие интактный *fra* оперон, ограниченный сайтами рестрикции *Hind*III и *Pst*I.



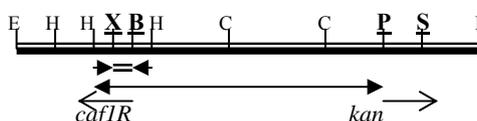
- Плазмиды, обеспечивающие образование в клетках *E. coli* капсулы, состоящей из материала по данным РДИД иммунохимически подобного FI антигену *Y. pestis*, но отличающегося по данным РНАт и, особенно, РНГА. Эти конструкции, в свою очередь, можно разделить на две группы:

- 3.1. Вставки ген-блока *kan* в сайты *Xho*I и *Bam*HI, затрагивающие структуру локуса рFга, минимально необходимого для полноценной экспрессии генов, обеспечивающих образование "классической" капсулы *Y. pestis* в клетках *E. coli*.



При этом может повреждаться непосредственно структурный ген капсульного антигена, что могло бы объяснить причину изменения иммунохимической специфичности капсулы, или регуляторные гены, определяющие его фолдинг и сборку в надмолекулярную структуру - капсулу.

3.2. Вставки ген-блока *kan* в сайты *Pst*I и *Sal*GI, незатрагивающие структуру локуса *rFra*, необходимого для полноценной экспрессии генов, обеспечивающих образование "классической" капсулы *Y. pestis* в клетках *E. coli*. Эти данные можно объяснить ингибированием трансляции за счет образования стабильных дуплексов мРНК, транскрибированных во встречных направлениях с одного фрагмента ДНК [579].



Учитывая, что плазмиды представляют собой замкнутые кольцевые молекулы ДНК, то в районе уникальных сайтов *Xho*I и *Bam*HI должен находиться промотор регуляторного гена, имеющий направление действия противоположное промотору гена *kan*. Как было показано позднее, здесь действительно расположен ген *cafIR*, регулирующий работу оперона *fra* [476, 477]. В случае если на фрагменте ДНК между промоторами *kan* и *cafIR* генов отсутствуют терминаторы транскрипции со стороны действия промотора гена *kan* и если район гомологии гибридизовавшихся цепей мРНК включает участок связывания с рибосомой мРНК, "читанной" с гена *cafIR*, то не происходит инициация трансляции и не образуется регуляторный белок CafIR. Это, в свою очередь, приводит к отсутствию инициации синтеза мРНК с "термоиндуцибельного" промотора  $P_{td}$ , расположенного перед геном *cafIM*, а считывание генов *cafIA* и *cafI* иницируется с термонеиндуцибельного промотора  $P_{ti}$  (см. рис. 1), что и приводит к образованию атипичной капсулы. О.А. Кириллиной [165] была выявлена зависимость продукции "классического" капсульного антигена от ориентации встраивания *fra* локуса по отношению к генам векторной плазмиды. Плазмида *rAF10-23* обеспечивала продукцию типичного антигена, а при обратной ориентации клонированной вставки в плазмиде *rAF10-2* обра-

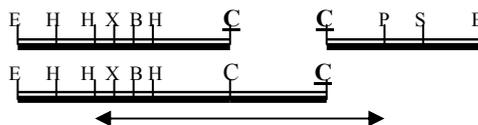
зование FI с помощью РНГА выявить не удалось. На наш взгляд, это наблюдение можно также объяснить ингибированием трансляции за счет образования стабильных дуплексов мРНК, транскрибированных во встречных направлениях с одного фрагмента ДНК.

4. Плазмиды, несущие фрагмент репликона rFga, но не обеспечивающие образование капсулы в клетках *E. coli*. Их, в свою очередь, можно разделить на три группы:

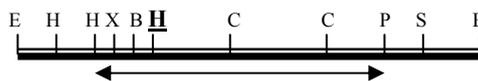
4.1. Плазмида rFSX, у которой отсутствует большая часть локуса rFga, минимально необходимого для полноценной экспрессии генов, обеспечивающих образование "классической" капсулы *Y. pestis* в клетках *E. coli*.



4.2. Плазмиды, у которых делетированы фрагменты, примыкающие ко второму *ClaI* сайту рестрикции



4.3. Плазмида rFHK3, несущая вставку ген-блока *kan* в третий *HindIII* сайт рестрикции.



Соответствие результатов наших исследований способности инсерционных и делеционных производных плазмиды rFS1 определять синтез капсульного антигена и образование капсулы *Y. pestis* в клетках *E. coli* данным А.В. Карлышева с соавт. [442, 443, 476-478], П.А. Черепанова с соавт. [350, 351], W.J. Simpson *et al.* [567], О.А. Кириллиной [165] и А.Ю. Гончарова с соавт. [91, 92] отражено на рисунке 9.

Различия в трактовке роли отдельных генов в биогенезе капсулы можно объяснить тремя причинами: 1) использованием вместо непосредственной визуализации производных серологических методов, направленных на тестирование В-клеточных эпитопов капсульного антигена и выбранных, на наш взгляд, без достаточной мотивации, для выявления морфологической структуры (капсулы); 2) изучением *fra* локусов, несущих

Ссылки на литературу	Названия плазмид	Физические карты фрагментов ДНК,	Наличие капсулы по данным световой микроскопии				Внутриклеточный синтез FI по данным РНАГ				
			РА	РДИД	РНГА	РНАГ	ИФА	РДИД	РНГА	РНАГ	
[350, 351, 476, 567], НИ	pFS1 (pKM1, pYPR1)		+	+	+	+	+	+	+	+	+
[476]	p12R		+	НД	+	НД	+	+	НД	+	НД
	pFS2-13		НД	НД	-	НД	НД	НД	НД	НД	+/- <sup>2</sup>
[165]	pAF10-23		НД	НД	+	НД	НД	НД	НД	НД	НД
	pAFB10-23		НД	НД	-	НД	НД	НД	НД	НД	НД
[350, 351]	pKM6		+	НД	+	НД	НД	НД	НД	НД	НД
	НД		НД	НД	-	НД	НД	НД	НД	НД	НД
[567]	pYPR5		НД	НД	НД	НД	НД	НД	НД	НД	НД
НИ	pFHK2		+	НД	+	НД	НД	НД	НД	НД	НД
	pFXK1		+	НД	-	НД	НД	НД	НД	НД	НД
	pFBK7		+	НД	-	НД	НД	НД	НД	НД	НД
	pFPK1		+	НД	+	НД	НД	НД	НД	НД	НД
[91,92]	pMB15 <sup>3</sup>		НД <sup>4</sup>	+	+/- <sup>4</sup>	НД	НД	НД	НД	НД	НД

Рисунок 9. Сводные данные изучения структурно-функциональной организации *fra* оперона *Y. pestis*, экспрессируемого в клетках реципиентных штаммов *E. coli*

<sup>1</sup> Генетическая карта представлена по данным А.В. Karlyshev *et al.* [476], т.к. они были подтверждены более поздними исследованиями [460, 496].

<sup>2</sup> "+/-" по данным реакции в исследуемом препарате присутствовали следовые количества капсульного антигена.

<sup>3</sup> В клетках *E. coli* синтез капсульного антигена отмечали только при температуре выращивания культур 37° клетки фракцию I не синтезировали и после первого пассажа погибали" [91, 92].

<sup>4</sup> "Основываясь на результатах РНГА и люммикроскопии, клетки *E. coli* DH5α/pMB15 не способны формировать из фракции I капсулу, характерную для клеток *Y. pestis* EV-76(370)" [91, 92].

щих неидентифицированные мутации; 3) различной интерпретацией полученных с помощью РНГА данных о внутри- и внеклеточном содержании капсульного антигена в *cafIM* штаммах. Остановимся на этих предположениях более подробно.

- 1) В последнее время световая микроскопия с использованием негативного контрастирования все чаще используется для характеристики гетерологичных продуцентов FI [15, 351, 368, 577], несущих даже полный кластер *fra* генов. Однако А.В. Карлышев с соавт. [476] применили указанный метод только для первичного изучения космидного  $\text{Fra}^+$  клона, использованного для дальнейшего субклонирования. На основании лишь данных РНГА и РА они сделали заключение, что в *cafIR*<sup>59</sup> и *cafIM* клетках *E. coli* капсула не образуется. О.А. Кириллина [165] не смогла с помощью РНГА выявить продукцию капсульного антигена в клетках кишечной палочки, дефектных по гену *cafIM*.<sup>60</sup> А.Ю. Гончаров [91], основываясь на результатах РНГА и люминесцентной микроскопии, утверждает, что *cafIR* и *cafIM* клетки *E. coli* "не способны формировать из фракции 1 капсулу, **характерную**<sup>61</sup> для клеток *Y. pestis*". Но П.А. Черепанов с соавт. [350] установили, что в *cafIM* клетках *E. coli* происходит образование капсульного антигена, сохранившего способность реагировать в РДИД и РНАт, но индифферентного именно в РНГА.<sup>62</sup> Данные П.А. Черепанова об избирательном изменении серологической специфичности капсульного антигена из *cafIM* штаммов *E. coli* были подтверждены нами в настоящем исследовании и А.Ю. Гончаровым с соавт. [91, 92]. Однако, в отличие от экспериментов П.А. Черепанова, в наших опытах

<sup>59</sup> Следует отметить, что по данным А.В. Карлышева с соавт. [476] только утрата всего гена *cafIR* приводила к практически полному снижению продукции FI. При сохранении 81 N-концевых аминокислотных остатков отмечали эффективный синтез антигена и образование капсулы. Y. Du *et al.* [423] показали, что функциональная активность CafIR сохраняется и при дальнейшем укорочении N-концевой последовательности до 76 аминокислотных остатков. Оказалось, что этот участок CafIR обладает значительной аминокислотной гомологией с ДНК-связывающими доменами регуляторов транскрипции семейства XylS/AraC [440].

<sup>60</sup> Следует отметить, что для первичного изучения  $\text{Fra}^+$  клонов, полученных на основе фагового вектора и использованных для дальнейшего субклонирования О.А. Кириллина [165] наряду с РНГА использовала РДИД. В дальнейшей работе для детекции FI она применяла только РНГА.

<sup>61</sup> Выделено нами.

<sup>62</sup> РА, как и РНГА, не отличаются от РДИД по своему механизму, но в силу несоизмеримо больших размеров корпускулярного антигена – бактериальной клетки (РА) или "корпускулярного антитела" – эритроцита с фиксированными на его поверхности антителами (РНГА) по сравнению с вступающей в реакцию комплементарной молекулой поперечная сшивка, например, двух соседних эритроцитов может оказаться недостаточной для их фиксации и образования "решетки", обеспечивающей связывание клеток по многим точкам [196].

атипичная капсула, не выявляемая в РНГА, образовывалась и в клетках с *cafIR* геном, поврежденным в *XhoI* сайте рестрикции, что согласуется с данными агглютинационных тестов, представленных в работе А.В. Карлышева.

Таким образом, эффективный синтез капсульного антигена чумного микроба не зависит от экспрессии гена *cafIM*. Однако при нарушении структуры гена *cafIM* происходит образование капсулы отличающейся по своим серологическим свойствам от типичной, что подтверждает предположение об участии гена *cafIM* в посттрансляционной сборке субъединиц капсульного антигена [442]. Нарушение структуры гена *cafIR* во втором *HindIII* сайте, не затрагивающее нуклеотидную последовательность, кодирующую N-концевую последовательность из 81 аминокислотного остатка, не влияет на эффективный синтез капсульного антигена и образование капсулы. Дальнейшее укорочение (вставка ген-блока  $Km^R$  в *XhoI* сайт) области, кодирующей N-конец CafIR, до "емкости" в 18 аминокислотных остатков приводит к образованию атипичной капсулы, что косвенно подтверждает предположение А.В. Карлышева с соавт. [476] о положительной регуляции экспрессии гена *cafIM* продуктом гена *cafIR* за счет его присоединения к инвертированным повторам, расположенным непосредственно перед началом гена *cafIM*. Следует отметить, что, по данным гомологии аминокислотных остатков регуляторов транскрипции семейства XylS/AraC, ДНК-связывающий домен белка CafIR включает в себя участок от 24 до 44 аминокислотных остатков [440, 476]. Перемещение же субъединиц капсульного антигена на поверхность микробной клетки может происходить и в клетках с дефектными генами *cafIR* или *cafIM*. Возможные механизмы транслокации структурных субъединиц на поверхность бактериальной клетки с дефектными генами *cafIR* или *cafIM* будут обсуждены ниже.

- 2) Материалы, представленные в работе А.Ю. Гончарова [91], во многом согласуются с результатами исследований П.А. Черепанова [350] и нашими данными, но в экспериментах А.Ю. Гончарова [91] синтез FI отмечался лишь при температуре 28 °С. При темпера-

туре 37 °С капсульный антиген не синтезировался, клетки *E. coli*, несущие рекомбинантную плазмиду pMB15, после первого пассажа на селективной среде погибали, а в неселективных условиях утрачивали плазмиду. Необходимо учитывать, что эта работа проводилась с производными плазмиды pMB60/3, образовавшейся в результате спонтанной перестройки исходной структурно нестабильной плазмиды pMB60.<sup>63</sup> Было установлено, что клонированный фрагмент уменьшился примерно на 6 тпн, но конкретные структурные изменения, отличающие исходную конструкцию от репликона pMB60/30, не были идентифицированы. В то же время известно, что внутригеномные перестройки могут приводить к образованию новых генетических структур, которые, в свою очередь, способны изменять экспрессию расположенных рядом генов [88, 486]. Поэтому высока вероятность, что целый ряд особенностей экспрессии *fra* оперона в составе делеционных производных плазмиды pMB60/3 носит чисто "лабораторный" характер и не имеет никакого отношения к экспрессии *fra* оперона в клетках возбудителя чумы. В пользу этого свидетельствует Fra<sup>-</sup> фенотип клеток штамма *Y. pestis* PKR133pMB60/3. Не исключают наличия "случайной мутации в клоне, отобранном для секвенирования" и П.А. Черепанов с соавт. [350], чьи данные по определению первичной нуклеотидной последовательности не во всем согласуются с аналогичными материалами А.В. Карлышева с соавт. [476] (рис. 1), подтвержденными позднее на ряде штаммов *Y. pestis* [460, 479, 496].

- 3) Самым простым и традиционным объяснением значительного преобладания титров "внутриклеточного" капсульного антигена над титрами антигена, выявляемого во взвесах цельных бактерий с помощью РНГА, является предположение о нарушении его секреции в мутантных клетках *Y. pestis* [271, 534] или *caf1M* бактериях *E. coli* [91, 476]. Однако результаты настоящего раздела исследований и данные А.Ю. Гончарова [91] свидетельствуют о том, что, по крайней мере, в *caf1M* клетках *E. coli* секреция капсульного антигена тестируется в РДИД. Расхождение в данных РНГА и РДИД можно было бы объяснить

---

<sup>63</sup> Плазмида pMB60 была получена путем клонирования 18,5-т.п.н. *PstI* фрагмента репликона pFra из моноплаз-

секрецией субъединиц CafI, неспособных к агрегации, т.к. в РДИД выявляется не только агрегированная форма FI, но и полностью диссоциированные субъединицы капсульного антигена [388]. В РНГА же "гаптен чумного микроба" в отличие от нативного капсульного антигена не определяется [148]. Однако наличие в *cafIM* клетках *E. coli* видимой под световым микроскопом капсулы свидетельствует, на наш взгляд, о том, что образующий эту капсулу антиген находится в агрегированной форме. Более того, известно, что субъединицы капсульного антигена имеют тенденцию к самопроизвольному образованию агрегатов с большим молекулярным весом [299, 388]. В то же время известно, что по мере увеличения в антигене эпитопной плотности (количества идентичных антигенных детерминант на одну молекулу или молекулярный агрегат) возрастает поливалентность прикрепления этого антигена к антителам, т.е. образуется связь полимера с повторяющимися антигенными структурами сразу с несколькими антителами, фиксированными на поверхности соседних эритроцитов. Чем больше образуется поперечных "сшивков" антиген-антитело между эритроцитами, тем надежнее они фиксированы и тем устойчивей "решетка" агрегата, выявляемого в РНГА [196, 319]. На наш взгляд, эти соображения в совокупности с результатами оценки серологической активности типичной и атипичной капсул свидетельствуют о том, что в агрегатах субъединиц капсульного антигена, образующих капсулу *cafIM* штаммов *E. coli*, плотность эпитопов, комплементарных антителам коммерческого диагностикума эритроцитарного чумного моноклонального антикапсульного иммуноглобулинового, недостаточна для образования устойчивых агглютинатов. То, что эпитопная плотность поверхностных агрегатов атипичных молекул значительно ниже, чем у типичной капсулы и даже у агрегатов внутриклеточных субъединиц, вступающих в РНГА после лизиса *cafIM* клеток *E. coli*, в свою очередь, может указывать на то, что изменения, приводящие к снижению плотности типичных антигенных детерминант, происходят во время переноса структурных субъединиц на клеточную поверхность через цитоплазматическую и внеш-

нюю мембраны и лежащую между ними периплазму в отсутствии периплазматического шаперона Caf1M. Как известно, периплазматические шапероны отвечают за перенос нестабильных конформеров структурных субъединиц пилевых и непилевых адгезинов на поверхность бактерии и их переход в нативную конформацию [510]. В случае транслокации структурных субъединиц без участия шаперона Caf1M, по-видимому, агрегат субъединиц капсульного антигена образуется в основном из различных конформеров, обладающих конформационными эпитопами, отличающимися от иммунодоминантного конформационного эпитопа нативной формы капсульного антигена. Низкая концентрация нативных субъединиц в составе агрегата, образующего капсулу, оказывается достаточной для РНАт, но не может обеспечить эффективного образования агглютината в РНГА. Наличие же секвенциальных эпитопов, независимых от конформации, обеспечивает возможность реагирования атипичного антигена с поликлональными антикапсульными антителами в РДИД.

Еще одним доказательством секреции капсульного антигена в *caf1M* клетках кишечной палочки и его серологической атипичности являются данные А.Ю. Гончарова [91], который пишет, что "при анализе результатов электрофореза обращает на себя внимание то, что процентное содержание фракции 1 в клетках *E. coli* DH5 $\alpha$ рMB15, вычисленное на основании денситограмм, составляет около 2,4 %, а в бульоне 11 %". Далее он отмечает, что эти данные подтверждаются РДИД, но не совпадают с результатами, полученными с помощью РНГА.

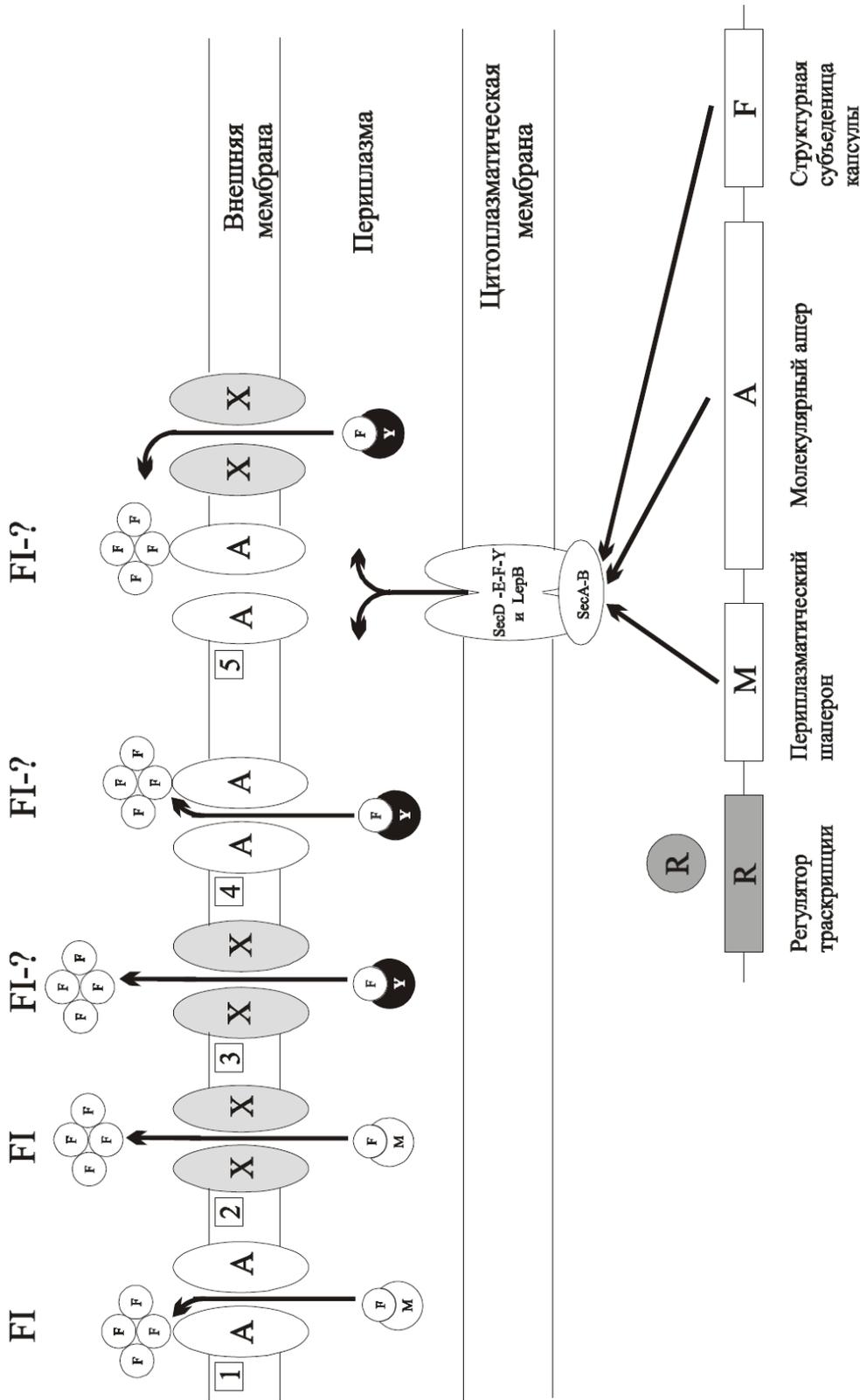
Как было отмечено в разделе 1.3, *fra* оперон филогенетически родственен аналогичным структурам, детерминирующим биогенез пилевых и непилевых адгезинов бактерий. Принято считать, что формирование полноценных органелл происходит только при обязательном образовании в бактериальной клетке пары - периплазматический шаперон/молекулярный ашер, а отсутствие в клетках периплазматического шаперона приводит,

по мнению большинства исследователей, к прекращению переноса структурных субъединиц на клеточную поверхность [389, 442; 463, 476, 485]. Представленные в настоящей главе данные об образовании капсулы даже при нарушении структуры гена *cafIM* (pFBK7 и pFBK10) или при предполагаемом нарушении экспрессии этого гена (pFXK1, pFPK2 и pFSK2), казалось бы, позволяют усомниться в необходимости периплазматических шаперонов как обязательного компонента подобных секреторных систем. Однако, не отрицая, что шаперон/ашерный путь секреции субъединиц является основным, мы можем предположить существование как минимум трех альтернативных вариантов переноса структурных субъединиц капсульного антигена на поверхность бактериальной клетки.<sup>64</sup>

**1. Секреция с использованием гетерологичного шаперона или гетерологичной пары - шаперон/ашер**, строго говоря, является лишь вариантом "классического" пути секреции [485]. Схема, иллюстрирующая "классический" биогенез капсулы *Y. pestis* и возможные механизмы образования атипичной капсулы без участия периплазматического шаперона представлена на рисунке 10. Как уже было отмечено в обзоре литературы, *fra* оперон кодирует четыре белка. Один из них – Caf1R регулирует температурозависимую экспрессию генов *cafIM*, *caf1A*, *caf1* и не выходит за пределы цитоплазмы. Три другие синтезируются в виде белков предшественников с N-концевыми сигнальными пептидами [476], что обеспечивает их транслокацию в периплазму с помощью "нормального экспортного" Sec пути грамотрицательных бактерий [535]. На рисунке 10 представлено пять возможных сценариев дальнейшего развития событий.

**1** – завершение биогенеза капсулы по классическому пути: комплекс структурная субъединица-шаперон Caf1M распознается гомологичным ашером Caf1A, что обеспечивает

<sup>64</sup> Можно предположить, что ашер Caf1A способен связывать не только гомологичную субъединицу Caf1 или интерлейкин  $1\beta$  [608], но и другие биомолекулы, синтезируемые реципиентным штаммом или присутствующие в питательной среде, и таким образом формировать капсулу. Тот факт, что атипичная капсула образована именно из структурных субъединиц Caf1, подтверждается не только ее способностью реагировать в РДИД и РНАт с антителами к FI, но и отсутствием капсулы в клетках, несущих плазмиду pDC1. В конструкции pDC1 удалена C-концевая часть гена *caf1*, но присутствуют интактные гены *caf1R*, *caf1M* и *caf1A*.



Соединенные линией прямоугольники изображают гены *fra* оперона: **R** – *caf1R*, **M** – *caf1M*, **A** – *caf1A* и **F** – *caf1F*. **SecA-B**, **SecD-E-F-Y** и **LepB** – комплекс белков, обеспечивающий "нормальный экспорт" в периплазму белков, обладающих сигнальными пептидами. **F** в белом круге – субъединица капсульного антигена без сигнального пептида; **M** в белом полумесяце – шаперон Caf1M; **Y** в черном полумесяце – гипотетический неидентифицированный шаперон; **A** в двух белых овалах – секреторный канал, образованный шаперонным шапероном; **X** в двух серых овалах – секреторный канал, образованный гипотетическим неидентифицированным шапероном; **F1** – "классическая капсула; **F1-?** – атипичная капсула. Схема составлена с учетом данных А.Р. Pugsley [535], А.В. Karlyshev *et al.* [476] и S.J. Hultgren, С.Н. Jones [462, 463].  
**Рисунок 10. Упрощенная схема, представляющая "классический" биогенез капсулы *Y. pestis* и возможные механизмы образования атипичной капсулы без участия периплазматического шаперона**

транслокацию и "заякоривание" структурной субъединицы на клеточной поверхности и образование типичной капсулы.

[2] – А.В. Карлышев с соавт. [478] показали, что в клетках *E. coli*, несущих *fra* оперон с нарушенной экспрессией гена *caf1A*, капсула не образуется, но капсульный антиген секретруется в среду культивирования. Позднее было показано, что именно ашер Caf1A обладает высоким сродством к субъединице капсульного антигена и обеспечивает прикрепление вещества капсулы к клеточной поверхности [608]. Возможно, что секреция обеспечивается гетерологичным неидентифицированным ашером "X", неспособным обеспечить прикрепление капсульного антигена к клеточной поверхности. Наше предположение основывается на том, что в геноме одной бактерии могут одновременно присутствовать два вида кластеров генов этого типа. У *Y. pestis* это *fra* и *psa* опероны [463].<sup>65</sup>

[3] – в случае секреции капсульного антигена за счет гетерологичной пары – шаперон "Y"/ашер "X" капсула образовываться не должна, а в среде культивирования должен присутствовать атипичный капсульный антиген. Следует отметить, что в наших опытах ничего подобного не было отмечено, как, впрочем, и в доступных нам публикациях.

[4] – первый возможный вариант образования атипичной капсулы за счет работы пары - шаперон "Y"/ашер Caf1A.

[5] – образование атипичной капсулы за счет работы пары - шаперон "Y"/ашер "X".

**2. Секреция с помощью мембранных пузырьков.** Почти 20 лет назад J.M. Ingram *et al.* [464] предположили, что секреция ЛПС и щелочной фосфатазы носит сопряженный характер. Позднее эта гипотеза была подтверждена J.L. Kadurugamuwa, T.J. Beveridge [474], открывших новый тип секреции белков. По их данным, во время "нормального" роста грамотрицательных бактерий образуются мембранные пузырьки (membrane yesicles - MVs), содержащие ЛПС, "зрелые" периплазматические белки и их "незрелые" цитоплазматические формы. Схема, иллюстрирующая возможные механизмы секреции капсульного антигена без

участия периплазматического шаперона представлена на рисунке 11. 1 – если субъединицы капсульного антигена находятся в периплазме, то (2) при образовании выпячивания внешней мембраны они попадают в образовавшуюся полость, а затем при образовании мембранного пузырька оказываются за пределами бактериальной клетки. В случае лизиса пузырька субъединицы капсульного антигена могут присоединяться к ашеру Caf1A и образовывать капсулу. Однако С.Н. Jones *et al.* [471] на модели *pap* оперона *E. coli* показали, что Sec путь грамотрицательных бактерий обеспечивает лишь транслокацию субъединиц адгезинов через цитоплазматическую мембрану, но в отсутствие периплазматического шаперона они остаются на периплазматической поверхности мембраны, но не переходят в периплазматическое пространство (3). Если это наблюдение справедливо и для *fra* оперона, то возможно образование пузырька с более сложной архитектурой (4). Лизис этого пузырька также приведет к освобождению структурных субъединиц для последующего контакта с ашером и образования капсулы.

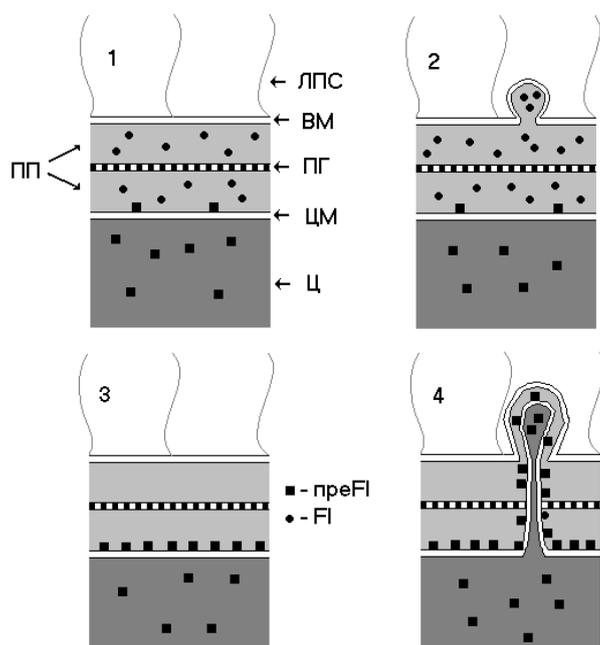
**3. Частичный лизис бактериальных клеток** может обеспечить оставшиеся бактерии материалом для формирования капсулы.

Хотя молекулярные механизмы образования атипичной капсулы, кодируемой *fra* опероном с дефектами генов *caf1R* или *caf1M*, могут быть установлены лишь после проведения специальных экспериментов, не являющихся предметом настоящего исследования, нам кажется, что сам факт возможности образования подобных капсул свидетельствует о необходимости всестороннего изучения этого явления на модели *Y. pestis*. Возможные причины сероварии будут подробно рассмотрены в 5-ой главе.

Результаты, полученные в настоящем разделе работы, легли в основу разработки оригинального способа конструирования Fga<sup>-</sup> вариантов возбудителя чумы (разделы 2.10-2.12) и явились основанием для изучения биологической значимости атипичных капсул на модели

---

<sup>65</sup> Нельзя также исключать возможность поступления капсульного антигена в среду культивирования за счет частичного лизиса бактериальных клеток.



ЛПС липополисахарид; ВМ – внешняя мембрана; ПП – периплазма; ПГ – пептидогликан; ЦМ – цитоплазматическая мембрана; Ц – цитоплазма; преF1 – "незрелый" белок Caf1; F1 – субъединица капсульного антигена Caf1 без сигнального пептида. Схема составлена с учетом данных J.L. Kadurugamuwa, T.J. Beveridge [474], C.H. Jones *et al.* [471].

Рисунок 11. Схема, представляющая возможные механизмы секреции F1 без участия периплазматического шаперона

*Y. pestis* (глава 5). Кроме того, они учитывались при конструировании продуцентов F1 (глава 6) и экспериментальных вакцинных штаммов (глава 7).

#### Глава 4. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УТРАТЫ СПОСОБНОСТИ К СИНТЕЗУ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА НА ВИРУЛЕНТНОСТЬ *Y. pestis*

После выявления "детерминант вирулентности" *Y. pestis* на модели изогенных вариантов вирулентного штамма MP6 [398-400] было рекомендовано их изучение у всех свежевыделенных штаммов с целью исследования изменчивости возбудителя чумы в естественных условиях и определения эпизоотологического значения этого феномена [169, 249, 380]. Значительный объем исследований показал, что в отличие от многих других бактерий чумной микроб весьма однороден как вид, и свойства штаммов, циркулирующих на территории определенных природных очагов, высококонсервативны [120, 397, 418]. Тем не менее, неоднократно описывались случаи выделения атипичных штаммов, т.е. отличающихся по некоторым признакам от преобладающего в определенном очаге экотипа *Y. pestis* [120, 169, 179, 191, 249, 596 и др.].

В плане настоящего исследования наиболее интересными представляются случаи выделения от различных видов животных и людей штаммов *Y. pestis*, дефектных по продукции капсульного антигена [2, 4, 155, 169, 171, 191, 249, 276, 281, 290-292, 329, 386, 465, 528, 590, 593-596, 602 и др.]. В таблице 4 представлены сводные данные о выделении подобных штаммов в различных природных очагах чумы СНГ.

Образование  $Fra^-$  вариантов может происходить при элиминации плазмиды  $pFra$  из клеток чумного микроба [251, 422, 590], ее обратимой интеграции в различные участки хромосомы *Y. pestis* [174, 437, 527, 534 590], в результате повреждения *fra* оперона резидентными для возбудителя чумы IS-элементами: IS100 и IS285 [50] или бактериофагами [258].

Таблица 4. Природные очаги чумы СНГ, в которых были выделены Fga<sup>-</sup> штаммы*Y. pestis*<sup>66</sup>

Название региона	Источники выделения	Эпидемическая значимость очагов
Кавказский	норовые блохи <i>Ceratophyllus tesquorum</i> , блохи обыкновенной полевки	низкая
Очаги Северного Прикаспия	малый суслик, большой суслик, блохи	высокая
Среднеазиатский пустынный	большая песчанка, полуденная песчанка, блохи, степной хорь	средняя
Среднеазиатские горные и сибирские	нет данных о выделении	средняя

Интересно, что во всех исследованиях, кроме работ с экспериментальным штаммом 358/12 [6] и "природным" изолятом И-2422<sup>67</sup> [198], бескапсульные варианты, в отличие от полноценных штаммов, обладали избирательной вирулентностью. В большинстве публикаций отмечалось резкое снижение их вирулентности в отношении морских свинок, но не белых мышей [198, 201, 206, 230, 257, 266, 291, 292, 329, 398-400, 421, 574, 589, 590, 602 и др.], в отношении крыс, но не мышей [206, 594] в отношении морских свинок, но не белых мышей и серых сурков [63], или в отношении морских свинок, но не белых мышей, тушканчиков, больших и полуденных песчанок [205]. В Или-Каратальском междуречье выделены Fga<sup>-</sup> штаммы, авирулентные для белых мышей и морских свинок, слабо вирулентные для полуденных, краснохвостых и гребенщикковых, но высоко вирулентные для больших песчанок [8, 191, 250].<sup>68</sup> В последнее время таким атипичным вариантам приписывают способность вы-

<sup>66</sup> Составлена на основании подлинников паспортов штаммов из РКПБ "Микроб" и доступных нам литературных источников. Эпидемическая значимость очагов указана по данным А.М. Кокушкина [174].

<sup>67</sup> Как уже было отмечено в обзоре литературы, по данным паспорта штамм при выделении был охарактеризован как Fga<sup>+</sup>, но утратил этот признак в процессе лабораторного хранения на питательных средах.

<sup>68</sup> У штаммов, выделенных в Южном Прибалхашье в 1963-1964 гг. и охарактеризованных Т.П. Кудиновой "как бесфракционные авирулентные для белых мышей, крыс и морских свинок, но вирулентные для больших песчанок", в 1964-1965 гг. Н.К. Куница [197] проверил вирулентность для белых мышей и морских свинок. Указанные штаммы "были высоковирулентными и вызывали гибель животных от доз 10 м. т. и выше в сроки от 60-90 суток с выделением бактериальной формы чумы", сохраняя Fga<sup>-</sup> фенотип. В процессе 30-летнего хранения эти

зывать хронические формы инфекционного процесса [278, 593], что может играть определенную роль в поддержании эпизоотий, а, возможно, и в сохранении возбудителя чумы в межэпизоотический период [276, 409].

Целью настоящего раздела исследований явилась разработка эффективного и воспроизводимого способа направленного конструирования высоковирулентных  $Fra^-$  штаммов *Y. pestis* и оценка их биологических характеристик.

#### 4.1. КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ *Y. pestis*, ДЕФЕКТНЫХ ПО ГЕНАМ *cafI*, *cafIM* И *cafIA* ОПЕРОНА *fra*

Известно несколько способов селекции  $Fra^-$  вариантов *Y. pestis* [86, 150, 151, 193, 278, 335, 398-400, 437, 580, 595], при которых утрата способности образовывать капсулу, как правило, сопровождается снижением вирулентности для лабораторных животных [6, 86, 397, 437]. Описано получение лишь трех клонов штамма 358 (358/12, 358/13 и 358/14), сохранивших исходную вирулентность [6]. Указанные методы, основанные на отборе спонтанных или индуцированных мутантов, характеризуются низкой продуктивностью [6, 86, 335, 398-400] либо способствуют возникновению множества непредвиденных и нежелательных мутаций. Так выращивание культур на кальцийдефицитных средах при температуре 37 °C вызывает не только повреждения плазмиды  $pFra$  [151, 193], но также инсерции и делеции плазмиды  $pCad$ , а также мутации в хромосоме *Y. pestis* [533]. Отсутствие направленного мутагенного эффекта присуще и методам, в которых используются обработка клеток чумного микроба бромистым этидием, акридином оранжевым, новобиоцином, введение в клетки плазмид, несовместимых с  $pFra$  [437], или транспозонный мутагенез [150]. ПЦР и ДНК гибридизация показывают, что полученные таким образом  $pFra^-$  "мутанты", как правило, сохраняют гены, ответственные за капсулообразование. Более того, в ряде случаев при проведении пассажей этих культур через

---

штаммы перешли в L-формы ( $Fra^-$ ), вызывающие развитие персестирующей инфекции, приводящей к гибели белых мышей в сроки от 8 до 291 сут.

организм лабораторных животных восстанавливается вирулентность, Fga<sup>+</sup> фенотип, а плазида pFga переходит в автономное состояние [437].

Этих недостатков лишен разработанный нами способ, в основе которого лежит использование локализованного мутагенеза, обеспечивающего необратимую целенаправленную замену генов *fra* оперона на ген *kan* [162].

На первом этапе работы был осуществлен мутагенез плазмиды pFga в моноплазмидном штамме EV100 с помощью интегративных векторов pFS23 и pFSX. Поскольку плазмиды отличались друг от друга по своей конструкции (рис. 2, 3), мы предполагали, что они будут по-разному встраиваться в репликон pFga, и это даст нам возможность получить клоны-интеграта с различной структурой и сравнить их свойства.

В обеих плаزمидках ген *kan* окружен по краям участками ДНК pFga, поэтому интеграция этого гена в плазмиду pFga может осуществляться двумя путями: по схеме Кэмпбелла (A.M. Campbell) [332], либо за счет двух актов гомологичной рекомбинации между векторной и “целевой” плазмидками [343]. В первом случае встраивается вся векторная плазида целиком с образованием прямых повторов по флангам (рис. 12), во втором случае встраивается только ген *kan* и повторы не образуются (рис. 13). Следует отметить, что при встраивании интегративных векторов по схеме Кэмпбелла имеют место амплификация и перестройки интегрированной ДНК [244]. Таким образом, нас могли бы удовлетворить лишь рекомбинанты, образовавшиеся по второму пути.

Действительно, анализ клонов, полученных в результате трансформации клеток *Y. pestis* EV100 плазмидой pFSX, показал, что все они обладали фенотипом Km<sup>R</sup>Tc<sup>R</sup>, т.е. встраивание вектора происходило по схеме Кэмпбелла. Подавляющее большинство из них сохранило выраженную в различной степени способность продуцировать FI. Это свидетельствует о диплоидности рекомбинантных клеток по “дикой” и дефектной аллелям *fra* оперона.

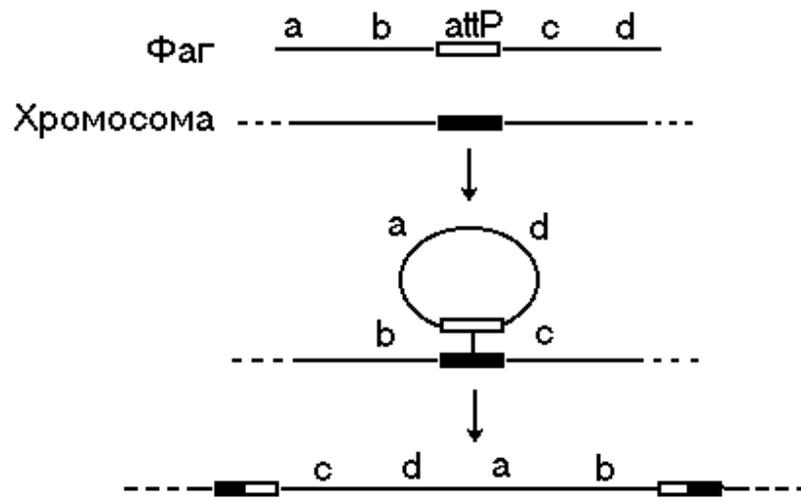
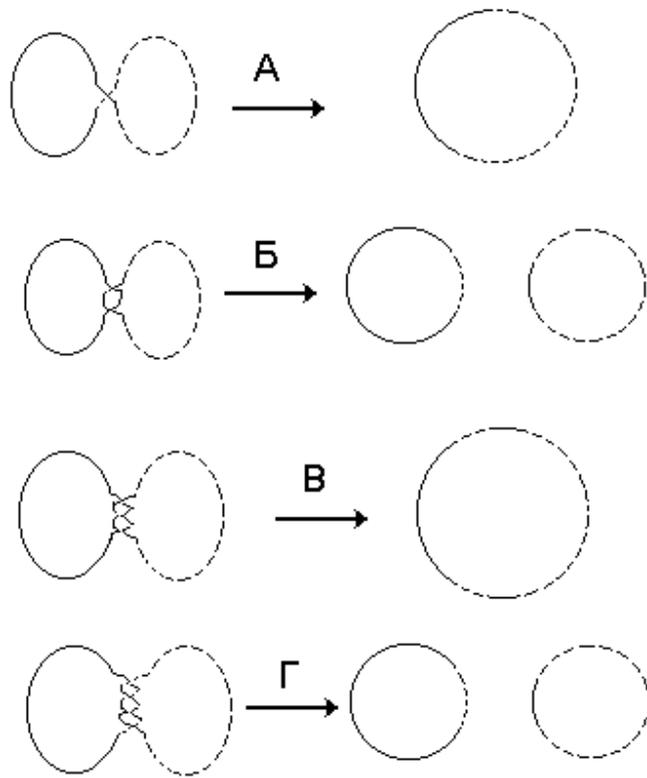


Рисунок 12. Схема интеграции геномов Кэмпбелла [332].



Нечетное число кроссинговеров в области спаривания приводит к интеграции (А и В). Четное число кроссинговеров приводит к обмену участками репликонов (Б и Г). Вариант А соответствует схеме Кэмпбелла.

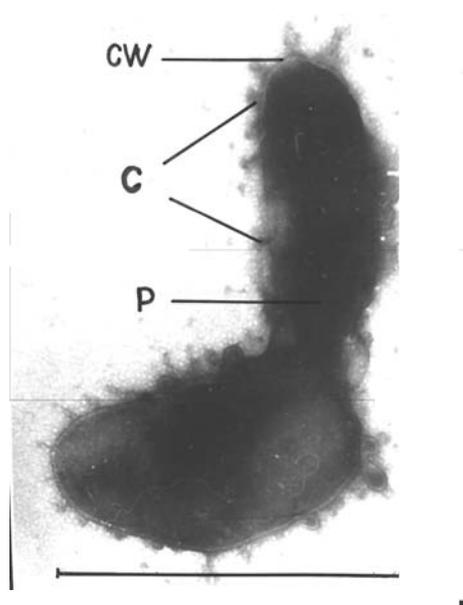
**Рисунок 13. Схемы рекомбинации при различном числе кроссинговеров.**

В то же время, 20 % трансформантов, получивших плазмиду pFS23, обладали фенотипом  $Km^R Tc^S$ , что свидетельствовало о рекомбинации в результате двойного кроссинговера. 100 %  $Km^R Tc^S$  клонов обладали фенотипом -  $Fra^-$ .

Интеграция гена *kan* в состав плазмиды pFra была подтверждена переклонированием *EcoRI* фрагментов измененных плазмид (pFra/pFS23), выделенных из пяти независимых клонов, в вектор pUC19. Отбор трансформантов проводили на агаризованной питательной среде, содержащей ампициллин и канамицин. Рестрикционный анализ выявил наличие во всех рекомбинантных *EcoRI* фрагментах полного соответствия с аналогичным фрагментом из плазмиды pFS23. Для дальнейшей работы нами отобран вектор pFS23.

В следующей серии экспериментов использовали штамм EV линии НИИЭГ (рис. 14), несущий все три резидентные плазмиды *Y. pestis*. После передачи в него плазмиды pFS23 лишь 0,1 % выросших клонов обладала фенотипом  $Km^R Tc^S$ . Для повышения доли  $Fra^-$  вариантов в популяции трансформантов было решено провести их селекцию в организме иммунных белых мышей. Для этого, непосредственно перед внутрибрюшинным заражением смесью трансформантов, предварительно иммунизированным животным вводили внутрибрюшинно раствор  $FeSO_4$ . Погибших или умерщвленных на 5-е сутки животных вскрывали и подвергали бактериологическому исследованию. Более 50 % выделенных культур обладали фенотипом  $Km^R Tc^S Fra^-$  (рис. 15). Таким образом, было показано, что наличие в бактериях репликонов pPst и pCad не препятствует образованию искомым рекомбинантов, хотя процент их образования был ниже, чем в изогенном моноплазмидном штамме EV100.

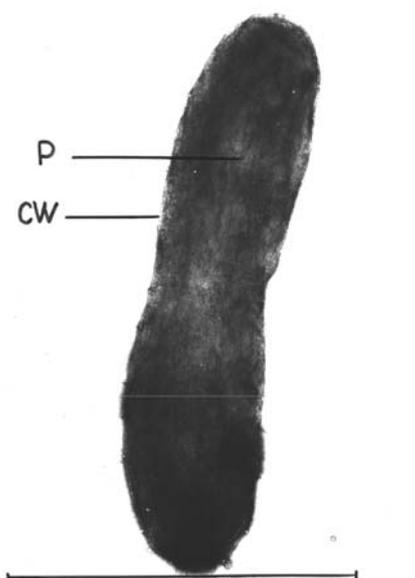
Успех предварительных экспериментов на модели аттенуированных бактерий позволил нам перейти к конструированию  $Fra^-$  вариантов на основе высоковирулентных штаммов *Y. pestis*. В работу были взяты штаммы, используемые в качестве вирулентных тест-штаммов при контроле иммуногенности чумных вакцин: 296, И-2638, X и два набора изогенных штаммов: 231, 231pPst<sup>-</sup>, 231Psb<sup>-</sup> и 358, 358pPst<sup>-</sup>. Частота образования рекомбинантов с фе-



Негативное контрастирование. Размер масштабной линейки - 1 мкм. Бактерии выращивали 48 ч при температуре 37 °С.

*P* - протоплазма (protoplasm). *CW* - клеточная стенка (cell wall). *C* - капсула (capsule).

Рисунок 14. Электронная микрофотография делящейся клетки штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ.



Негативное контрастирование. Размер масштабной линейки - 1 мкм. Бактерии выращивали 48 ч при температуре 37 °С.

*P* - протоплазма (protoplasm). *CW* - клеточная стенка (cell wall).

Рисунок 15. Электронная микрофотография единичной клетки штамма *Y. pestis* EVpFra/pFS23.

нотипом  $Km^R Tc^S$  у различных реципиентных штаммов находилась в пределах 0,1-15 % от числа всех трансформантов. Пассаж смеси трансформантов через организм иммунных мышей увеличивал содержание  $Km^R Tc^S$  вариантов в популяции бактерий до 50-100 %. Все проанализированные  $Km^R Tc^S$  клоны обладали  $Fra^-$  фенотипом. В дальнейшем клоны, утратившие способность продуцировать FI, “анимализировали” в организме интактных белых мышей и морских свинок перед определением величин  $LD_{50}$ . Вирулентность всех сконструированных нами  $Fra^-$  вариантов *Y. pestis* для белых мышей и морских свинок при подкожном заражении сохранилась на уровне исходных штаммов.<sup>69</sup> Двадцатикратные пересевы на плотных и жидких питательных средах без антибиотиков, десятикратные пассажи на белых мышах и пятикратные – на морских свинках показали, что  $Fra^-$  фенотип стабильно сохранялся у всех проверенных клонов. Изогенные наборы на основе штаммов 231 и 358 были отобраны для дальнейших детальных исследований.

#### 4.2. КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ *Y. pestis*, ЛИШЕННЫХ ПЛАЗМИДЫ pFra

Основной трудностью при отборе клонов *Y. pestis* с утраченной плазмидой pFra из гетерогенной микробной популяции является отсутствие удобных селективных маркеров. Использование штаммов, несущих в составе “коинтеграта” pFra/pFS23 ген *kan* (см. предыдущий раздел), значительно облегчило эту задачу и позволило осуществить отбор вариантов, спонтанно утративших плазмиду pFra/pFS23.<sup>70</sup>

Все полученные  $Km^S$  варианты характеризовались фенотипом  $Fra^-$  и генотипом pFra<sup>-</sup>, что свидетельствует о высокой стабильности наследования рекомбинирующего участка вектора pFS23 в составе плазмиды pFra/pFS23 и позволяет судить о частоте элиминации репликона pFra (pFra/pFS23) из клеток *Y. pestis* в естественных условиях. Эта величина в условиях

<sup>69</sup> Опыт проводили однократно, используя по три животных на каждую из четырех заражающих доз. Так как величины  $LD_{50}$  штаммов 358/12 и 358pFra<sup>-</sup> для белых мышей и морских свинок не отличались, в представленных в настоящей работе экспериментах использовали штамм 358pFra<sup>-</sup>.

<sup>70</sup> Методика селекции описана в разделе 2.11.

наших экспериментов составляла  $2,5-5,0 \times 10^{-5}$  от общего количества взятых в исследование клеток, что указывает на возможность довольно частого появления таких клонов в природных условиях. Клоны, утратившие pFra, объединяли, а затем “анимализировали” в организме интактных белых мышей и морских свинок перед проведением дальнейших исследований.

#### 4.3. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ИЗОГЕННЫХ ШТАММОВ *Y. pestis*, ЛИШЕННЫХ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ

Определение основных фенотипических характеристик исследованных бескапсульных штаммов показало, что они отличались от исходных вариантов только по способности продуцировать FI или FI и Tox (для pFra/pFS23 и pFra<sup>-</sup> штаммов, соответственно). Утрата этих признаков не отразилась на проявлении культуральных, биохимических свойств, питательных потребностях, кальцийзависимости, пестициногенности, фибринолитической и плазмокоагулазной активностях, пигментсорбции, способности синтезировать V и pH6 антигены, чувствительности к диагностическим фагам.

##### 4.3.1. ВИРУЛЕНТНОСТЬ ИЗОГЕННЫХ ШТАММОВ *Y. pestis*, ЛИШЕННЫХ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ, ДЛЯ ИНТАКТНЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Сравнительная оценка вирулентности исследуемых штаммов *Y. pestis* для лабораторных животных при подкожном способе заражения не выявила различий в величинах LD<sub>50</sub> исходных Fra<sup>+</sup> штаммов и их Fra<sup>-</sup> производных. Единственным исключением явилась пара штаммов, 231Psb<sup>-</sup> и 231Psb<sup>-</sup>pFra/pFS23, величины LD<sub>50</sub> которых для морских свинок составили 10 (2-24) КОЕ и 267 (67-966) КОЕ соответственно (табл. 5).

Таблица 5. Вирулентность экспериментальных штаммов возбудителя чумы  
для белых мышей и морских свинок

Штаммы <i>Y. pestis</i>	Вирулентность при подкожном способе заражения для			
	белых мышей		морских свинок	
	LD <sub>50</sub> (КОЕ)	средние сроки жизни (сут)	LD <sub>50</sub> (КОЕ)	средние сроки жизни (сут)
231	<b>3</b> (1-18)	<b>7,3</b> (4-6)	<b>4</b> (1-22)	<b>8,1</b> (5-9)
231pPst <sup>-</sup>	<b>1</b> (1-4)	<b>6,9</b> (4-7)	<b>4</b> (1-21)	<b>8,6</b> (5-9)
231Psb <sup>-</sup>	<b>4</b> (1-21)	<b>7,8</b> (5-8)	<b>10</b> (2-24)	<b>8,9</b> (6-10)
231pFra/pFS23	<b>5</b> (1-42)	<b>8,2</b> (7-10)	<b>27</b> (5-210)	<b>10,2</b> (8-13)
231pFra <sup>-</sup>	<b>8</b> (2-41)	<b>7,9</b> (7-10)	<b>2</b> (1-5)	<b>9,7</b> (8-10)
231Psb <sup>-</sup> pFra/pFS23	<b>13</b> (3-63)	<b>8,6</b> (6-12)	<b>267</b> (67-966)	<b>24,5</b> (9-26)
231pPst <sup>-</sup> pFra/pFS23	<b>1</b> (1-5)	<b>6,3</b> (6-10)	<b>9</b> (2-38)	<b>12,7</b> (9-16)
231pFra <sup>-</sup> pPst <sup>-</sup>	<b>1</b> (1-4)	<b>6,5</b> (6-11)	<b>9</b> (1-45)	<b>12,4</b> (9-15)
KM278 (231/830)	<b>&gt; 10<sup>8</sup></b>	–	<b>&gt; 1,5×10<sup>10</sup></b>	–
231pCad <sup>-</sup>	<b>&gt; 10<sup>8</sup></b>	–	<b>&gt; 1,5×10<sup>10</sup></b>	–
358	<b>7</b> (1-27)	<b>4,6</b> (3-5)	<b>13</b> (3-63)	<b>8,6</b> (5-9)
358pPst <sup>-</sup>	<b>1</b> (1-2)	<b>5,5</b> (4-6)	<b>11</b> (2-68)	<b>6,3</b> (5-9)
358pFra/pFS23	<b>5</b> (1-42)	<b>7,8</b> (6-10)	<b>13</b> (3-63)	<b>11,2</b> (9-15)
358pFra <sup>-</sup>	<b>3</b> (1-18)	<b>6,2</b> (6-8)	<b>10</b> (2-15)	<b>10,6</b> (8-13)
358pPst <sup>-</sup> pFra/pFS23	<b>2</b> (1-16)	<b>9,2</b> (7-12)	<b>26</b> (6-22)	<b>13,8</b> (10-16)

Средние сроки жизни белых мышей, погибших в результате заражения штаммом 231 или его изогенными производными, практически не отличались, за исключением некоторой задержки гибели мышей, зараженных штаммом 231Psb<sup>-</sup>pFra/pFS23 (табл. 5). Независимо от вида животных, инфекция, вызванная Fra<sup>-</sup>Tox<sup>+</sup> дериватами штамма 358, приводила к их гибели в более поздние сроки, чем заболевания, вызванные Fra<sup>+</sup>Tox<sup>+</sup> или Fra<sup>-</sup>Tox<sup>-</sup> вариантами этого штамма. Все Fra<sup>-</sup> варианты анализированных штаммов вызывали гибель морских свинок в более поздние сроки, чем их исходные варианты.

Для более полной оценки вклада отдельных факторов патогенности в вирулентность возбудителя чумы в схему данного эксперимента были также включены штаммы: 231pCad<sup>-</sup> - лишенный плазмиды pCad и KM278 - утративший способность к продукции рН6 антигена. Как и следовало ожидать, утрата плазмиды pCad или способности к продукции антигена рН6 сопровождалась потерей вирулентности для лабораторных животных.

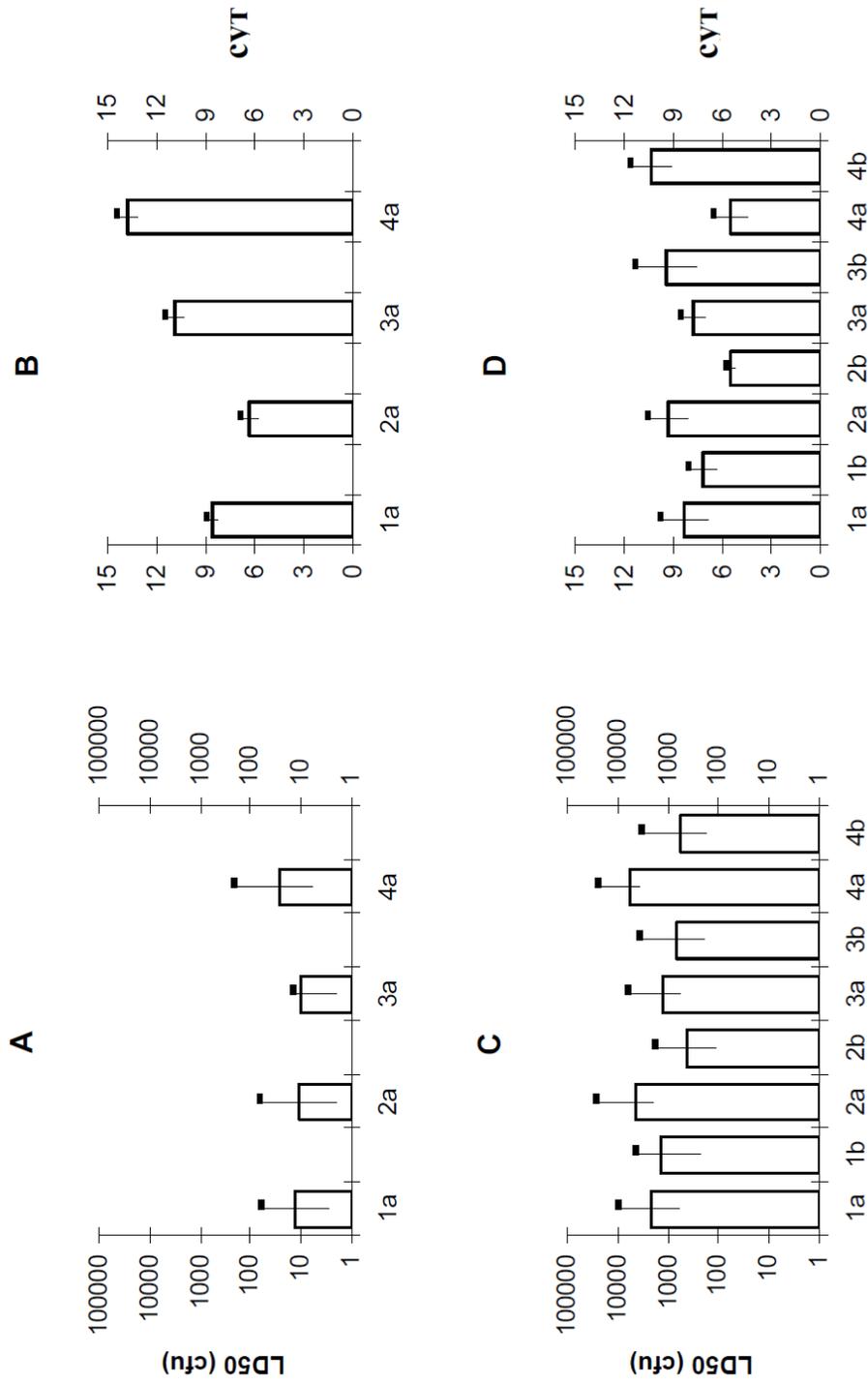
В следующей серии опытов оценивали вирулентность изогенных производных штамма 358, лишенных одной из плазмид: pFra или pPst, или обеих - одновременно, при подкожном и аэрогенном заражении морских свинок. При подкожном заражении использовали "28-градусные", а при аэрозольном "28- и "37-градусные" культуры *Y. pestis*.<sup>71</sup> Как видно из рис. 16, не было выявлено достоверных различий между величинами LD<sub>50</sub> исходного штамма 358 и его производных во всех трех группах морских свинок. Сравнительная оценка вирулентности вариантов *Y. pestis*, выращенных в различных температурных условиях, при респираторном заражении показала, что величины LD<sub>50</sub> меньше для "37-градусных" культур. Эти различия, учитывая доверительные интервалы, были достоверны только для pPst<sup>-</sup> штаммов. В среднем величины LD<sub>50</sub> снижались примерно в два и десять раз для pPst<sup>+</sup> и pPst<sup>-</sup> штаммов, соответственно.

Анализ средней продолжительности жизни зараженных животных позволил выявить две тенденции:

Сроки гибели морских свинок, зараженных подкожно "28-градусными" культурами *Y. pestis* с фенотипом pPst<sup>+</sup>, изменялись в случае утраты плазмиды pPst в направлении противоположном таковому у животных, инфицированных респираторным способом 28-градусными культурами, что отражено на рис. 16.B и 16.D (1a, 2a, 3a и 4a), но коррелировали с направлением изменений при использовании 37-градусных культур, что представлено на рис. 16.B и на рис. 16.D (1a, 2a, 3a, 4a и 1b, 2b, 3b, 4b).

2. Присутствие в клетках *Y. pestis* плазмиды pFra обеспечивало снижение сроков жизни аэрогенно зараженных животных при использовании "37-градусных" культур по сравнению с "28-градусными" культурами (1a, 1b, 2a и 2b на рис. 16.D). Напротив, утрата плазмиды pFra вела к их увеличению (3a, 3b, 4a и 4b на рис. 16.D).

<sup>71</sup> Культуры *Y. pestis*, выращенные при температуре 28°C, использовали для моделирования двух типов передачи чумы: 1) **грызун / блоха / человек** - бубонная форма чумы (подкожное заражение) и 2) **грызун / контаминированная почва (пыль) / человек** - легочная форма чумы (ингаляционное заражение). Культуры, выращен-



Величины LD<sub>50</sub> (A, C) и средние сроки жизни (B, D) морских свинок, зараженных подкожно (A, B) или ингаляционно (C, D) изогенными штаммами, выращенными при температуре 28 °C (a) или 37 °C (b). Штаммы *Y. pestis*: 1 - 358, 2 - 358pPst<sup>-</sup>, 3 - 358pFra<sup>-</sup>, 4 - 358pFra<sup>-</sup>pPst<sup>-</sup>. Доверительный интервал вычисляли для вероятности 95 %.

**Рисунок 16. Вирулентность экспериментальных штаммов возбудителя чумы для морских свинок.**

#### 4.3.2. ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ИЗОГЕННЫХ ШТАММОВ *Y. pestis*, ЛИШЕННЫХ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ, ПРЕОДОЛЕВАТЬ ИММУНИТЕТ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Наличие двух представительных изогенных наборов высоковирулентных в отношении белых мышей и морских свинок штаммов *Y. pestis*, отличающихся по наличию таких факторов патогенности, как Fga, Tох, Pla и Hms, позволило нам поставить эксперименты по изучению роли указанных факторов в иммуногенезе экспериментальной чумы у этих видов лабораторных животных. Результаты заражения животных, иммунизированных за 21 сут до заражения вакцинным штаммом EV линии НИИЭГ в дозе  $10^4$  КОЕ на животное, представлены в табл. 6.

Как видно из таблицы, все штаммы с фенотипом Fga<sup>-</sup>Tох<sup>-</sup> проявляли способность вызывать повышенный процент гибели белых мышей, иммунизированных вакцинным штаммом EV, что выразилось в снижении показателей LD<sub>50</sub> на два-три порядка и согласуется с данными, полученными другими исследователями [6, 174, 354]. Однако способность преодолевать у лабораторных животных специфический иммунитет, индуцированный вакцинным штаммом EV, в наших экспериментах удалось выявить и при заражении штаммами, избирательно утратившими способность к синтезу FI без нарушения продукции "мышинного" токсина, или штаммами, утратившими вместе с признаком Fga плазмиду pPst и признак пигментсорбции, но не вариантами *Y. pestis*, лишенными плазмиды pPst и обладающими Hms<sup>-</sup> фенотипом, но образующими капсулу, что подтверждает ведущую роль капсульного антигена *Y. pestis* в создании специфического иммунитета у белых мышей. Утрата всех исследованных факторов патогенности не влияла на величины LD<sub>50</sub> экспериментальных штаммов в экспериментах с использованием иммунных морских свинок. Средние сроки жизни как белых мышей, так и морских свинок, зараженных Fga<sup>-</sup> штаммами, увеличивались примерно в 1,5 раза.

Таблица 6. Результаты заражения иммунных белых мышей и морских свинок экспериментальными штаммами возбудителя чумы

Штаммы <i>Y. pestis</i>	Показатели LD <sub>50</sub> (КОЕ)		Средние сроки жизни (сут)	
	белые мыши	морские свинки	белые мыши	морские свинки
231	<b>1,0×10<sup>5</sup></b> (2,0×10 <sup>4</sup> -6,0×10 <sup>5</sup> )	<b>5,6×10<sup>5</sup></b> (1,2×10 <sup>5</sup> -1,9×10 <sup>6</sup> )	<b>5,8</b> (3-16)	<b>11,0</b> (6-16)
231pPst <sup>-</sup>	<b>3,2×10<sup>5</sup></b> (5,0×10 <sup>4</sup> -1,3×10 <sup>6</sup> )	<b>1,5×10<sup>6</sup></b> (3,8×10 <sup>5</sup> -6,0×10 <sup>6</sup> )	<b>6,9</b> (5-18)	<b>12,2</b> (7-23)
231Psb <sup>-</sup>	<b>2,5×10<sup>5</sup></b> (5,8×10 <sup>4</sup> - 8,7×10 <sup>5</sup> )	<b>1,0×10<sup>6</sup></b> (2,6×10 <sup>5</sup> -4,0×10 <sup>6</sup> )	<b>6,2</b> (3-17)	<b>11,5</b> (6-17)
231pFra/pFS23	<b>1,0×10<sup>3</sup></b> (2,0×10 <sup>2</sup> -6,0×10 <sup>3</sup> )	<b>6,9×10<sup>5</sup></b> (8,7×10 <sup>4</sup> -2,1×10 <sup>6</sup> )	<b>8,3</b> (6-30)	<b>16,5</b> (8-30)
231pFra <sup>-</sup>	<b>2,1×10<sup>3</sup></b> (4,0×10 <sup>2</sup> -9,0×10 <sup>3</sup> )	<b>7,0×10<sup>5</sup></b> (3,0×10 <sup>5</sup> -1,1×10 <sup>6</sup> )	<b>9,1</b> (7-30)	<b>17,2</b> (7-30)
231Psb <sup>-</sup> pFra/pFS23	<b>2,5×10<sup>3</sup></b> (5,8×10 <sup>2</sup> -9,0×10 <sup>3</sup> )	<b>2,5×10<sup>6</sup></b> (5,8×10 <sup>5</sup> -9,0×10 <sup>6</sup> )	<b>8,6</b> (6-28)	<b>17,6</b> (8-30)
231pPst <sup>-</sup> pFra/pFS23	<b>2,3×10<sup>3</sup></b> (5,8×10 <sup>2</sup> -9,3×10 <sup>3</sup> )	<b>1,6×10<sup>6</sup></b> (4,0×10 <sup>5</sup> -6,2×10 <sup>6</sup> )	<b>9,5</b> (8-30)	<b>16,7</b> (7-29)
358	<b>3,2×10<sup>5</sup></b> (7,0×10 <sup>4</sup> -1,6×10 <sup>6</sup> )	<b>1,0×10<sup>6</sup></b> (2,6×10 <sup>5</sup> -4,0×10 <sup>6</sup> )	<b>6,3</b> (3-15)	<b>11,8</b> (5-21)
358pFra/pFS23	<b>3,0×10<sup>2</sup></b> (7,3×10 <sup>1</sup> -1,7×10 <sup>3</sup> )	<b>1,5×10<sup>6</sup></b> (3,8×10 <sup>5</sup> -6,0×10 <sup>6</sup> )	<b>8,9</b> (6-28)	<b>17,8</b> (6-30)
358pFra <sup>-</sup>	<b>2,7×10<sup>3</sup></b> (5,2×10 <sup>2</sup> -1,2×10 <sup>4</sup> )	<b>6,8×10<sup>5</sup></b> (1,7×10 <sup>5</sup> -3,1×10 <sup>6</sup> )	<b>8,7</b> (7-27)	<b>17,6</b> (6-30)
358pPst <sup>-</sup> pFra/pFS23	<b>1,8×10<sup>3</sup></b> (5,7×10 <sup>2</sup> -8,6×10 <sup>3</sup> )	<b>1,7×10<sup>6</sup></b> (4,2×10 <sup>5</sup> -6,4×10 <sup>6</sup> )	<b>9,3</b> (7-30)	<b>18,0</b> (7-30)

Следует отметить, что напряженность противочумного иммунитета отличается у иммунизированных и переболевших чумой животных [293, 325]. Это послужило основанием для сравнительного изучения иммунитетпреодолевающих свойств Fra<sup>-</sup> штаммов *Y. pestis* в отношении морских свинок, иммунизированных вакцинным штаммом чумного микроба EV, и предварительно иммунизированных животных, выживших после заражения 200 Dcl вирусного штамма 231.<sup>72</sup> Результаты эксперимента представлены в табл. 7.

<sup>72</sup> Повторно морских свинок заражали через 45 сут после первого заражения.

Таблица 7. Результаты заражения иммунных и переболевших чумой морских свинок экспериментальными штаммами возбудителя чумы

Штаммы <i>Y. pestis</i>	Показатели LD <sub>50</sub> (КОЕ)		Средние сроки жизни (сут)	
	иммунные	переболевшие	иммунные	переболевшие
231	<b>3,6×10<sup>5</sup></b> (9,1×10 <sup>4</sup> -1,4×10 <sup>6</sup> )	<b>1,6×10<sup>8</sup></b> (4,1×10 <sup>7</sup> -6,5×10 <sup>8</sup> )	<b>11,1</b> (5-18)	<b>13,1</b> (11-30)
231pFra/pFS23	<b>4,1×10<sup>5</sup></b> (1,0×10 <sup>5</sup> -1,6×10 <sup>6</sup> )	<b>6,1×10<sup>6</sup></b> (1,5×10 <sup>6</sup> -2,4×10 <sup>7</sup> )	<b>15,9</b> (8-30)	<b>17,6</b> (10-30)

Из таблицы видно, что на модели переболевших морских свинок, величины LD<sub>50</sub> имеют тенденцию к увеличению, что согласуется с данными И.С. Тинкера с соавт. [325]. Однако Fra<sup>-</sup> штамм *Y. pestis* 231pFra/pFS23 почти на два порядка превосходил исходный штамм "дикого" типа по своей вирулентности в отношении переболевших чумой животных. Во всех случаях средние сроки жизни переболевших свинок увеличивались по сравнению с аналогичными показателями однократно иммунизированных.

#### 4.4. ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения роли отдельных факторов и, в том числе, капсульного антигена в патогенности *Y. pestis*, выяснения их возможного участия в механизмах, которые обеспечивают внеклеточную диссеминацию, размножение возбудителя чумы в плазме, интерстициальной жидкости и внутри фаголизосом, необходимо наличие генетически определенных изогенных вариантов вирулентного штамма. Очевидно, что ценность и убедительность полученных результатов возрастает, если они воспроизводятся в разных опытах, выполняемых на разных моделях. Поэтому наиболее достоверные сведения можно получить при использовании нескольких наборов генетически охарактеризованных изогенных мутантов, сконструированных на основе "родительских" штаммов, относящихся к различным экотипам возбудителя. Однако спонтанные мутации, затрагивающие отдельные "детерминанты вирулентности" относительно редки, а при индуцированном мутагенезе *in vivo* (с помощью супермутагенов или

транспозонов) мутагенному воздействию подвергается весь геном, в силу чего указанный метод имеет такой недостаток, как образование множественных мутаций. Это, в свою очередь, приводит к большим трудностям при интерпретации результатов. Генная инженерия для получения стабильных неревертирующих мутаций позволяет использовать метод локализованного мутагенеза, при котором все необходимые изменения вносятся в клонированный фрагмент ДНК *in vitro*. Как правило, в структурный ген (или вместо него) встраивают ген устойчивости к антибиотику. Затем реципиентные клетки трансформируют гибридной молекулой ДНК, содержащей подвергнутый изменениям ген (или кластер генов), фланкированный последовательностями, гомологичными аллельному участку генома реципиента. В результате двойного кроссинговера происходит замещение интактного участка ДНК на дефектный. Селекцию рекомбинантных клеток проводят на плотных питательных средах с соответствующим антибиотиком.

Использование в наших исследованиях метода локализованного мутагенеза с помощью интегративной плазмиды rFS23 в сочетании с прямой селекцией  $Fra^-$  рекомбинантов *in vivo* (в организме иммунизированных FI белых мышей) позволило разработать простую и надежную методику получения высоковирулентных  $Fra^-$  вариантов *Y. pestis*, которую удалось воспроизвести на всех "произвольно" выбранных штаммах возбудителя чумы. Представленные в настоящей главе данные о необязательности наличия FI в клетках чумного микроба для "полной" вирулентности *Y. pestis* согласуются с работой В.В. Акимовича и Л.Н. Шаниной [6] и **результатами**<sup>73</sup> исследований В.В. Кутырева [198, 201], но противоречат данным подавляющего большинства исследователей<sup>74</sup>, изучавших вирулентность  $Fra^-$  вариантов возбудителя чумы. Этот факт позволяет нам предположить, что значительное сниже-

---

<sup>73</sup> Игнорируя данные собственных исследований экспериментального штамма 358/12 и его изогенных производных и "дикого" штамма И-2422 $Fra^-$ , только на основании данных по изучению вирулентности изогенных производных "дикого" штамма И-1843 В.В. Кутырев делает вывод, что низкая вирулентность природных  $Fra^-$  "штаммов для морских свинок обусловлена отсутствием экспрессии капсульного антигена" [198].

<sup>74</sup> К сожалению, в публикациях исследователей из Fort Detrick (USA) [416, 437, 604], использовавших близкий по методологии к нашему способ получения  $Fra^-$  вариантов *Y. pestis*, есть только данные о вирулентности  $Fra^-$

ние вирулентности Fga<sup>-</sup> штаммов в экспериментах большинства исследователей [63, 191, 198, 201, 291, 329, 400, 590 и др.] может быть связано с наличием в изученных ими штаммах дополнительных неидентифицированных мутаций. В пользу данного предположения свидетельствует выделение в Южном Прибалхашье (1) полноценных в антигенном отношении штаммов и (2) лишенных только одного из общепризнанных "детерминант вирулентности" - продукции FI [191]. Все эти штаммы были авирулентны для белых мышей и морских свинок "вследствие отсутствия у них X-детерминанты вирулентности, природа которой пока не раскрыта" [63].

Еще одним свидетельством о возможности влияния на вирулентность неидентифицированных мутаций могут быть расхождения результатов наших исследований с данными А.М. Кокушкина [174] о вирулентности изогенных производных штамма 358. В его исследовании показано, что штамм, утративший обе "видоспецифические" плазмиды возбудителя чумы, снизил примерно на два порядка свою вирулентность по сравнению с исходным штаммом "дикого" типа и аналогичным ему вариантом 358pFra<sup>-</sup>pPst<sup>-</sup>, использованном в наших исследованиях. Это противоречие мы склонны отнести к методическим отличиям получения подобных штаммов. В цитируемой работе вирулентный штамм 358Psb<sup>+</sup>pPst<sup>+</sup>pCad<sup>+</sup> был получен из авирулентного штамма 358/12P<sup>+</sup>I путем передачи в него методом криотрансформации плазмиды pCad. На его основе по традиционной методике был получен штамм, лишенный плазмиды pPst. Затем в оба штамма методом криотрансформации в качестве селективного маркера была передана плазида pСКΔII, определяющая устойчивость к канамицину. Следует отметить, что, по нашим данным, не вошедшим в настоящую работу, при криотрансформации по методу А.М. Кокушкина [175] плазмиды в основном передаются в "компетентные" к криотрансформации клетки *Y. pestis*, имеющие невыявленные нами дефекты,

---

форм для белых мышей и африканских зеленых мартышек (*Cercopithecus aethiops*), но нет данных о вирулентности для морских свинок.

проявляющиеся в снижении вирулентности популяции трансформантов.<sup>75</sup> Для отбора клонов, сохранивших вирулентность на уровне реципиентных штаммов, необходимо проведение "анимализации" (см. раздел 2.14). Таким образом, двукратная криотрансформация без последующей селекции могла привести к обогащению популяции трансформантов бактериями, обладающими пониженной вирулентностью, и утрате высоковирулентных клонов.

По мнению А.М. Friedlander *et al.* [437], снижение вирулентности  $Fra^-$  штаммов, несущих плазмиду  $pFra$  в интегрированном состоянии, может быть связано с тем, что эта интеграция оказывает влияние на экспрессию других факторов патогенности.

В наших исследованиях на большом наборе штаммов *Y. pestis*, утративших способность к синтезу только FI или одновременно FI и мышинового токсина, было показано, что абсолютные величины  $LD_{50}$  достоверно не менялись по сравнению с исходными штаммами. Однако у животных, зараженных рядом штаммов с фенотипом  $Fra^-$ , отмечали достоверную задержку сроков гибели. Выраженность перехода чумной инфекции в подострую форму зависела от вида животных и исходного штамма *Y. pestis*.

Гипотетически утрата капсулы может вести к снижению способности *Y. pestis* к размножению в организме хозяина. Это, в свою очередь, сопровождается увеличением сроков жизни зараженных животных. Логично предположить, что утрата обоих факторов патогенности, кодируемых плазмидой  $pFra$ , должна выражаться в еще большей задержке сроков гибели и даже возрастании величин  $LD_{50}$ . Однако переключение энергетических ресурсов бактериальной клетки с синтеза продуктов плазмиды  $pFra$  на продукцию оставшихся факторов патогенности *Y. pestis* может вести к восстановлению способности возбудителя чумы к эффективному размножению в организме хозяина, что, соответственно, ведет к сокращению сроков жизни зараженных животных вплоть до аналогичных для инфекции, вызванной

---

<sup>75</sup> На основании анализа данных литературы И.В. Домарадский [117] высказал предположение, что "переносы генетической информации легче удаются в случае атипичных форм некоторых бактерий. При таком объяснении речь должна идти не о снижении вирулентности клеток под влиянием плазмид, а об изменении состава популяции, вызванного накоплением (отбором) рекомбинантов с изначально низкой вирулентностью или во-

штаммами “дикого” типа. Это предположение косвенно подтверждается результатами наших экспериментов, представленных в разделе 4.3.1, и данными об увеличении каталазной активности и способности более интенсивно размножаться в макрофагах у Fra<sup>-</sup> субкультур штамма 231 по сравнению с клетками “дикого” типа [296].

Известно, что вирулентность патогенных микроорганизмов полидетерминантна и носит интегративный характер. Для обеспечения инфекционного процесса несколько факторов патогенности могут функционировать как индивидуально, так и сочетанно. “Выключение” любого из этих факторов, в свою очередь, может не влиять на вирулентность микроба, либо приводить к его аттенуации [236, 434, 435]. На наш взгляд, “накопление” в штамме дикого типа неидентифицированных мутаций, потенциально снижающих его способность эффективно размножаться в организме хозяина, до какого-то времени компенсируется наличием широкого набора факторов патогенности. Поэтапная элиминация этих факторов из микробной клетки на определенной стадии приводит к невозможности компенсации их утраты за счет сверхпродукции оставшихся, что проявляется в значительном снижении вирулентности.<sup>76</sup> Представленные в настоящей главе данные подтверждают это предположение. Наше наблюдение, что при ингаляционном заражении в некоторых случаях pPst<sup>-</sup> штаммы вызывали гибель морских свинок в более ранние сроки, чем их изогенные pPst<sup>+</sup> варианты, на первый взгляд, кажется удивительным. Продукты плазмиды pPst обеспечивали преимущество клеткам *Y. pestis*, выращенным при температуре 28 °C (рис. 16.D - 1a, 1b, 2a, 2b). Эти продукты, вероятно, принимают участие в начальном преодолении “легочных систем защиты” хозяина в период перехода клеток возбудителя чумы от “векторного” (28 °C) к “гостальному” (37 °C) фенотипу, который характеризуется продукцией основных факторов патогенности, обеспечивающих, в свою очередь, развитие генерализованной инфекции. Выращенные при темпе-

---

обще авирулентных.” По нашим неопубликованным данным указанных недостатков лишен метод трансдукции с помощью фага P1 vir [265] или P1 *cml clr* 100ts [150].

<sup>76</sup> Только одновременная утрата штаммом 358 плазмид pFra и pPst приводила к увеличению сроков гибели морских свинок зараженных подкожно.

ратуре 37 °С культуры *Y. pestis*, в отличие от 28-градусных культур, способны выживать и даже размножаться в фагоцитарных клетках [403] и, при попадании в легочные макрофаги, сразу же начинают быстрый рост и приобретают способность сопротивляться "удалению" из легких морских свинок [438]. В этом случае, продукты плазмиды pPst больше не нужны для диссеминации бактерий. Переключение энергетических ресурсов микробной клетки с синтеза продуктов плазмиды pPst на синтез других факторов патогенности и на размножение pPst<sup>-</sup> клеток *Y. pestis* может приводить к обострению инфекционного процесса и сокращению сроков жизни зараженных животных. Дополнительная потеря способности к синтезу FI, (рис. 16.D - 3a, 3b, 4a, 4b) приводит к увеличению сроков жизни инфицированных животных.

Обсуждая экспериментальные данные, представленные в этом разделе работы, нельзя не остановиться на проблеме вирулентности pPst<sup>-</sup> штаммов для морских свинок. В целом ряде исследований показано, что полевоchie штаммы возбудителя чумы (pPst<sup>-</sup>), выделенные на Закавказском нагорье, по вирулентности для белых мышей не отличаются от штаммов *Y. pestis*, выделенных от песчанок в соседнем Закавказском пустынном очаге. Но штаммы, выделенные от песчанок (pPst<sup>+</sup>) высоковирулентны для морских свинок. "Вирулентность же микробов полевоchieй разновидности для них колеблется в пределах от полной авирулентности до гибели 50 % взятых в опыт животных (при дозах от 10<sup>1</sup> м.т. до 10<sup>9</sup> м.т.)". При исследовании более 40 штаммов, выделенных в разные годы в Закавказском высокогорном очаге, "отмечена более высокая вирулентность для морских свинок штаммов, полученных в Ленинанканском мезоочаге, по сравнению со штаммами, выделенными в Зангезуро-Карабахском мезоочаге [138]. Другие исследователи также отмечали высокую вирулентность для морских свинок отдельных штаммов *Y. pestis*, выделенных от обыкновенных полевков на Армянском нагорье [1] и в Дагестанском горном очаге [283]. Настоящая работа свидетельствует, что сама по себе утрата плазмиды pPst не приводит к снижению вирулентности исследованных нами экспериментальных штаммов в отношении морских свинок. Это согласуется с исследо-

ваниями В.В. Кутырева [198], показавшего, что передача плазмиды pPst в клетки типичного "полевого" штамма 6499 не приводила к снижению величин LD<sub>50</sub>. По мнению разных исследователей, причина избирательной вирулентности полевоых штаммов связана с их способностью ферментировать рамнозу [174, 288, 289], наличием "дополнительных хромосомных мутаций к ауксотрофности" [198] или отсутствием у них 32-kDa протеина внешней мембраны, имеющегося у всех вирулентных для морских свинок и человека экотипов *Y. pestis* [612, 613]. Выяснение действительных причин этих различий еще требует своего решения.

Всестороннее изучение экспериментальных штаммов микроорганизмов, дефектных по продукции отдельных факторов патогенности, интересно не только с точки зрения выяснения особенностей вызванного ими инфекционного процесса на модели интактных животных. Не меньший интерес представляет эпидемиологическая значимость естественной вариабельности циркулирующих в природе возбудителей инфекционных заболеваний и, в первую очередь, взаимосвязь изменения антигенной структуры патогенов и их способности преодолевать коллективный популяционный иммунитет хозяев, лежащая в основе саморегуляции паразитарных систем. Даже беглый анализ литературных данных показывает, что изменчивость по одному определенному антигену неравнозначна для развития эпидемического процесса у различных носителей и, соответственно, в различных природных очагах.

Так, иммунизация больших песчанок Fra<sup>+</sup> штаммами *Y. pestis* создавала у них стойкий иммунитет к заражению капсульными и слабый к заражению Fra<sup>-</sup> бактериями. Иммунизация Fra<sup>-</sup> вариантами повышала устойчивость больших песчанок к заражению бескапсульными штаммами, не влияя на их чувствительность к Fra<sup>+</sup> штаммам [191]. При заражении интактных больших песчанок Fra<sup>+</sup> штаммами на 5-9-е сутки животные гибли от генерализованной инфекции с выделением Fra<sup>+</sup> культур. Гибель в сроки позже одного месяца или умерщвление животных в эти же сроки, как правило, вели к выявлению Fra<sup>-</sup> форм возбудителя чумы в абсцессах, сформировавшихся в местах введения исходной Fra<sup>+</sup> культуры [278]. Выделение

Fra<sup>+</sup> или Fra<sup>-</sup> бактерий чередовалось в зависимости от фазы эпизоотии и коррелировало, в первую очередь, с колебаниями процента серопозитивных в отношении FI больших песчанок в популяции [276].

В опытах по заражению вирулентными неизогенными Fra<sup>+</sup> и Fra<sup>-</sup> штаммами *Y. pestis* серых сурков, выживших после предварительного заражения этими же штаммами чумного микроба, было показано, что "от гибели в результате заражения капсульным штаммом" их "практически не защищали бескапсульные микробы, а капсульные защищали слабо. По отношению к бескапсульному штамму ... как капсульные, так и бескапсульные микробы обладали выраженными иммуногенными свойствами" [63]. Следует отметить, что в доступной нам литературе нет сведений о выделении Fra<sup>-</sup> штаммов от сурков и их эктопаразитов.

В наших экспериментах были подтверждены известные данные об иммунитетпреодолевающей способности Fra<sup>-</sup> штаммов на модели белых мышей, предварительно иммунизированных Fra<sup>+</sup> штаммами, вакциной USP или антигеном FI [6, 174, 354, 368, 398-400, 437] и отсутствии селективных преимуществ у Fra<sup>-</sup> штаммов на модели иммунизированных содержащими FI препаратами морских свинок [354]. Результаты экспериментов с иммунными морскими свинками, казалось бы, противоречат результатам исследования фагоцитарной активности "иммунных" перитонеальных макрофагов морских свинок в отношении штаммов *Y. pestis*, отличающихся по продукции антигенов FI и Tox, в котором показано, что Fra<sup>-</sup> штаммы возбудителя чумы имеют преимущество размножения внутри макрофагов животных, иммунизированных штаммом EV линии НИИЭГ [194]. По этому поводу хочется высказать два соображения. С одной стороны, моделирование такого сложного явления как инфекционное заболевание на изолированных клетках животных, переживающих в питательных средах вне организма, позволяет изучать тонкие механизмы взаимодействия патогенных микроорганизмов с отдельными эукариотическими клетками, с другой стороны, - является крайней степенью упрощения изучаемого процесса. Поэтому сравнение результатов, полу-

ченных в опытах *in vivo* и в экспериментах с изолированными фагоцитами, требует серьезной критичной оценки. В этом плане интересно, что свойства Fra<sup>+</sup> и Fra<sup>-</sup> штаммов, выявленные на модели "иммунных" перитонеальных макрофагов, не проявляются в опытах на морских свинках, однократно иммунизированных аттенуированным вакцинным штаммом EV, но четко видны при заражении переболевших чумой животных. Это, на наш взгляд, еще раз подчеркивает разницу между поствакцинальным и постинфекционным иммунитетом при чуме и свидетельствует о необходимости оценки эпидемиологической значимости изменения антигенной структуры *Y. pestis* именно на модели переболевших животных.

## Глава 5. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ШТАММОВ *Y. pestis*, ОБРАЗУЮЩИХ АТИПИЧНЫЕ КАПСУЛЫ

В наших экспериментах, описанных в главе 3, и работах других исследователей [91, 92, 350, 351] нарушение структуры гена *cafIM* не приводило к прекращению синтеза капсульного антигена в клетках *E. coli*. В дефектных по этому гену продуцентах выявляли изменение иммунохимической активности. Атипичный антиген удавалось выявлять с помощью РДИД и РНАт, но не РНГА. Для выяснения влияния *cafIM* мутаций на биологические свойства *Y. pestis* и определения потенциальной способности *cafIM* мутантов циркулировать в природных очагах было проведено конструирование штаммов энтеробактерий и, прежде всего, возбудителя чумы, несущих *fra* оперон, дефектный по гену *cafIM*. Эти штаммы были использованы для изучения влияния экспрессии гена *cafIM* на образование капсулы, ее серологическую специфичность и биофизические свойства в клетках различных энтеробактерий, а также определения вирулентности *cafIM* мутантов возбудителя чумы и патоморфологических изменений вызываемых у инфицированных ими белых мышей.

### 5.1. КОНСТРУИРОВАНИЕ pFra<sup>+</sup> ШТАММОВ *Y. pestis*, ДЕФЕКТНЫХ ПО ГЕНУ *cafIM* ОПЕРОНА *fra*

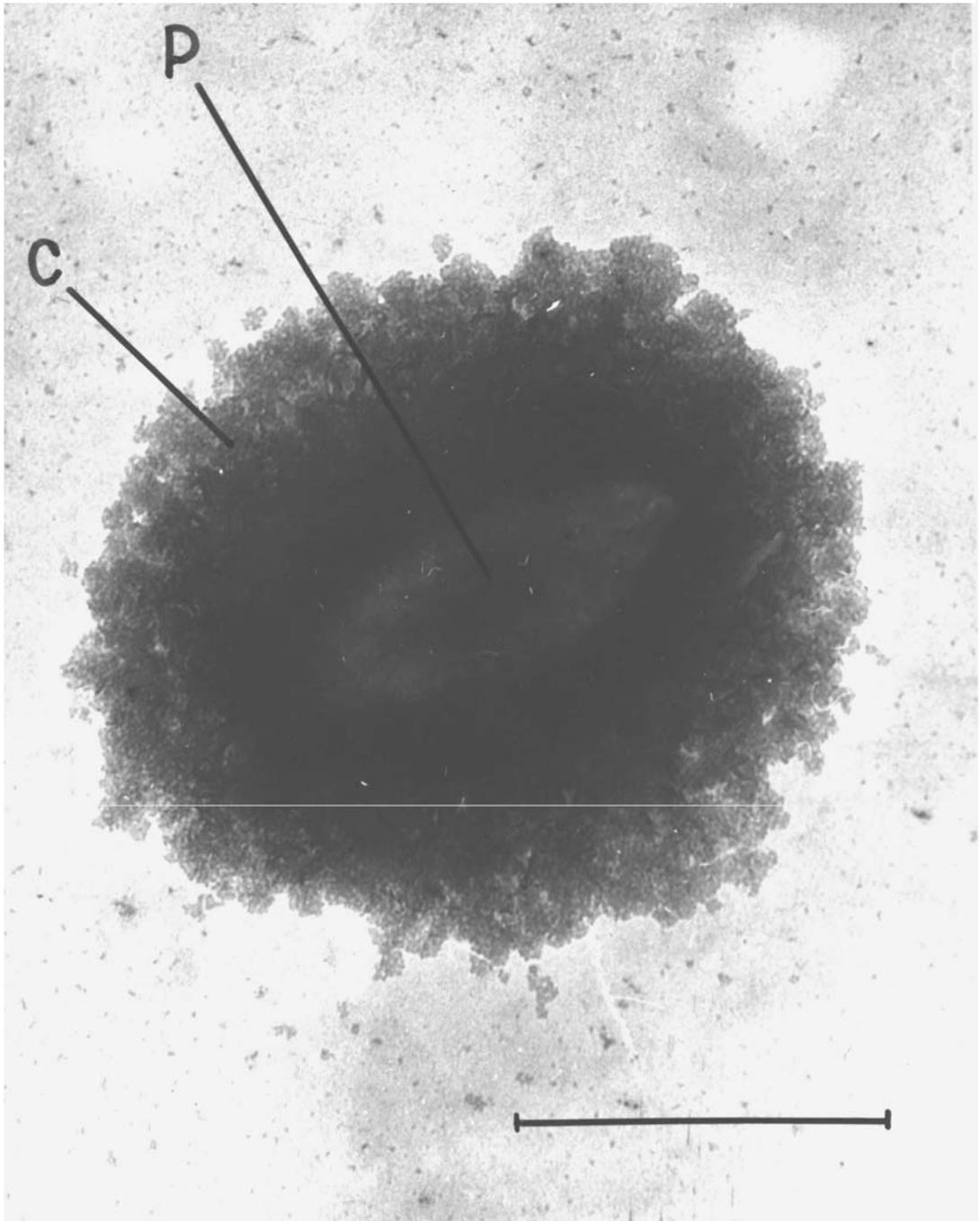
Инактивацию локуса *cafIM* в клетках возбудителя чумы проводили с помощью локализованного мутагеза, позволяющего за счет гомологичной рекомбинации осуществлять замену интактного локуса *cafIM* плазмиды pFra на рекомбинантный локус, в нуклеотидную последовательность гена *cafIM* которого был встроен ген *kan*. Несущие рекомбинантный локус *cafIM::kan* плазмиды pFBK7 и pFBK10 были получены путем встраивания в противоположных ориентациях гена *kan* из плазмиды pUC4K в BamHI сайт плазмиды pFS1 (см. раздел 2.10).

В клетки штамма *Y. pestis* EV плазмиды передавали методом криотрансформации. Смесь трансформантов, выросших на плотной питательной среде с канамицином, культивировали в неселективных условиях в жидкой питательной среде с аэрацией в течение 40-50-ти генераций. Затем микробные культуры рассеивали до единичных колоний и пересевали на плотные питательные среды с канамицином и ампициллином. Для дальнейших исследований отбирали клоны с фенотипом  $Km^R Ap^S$ , которые составляли около 0,5 % от клеток популяции трансформантов. Скрининг плазмидного состава отобранных клонов показал отсутствие дополнительных плазмид по сравнению с исходным штаммом *Y. pestis* EV. Это, на наш взгляд, свидетельствует об интеграции в оперон *fra* интактной плазмиды pFra гена *kan* путем аллельной рекомбинации с фланкирующими его фрагментами *fra* оперона из плазмиды pFS1 за счет четного числа кроссинговеров.

Интеграция гена *kan* в плазмиду pFra была подтверждена переклонированием *EcoRI* фрагментов измененных плазмид (pFra/pFBK7, pFra/pFBK10), выделенных из пяти независимых клонов, в вектор pUC19. Рестрикционный анализ выявил наличие в рекомбинантных *EcoRI* фрагментах ген-блока *kan* из плазмиды pUC4K, обеспечивающего устойчивость к канамицину.

Анализ гибридных клонов *Y. pestis* показал, что, несмотря на синтез отчетливо видимой под электронным микроскопом капсулы (рис. 17)<sup>77</sup>, она не выявлялась с помощью коммерческих иммунодиагностикумов в РДИД и РНГА. В РНАт клетки, образующие подобную капсулу, отнесенную нами к серовару FI-2, выявляли в концентрациях, превышающих  $10^7$  КОЕ/мл, в то время как диагностикум чумной эритроцитарный антигенный должен выявлять исходную культуру *Y. pestis* EV в концентрации не более  $2,5 \times 10^5$  КОЕ/мл [288]. В ходе приготовления клеточных суспензий обнаружено, что *cafIM* варианты штамма EV обладали повышенной способностью к **аутоагрегации**. В изотоническом растворе NaCl (0,9 %)

<sup>77</sup> На рисунках 14 и 15 представлены электронные микрофотографии исходного штамма EV линии НИИЭГ и его бескапсульного варианта *Y. pestis* EVpFra/pFS23. Все три препарата для электронной микроскопии готовили параллельно в одинаковых условиях.



Негативное контрастирование. Размер масштабной линейки - 1 мкм. Бактерии выращивали 48 ч при температуре 37 °С.

*P* - протоплазма (protoplasm). *C* - капсула (capsule).

Рисунок 17. Электронная микрофотография единичной клетки штамма *Y. pestis* EVpFra/pFBK10.

бактериальные культуры, культивированные на плотных питательных средах, удавалось лишь фрагментировать на мелкие кусочки "творожистой" консистенции без помутнения надосадочной жидкости. Выращенные в жидких питательных средах с интенсивной аэрацией культуры исходного и рекомбинантных штаммов визуально не отличались.

Успех предварительных экспериментов на аттенуированном штамме позволил нам перейти к конструированию *cafIM* вариантов на основе высоковирулентных штаммов *Y. pestis*. Попытки отобрать из популяций трансформантов рекомбинантные клоны штаммов 231 и 358 с фенотипом  $Km^R Ap^S Tc^S$  после нескольких пересевов на плотных питательных средах в неселективных условиях не увенчались успехом. Дополнительно проводили трехкратные пассажи смесей трансформантов в организмах белых мышей, иммунизированных FI в дозе 15 мкг на животное за 21 сут до заражения. Более 50 % выделенных от погибших мышей культур чумного микроба обладали фенотипом  $Km^R Ap^S Tc^S$ , не реагировали с коммерческими иммунодиагностикумами, но образовывали видимую под световым микроскопом капсулу. Капсула обладала более плотным и ровным внешним контуром, ее толщина была в два раза меньше, чем у исходных штаммов. *CafIM* производные вирулентных штаммов *Y. pestis* также как и аналогичные варианты штамма EV обладали повышенной способностью к аутоагрегации. Двадцатикратные пересевы на плотных и жидких питательных средах без антибиотиков и десятикратные пассажи на белых мышах показали, что способность образовывать атипичную капсулу стабильно сохранялась у всех проверенных клонов. Однако если способность к аутоагрегации сохранялась в процессе пересевов на питательных средах, то после двух-трех дополнительных пассажей через лабораторных животных, проведенных после выделения  $Km^R Ap^S Tc^S$  клонов, культурально-морфологические свойства *cafIM* штаммов соответствовали таковым у исходных штаммов "дикого" типа. Иммунохимические свойства "свежеполученных" штаммов и их "анимализированных" производных не отличались. Изогennyй набор на основе штамма 231 был отобран для дальнейших более детальных исследований.

## 5.2. ЭЛЕКТРОПОВЕРХНОСТНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ПО СПОСОБНОСТИ ОБРАЗОВЫВАТЬ КАПСУЛУ *Y. pestis*

Так как в предварительных исследованиях было установлено, что экспрессия *fra* оперона, дефектного по гену *cafIM*, в клетках *E. coli* и *Y. pestis* приводит к образованию атипичных капсул с различными серологическими свойствами, мы предположили, что эти иммунохимические отличия могут быть связаны с особенностями строения клеточных поверхностей данных микроорганизмов. Поскольку одним из основных известных нам отличий в строении клеточных стенок и внешних (надоболочечных) структур *E. coli* и *Y. pestis* является форма ЛПС [51, 107, 392], основной целью настоящего раздела исследований явилось изучение корреляции серологической активности и ЭКП клеток энтеробактерий, отличающихся по степени редуцированности ЛПС, с наличием или отсутствием у них типичной и атипичных капсул *Y. pestis*. Определение ЭКП бактерий в качестве дополнительного метода, характеризующего капсулы *cafIM* микроорганизмов, обосновывалось тем, что в нашем распоряжении имелись антисыворотки лишь к ограниченному числу сероваров атипичных капсул. Изменение же величины  $\xi$ -потенциала позволяет детектировать малейшие изменения структуры двойного электрического слоя, образованного взаимодействием ионогенных полярных групп (карбоксильных, гидроксильных, аминогрупп и др.) клеточной поверхности с противоположно заряженными ионами дисперсионной среды, и традиционно используется для выявления бактериальных капсул [109, 384] и поиска новых антигенов, располагающихся на клеточной поверхности [377].

В штаммы энтеробактерий, не обладающих репликоном *pFra Y. pestis*, рекомбинантные плазмиды *pFS1*, *pFBK7*, *pFBK10* или вектор *pHC79* передавали с помощью трансформации. Культуры микроорганизмов выращивали в течение 24 ч на агаре Хоттингера при температуре 37 °С. Штаммы, несущие плазмиды *pHC79*, *pFS1*, *pFBK7* и *pFBK10*, выращивали на средах, содержащих ампициллин для предотвращения спонтанной элиминации гибридных

репликонов. По данным М.Е. Bayer, J.L. Sloyer [384] присутствие ампициллина в питательном субстрате не влияет на ЭКП энтеробактерий.

Интересно, что повышенная способность к аутоагрегации при росте на плотных питательных средах, впервые выявленная нами у *cafIM* мутантов возбудителя чумы (см. раздел 5.1), была свойственна всем сконструированным и изученным нами гибридным энтеробактериям, обладающим R-формой ЛПС в сочетании с опероном *fra*, дефектным по гену *cafIM*, кроме штаммов *Y. pestis*, лишенных собственной плазмиды pFra. Наиболее выраженной способностью к аутоагрегации обладали гибридные штаммы *S. minnesota* R595, несущие плазмиды pFBK7 и pFBK10. Даже при культивировании в жидких питательных средах с интенсивной аэрацией культуры рекомбинантных штаммов росли в виде отдельных хлопьев "творожистой" консистенции без помутнения культуральной жидкости. При световой микроскопии гибридные бактерии располагались в виде скоплений, состоящих из 15-50-ти мелких клеток, покрытых общей капсулой или, точнее, образующих своеобразный синцитий (агломерат), в котором "сеть" с незначительной оптической плотностью изолировала отдельные микроорганизмы друг от друга и от окружающих скопления бактерий частиц туши. Размеры этих клеток в три-четыре раза уступали таковым у бактерий, несущих только вектор pHC79 или плазмиду pFS1 с интактным *fra* опероном. Еще одной характерной особенностью штаммов *S. minnesota* R595 с плазмидами pFBK7 или pFBK10 явилась необходимость их ежедневных пересевов при использовании как жидких, так и плотных питательных сред. При задержке переноса инокулята в свежую питательную среду даже на одни сутки видимый рост культуры прекращался.

Значения ЭКП бактериальных клеток, определенные при нейтральном значении pH буферного раствора, представлены в таблице 8. Все клетки обладали отрицательным зарядом. Полученные результаты свидетельствуют о том, что введение в геном клеток исходных штаммов оперона *fra* интактного или дефектного по гену *cafIM* приводило к изменению ЭКП реципиентных клеток.

Таблица 8. Характеристика использованных в работе штаммов микроорганизмов

Штамм	Плазмида, кодирующая синтез капсульного антигена	Форма ЛПС или хемотип	ЭКП (рН 7,0, 37 °С)	Капсула
<b><i>Y. pestis</i></b>				
231	pFra	R	-35,6±1,6*	типичная
EV НИИЭГ	pFra	R	-26,4±1,1 (-28,1±0,4*)	
EV11MpFS1	pFS1	S	-20,9±0,5	
JavapFS1	pFS1	R	-34,5±0,2	
358/12P <sup>-</sup> pFS1	pFS1	R	-39,0±0,1	
231pFra/pFBK7	pFra/pBK7	R	-39,6±0,1*	атипичная
231pFra/pFBK10	pFra/pBK10	R	-38,9±0,2*	
EVpFra/pFBK7	pFra/pBK7	R	-4,8±0,5 (-6,3±0,3*)	
EVpFra/pFBK10	pFra/pBK10	R	-2,1±0,4 (-3,5±0,2*)	
EV11MpFBK7	pFBK7	S	-27,7±0,1	
EV11MpFBK10	pFBK10	S	-27,3±0,7	
JavapFBK7	pFBK7	R	-40,6±0,4	
358/12P <sup>-</sup> pFBK7	pFBK7	R	-40,9±0,5	
231pFra/pFS23	pFra/pFS23	R	-34,6±0,7*	нет
EVpFra/pFS23	pFra/pFS23	R	-34,2±0,7 (-35,8±0,5*)	
EV11MpHC79	–	S	-24,7±0,5	
JavapHC79	–	R	-41,1±0,1	
358/12P <sup>-</sup> pHC79	–	R	-41,6±0,5	
<b><i>E. coli</i></b>				
JM83pFS1	pFS1	S	-35,7±0,4	типичная
F470pFS1	pFS1	Ra	-37,6±0,5	
F588pFS1	pFS1	Rd <sub>1</sub>	-38,6±1,9	
F583pFS1	pFS1	Rd <sub>2</sub>	-38,7±1,2	
F515pFS1	pFS1	Re	-36,0±0,2	
JM83pFBK7	pFBK7	S	-39,9±0,6	атипичная
F470pFBK7	pFBK7	Ra	-28,6±0,7	
F588pFBK7	pFBK7	Rd <sub>1</sub>	-51,7±0,4	
F583pFBK7	pFBK7	Rd <sub>2</sub>	-50,4±0,2	
F515pFBK7	pFBK7	Re	-23,3±0,2	
JM83pHC79	–	S	-41,5±0,2	нет
F470pHC79	–	Ra	-39,7±0,2	
F588pHC79	–	Rd <sub>1</sub>	-47,4±0,1	
F583pHC79	–	Rd <sub>2</sub>	-47,2±0,4	
F515pHC79	–	Re	-45,7±0,3	
<b><i>S. minnesota</i></b>				
R595pFS1	pFS1	Re	-1,9±0,4	типичная
R595pFBK7	pFBK7	Re	-2,5±0,1	атипичная
R595pHC79	–	Re	-54,3±0,8	нет

<i>S. enteritidis</i>				
PM1pFS1	pFS1	S	-35,3±0,6	типичная
PM1pFBK7	pFBK7	S	-34,5±0,7	атипичная
PM1pHC79	–	S	-25,6±0,4	нет

Примечание: \* - клетки убивали 70%-ным этанолом.

Наиболее достоверно, на наш взгляд, можно интерпретировать результаты, полученные на группе изогенных штаммов *E. coli*, для которых установлен состав коровых олигосахаридов редуцированного в различной степени ЛПС [560]. Анализ результатов, представленных на рисунке 18, показывает, что по величине значений ЭКП бескапсульные варианты этих штаммов можно разделить на две группы. Первая – штаммы с наиболее редуцированным (лишенным глюкозы и галактозы) гликолипидом – F515pHC79, F583pHC79, F588pHC79 (Re-Rd<sub>1</sub>-хемотипы), имеющие ЭКП (-46,5±1,0) мВ. Вторая представлена штаммом F470pHC79 (Ra-хемотип), характеризующимся несколько меньшим отрицательным зарядом микробных клеток (-39,7±0,2) мВ. Очевидно, что изменение величин ЭКП коррелирует с изменением структуры ЛПС.

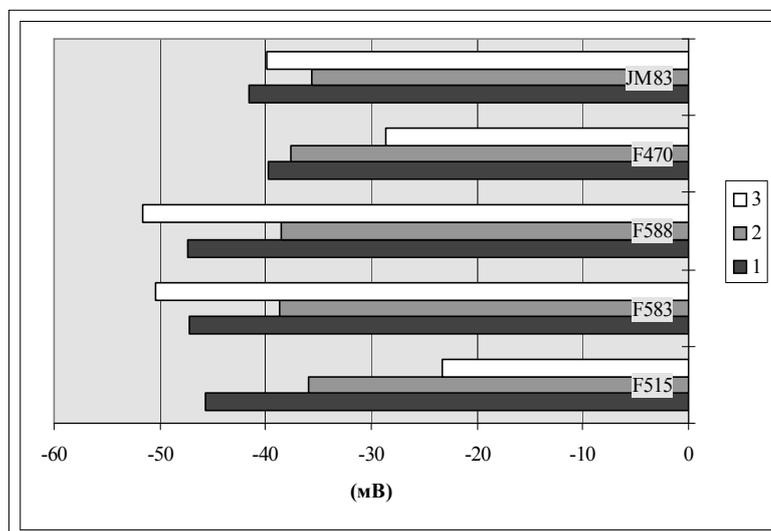


Рисунок 18. ЭКП клеток штаммов *E. coli*, отличающихся по наличию плазмид: 1 – pHC79, 2 – pFS1, 3 – pFBK7

Экранирование клеточной поверхности *E. coli* "классической" капсулой возбудителя чумы (интактный *fra* оперон) приводило к снижению и выравниванию значений ЭКП реци-

пиентных клеток кишечной палочки ((-37,3±1,5) мВ). В процессе образования подобной типичной капсулы, состоящей из субъединиц, кодируемых геном *cafI*, принимал участие и продукт гена *cafIM*.

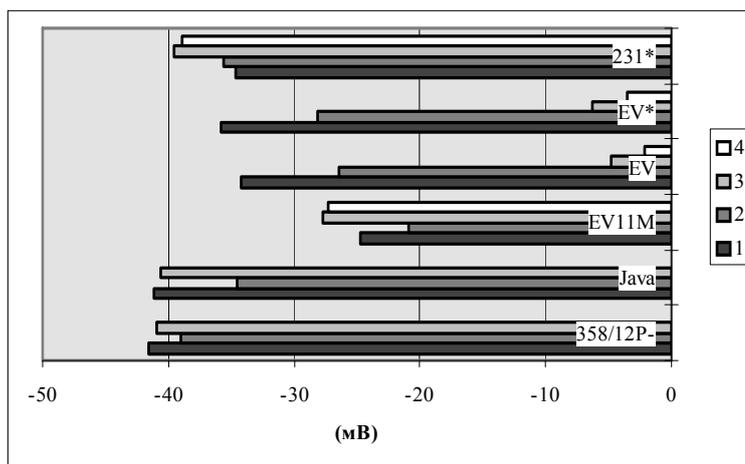
Образование капсулы в отсутствие шаперона CafIM (плазмиды pFBK7 и pFBK10), напротив, сопровождалось значительными колебаниями величин ЭКП в клетках реципиентных штаммов. Наличие атипичной капсулы на клеточной поверхности Ra-мутанта (F470pFBK10), лишённого боковых полисахаридных цепей, приводило к уменьшению значений ЭКП до (-28,6±0,7) мВ. Дальнейшее укорочение гликолипида в сочетании с атипичной капсулой у штаммов F588pFBK7 и F583pFBK7 (Rd<sub>1</sub>- и Rd<sub>2</sub>-хемотипы) сопровождалось увеличением значений ЭКП до (-51,7±0,4) и (-50,4±0,2) мВ соответственно. У штамма F515pFBK7 с наиболее редуцированной формой гликолипида отмечено снижение значений ЭКП до (-23,3±0,2) мВ.

ЛПС "природных изолятов" чумного микроба состоит из гликолипида предположительно Rd-Rc-типа и отдельно синтезируемых полисахаридных цепей, не связанных с кором и липидом А [31, 51, 107, 392].<sup>78</sup> Логично предположить, что по своим электрокинетическим свойствам клетки чумного микроба должны быть наиболее близки к изученным нами Rd-мутантам кишечной палочки. Используемые в работе варианты *Y. pestis* отличались по происхождению и содержанию собственных плазмид, продукты которых участвуют в формировании структур клеточной поверхности, определяющих электрофоретическую подвижность клеток [131, 184]. Это позволяет проводить сравнительную оценку лишь внутри изо-

<sup>78</sup> А.А. Безсонова и Г.Н. Ленская [40] выявили диссоциацию *Y. pestis* на шероховатую (R) и гладкую (S) формы. Они показали, что обычная форма существования чумного микроба шероховатая, а бактерии, находящиеся в гладкой форме, чувствительны к фагоцитозу и авирулентны. Эти данные долгие годы служили основанием для отбора именно R-культур в ходе выделения *Y. pestis* от больных, из трупов и полевого материала. Однако, как свидетельствует публикация И.Л. Мартиневского [223], описаны два "природных" изолята 1108-OS (pFga<sup>+</sup>pCad<sup>+</sup>pPst<sup>+</sup>, авирулентный для морских свинок и белых мышей) и 190 (авирулентный для морских свинок и белых мышей, но у больших песчанок вызывал хроническую инфекцию). Экспериментальный штамм 671-S, полученный И.Л. Мартиневским в процессе индуцированного мутагенеза нитрозогуанидином, обладал следующими свойствами: 1) рос на плотных средах в S-форме, на жидких вызывал помутнение; был вирулентен для морских свинок (Dcl=10<sup>3</sup> КОЕ) и белых мышей (Dcl=10<sup>2</sup> КОЕ); лизировался чумными диагностическими фагами.

генных групп, имеющих общий исходный штамм, а сравнение между группами – и тем более с данными, полученными на модели *E. coli* – весьма условно.

По величинам ЭКП исследованные бескапсульные варианты штаммов возбудителя чумы можно разделить на три группы (рис. 19).<sup>79</sup> Наибольшим отрицательным зарядом обладали несущий плазмиду pCad штамм 358/12P<sup>-</sup>pHC79 ((-41,6±0,5) мВ) и лишенный собственных плазмид штамм JavarHC79 ((-41,1±0,1) мВ). Промежуточное положение занимали штаммы 231pFS23 ((-34,6±0,7) мВ) и EVpFS23 ((-34,2±0,7) мВ до или (-35,8±0,4) мВ после обработки этанолом). Эти штаммы обладали интактными репликаонами pCad и pPst, а их плазмиды pFra несли поврежденный *fra* оперон (*caf1R*<sup>+</sup>, *caf1M*::*kan*,  $\Delta$ *caf1A-caf1*). Минимальным зарядом обладали клетки штамма EV11MpHC79 ((-24,7±0,5) мВ), характеризующегося отсутствием собственных плазмид и S-формой ЛПС.



Штаммы *Y. pestis*, клетки которых были подвергнуты предварительной обработке этанолом, помечены значком - \*.

Рисунок 19. ЭКП клеток исследованных штаммов *Y. pestis*, отличающихся по наличию плазмид: – pHC79 или pFra/pFS23, 2 – pFS1 или pFra, 3 – pFBK7 или pFra/ pFBK7, 4 – pFBK10 или pFra/ pFBK10

Наличие типичной капсулы приводило к снижению ЭКП клеток чумного микроба на

<sup>79</sup> Как видно из рис. 19, предварительная обработка микробных клеток этанолом приводила к увеличению отрицательного заряда примерно на 1,5 мВ, независимо от генотипа тестируемого штамма.

3-8 мВ по сравнению с их бескапсульными вариантами у всех авирулентных штаммов. Однако у вирулентного штамма 231 "дикого" типа был выявлен  $\xi$ -потенциал  $(-35,6 \pm 1,6)$  мВ) на 1 мВ больший, чем у его изогенного бескапсульного варианта 231pFra/pFS23  $(-34,6 \pm 0,7)$  мВ), хотя эта разница и не была достоверной.

Как и в клетках кишечной палочки, синтез атипичной капсулы у возбудителя чумы сопровождался резко отличающимися значениями величин ЭКП. Значительное снижение величин ЭКП выявлено у штаммов EVpFra/pFBK7  $(-4,8 \pm 0,5)$  мВ) и EVpFra/pFBK10  $(-2,1 \pm 0,4)$  мВ). Увеличение ЭКП отмечено у штаммов 231pFBK7  $(-39,6 \pm 0,1)$  мВ) и 231pFBK10  $(-38,9 \pm 0,2)$  мВ). Поверхностный заряд клеток штаммов 358/12P<sup>-</sup>pFBK7 и JavapFBK7 оставался примерно на уровне такового у их бескапсульных вариантов.

Введение в клетки исследованных штаммов сальмонелл интактного или дефектного по гену *cafIM* оперона *fra* также приводило к разнонаправленному изменению ЭКП реципиентных клеток (рис. 20). У рекомбинантных клеток вирулентного для мышевидных грызунов штамма *S. enteritidis* PM1 (S-форма ЛПС), обладающих "классической" или атипичной капсулами, величины ЭКП примерно в полтора раза превышали таковые у бескапсульного варианта, несущего только векторную плазмиду pHC79. В гибридных клетках штамма *S. minnesota* R595 (Re-хемотип), напротив, наличие любого варианта капсулы приводило к резкому снижению  $\xi$ -потенциала до практически электронейтральных значений.

Интересно отметить, что **только у производных вирулентных штаммов *Y. pestis* 231 и *S. enteritidis* PM1** наличие любой формы капсулы сопровождалось повышением ЭКП на 1-10 мВ.

В связи с тем, что экспрессия *fra* оперона является температурозависимой, нам представлялось интересным оценить изменения ЭКП у гибридных штаммов *Y. pestis* в зависимости от температуры культивирования. Для исследования были отобраны производные вак-

цинного штамма EV (R-форма ЛПС) и его бесплазмидного варианта EV11M (S-форма ЛПС) (рис. 21).

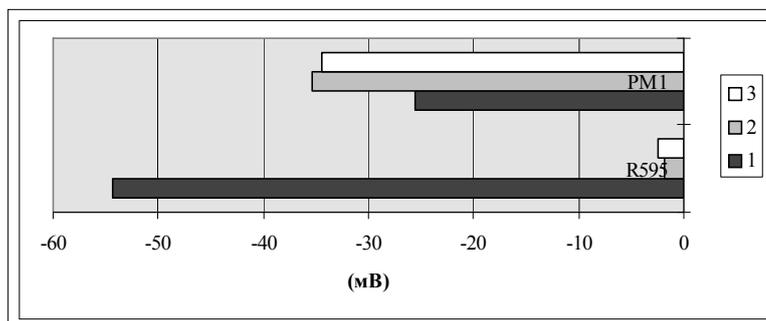
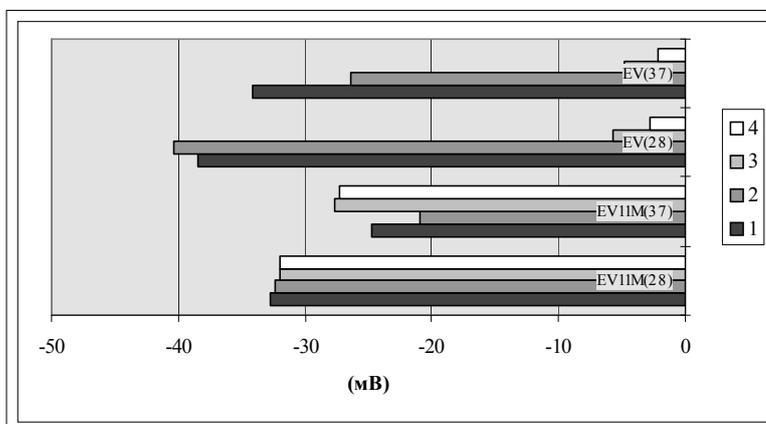


Рисунок 20. ЭКП клеток штаммов *S. enteritidis* PM1 и *S. minnesota* R595, отличающихся по наличию плазмид: 1 – рHC79, 2 – рFS1, 3 – рFBK7



Цифры в круглых скобках за названием штаммов показывают температуру (°C) культивирования данных культур.

Рисунок 21. ЭКП клеток *Y. pestis* штаммов EV и EV11M, отличающихся по наличию плазмид: – рHC79 или рFra/рFS23, 2 – рFS1 или рFra, 3 – рFBK7 или рFra/ рFBK7, 4 – рFBK10 или рFra/ рFBK10

Во всех случаях  $\xi$ -потенциал клеток, выращенных при температуре 28 °C, был выше ЭКП бактерий, культивированных при 37 °C. Интересно, что у всех производных штамма EV11M с S-формой ЛПС, выращенных при температуре 28 °C, значения ЭКП были примерно одинаковыми - (-32,3±1,2) мВ.

### 5.3. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ПО СПОСОБНОСТИ ОБРАЗОВЫВАТЬ КАПСУЛУ *Y. pestis*

Следующим этапом данного раздела исследований явилось изучение антигенной специфичности капсул сконструированных нами энтеробактерий. Результаты тестирования представлены в таблице 9. На основании иммунохимической активности все исследованные штаммы можно разделить на 6 групп (сероваров): FI (“классический” или типичный), FI-1, FI-2, FI-3, FI-4 и FI-? (объединяющий неидентифицированные серовары). Плазмиды, несущие интактный *fra* оперон обеспечивали образование “классической” капсулы иммунохимически идентичной в независимости от структуры ЛПС штаммов-продуцентов. При изучении *cafIM* штаммов в ряде случаев выявлена связь между структурой ЛПС и серологической специфичностью капсул. Так, с одной стороны, атипичные капсулы штаммов *E. coli* F588pFBK7 и F583 pFBK7 (Rd<sub>1</sub>- и Rd<sub>2</sub>-хемотипы соответственно) обладали выраженной иммунохимической гомологией с таковыми у *cafIM* производных штаммов *Y. pestis* 231, 358/12P<sup>-</sup> и Java (R-ЛПС). С другой стороны, все исследованные *cafIM* энтеробактерии с S-формой ЛПС образовывали капсулы FI-1 серовара (см. также раздел 3.2).

### 5.4. ИЗУЧЕНИЕ ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ШТАММОВ *Y. pestis*, ОПИСАННЫХ КАК Fra<sup>-</sup> И Fra<sup>±</sup>, НО ОБРАЗУЮЩИХ АТИПИЧНЫЕ ВАРИАНТЫ КАПСУЛЫ

Целью настоящего раздела исследований являлся поиск в ГосКПБ “Микроб” природных Fra<sup>-</sup>, Fra<sup>±</sup> и pFra<sup>-</sup> изолятов *Y. pestis* и оценка их капсулообразующей способности.

Бактерии выращивали в течение 2 сут на агаре Хоттингера, pH 7,2, при температуре 37 °С. Продукцию FI выявляли в РНГА. Наличие капсулы у всех штаммов определяли с помощью световой микроскопии по методу Гисса-Бури, а у штамма М-493 и с помощью электронной микроскопии (рис. 22).

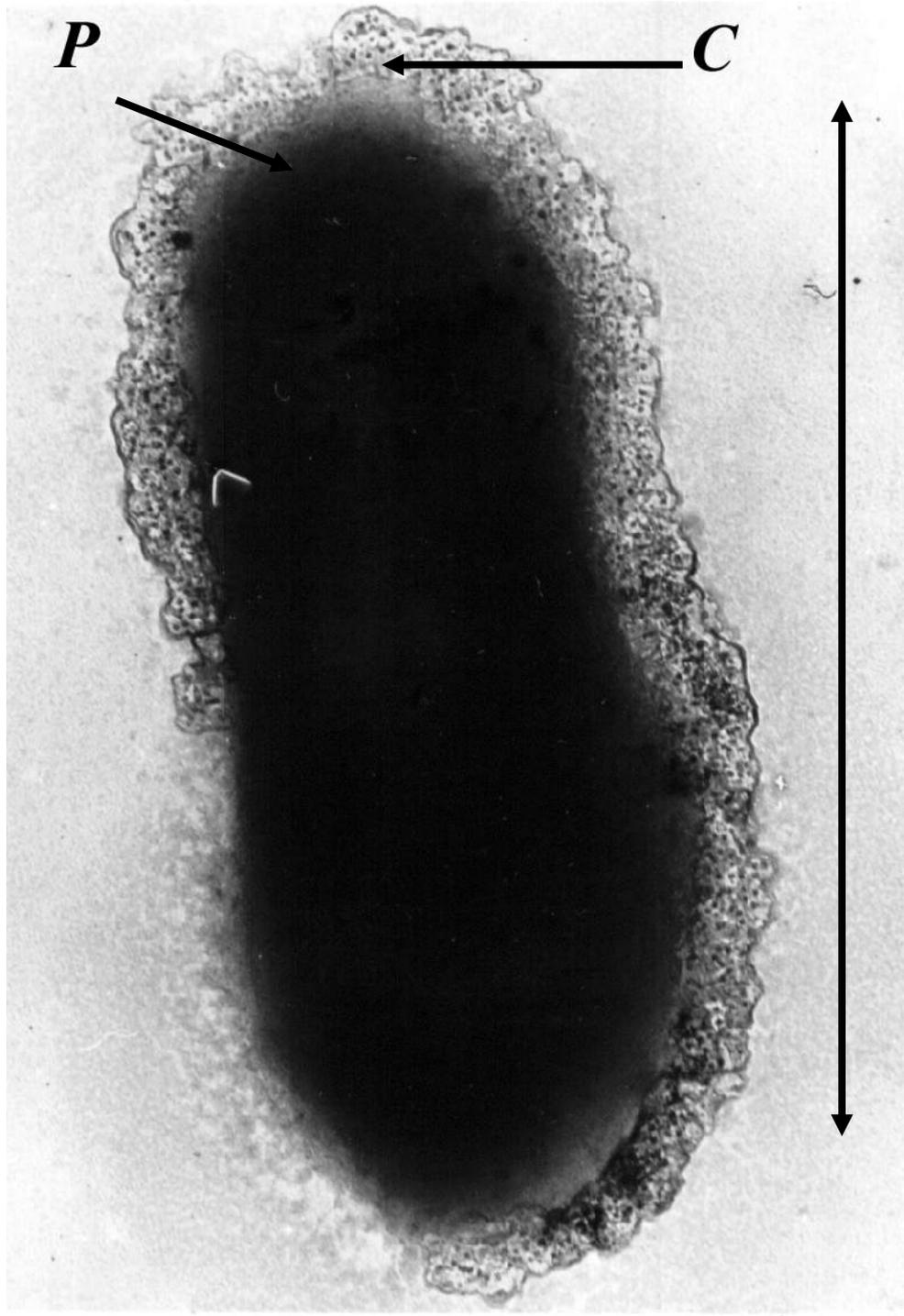
Таблица 9. Иммунохимические реакции рекомбинантных штаммов энтеробактерий

Штаммы	РДИД с антисыворотками, полученными к капсульным белкам, выделенным из штаммов				Титры реакций с коммерческими иммунодиагностическими		Форма ЛПС	Серовар
	EV	EVpFra/pFBK7	231pFra/pFBK10	R595pFBK7	РНГА	РНат		
<b><i>Y. pestis</i></b>								
EV НИИЭГ	+	-	-	-	1 : 4096	1 : 8192	R	FI
EVpFra/pFBK7	-	+	-	-	-	1 : 64	R	FI-2
EVpFra/pFBK10	-	+	-	-	-	1 : 32	R	FI-2
EV11MpFS1	+	-	-	-	> 1 : 8192	> 1 : 8192	S	FI
EV11MpFBK7	+	-	-	-	-	1 : 8	S	FI-1
EV11MpFBK10	+	-	-	-	-	1 : 2	S	FI-1
JavapFS1	+	-	-	-	> 1 : 8192	> 1 : 8192	R	FI
JavapFBK7	-	-	+	-	-	-	R	FI-3
358/12P <sub>-</sub> pFS1	+	-	-	-	> 1 : 8192	> 1 : 8192	R	FI
358/12P <sub>-</sub> pFBK7	-	-	+	-	-	-	R	FI-3
231	+	-	-	-	1 : 8192	1 : 8192	R	FI
231pFra/pFBK7	-	-	+	-	-	1 : 4	R	FI-3
231pFra/pFBK10	-	-	+	-	-	1 : 2	R	FI-3
<b><i>E. coli</i></b>								
JM83pFS1	+	-	-	-	1 : 4096	1 : 4096	S	FI
JM83pFBK7	+	-	-	-	-	1 : 32	S	FI-1
JM83pFBK10	+	-	-	-	-	1 : 2	S	FI-1
F470pFS1	+	-	-	-	1 : 256	1 : 256	Ra	FI
F470pFBK7	-	-	-	-	-	-	Ra	FI-?
F515pFS1	+	-	-	-	1 : 2048	1 : 4096	Re	FI
F515pFBK7	-	-	-	-	-	-	Re	FI-?
F583pFS1	+	-	-	-	1 : 2048	1 : 4096	Rd <sub>2</sub>	FI
F583pFBK7	-	-	+	-	-	-	Rd <sub>2</sub>	FI-3
F588pFS1	+	-	-	-	1 : 128	1 : 256	Rd <sub>1</sub>	FI
F588pFBK7	-	-	+	-	-	-	Rd <sub>1</sub>	FI-3

Продолжение таблицы 9

<i>S. minnesota</i>									
R595pFS1	+	-	-	-	-	1 : 8192	1 : 8192	Re	FI
R595pFBK7	-	-	-	-	+	-	1 : 8	Re	FI-4
R595pFBK10	-	-	-	-	+	-	1 : 8	Re	FI-4
<i>S. enteritidis</i>									
PM1pFS1	+	-	-	-	-	1 : 4096	1 : 8192	Re	FI
PM1pFBK7	+	-	-	-	-	-	1 : 2	Re	FI-1

Примечание: \* – FI-? – неустановленный серовар.



Негативное контрастирование. Размер масштабной линейки – 1 мкм. Бактерии выращивали 48 ч при температуре 37 °С.

*P* - протоплазма (protoplasm). *C* - капсула (capsule).

Рисунок 22. Электронная микрофотография единичной клетки штамма *Y. pestis* М-493.

К настоящему моменту по способности продуцировать FI и образовывать капсулу охарактеризован 21 "природный изолят" *Y. pestis*. Их описание приводится в таблице 10. Как видно из представленных данных Fra<sup>-</sup> фенотип и даже отсутствие детектируемого в ПЦР гена *cafI* (И-2422Fra<sup>-</sup>) не всегда сопровождалось отсутствием отчетливо видимой под световым микроскопом капсулы. Результаты наших экспериментов подтверждают данные других исследователей [180, 256, 368], показавших, что популяции Fra<sup>+</sup> бактерий гетерогенны по способности синтезировать FI и образовывать капсулу. Интересно, что в популяциях штаммов, образующих атипичные капсулы, также присутствует определенное количество бескапсульных бактерий.

Штамм М-493, как наиболее полно охарактеризованный в разносторонних исследованиях других экспериментаторов [50, 188, 336, 534], был отобран для дальнейших сравнительных исследований с экспериментальными *cafI* штаммами *Y. pestis*.

## 5.5. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА БЕЛКОВ КАПСУЛЫ ИЗ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ С АТИПИЧНЫМИ КАПСУЛАМИ И ИССЛЕДОВАНИЕ ЭТИХ ШТАММОВ С ПОМОЩЬЮ ИММУНОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Рекомбинантные штаммы чумного микроба с атипичными капсулами, сконструированные на основе штаммов EV, EV11M, 358/12P<sup>-</sup>, Java, 231, исходные штаммы "дикого" типа EV и 231, а также "природный изолят" М-493<sup>80</sup> культивировали на агаре Хоттингера, плотной питательной среде на основе гидролизата кильки или мясо-пептонном агаре. Биомассу смывали 0,02 М фосфатными буферами, имеющими значения pH от 9,0 до 5,0. После центрифугирования клеточной взвеси изоэлектрическую преципитацию капсульного белка из надосадочной жидкости проводили при pH 4,3-4,0, причем незначительный преципитат, образующийся при pH 5,0-4,6, удаляли центрифугированием. Переосаждение препаратов проводили двукратно.

Таблица 10. Образование капсулы исследованными Fra<sup>+</sup>, Fra<sup>-</sup> и Fra<sup>±</sup> штаммами *Y. pestis*

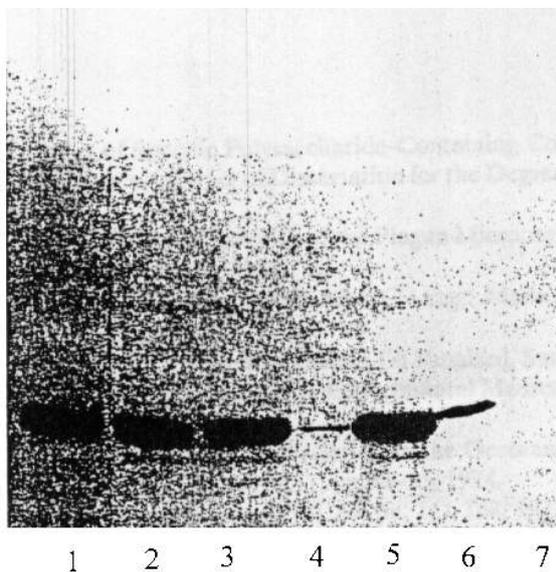
Штаммы <i>Y. pestis</i>	Происхождение штаммов	Данные паспортов		Наши экспериментальные данные		
		Наличие автономной плазмиды с <i>fra</i> опероном	Производство FI	Результаты ПЦР с праймерами на <i>cafI</i> ген	Обратные титры в РНГА	%-ное содержание в популяции бактериальных клеток с капсулами
EV	вакцинный (линия НИИЭГ)	+	+	+	1024	100
EV11M	экспериментальный	-	-	-	-	0
EV11MpFSK3	экспериментальный	+	+	+	> 4096	80
EVpFra <sup>-</sup> pPst <sup>-</sup> pFSK3	экспериментальный	+	+	+	> 4096	100
231	природный изолят	+	+	+	1024	98
231/830	экспериментальный	+	+	+	1024	70
231pFra <sup>-</sup> pPst <sup>-</sup>	экспериментальный	-	-	-	2	0
231pFra/pFBK10	экспериментальный	+	-	+	2	67
231pFra/pFS23	экспериментальный	+	-	-	2	0
358	природный изолят	+	+	+	1024	95
358pFra <sup>-</sup> pPst <sup>-</sup>	экспериментальный	-	-	-	2	0
358pFra/pFBK10	экспериментальный	+	-	+	-	74
10087	природный изолят	-	+	НД	2	44
115-Ур	природный изолят	-	НД	+	512	96
128-Ур	природный изолят	-	НД	+	4096	100
16-К	природный изолят	+	-	НД	-	40
252 (Рос)	природный изолят	+	-	НД	-	40
305(1694)	природный изолят	+	+	+	1024	90
622	природный изолят	+	НД	+	2	58
Java8	природный изолят	+	-	+	2	62
М-493	природный изолят	+	±	+	-	83
М-509	природный изолят	НД	НД	НД	-	10
М-510	природный изолят	НД	НД	НД	-	10
М-512	природный изолят	НД	±	НД	-	40
М-513	природный изолят	НД	НД	НД	-	15
М-521	природный изолят	НД	НД	НД	-	20
М-522	природный изолят	+	НД	НД	-	15
М-957	природный изолят	-	НД	НД	-	20
М-962	природный изолят	+	-	НД	2	63
М-974	природный изолят	-	-	НД	2	45
И-2422FraI <sup>-</sup>	утратил плазмиду pFra в процессе музейного хранения	-	-	-	-	97

<sup>80</sup> Штамм М-493 культивировали только на агаре Хоттингера.

У всех исследованных штаммов максимальный уровень синтеза капсульного белка отмечали в культурах, выращенных на агаре Хоттингера в течение 48 ч при температуре 37 °С. В отличие от капсульного антигена из исходных штаммов "дикого" типа (EV и 231) и генно-инженерных штаммов EV11MpFBK7, 358/12P<sup>-</sup>pFBK7, JavapFBK7 и 231pFra/pFBK7 капсульный белок из производных штамма EV (EVpFra/pFBK7 и EVpFra/pFBK10) переходил в раствор с поверхности клеток лишь при повышении значений pH буфера до 8,5 и более. При этом изоэлектрическая преципитация во всех исследованных препаратах отмечалась при pH  $4,05 \pm 0,05$ , как и у "классического" капсульного антигена.

Во всех препаратах содержались примеси ЛПС. В SDS-электрофорезе денатурированных кипячением белков большинство серологически атипичных антигенов формировали ряд полос различной интенсивности с молекулярными массами от 67 kDa до 12 kDa, в то время как капсульный антиген из штаммов "дикого" типа, атипичных производных штамма 231 и "природного изолята" M-493 образовывал по одной мажорной – с молекулярной массой около 12 kDa. По данным иммуноблотинга исследованных капсульных белков с кроличьей поликлональной моноспецифичной сывороткой к типичному антигену FI "классический" капсульный антиген присутствовал только в препаратах, выделенных из исходных штаммов "дикого" типа EV и 231. На иммуноблотах же тотальных клеточных лизатов штаммов *E. coli* и *Y. pestis* с интактным *fra* опероном или их *cafIM* вариантов после электрофореза в денатурирующих условиях субъединицы CafI были выявлены у всех исследованных энтеробактерий (рис. 23).

На следующем этапе работы проводили сравнительную оценку процесса очистки капсульных белков с помощью однократной изоэлектрической преципитации (с предварительным удалением фракции, преципитирующей при pH 5,0-4,6) из штаммов *Y. pestis* EV, M-493 и EVpFra/pFBK7, выращенных в течение 48 ч при температуре 37 °С с использованием бифазной системы агар-бульон. Как видно из рисунка 24, даже в культуральной жидкости штамма EV антиген FI был мажорным белком, а преципитация препарата при pH  $4,05 \pm 0,05$  и

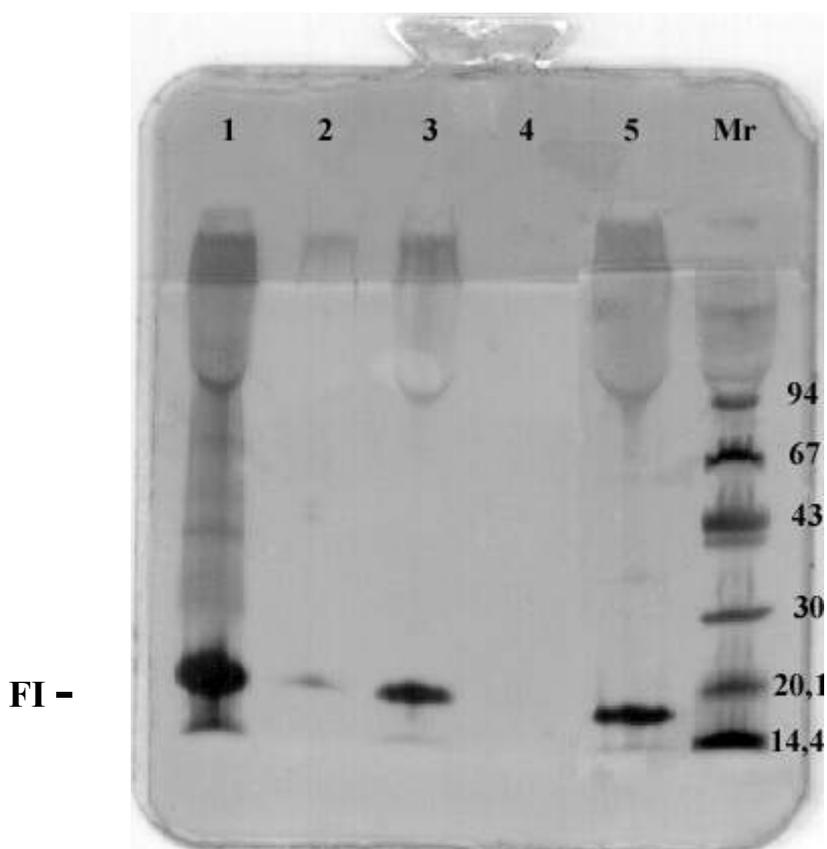


Температура культивирования указана в скобках после названия штаммов.

Треки:

- 1 - *Y. pestis* EV линии НИИЭГ (37 °С);
- 2 - *Y. pestis* EVpFra/pFBK10 (37 °С);
- 3 - *Y. pestis* EVpFra/pFBK7 (37 °С);
- 4 - *E. coli* HB101pFBK7 (37 °С);
- 5 - *Y. pestis* EVpFra/pFBK10 (28 °С);
- 6 - *Y. pestis* EVpFra/pFBK7 (28 °С);
- 7 - *E. coli* HB101pFBK7 (28 °С).

Рисунок 23. – Иммуноблотинг клеточных лизатов штаммов *Y. pestis* и *E. coli*, образующих различные сероварианты капсулы, с кроличьей поликлональной моноспецифичной сывороткой к типичному антигену F1.



Бактериальные клетки культивировали с использованием бифазной системы агар-бульон 48 ч при температуре 37 °С.

Электрофорез проводили в аппарате "Phast System" (Pharmacia LKB) в течение 90 мин при 120 В в 12,5 % ПААГ в денатурирующих условиях в присутствии SDS и β-меркаптоэтанола. Окрашивание геля серебром.

Треки:

1 – культуральная жидкость;

2 – супернатант после изоэлектрической преципитации (при pH 4,05±0,05) белков из культуральной жидкости;

3 – раствор преципитата белков в 0,02 М фосфатном буфере (pH 7,2);

4 – супернатант после "высаливания" сульфатом аммония (40 % насыщения) раствора преципитата белков в 0,02 М фосфатном буфере (pH 7,2);

5 - раствор "высоленных" белков в 0,02 М фосфатном буфере (pH 7,2);

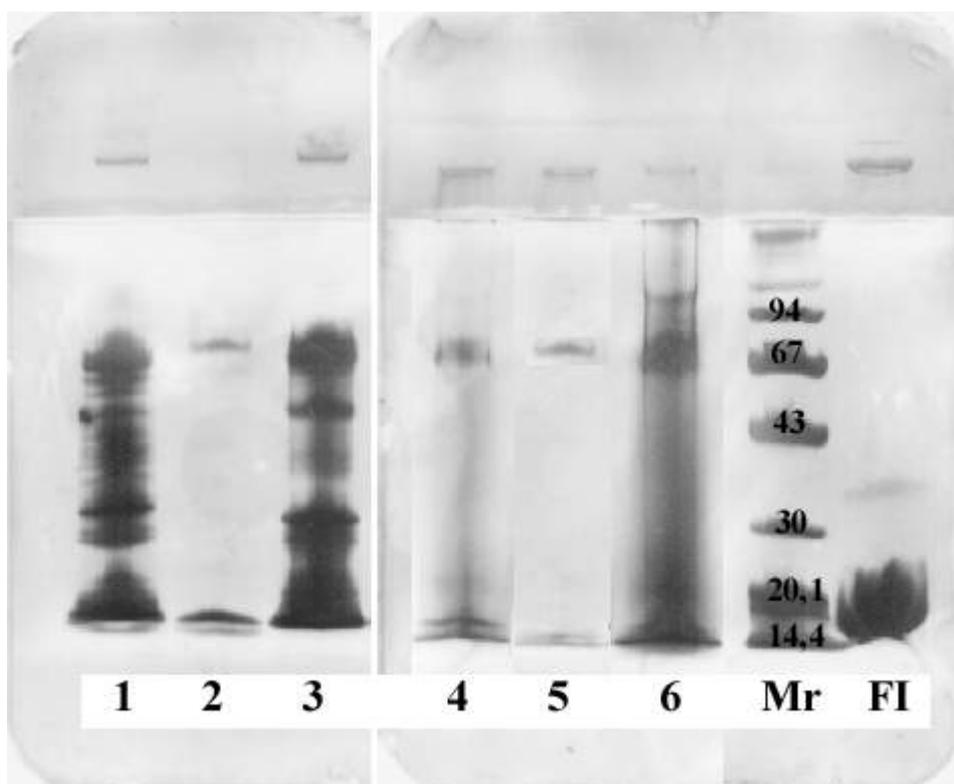
Mr – белки маркеры молекулярных масс (молекулярная масса маркерных белков в килодальтонах).

Рисунок 24. – Электрофоретический анализ белков в процессе выделения из типичного по продукции капсульного антигена FI штамма *Y. pestis* EV

последующее "высаливание" сульфатом аммония не приводили к принципиальным изменениям электрофоретической картины. Следует отметить, что при "проявлении" гелей с препаратами не серебром, а Кумасси R250 на электрофореграммах окрашивалась только полоса, соответствующая субъединичной форме Caf1. Рисунок 25 свидетельствует, что изоэлектрическая преципитация культуральной жидкости штаммов M-493 и EVpFra/pFBK7 также не приводила к значительному изменению белкового состава препаратов до и после "очистки".

Более тщательный электрофоретический анализ белков капсулы различных штаммов *Y. pestis* показал, что мажорные белки, выделенные из двух атипичных штаммов (231pFra/pFBK10 и M-493), обладали электрофоретической подвижностью, превышающей таковую "классического" антигена FI и совпадающей с подвижностью рН6 антигена (рис. 26). Иммуноблотинг белков капсулы, выделенных из вышеуказанных штаммов, подтвердил, что в отличие от бактерий "дикого" типа два изученных нами атипичных штамма образовывали капсулы, основной составляющий компонент которых был представлен рН6 антигеном. В препарате, выделенном из штамма EVpFra/pFBK7, мажорный белок обладал электрофоретической подвижностью примерно соответствующей таковой белка – маркера с молекулярной массой 67 kDa. Реакции этого мажорного белка с антителами к FI или рН6 антигенам выявлено не было.

На следующем этапе исследования проводили электрофоретический анализ суммарных секретируемых белков *Y. pestis*, полученных осаждением из культуральной жидкости этанолом. В эксперименте использовали бактериальные культуры, предварительно выращенные в течение 24 ч при температуре 28 °С в 30 мл бульона Хоттингера (рН 5,8, 7,2 или 8,0), а затем культивированные в течение 24 ч при температуре 37 °С с использованием бифазной системы агар-бульон Хоттингера (рН 5,8, 7,2 или 8,0).<sup>81</sup> Наиболее выраженные различия "протеинограмм" секретируемых белков выявлены между препаратами, выделенными из различных штаммов, но белковые профили зависели и от рН среды культивирования



Бактериальные клетки культивировали с использованием бифазной системы агар-бульон 48 ч при температуре 37 °С.

Электрофорез проводили в аппарате "Phast System" (Pharmacia LKB) в течение 90 мин при 120 В в 12,5 % ПААГ в денатурирующих условиях в присутствии SDS и β-меркаптоэтанола. Окрашивание геля серебром.

Треки:

1 – культуральная жидкость (EVpFra/pFBK7);

2 – супернатант после изоэлектрической преципитации (при pH 4,05±0,05) белков из культуральной жидкости (EVpFra/pFBK7);

3 – раствор преципитата белков в 0,02 М фосфатном буфере (pH 7,2) (EVpFra/pFBK7);

4 – культуральная жидкость (M-493);

5 – супернатант после изоэлектрической преципитации (при pH 4,05±0,05) белков из культуральной жидкости (M-493);

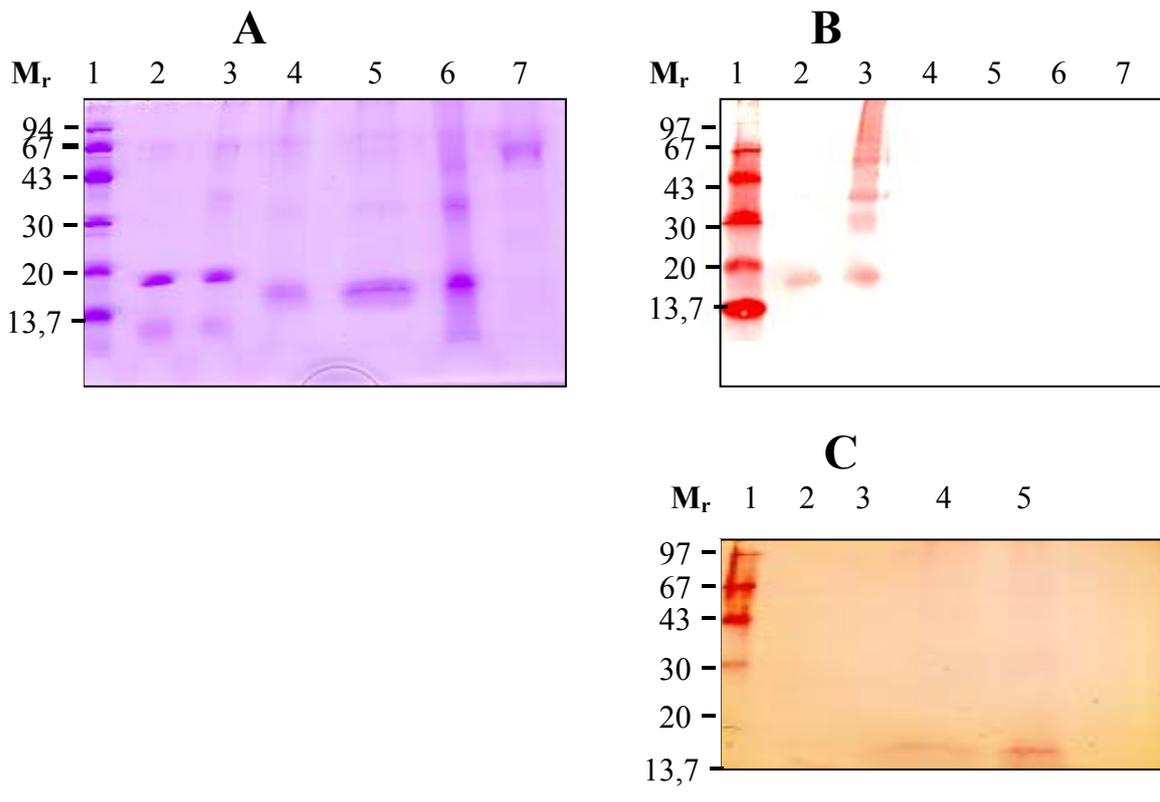
6 – раствор преципитата белков в 0,02 М фосфатном буфере (pH 7,2) (M-493);

Mr – белки маркеры молекулярных масс (молекулярная масса маркерных белков в килодальтонах).

FI – препарат капсульного антигена FI.

**Рисунок 25. – Электрофоретический анализ белков в процессе выделения из атипичных штаммов *Y. pestis* EVpFra/pFBK7 и M-493**

<sup>81</sup> В данном эксперименте, в отличие от предыдущих, проводили контроль pH использованных питательных сред.



**А** – электрофоретический анализ белков капсулы различных штаммов *Y. pestis*.

Электрофорез проводили в аппарате mini-Protean (Bio-Rad) в течение 90 мин при 120 В в 12,5 % ПААГ в денатурирующих условиях в присутствии SDS и  $\beta$ -меркаптоэтанола. Окрашивание геля красителем Кумасси R250.

**В** – иммуноблотинг белков капсулы различных штаммов *Y. pestis* с моноспецифическими IgG против рекомбинантного белка Caf1.

**С** – иммуноблотинг белков капсулы различных штаммов *Y. pestis* с моноспецифической сывороткой против рекомбинантного рН6 антигена.

После проведения электрофореза в 12,5 % ПААГ белки из геля переносили на мембрану Z-probe (Bio-Rad) в аппарате mini-Trans-Blot (Bio-Rad) в течение 45 мин при 250 мА при температуре 20 °С.

Треки:

1 – белки маркеры молекулярных масс;

2 – рекомбинантный белок Caf1, выделенный из культуральной жидкости штамма *E. coli* HB101pFS2;

3 – материал капсулы, полученный из вакцинного штамма *Y. pestis* EV;

4 – материал капсулы, полученный из штамма *Y. pestis* 231pFra/pFBK10;

5 – материал капсулы, полученный из штамма *Y. pestis* M-493;

6 – рекомбинантный рН6 антиген, выделенный из культуральной жидкости штамма *E. coli* JM83pIG824;

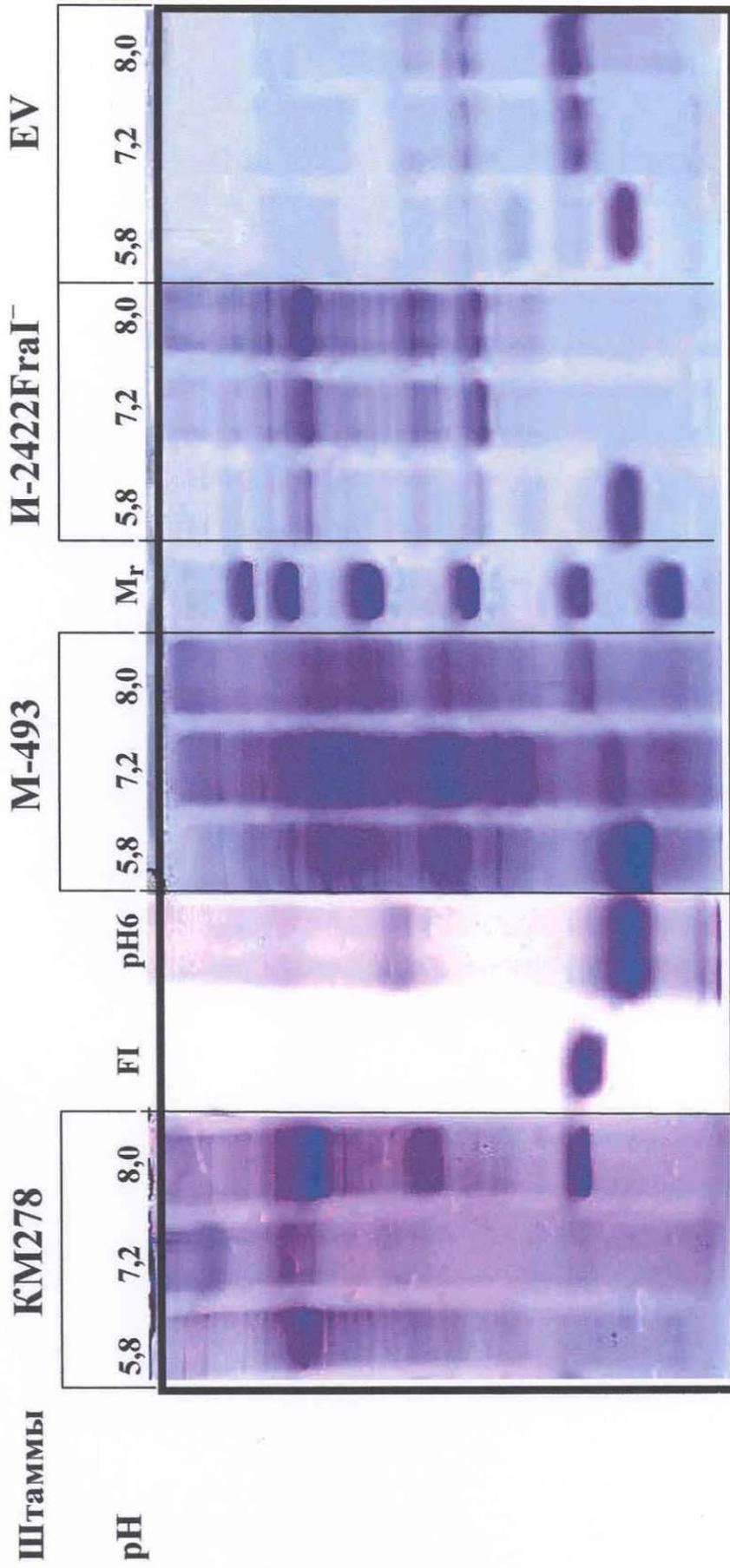
7 – материал капсулы, полученный из вакцинного штамма *Y. pestis* EVpFra/pFBK7.

$M_r$  – молекулярная масса белков в килодальтонах.

**Рисунок 26. – Электрофоретический анализ и иммуноблотинг с кроличьей поликлональной моноспецифической сывороткой к типичному антигену FI или рН6 антигену белков капсулы различных штаммов *Y. pestis*, выделенных с помощью изоэлектрической преципитации**

(рис. 27). Иммуноблотинг капсульных белков, выделенных из вышеуказанных штаммов, показал, что тестируемые количества рН6 антигена образовывались всеми исследованными штаммами кроме рН6<sup>-</sup> варианта КМ278, но только при кислых значениях рН (5,8) среды (рис. 28). Реакция исследованных препаратов с моноспецифическими IgG против типичного капсульного антигена *Y. pestis* выявлена только у штаммов КМ278 и EV, причем наибольшая продукция FI отмечена при рН 8,0 (рис. 29). Иммуноблотинг препаратов суммарных секретлируемых белков с использованием сыворотки против белков S-слоя *Y. pestis* выявил указанные белки в препаратах из штаммов М-493 и И-2422FraГ, причем в штамме М-493 обнаружили относительно большее содержание субъединицы с молекулярной массой несколько более 30 kDa, а в штамме И-2422FraГ - менее 67 kDa (рис. 30).

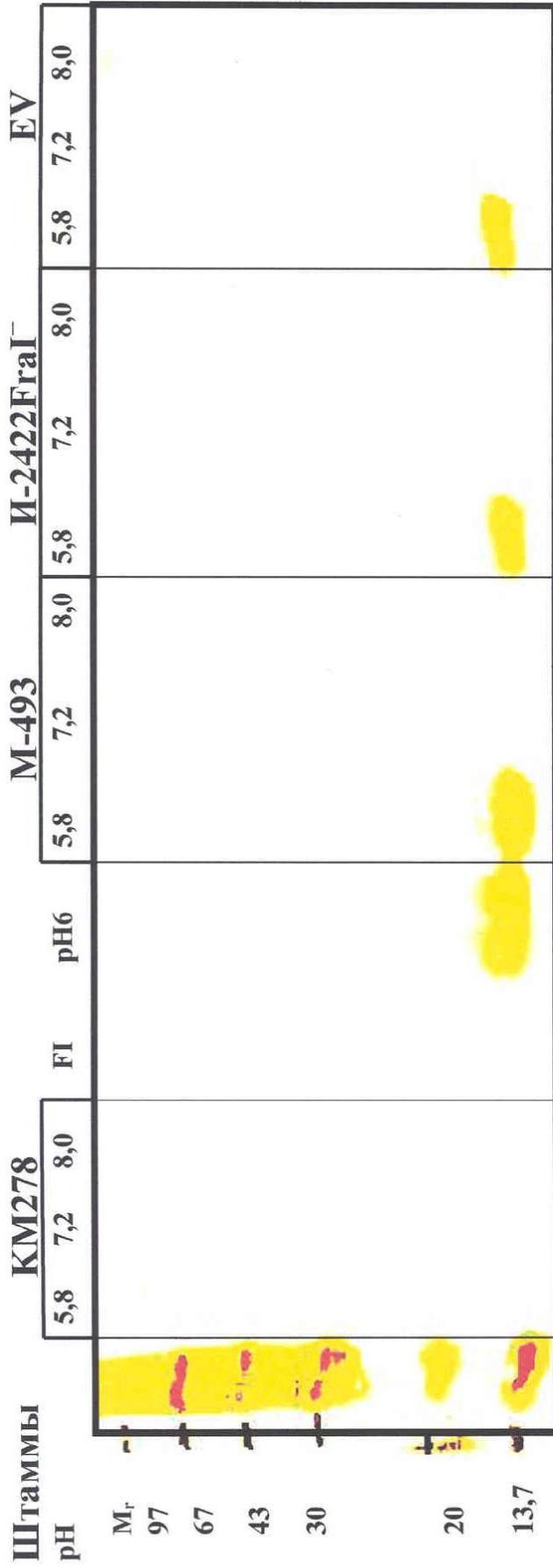
Следующим этапом исследования было выявление с помощью иммуноэлектронной микроскопии в составе типичной и атипичных вариантов капсул компонентов, идентифицированных с помощью иммуноблотинга в препаратах суммарных секретлируемых белков. Результаты этих экспериментов, представленные на рисунках 31-38 и в таблице 11, свидетельствуют, что иммуноэлектронная микроскопия является более чувствительным методом выявления антигенов, чем иммуноблотинг. Так, клетки взятого в качестве контроля штамма *E. coli* JM83pIG824, выращенного при температуре 37 °С и рН 5,8, были способны образовывать отчетливо видимую капсулу (рис. 36), а бактерии, культивируемые при температуре 37 °С но рН 7,2, были бескапсульными, но к их поверхности присоединялись антитела к рН6 антигену (рис. 37). Клетки реципиентного штамма *E. coli* JM83 не образовывали видимую капсулу и не реагировали с антителами к рН6 антигену. В клетках же исследованных штаммов *Y. pestis* капсулы присутствовали при выращивании культур при различных значениях рН. Зависимость количества связавшихся с бактерией антител к рН6 антигену от среды была следующей рН5,8 > рН 7,2 > рН 8,0 (рис. 33-34, табл. 11). В то же время продукцию рН6 антигена с помощью иммуноблотинга удавалось регистрировать лишь в клетках выращенных



FI - очищенный капсульный белок FI, выделенный из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *E. coli* HB101pFS2.  
 рН6 - очищенный рН6 антиген, выделенный из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *E. coli* HB101pIG824.

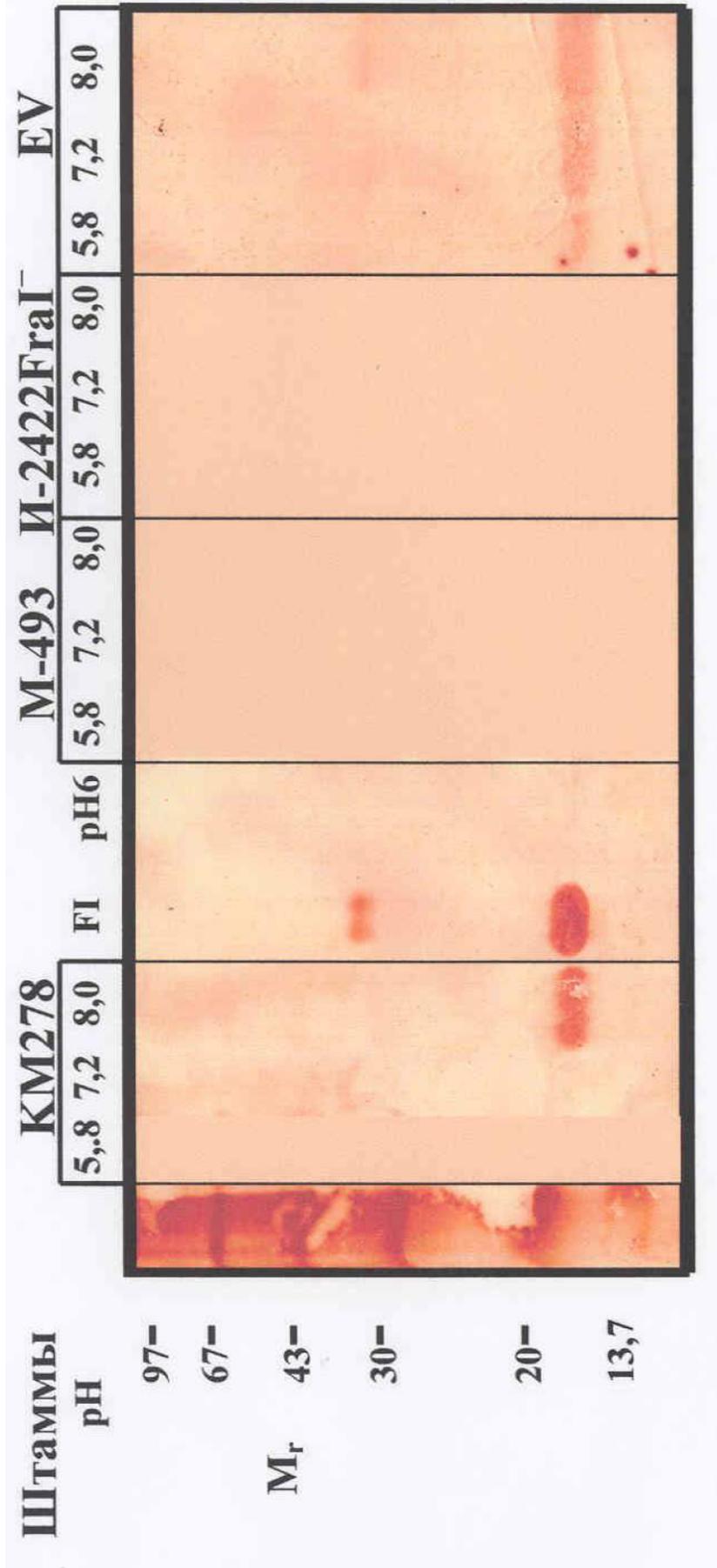
M<sub>r</sub> - белки-маркеры молекулярных масс (94, 67, 43, 30, 20 и 13,7 kDa).

Рисунок 27. Электрофоретический анализ препаратов суммарных секретируемых белков различных штаммов *Y. pestis*, выращенных при различных значениях рН при температуре 37 °С



FI - очищенный капсульный белок FI *Y. pestis*, выделенный из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *E. coli* HB101pFS2.  
 pH6 - очищенный pH6 антиген *Y. pestis*, выделенный из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *E. coli* HB101pIG824.  
 M<sub>r</sub> - биотинилированные белки-маркеры молекулярных масс (97, 67, 43, 30, 20 и 13,7 kDa).

**Рисунок 28. Иммуноблотинг препаратов суммарных секретируемых белков различных штаммов *Y. pestis*, выращенных при различных значениях pH, с использованием сыворотки против pH6 антигена *Y. pestis***

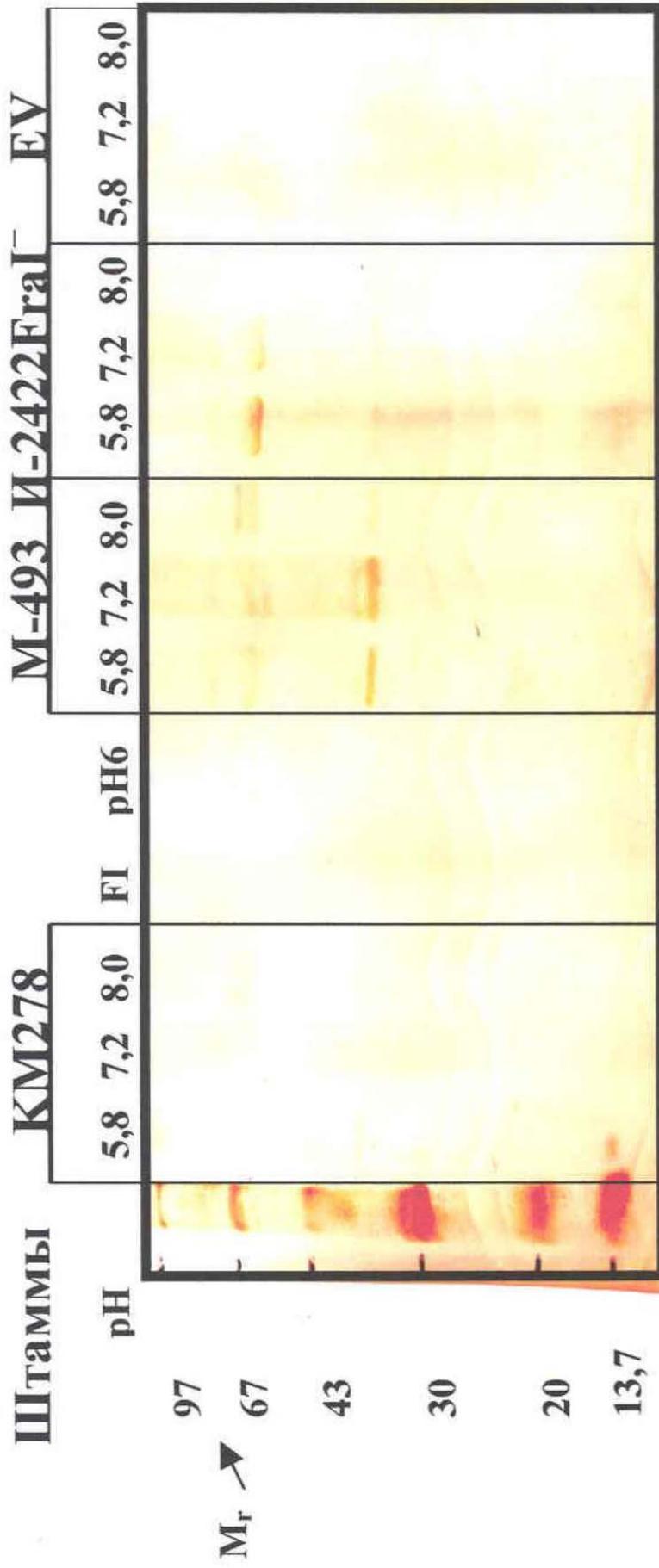


FI - очищенный капсульный белок *Y. pestis*, выделенный из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *E. coli* HB101pFS2

рН6 - очищенный рН6 антиген *Y. pestis*, выделенный из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *E. coli* HB101pIG824

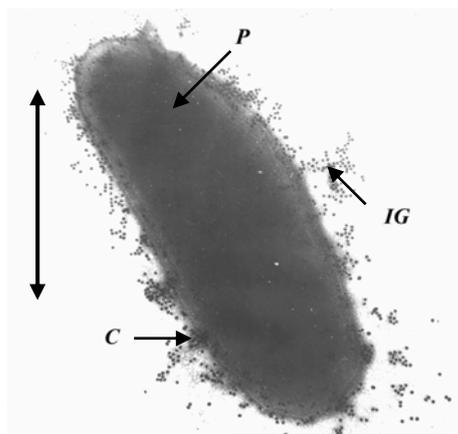
M<sub>r</sub> - биотинилированные белки-маркеры молекулярных масс (97, 67, 43, 30, 20 и 13,7 kDa)

Рисунок 29. Иммуноблоттинг препаратов суммарных секретируемых белков различных штаммов *Y. pestis*, выращенных при различных значениях рН, с использованием моноспецифических IgG против СаI антигена *Y. pestis*



FI - очищенный капсульный белок FI *Y. pestis*, выделенный из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *E. coli* HB101pFS2  
 рН6 - очищенный рН6 антиген *Y. pestis*, выделенный из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *E. coli* HB101pIG824  
 $M_r$  - биотинилированные белки-маркеры молекулярных масс (97, 67, 43, 30, 20 и 13,7 kDa)

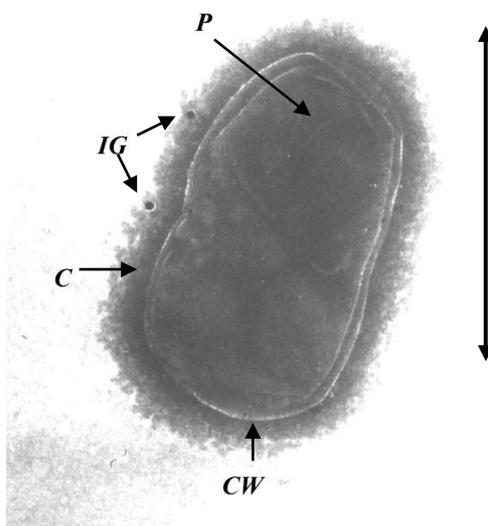
Рисунок 30. Иммуноблоттинг препаратов суммарных секретируемых белков различных штаммов *Y. pestis*, выращенных при различных значениях рН, с использованием сыворотки против белков S-слоя *Y. pestis*



Негативное контрастирование. Размер масштабной линейки - 1 мкм. Бактерии выращивали 48 ч при температуре 37 °С (рН 7,2).

*P* - протоплазма (protoplasm). *C* - капсула (capsule). *IG* - мышинные моноклональные антитела к FI и конъюгат белка А с коллоидным золотом (immunogold).

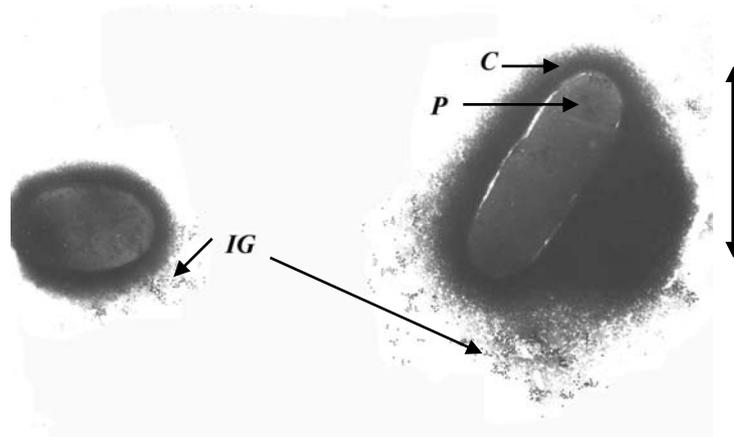
Рисунок 31. Иммуноэлектронная микрофотография единичной клетки штамма *Y. pestis* 231.



Негативное контрастирование. Размер масштабной линейки - 1 мкм. Бактерии выращивали 48 ч при температуре 37 °С (рН 7,2).

*P* - протоплазма (protoplasm). *CW* - клеточная стенка (cell wall). *C* - капсула (capsule). *IG* - мышинные моноклональные антитела к FI и конъюгат белка А с коллоидным золотом (immunogold).

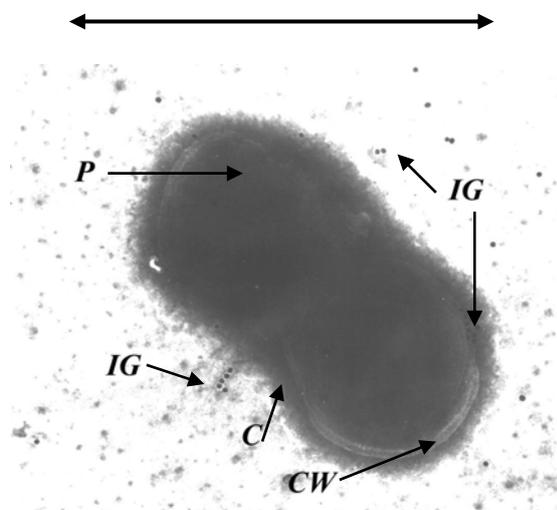
Рисунок 32. Иммуноэлектронная микрофотография единичной клетки штамма *Y. pestis* 231pFra/pFBK10.



Негативное контрастирование. Размер масштабной линейки - 1 мкм. Бактерии выращивали 48 ч при температуре 37 °С (рН 5,8).

*P* - протоплазма (protoplasm). *C* - капсула (capsule). *IG* - кроличьи поликлональные моноспецифичные антитела к рН6 антигену, конъюгированные с коллоидным золотом (immunogold).

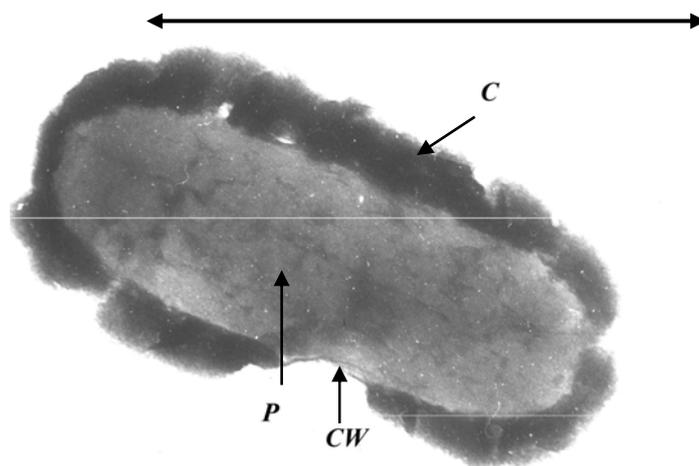
Рисунок 33. Иммуноэлектронная микрофотография двух клеток штамма *Y. pestis* 231pFra/pFBK10.



Негативное контрастирование. Размер масштабной линейки - 1 мкм. Бактерии выращивали 48 ч при температуре 37 °С (рН 8,0).

*P* - протоплазма (protoplasm). *CW* - клеточная стенка (cell wall). *C* - капсула (capsule). *IG* - кроличьи поликлональные моноспецифичные антитела к рН6 антигену, конъюгированные с коллоидным золотом (immunogold).

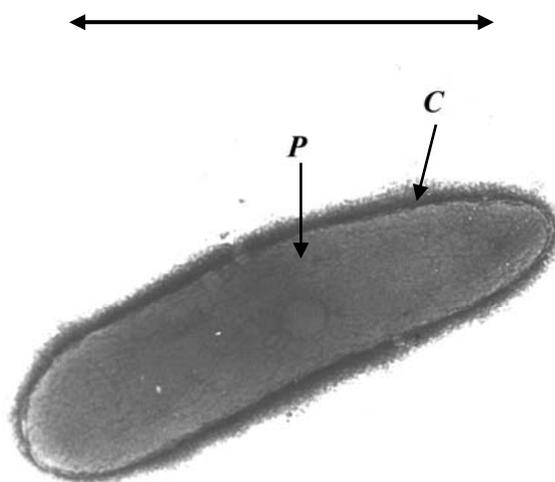
Рисунок 34. Иммуноэлектронная микрофотография единичной клетки штамма *Y. pestis* И-2422FraГ.



Негативное контрастирование. Размер масштабной линейки - 1 мкм. Бактерии выращивали 48 ч при температуре 37 °С (рН 5,8).

*P* - протоплазма (protoplasm). *CW* - клеточная стенка (cell wall). *C* - капсула (capsule). Кроличьи поликлональные моноспецифичные антитела к рН6 антигену, конъюгированные с коллоидным золотом, не взаимодействуют с капсулой бактерии.

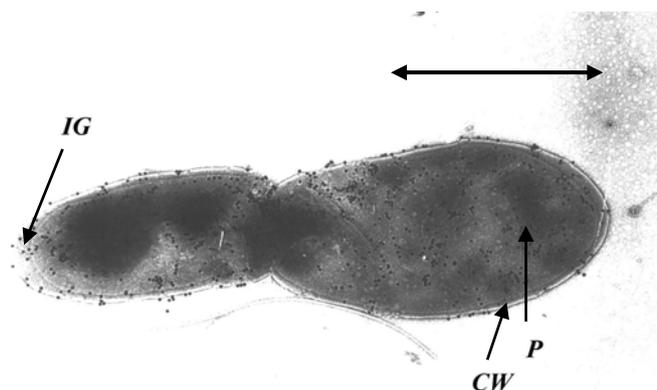
Рисунок 35. Иммуноэлектронная микрофотография единичной клетки штамма *Y. pestis* KM278.



Негативное контрастирование. Размер масштабной линейки - 1 мкм. Бактерии выращивали 24 ч при температуре 37 °С (рН 5,8).

*P* - протоплазма (protoplasm). *C* - капсула (capsule).

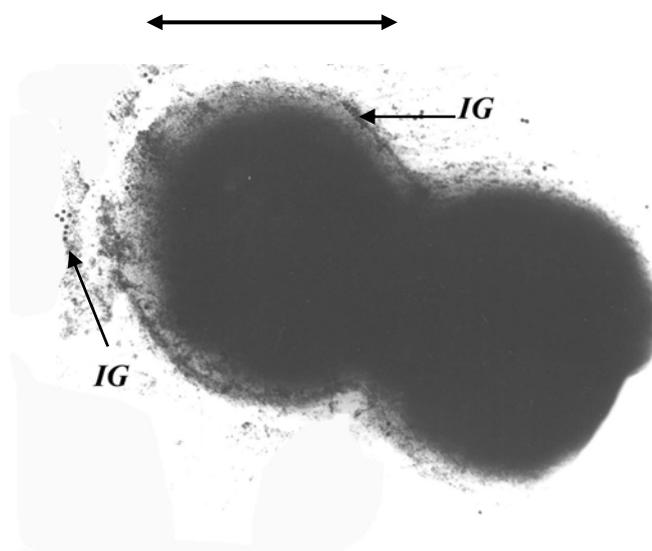
Рисунок 36. Электронная микрофотография единичной клетки штамма *E. coli* JM83rIG824.



Негативное контрастирование. Размер масштабной линейки - 1 мкм. Бактерии выращивали 24 ч при температуре 37 °С (рН 7,2).

*P* - протоплазма (protoplasm). *CW* - клеточная стенка (cell wall). *C* - капсула (capsule). *IG* - кроличьи поликлональные моноспецифичные антитела к рН6 антигену, конъюгированные с коллоидным золотом (immunogold).

Рисунок 37. Иммуноэлектронная микрофотография двух клеток штамма *E. coli* JM83pIG824.



Негативное контрастирование. Размер масштабной линейки - 1 мкм. Бактерии выращивали 48 ч при температуре 37 °С (рН 7,2).

*IG* - кроличьи поликлональные моноспецифичные антитела к белкам S-слоя, конъюгированные с коллоидным золотом (immunogold).

Рисунок 38. Иммуноэлектронная микрофотография делящейся клетки штамма *Y. pestis* EVpFra/pFBK7.

при рН 5,8 (рис. 28). Клетки рН6<sup>-</sup> штамма *Y. pestis* KM278 образовывали отчетливо видимую капсулу, но не реагировали с антителами к рН6 антигену (рис. 35).

Таблица 11. Результаты иммуноэлектронномикроскопического анализа

исследованных штаммов энтеробактерий, выращенных при температуре 37 °С

Штаммы	Реакция капсулы или поверхности клеток с антителами к					Наличие капсулы		
	FI	рН6			белкам S-слоя			
	рН 7,2	рН 5,8	рН 7,2	рН 8,0	рН 7,2	рН 5,8	рН 7,2	рН 8,0
<b><i>Y. pestis</i></b>								
EV	+ <sup>82</sup>	+	+	+/- <sup>83</sup>	НД	<u>есть</u>	<u>есть</u>	<u>есть</u>
EVpFra/pFS23	-	НД	НД	НД	НД	НД	нет	НД
EVpFra/pFBK7	+/- <sup>84</sup>	НД	НД	НД	+/-	НД	<u>есть</u>	НД
EVpFra/pFBK10	+/-	НД	НД	НД	НД	НД	<u>есть</u>	НД
231	+	+	+	+/-	НД	<u>есть</u>	<u>есть</u>	<u>есть</u>
KM278	НД	-	-	-	НД	<u>есть</u>	<u>есть</u>	<u>есть</u>
231pFra/pFBK7	+/-	НД	НД	НД	НД	НД	<u>есть</u>	НД
231pFra/pFBK10	+/-	+	+	+	НД	<u>есть</u>	<u>есть</u>	<u>есть</u>
231pFra/pFS23	-	НД	НД	НД	НД	НД	нет	НД
M-493	НД	+	+	+	НД	<u>есть</u>	<u>есть</u>	<u>есть</u>
И-2422FraI <sup>-</sup>	НД	+	+	+	НД	<u>есть</u>	<u>есть</u>	<u>есть</u>
<b><i>E. coli</i></b>								
JM83	НД	-	НД	НД	НД	нет	НД	НД
JM83pIG824	НД	+	+	+/-	НД	<u>есть</u>	нет	нет

При исследовании с помощью антител к FI клеток возбудителя чумы, выращенных при температуре 37 °С и рН 7,2, показано, что антитела реагируют с Fra<sup>+</sup> (рис. 31), но не с Fra<sup>-</sup> (картина аналогичная представленной на рис. 15) бактериями. На поверхности одной из 10-20 микробных клеток *cafIM* мутантов *Y. pestis* выявляли единичные частицы коллоидного золота (рис. 32).

<sup>82</sup> "+" – на поверхности каждой микробной клетки видно несколько от нескольких десятков до полутора-двух сотен частиц коллоидного золота.

<sup>83</sup> "+/-" – на поверхности каждой микробной клетки видно от двух-трех до 10-15 частиц коллоидного золота.

<sup>84</sup> "+/-" – на поверхности одной из 10-20 микробных клеток встречаются единичные частицы коллоидного золота.

## 5.6. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ ШТАММОВ *Y. pestis*, ОБЛАДАЮЩИХ АТИПИЧНЫМИ КАПСУЛАМИ, С ИХ ИЗОГЕННЫМИ "КЛАССИЧЕСКИМИ" И БЕСКАПСУЛЬНЫМИ ВАРИАНТАМИ

Определение основных фенотипических характеристик исследованных Caf1M<sup>-</sup> штаммов *Y. pestis* 231pFra/pFBK7 и 231pFra/pFBK10, прошедших предварительную "анимализацию", показало, что они отличались от исходного варианта 231 только по серологической специфичности образуемых капсул. Мутация по гену *caf1M* не отразилась на проявлении культуральных, биохимических свойств, питательных потребностях, кальцийзависимости, пестициногенности, фибринолитической и плазмокоагулазной активностях, пигментсорбции, способности синтезировать V и рН6 антигены, чувствительности к диагностическим фагам. Аналогичными свойствами обладал и "природный" изолят *Y. pestis* М-493.

Вирулентность штаммов определяли при внутрибрюшинном заражении белых мышей суспензиями двухсуточных агаровых культур, приготовленных в изотоническом растворе хлорида натрия. Часть мышей за 21 сут до заражения иммунизировали подкожно вакцинным штаммом EV линии НИИЭГ в дозе  $10^5$  КОЕ на животное. Данные о вирулентности исследованных штаммов чумного микроба с типичной (231) и серологически атипичной капсулой (231pFra/pFBK7, 231pFra/pFBK10), а также их изогенного бескапсульного варианта (231pFra/pFS23) представлены в таблице 12. Здесь же приведены полученные в отдельном опыте результаты определения вирулентности и "природного" изолята *Y. pestis* М-493.

Следует отметить, что хотя вирулентность штаммов с атипичной капсулой для интактных животных несколько снижена, их величины LD<sub>50</sub> для иммунных мышей были на 1-3 порядка ниже, чем аналогичные показатели у исходного штамма "дикого" типа. По своей способности преодолевать иммунитет они были близки к бескапсульному штамму 231pFra/pFS23.

Следующим этапом настоящего раздела исследований являлась оценка иммуногенной активности различных серовариантов капсульных белков в отношении *caf1M* штамма

*Y. pestis* 231pFra/pFBK10. Напряженность противочумного иммунитета оценивали на группе белых мышей, иммунизированных за 21 сут до заражения препаратами этих антигенов<sup>85</sup> (без адьювантов) в дозе 15 мкг белка на животное (табл. 13). Оказалось, что использованные иммунизирующие дозы препаратов четырех сероваров капсульных белков не обеспечивали значимого уровня защиты.

Таблица 12. **Результаты заражения интактных и иммунизированных вакцинным штаммом EV белых мышей исследуемыми штаммами возбудителя чумы**

Штаммы <i>Y. pestis</i>	Показатели LD <sub>50</sub> (КОЕ)		ИИ	Средние сроки жизни (сут)	
	интактные	иммунные		интактные	иммунные
231	<b>13</b> (1 - 35)	<b>1,7×10<sup>5</sup></b> (5,3×10 <sup>4</sup> – 5,3×10 <sup>5</sup> )	<b>13077</b>	<b>6,0</b>	<b>6,0</b>
231pFra/pFS23	<b>18</b> (4 - 65)	<b>900</b> (280 – 2,8×10 <sup>3</sup> )	<b>50</b>	<b>7,6</b>	<b>5,3</b>
231pFra/pFBK7	<b>39</b> (11 - 142)	<b>1,2×10<sup>4</sup></b> (3,9×10 <sup>3</sup> – 3,9×10 <sup>4</sup> )	<b>308</b>	<b>5,7</b>	<b>7,8</b>
231pFra/pFBK10	<b>200</b> (55 - 730)	<b>320</b> (64 - 800)	<b>1,6</b>	<b>8,7</b>	<b>6,5</b>
M-493	<b>70</b> (14-444)	<b>686</b> (137-4,3×10 <sup>3</sup> )	<b>9,8</b>	<b>6,1</b>	<b>7,2</b>

Таблица 13. **Напряженность иммунитета, обеспечиваемая препаратами капсульных белков различных сероваров в отношении штамма *Y. pestis* 231pFra/pFBK10**

Штаммы <i>Y. pestis</i> - источники выделения белков	Серовар	Показатели LD <sub>50</sub> (КОЕ)	Продолжительность жизни ни погибших мышей (сут)	ИИ
EV НИИЭГ	<b>FI</b>	<b>100</b> (25-316)	<b>7,0</b>	<b>1,3</b>
EV11MpFBK10	<b>FI-1</b>	<b>1000</b> (316-3162)	<b>7,8</b>	<b>12,7</b>
EVpFra/pFBK10	<b>FI-2</b>	<b>562</b> (178-1778)	<b>8,0</b>	<b>7,1</b>
231pFra/pFBK10	<b>FI-3</b>	<b>237</b> (75-750)	<b>9,1</b>	<b>3,0</b>
Контроль	–	<b>79</b> (16-398)	<b>9,0</b>	–

Низкая иммуногенная активность всех исследованных сероваров капсульного антигена в отношении штамма 231pFra/pFBK10 предопределила наши попытки повысить эффективность иммунизации именно антигеном FI-3 серовара, свойственным заражающему штам-

<sup>85</sup> Использовали препараты, полученные после двукратной изоэлектрической преципитации.

му. Для этого использовали два подхода: 1) конъюгирование антигена с адъювантом полисахаридной природы; 2) использование цельноклеточной убитой вакцины, приготовленной на основе заражающего штамма.

1) Оценивали протективность препарата капсульного антигена, выделенного из штамма 231pFra/pFBK10, и двух вариантов приготовленной на его основе "химической" вакцины, отличающихся различным содержанием конъюгированного с капсульным антигеном гликолипида Re-хемотипа. Подобная "химическая" вакцина, приготовленная на основе "классического" капсульного антигена, превосходила по протективности живую чумную вакцину в отношении типичного штамма 231 [314]. Для получения "химических" экспериментальных вакцин капсульный антиген, выделенный из штамма 231pFra/pFBK10, комплексировали с МФЛА, полученным по A.G. Johnson *et al.* [470], в присутствии триэтиламина. МФЛА получали из гликолипида хемотипа Re, выделенного по С.Н. Chen *et al.* [405] из штамма *S. minnesota* R595. Тремя указанными препаратами однократно иммунизировали мышей в дозах от 10 до 80 мкг белка на одно животное, дозы МФЛА в "химических" вакцинах - 2,5-20 мкг на одно животное.

2) В опытах по оценке протективности убитой вакцины использовали "37-градусные" клетки штамма 231pFra/pFBK10, приготовленные аналогично вакцине USP [507], в дозах от  $10^3$  до  $10^8$  м.к. на животное.

Во всех опытах по оценке протективности экспериментальных вакцин величины  $ImD_{50}$  превышали максимальные исследованные дозы, что говорит о практически полном отсутствии протективного эффекта. Иммунизация мышей комплексированными с МФЛА препаратами капсульного антигена серовара FI-3 сопровождалась увеличением средней продолжительности жизни павших мышей на одни-двое суток.

## 5.7. ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У ИНТАКТНЫХ И ИММУННЫХ БЕЛЫХ МЫШЕЙ, ЗАРАЖЕННЫХ ВАРИАНТАМИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ, ОТЛИЧАЮЩИМИСЯ ПО СПОСОБНОСТИ СИНТЕЗИРОВАТЬ КАПСУЛЬНЫЙ АНТИГЕН

Чума - острое инфекционное заболевание, для которого свойственна гематогенная генерализация возбудителя. Особенности характера и динамики тканевых изменений, заключающихся в серозно-геморрагическом воспалении, переходящем в геморрагически-некротическое и гнойное, определяются способностью возбудителя чумы продуцировать ферменты агрессии и подавлять фагоцитоз [210, 318]. Один из общепризнанных антифагоцитарных факторов *Y. pestis* – это капсула, образованная капсульным антигеном FI [195, 279, 317, 328, 334, 399, 403, 437, 469, 544, 599]. В ходе настоящей работы установлено, что возбудитель чумы способен образовывать несколько серологически отличающихся вариантов капсулы, причем бескапсульные бактерии также как и микробы с атипичной капсулой способны преодолевать специфический иммунитет у мышей, индуцированный вакцинным штаммом EV (см. раздел 5.3).

Целью настоящего раздела исследований явилось сравнительное изучение на модели интактных и иммунных белых мышей патологической морфологии инфекционного процесса, вызванного изогенными штаммами чумного микроба, отличающимися по способности образовывать капсулу.

В работе были исследованы органы животных, погибших в результате заражения штаммом *Y. pestis* "дикого" типа 231 и его изогенными производными: лишенным капсулы штаммом 231pFra/pFS23 и вариантами 231pFra/pFBK7 и 231pFra/pFBK10, образующими атипичные капсулы (табл. 12).

Результаты вскрытия и гистологического исследования показали в основном однотипный характер морфологических изменений во всех группах подопытных животных, зараженных исследованными штаммами.

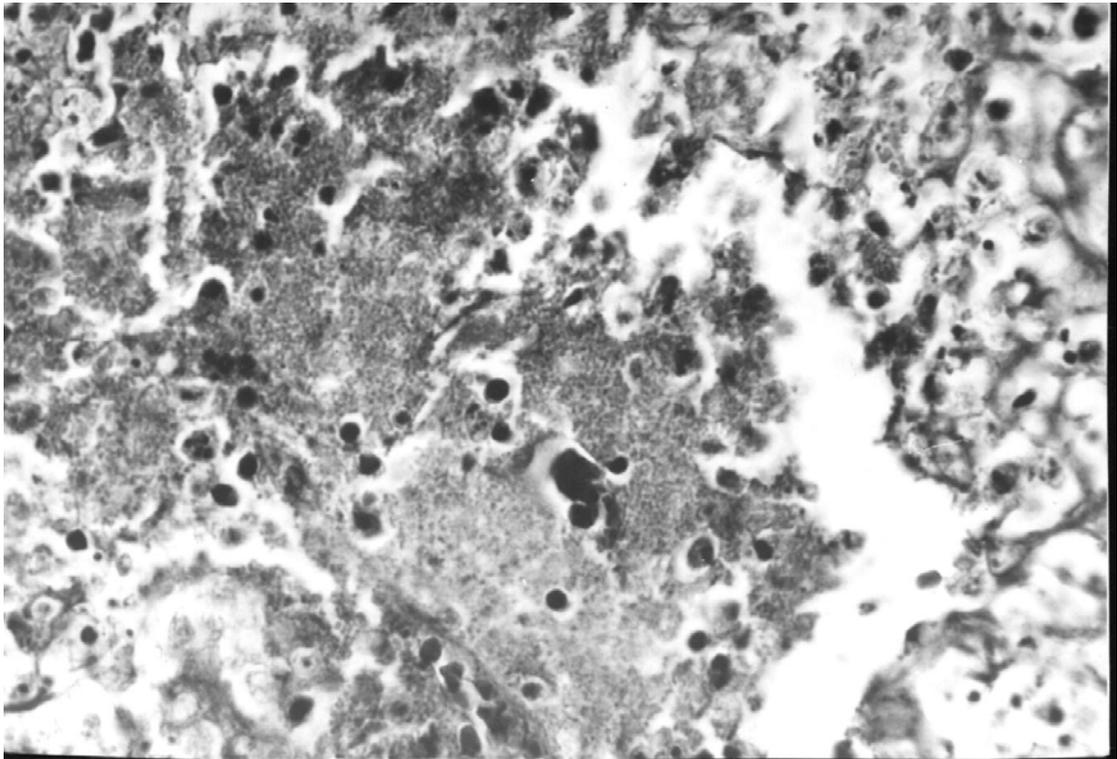
На месте введения возбудителя, макроскопически, наблюдали полнокровие и серозный отек подкожной клетчатки. Регионарные лимфатические узлы значительно увеличены в размере, темно красного цвета. Клетчатка вокруг них отечна и гиперемирована. У животных, погибших на вторые-четвертые сутки, селезенка гиперемирована, но не увеличена, в более поздние сроки гибели отмечали увеличение размеров селезенки в два-три раза. В печени и селезенке мышей, павших в поздние сроки, под капсулой и на разрезе встречали единичные серые узелки, размерами до 2 мм в диаметре. На шестые-восьмые сутки исследования у отдельных мышей в легких встречали небольшие очаги уплотнения серовато-белого и темно-красного цвета. В остальных внутренних органах наблюдали полнокровие.

При бактериологическом исследовании органов животных, павших в результате заражения любым из тестированных штаммов *Y. pestis*, бактерии высеивали из всех анализируемых внутренних органов.

Гистоморфологически в регионарных лимфоузлах мышей, зараженных исследуемыми штаммами, вслед за гиперпластическими изменениями, имевшими место в начале развития инфекционного процесса, отмечали обеднение лимфоидными клеточными элементами, частичное разрушение клеток ретикулоэндотелиальной системы.

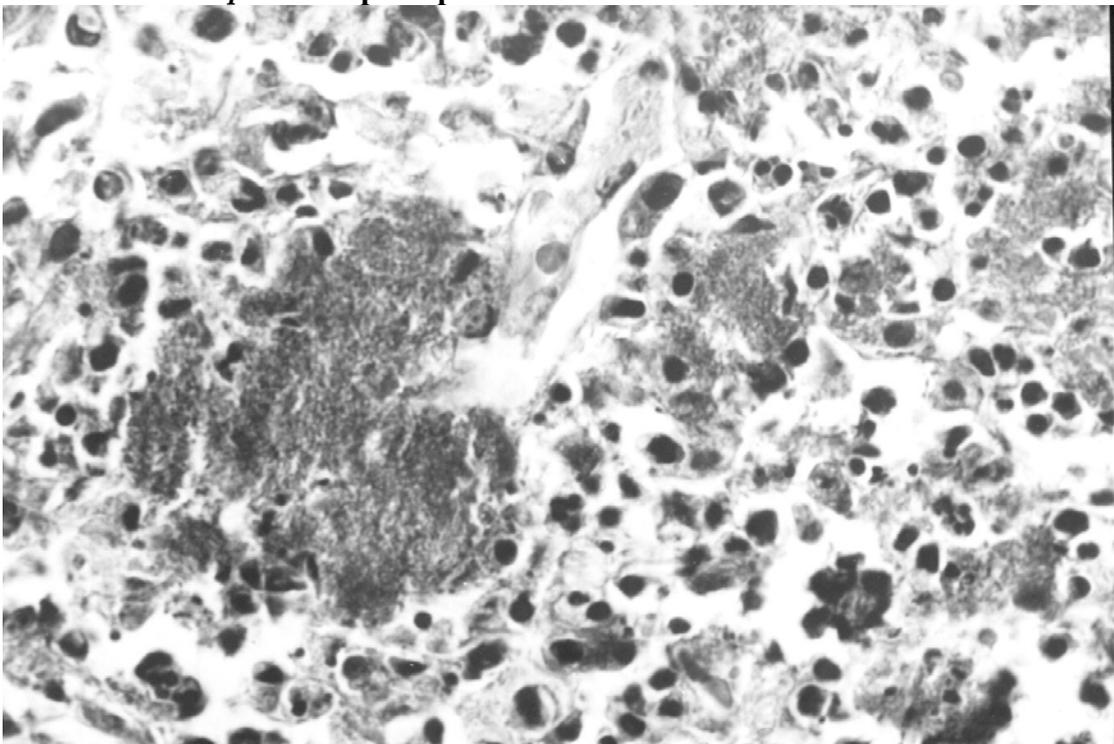
В селезенках выявлены обширные геморрагии, множественные очаговые некрозы содержали скопления микробных клеток. Белая пульпа была обеднена клеточными элементами, центры размножения лимфоцитов и фигуры митоза отсутствовали. Клетки системы мононуклеарных фагоцитов были разрушены или находились в состоянии некробиоза. Бескапсульный вариант 231pFra/pFS23 вызывал в селезенке процессы, аналогичные развивающимся после заражения штаммами, обладающими капсулами с различной серологической специфичностью. Однако деструктивное воздействие этого бескапсульного варианта, по видимому, было менее выраженным, преобладал геморрагический эффект (рис. 39).

В селезенках иммунных мышей, павших после заражения указанными штаммами, белая пульпа продолжала занимать обширные пространства, однако в ней затухали пролифера-



Колонии микробов на фоне выраженного серозного воспаления и повреждения структуры органа, некроз. Азур-эозин.  $\times 200$ .

Рисунок 39. – Микрофотография селезенки интактной белой мыши погибшей после заражения штаммом *Y. pestis* 231pFra/pFS23.



Колонии микробов на фоне выраженного серозного воспаления и повреждения структуры органа, некроз. Азур-эозин.  $\times 200$ .

Рисунок 40. – Микрофотография селезенки иммунной белой мыши погибшей после заражения штаммом *Y. pestis* 231pFra/pFS23.

тивные процессы. Было отмечено некоторое снижение числа лимфоидных клеток и распад клеток микроокружения. В красной пульпе выявлены сливающиеся зоны некроза, распад клеток мононуклеарной фагоцитарной системы, интенсивное обсеменение чумными микробами (рис. 40, 41).

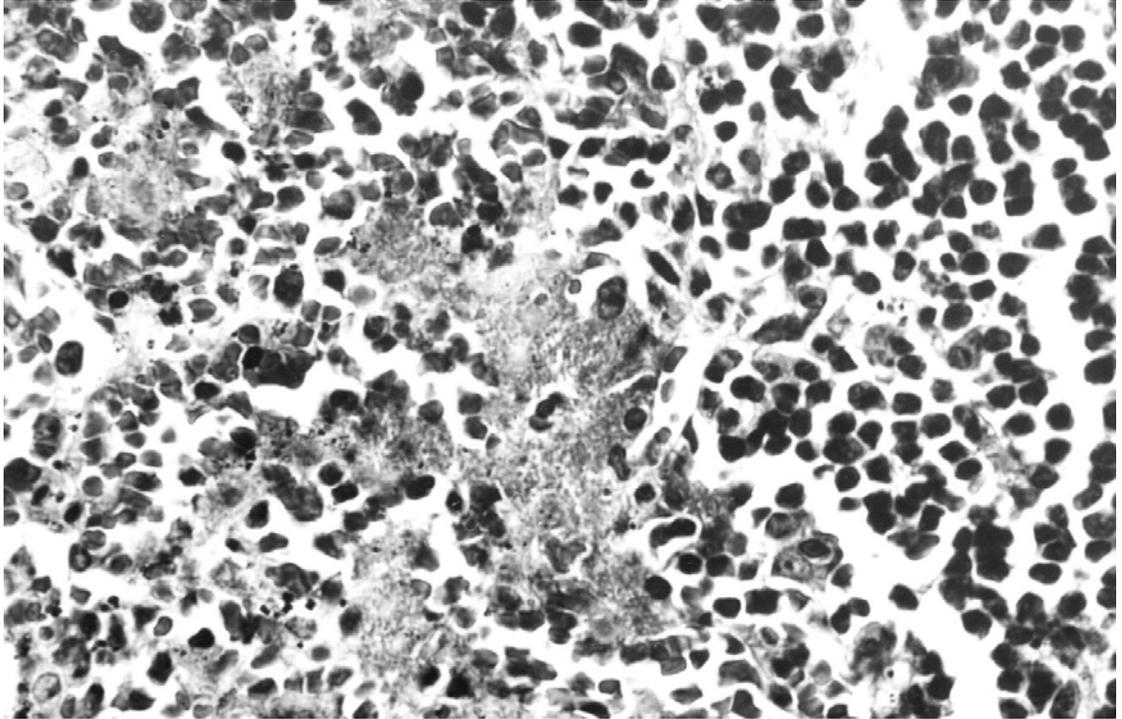
В печени мышей, инфицированных исследованными штаммами, обнаружены гранулемы, некротические массы которых содержали скопления возбудителя. В ряде случаев имели место точечные кровоизлияния, периваскулит. Скопления бактерий выявлены как в некротических массах на месте распада клеток паренхимы, так и в разрушающихся купферовских клетках, что более характерно для иммунизированных животных.

В легких погибших мышей обнаружено полнокровие кровеносных сосудов, очаги серозно-геморрагического воспаления. У животных, погибших в результате заражения штаммами 231 и 231pFra/pFBK10, имели место более глубокие повреждения в ткани легкого, некроз клеток воспалительного инфильтрата, присутствие скоплений возбудителя в продуктах распада, в просветах капилляров.

В почках и надпочечниках отмечено полнокровие кровеносных капилляров, у отдельных животных в почках - очаговые кровоизлияния.

## 5.8. ОБСУЖДЕНИЕ

К моменту начала настоящих исследований у возбудителя чумы не было выявлено серовариации, характерной для других патогенных бактерий и, в том числе, для других представителей рода *Yersinia* [120, 397, 418]. Однако экспериментальные данные П.А. Черепанова с соавт. [350] об изменении иммунохимических свойств капсульного антигена, образуемого в рекомбинантных *cafIM* клетках *E. coli*, и широкое распространение явления антигенной изменчивости у большинства изученных патогенных бактерий [136, 137, 434, 435] предопределили наш интерес к конструированию *cafIM* штаммов *Y. pestis*, определению их биологических свойств и потенциальной способности циркулировать в природных очагах чумы. Па-



Колонии микробов на фоне выраженного серозного воспаления и повреждения структуры органа, некроз. Азур-эозин.  $\times 200$ .

Рисунок 41. **Микрофотография селезенки иммунной белой мыши погибшей после заражения штаммом *Y. pestis* 231.**

параллельно с конструированием экспериментальных *cafIM* мутантов и их всесторонним изучением проводили целенаправленный поиск образующих атипичные капсулы "природных изолятов" возбудителя чумы в ГосКПБ "Микроб".

Для конструирования *cafIM* мутантов *Y. pestis* использовали способ локализованного мутагенеза, апробированный нами при получении бескапсульных штаммов *Y. pestis* (см. главу 4). С помощью интегративных плазмид pFBK7 и pFBK10 и прямой селекции *cafIM* рекомбинантов *in vivo* (в организме иммунизированных FI белых мышей) нам удалось получить высоковирулентные *cafIM* варианты *Y. pestis*, что еще раз свидетельствует о перспективности использования этого методического подхода для конструирования генетически определенных мутантов бактерий с целью последующего изучения молекулярных механизмов патогенности.

В ходе конструирования *cafIM* вариантов *Y. pestis* мы обнаружили, что только у pFra<sup>+</sup> штаммов происходит изменение культурально-морфологических свойств, выражающееся в приобретении способности к аутоагрегации. По-видимому, для реализации этого свойства необходимо взаимодействие образующих атипичную капсулу субъединиц с транслоцируемым(и) на клеточную поверхность продуктом(ами) неидентифицированных генов, расположенных именно на плазмиде pFra.<sup>86</sup> Следует напомнить, что после нескольких пассажей вирулентных экспериментальных *cafIM* штаммов *Y. pestis* на лабораторных животных выделяются культуры, сохранившие свою серологическую специфичность, но утратившие способность к аутоагрегации. Это, на наш взгляд, свидетельствует о том, что аутоагрегирующие клетки имеют меньшую жизнестойкость в организме хозяина. Снижение жизнеспособности *in vivo* может быть связано с затруднением поступления в подобные клетки питательных веществ, вызванным, скорее всего, резким увеличением гидрофобности бактерий. В пользу этого предположения, на наш взгляд, свидетельствуют культурально-морфологические особенности обладающих наибольшей способностью к аутоагрегации *cafIM* штаммов

*S. minnesota* R595 с плазмидами pFBK7 или pFBK10, жизнестойкость которых резко снижена даже *in vitro* (см. раздел 5.2).<sup>87</sup> В организме животного селективными преимуществами должны обладать мутанты, у которых рост и продукция факторов патогенности не лимитированы поступлением в клетку питательных веществ.

Выявленное на модели pFra<sup>+</sup> штаммов *Y. pestis* изменение культурально-морфологических свойств *cafIM* штаммов, проявляющееся в повышении способности бактериальных клеток к аутоагрегации, было также отмечено у других R- но не S-форм таких представителей энтеробактерий как *E. coli* и *S. minnesota*. Логично предположить, что эти различия могут быть связаны именно с особенностями строения ЛПС исследованных микроорганизмов. По данным И.А. Дятлова [131], способность к адгезии и гидрофобность клеток чумного микроба, как правило, возрастают по мере снижения заряда и поверхностной энергии клеток. Следовало ожидать, что и у наших рекомбинантных бактерий выраженная способность к аутоагрегации может сопровождаться значительным снижением  $\xi$ -потенциала. Для подтверждения этого предположения было проведено изучение электроповерхностных характеристик гибридных и исходных энтеробактерий, несущих интактный оперон *fra*, его *cafIM* вариант или лишенных этого кластера генов соответственно.

Действительно, клетки штаммов *Y. pestis* EVpFBK7, EVpFBK10 и *S. minnesota* R595pFBK7 (табл. 8) обладали значительно меньшими ЭКП, чем остальные исследованные бактерии. Значения  $\xi$ -потенциала были близки к нулю, а сила отталкивания одноименно заряженных клеток штаммов *Y. pestis* EV и *S. minnesota* R595 с плазмидами pFBK7 и pFBK10 значительно уменьшалась. Логично предположить, что это и было основной причиной, приводившей к аутоагрегации указанных вариантов рекомбинантных бактерий.

<sup>86</sup> У других исследованных энтеробактерий гомологичные гены или гены, кодирующие продукты с аналогичной функцией, должны быть, по нашему мнению, расположены на хромосоме.

<sup>87</sup> Нельзя также исключить возможности того, что наши генно-инженерные манипуляции с *fra* опероном стимулируют переход бактерий в некультивируемую форму. Так, взаимодействие ашера Caf1A в роли рецептора с интерлейкином 1 $\beta$  [608] рассматривается Ю.М. Романовой с соавт. [284] как один из этапов регуляции скорости бактериального роста.

Однако следует отметить, что, с одной стороны, клетки штамма *S. minnesota* R595pFS1 с интактным *fra* опероном, характеризовавшиеся даже меньшим ЭКП ((-1,9±0,4) мВ), чем *cafIM* бактерии *S. minnesota* R595pFBK7 ((-2,5±0,1) мВ), не обладали способностью к аутоагрегации, как и бескапсульный штамм *S. minnesota* R595pHC79 ((-54,3±0,8) мВ). С другой стороны, способные к аутоагрегации клетки *cafIM* рекомбинантных штаммов *E. coli* с Re-Ra-хемотипами гликолипида имели достаточно высокие значения  $\xi$ -потенциала – от -23,3 мВ до -51,7 мВ, сопоставимые с таковыми у их изогенных бескапсульных штаммов или вариантов с типичными капсулами. Это свидетельствует о том, что при межклеточных взаимодействиях исследованных бактерий, приводящих к аутоагрегации их клеток,  $\xi$ -потенциал не является единственным определяющим фактором.

Общепризнанно, что ЭКП бактериальных клеток отражает свойства их поверхности. Любые изменения в составе, структуре и количестве "поверхностных компонентов" могут влиять на величину  $\xi$ -потенциала. При изменениях условий культивирования могут синтезироваться новые "поверхностные компоненты", обладающие зарядом или лишенные его. Они могут влиять на ЭКП за счет своего собственного заряда или, в случае отсутствия такового, образовывать химические связи или экранировать заряженные группы, расположенные на бактериальной поверхности. Заряженные группы могут исчезнуть с клеточной поверхности в результате прекращения синтеза, перехода в раствор или ферментативного гидролиза. К значительному изменению ЭКП может привести адсорбция и закрепление на клеточной поверхности ионов из окружающей среды или, напротив, утрата этой способности [377].

На группе изогенных **бескапсульных** штаммов *E. coli*, для которых установлен состав коровых олигосахаридов редуцированного в различной степени ЛПС [560], была выявлена корреляция изменения величин  $\xi$ -потенциала бактериальных клеток с изменением структуры их ЛПС. Логично предположить, что отрицательные заряды этих поверхностно расположенных биополимеров будут вносить существенный вклад и в формирование ЭКП клеток энте-

робактерий, обладающих типичными или атипичными капсулами. Однако наличие на клеточной поверхности *E. coli* типичной капсулы возбудителя чумы сопровождалось снижением и выравниванием значений ЭКП реципиентных клеток кишечной палочки. В экспериментах на авирулентных штаммах *Y. pestis* наличие типичной капсулы также приводило к снижению ЭКП клеток на 3-8 мВ по сравнению с их бескапсульными вариантами. Наиболее резкое – примерно на 50 мВ, по сравнению с его бескапсульным вариантом, снижение  $\xi$ -потенциала было выявлено в клетках штамма *S. minnesota* R595pFS1. Приведенные выше результаты наших экспериментов на модели авирулентных бактерий подтверждают данные И.А. Дятлова [131] о том, "что капсула чумного микроба полностью экранирует заряды других поверхностных антигенов".<sup>88</sup> Следует отметить, что он использовал изогенную по плазмидному составу систему на основе штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, т.е. бескапсульные варианты отличались от капсульных полной утратой плазмиды pFga. Аналогичные данные были получены В.Н. Корсуковым с соавт. [184] еще на трех наборах изогенных штаммов *Y. pestis* с различным плазмидным составом. В наших же опытах штаммы, входящие в изогенные наборы, отличались лишь по наличию генов *fra* оперона. Таким образом, результаты наших исследований в сочетании с данными В.Н. Корсукова с соавт. [184] и И.А. Дятлова [131] позволяют сделать заключение, что основным продуктом плазмиды pFga, влияющим на  $\xi$ -потенциал клеток *Y. pestis*, выращенных при температуре 37 °С, является именно капсульный антиген.

При определении ЭКП вирулентных штаммов *Y. pestis* 231 и *S. enteritidis* PM1pFS1 было выявлено, что наличие "классической" капсулы сопровождалось повышением абсолютных значений  $\xi$ -потенциала на 1 мВ и 10 мВ соответственно, по сравнению с изогенными бескапсульными вариантами.<sup>89</sup> Эти данные противоречат результатам И.А. Дятлова и В.В. Кутырева [132], в работе которых клетки штамма 231, "несущие pFga и выращенные при

---

<sup>88</sup> Значительные отличия абсолютных значений ЭКП клеток возбудителя чумы в экспериментах И.А. Дятлова [131] и в настоящей работе мы объясняем различными метрологическими характеристиками оборудования, использованного для определения  $\xi$ -потенциала.

37 °С", обладали  $\xi$ -потенциалом меньшим, чем их изогенный бескапсульный вариант. К сожалению, цитированная работа опубликована в виде тезисов и не содержит информации, необходимой для корректного обсуждения возможных причин указанного несоответствия.

Результаты исследования *cafIM* энтеробактерий показали, что синтез атипичной капсулы сопровождался резко отличающимися значениями величин ЭКП бактериальных клеток. Так, в штаммах с серологически атипичными капсулами, сконструированными на основе вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ (R-форма ЛПС), и в варианте *S. minnesota* R595 (Re-хемотип) с атипичной капсулой отмечали резкое снижение ЭКП на 20-50 мВ по сравнению с бескапсульными вариантами. У несущих атипичные капсулы рекомбинантных бактерий, сконструированных на основе штаммов *Y. pestis* 231 (R-форма ЛПС) и EV11M (S-форма ЛПС), а также штамма *S. enteritidis* PM1 (S-форма ЛПС), происходило повышение  $\xi$ -потенциала на 3-9 мВ.

Наиболее четко зависимость величины ЭКП *cafIM* бактерий от формы их ЛПС прослеживается на производных изогенного набора штаммов *E. coli*, отличающихся друг от друга лишь степенью редуцированности ЛПС. Введение плазмиды pFBK7 в клетки Ra-мутанта F470, лишенные только боковых полисахаридных O-цепей, приводило к уменьшению значений ЭКП до  $(-28,6 \pm 0,7)$  мВ. Дальнейшее укорочение гликолипида в сочетании с атипичной капсулой у штаммов F588pFBK7 и F583pFBK7 (Rd<sub>1</sub>- и Rd<sub>2</sub>-хемотипы) сопровождалось увеличением значений ЭКП до  $(-51,7 \pm 0,4)$  мВ и  $(-50,4 \pm 0,2)$  мВ соответственно. У штамма F515pFBK7 (Re-хемотип) с наиболее редуцированной формой гликолипида отмечено снижение значений ЭКП до  $(-23,3 \pm 0,2)$  мВ. Как видно из приведенных данных штаммы F588pFBK7 и F583pFBK7, обладающие наиболее близкой структурой ЛПС, обладают и близкими  $\xi$ -потенциалами. Значительные отличия этих двух штаммов по структуре гликолипидов от штаммов F470pFBK7 и F515pFBK7, сопровождаются не только значительными различиями

---

<sup>89</sup> Интересно, что у большинства патогенных бактерий наличие капсулы сопровождается именно увеличением отрицательного заряда микробной клетки, способствующего электростатическому отталкиванию от одноимен-

абсолютных значений  $\xi$ -потенциалов, но и разной направленностью изменений ЭКП по сравнению с бескапсульными штаммами.

Оценка изменения ЭКП у гибридных производных вакцинного штамма EV (R-форма ЛПС) и его бесплазмидного варианта EV11M (S-форма ЛПС) в зависимости от температуры культивирования (рис. 21) показала, что  $\xi$ -потенциал клеток, выращенных при температуре 28 °С, был выше ЭКП бактерий, культивированных при - 37 °С. Возможно, это связано с тем, что у иерсиний при температуре 37 °С синтезируются ЛПС с более короткой боковой полисахаридной цепью или кором, чем при температуре 28 °С [103, 387]. Однако подтверждение этого предположения требует проведения дополнительных исследований.

Невозможность выявления атипичной капсулы коммерческими иммунодиагностическими средствами послужила предпосылкой для получения набора антикапсульных сывороток. Исследованные *cafIM* дефектные варианты *Y. pestis*, *E. coli* и *Salmonella* spp. по своей серологической специфичности были разделены на 6 групп (сероваров): FI (“классический” или типичный), FI-1, FI-2, FI-3, FI-4 и FI-? (объединяющий неидентифицированные серовары). Так как во всех атипичных штаммах присутствовал одинаково измененный *fra* оперон, можно предположить, что “выключение” гена *cafIM* является пусковым механизмом серовариации, а иммунохимическая специфичность каждого из вариантов атипичной капсулы определяется штаммовыми особенностями клеточной поверхности.

Одним из основных компонентов клеточной оболочки грамотрицательных бактерий является ЛПС, который образует сложный макромолекулярный комплекс с протеинами и липидами и, принимая участие в формировании внешних (надоболочечных) структур бактериальной клетки, определяет серологическую специфичность бактерий [107, 136]. Показано, что препараты FI, даже подвергавшиеся специальной очистке, содержали примеси ЛПС, причем их содержание колебалось в десятки раз в зависимости от вида и даже штамма продуцента [159, 301, 313, 368]. В наших опытах при обычных условиях культивирования

(рН 7,2) капсульный антиген сероварианта FI-2 (EVpFra/pFBK7 и EVpFra/pFBK10) был крепко сцеплен с клеточной поверхностью и не растворялся в культуральной среде. При щелочных значениях рН (8,5-9,0) отмечался переход капсульного антигена сероварианта FI-2 в раствор. Эти же условия характерны для перехода в растворимое состояние ЛПС возбудителя чумы [39]. ЛПС *Y. pestis*, в отличие от большинства других энтеробактерий, представлен в редуцированной R-форме (лишен боковых полисахаридных О-цепей) [31, 51, 107, 392]. В то же время показано, что у R-мутантов *E. coli* меняется, по сравнению со штаммами с полноценным ЛПС, процесс тримеризации поринов, расположенных на поверхности микробной клетки. На этом основании высказано предположение, что полноценный ЛПС является своеобразным фактором, обеспечивающим правильную сборку субъединиц этих белков [491]. Возможно, что и сероварияция капсулы у *cafIM* мутантов *Y. pestis* опосредована влиянием редуцированного в различной степени ЛПС на процесс ее агрегации. Как свидетельствуют наши эксперименты, форма ЛПС штамма-продуцента не влияет на антигенную специфичность капсульного антигена, кодируемого интактным *fra* опероном. Но на модели набора R-мутантов *E. coli* с известными формами ЛПС и серии штаммов *Y. pestis* выявлена корреляция формы ЛПС с серологической специфичностью образуемых ими атипичных капсул – штаммы *E. coli* F583pFBK7 (Rd<sub>2</sub>-хемотип) и F588pFBK7 (Rd<sub>1</sub>-хемотип) и штаммы *Y. pestis* JavapFBK7, 358/12P<sup>-</sup>pFBK7, 231pFra/pFBK7 и 231pFra/pFBK10 (предположительно Rd-Rc-хемотип [31]) по своей иммунохимической активности были отнесены нами к одному серовару – FI-3. В свою очередь, все *cafIM* энтеробактерии с S-формой ЛПС обладали одинаковой серологической специфичностью (серовар FI-1). Учитывая данные наших экспериментов и то, что различные "природные изоляты" *Y. pestis* отличаются по степени редуцированности ЛПС [103, 223], следует допустить возможность образования в клетках возбудителя чумы целого спектра серологических вариантов капсулы.

Нельзя без обсуждения исключить и возможность того, что иммунохимическая специфичность *cafIM* энтеробактерий определяется не белковым, а именно полисахаридным

компонентом надоболочечных структур. Исследования структуры O антигенов позволили сформулировать принцип иммунодоминантности концевых в олигосахаридной цепочке моносахарида, причем серологическая специфичность олигосахаридных антигенных детерминант связана также с конформацией молекулы, зависящей от соседних звеньев цепочки [213]. R-мутанты энтеробактерий, отличающиеся по степени редукции ЛПС всего лишь на один моносахарид коровой части, относятся к разным серовариантам [560]. Можно предположить, что в *caf1M* штаммах энтеробактерий мономеры Caf1, вступая во взаимодействие с ЛПС, изменяют конформацию концевых участков кора, что и может быть причиной изменения иммунохимической активности. Однако, учитывая то, что коровые области ЛПС *Y. pestis* не имеют общих эпитопов с аналогичными областями ЛПС R-вариантов *E. coli* [76, 103], использованных и в настоящем исследовании, вероятность возникновения одинаковых антигенных детерминант после взаимодействия ЛПС с мономерами Caf1, на наш взгляд, близка к нулю.

Как отмечалось выше, феномен антигенной изменчивости капсулы *Y. pestis* выявлялся лишь в клетках бактерий, дефектных по продукции шаперона Caf1M. Молекулярные шапероны - это класс протеинов, отвечающих за правильную укладку целого ряда полипептидных цепей в третичную структуру и сборку в олигомеры, препятствующих образованию кинетически невыгодных стерических вариантов [425]. Принято считать, что нативная форма белка соответствует конформации с минимально возможной поверхностью. Это обеспечивает термодинамическую стабильность нативной конформации и при температурах, когда этот вариант укладки не является оптимальным [552].

Можно предположить, что шаперон Caf1M обеспечивает правильную укладку полипептидной цепочки Caf1 в "классическую" нативную форму, что, в свою очередь, стабилизирует структуру образующегося агрегата, защищая его от взаимодействия с ЛПС микробной клетки. В случае отсутствия шаперона Caf1M в процессе укладки субъединицы Caf1, по-видимому, процесс самоорганизации белковой цепи последнего, происходящий путем пере-

бора всех кинетически выгодных конформаций цепи, не приводит к образованию стабильных структур с глобальным энергетическим минимумом. Это свидетельствует о том, что энергия нативной конформации цепи не отделена от энергий других структур достаточно большой энергетической щелью, а "популяция" образующихся субъединиц Caf1M конформационно гетерогенна. Агрегация подобных структурно нестабильных субъединиц приводит к образованию капсулы, свойства которой в значительной степени определяются формой ЛПС штамма-производителя, сдвигающего равновесие структур субъединиц в сторону вариантов укладки, наиболее кинетически выгодных для данных условий. Следствием изменения укладки аминокислотной цепи субъединиц атипичного капсульного антигена может быть закрытие антигенных эпитопов, выявляемых коммерческими иммунодиагностическими наборами, и образование новых антигенных детерминант.

Анализ капсулообразующей способности природных Fra<sup>+</sup>, Fra<sup>-</sup> и Fra<sup>±</sup> изолятов *Y. pestis* из ГосКПБ "Микроб" и аналогичных авторских экспериментальных штаммов позволил разделить все исследованные культуры бактерий на три группы:

1) штаммы "дикого" типа, обладающие выраженной серологической активностью (титры в РНГА от 1:512 до 1:4096) и содержащие в своих популяциях от 70 % до 100 % клеток с отчетливо видимыми под световым микроскопом капсулами: а) 115-Ур, 128-Ур, 231, 305(1694), 358 ("природные"); б) вакцинный штамм EV; в) EVpFra<sup>-</sup>pPst<sup>-</sup>pFSK3, EV11MpFSK3, 231/830 (экспериментальные);

2) экспериментальные штаммы, не обладающие серологической активностью (РНГА отрицательная или положительная в разведении 1:2)<sup>90</sup> и не содержащие в своих популяциях клеток с видимыми под световым микроскопом капсулами: а) штаммы, утратившие плазмиду pFra: EV11M, 231pFra<sup>-</sup>pPst<sup>-</sup>, 358pFra<sup>-</sup>pPst<sup>-</sup>; б) штамм 231pFra/pFS23, в котором за счет ло-

<sup>90</sup> Бактериальные клетки выявляются в концентрациях, превышающих 10<sup>7</sup> м.к./мл (1:64-1:128), в то время как диагностический эритроцитарный чумной моноклональный антикапсульный иммуноглобулиновый должен выявлять исходную культуру *Y. pestis* в концентрации менее 2,5×10<sup>5</sup> м.к./мл (1:4096).

кализованного мутагенеза *fra* оперон несет вставку гена *kan* в *Bam*HI сайте гена *cafIM* и делецию *Cla*I фрагмента, затрагивающую С-конец *Caf*IA и N-конец *Caf*I.

3) штаммы, практически не обладающие серологической активностью (РНГА отрицательная или положительная в разведении 1:2), но содержащие в своих популяциях от 10 % до 97 % клеток с отчетливо видимыми под световым микроскопом капсулами: а) экспериментальные штаммы со вставкой гена *kan* в *Bam*HI сайте гена *cafIM*: 231pFra/pFBK10, 358pFra/pFBK10; б) "природные изоляты", часть из которых по данным скрининга плазмид лишена плазмиды pFra в автономном состоянии: 10087, 16-K, 252 (Рос), 622, Java-8, M-493, M-509, M-510, M-512, M-513, M-521, M-522, M-957, M-962, M-974, И-2422FraГ. Интересно, что последний из указанных штаммов лишен не только автономной плазмиды pFra, но и детектируемого в ПЦР гена *cafI*.

Следующим этапом наших исследований была попытка получения очищенных препаратов атипичного капсульного антигена с помощью препаративного метода изоэлектрической преципитации, который в последнее время все чаще используется для выделения и очистки "классического" капсульного антигена [131, 133, 317, 326].<sup>91</sup> Данные, полученные нами при исследовании Fra<sup>+</sup> штаммов чумного микроба: EV и 231, выращенных при температуре 37 °С, рН 7,2-8,0, подтверждают общепризнанное мнение о том, что основным компонентом "классической" капсулы являются субъединицы *Caf*I. Вместе с тем, как отмечает В.И. Вейнблат [68] капсула состоит не только из FI, но и из других - минорных компонентов, которые могут играть важную роль (например, в серологической специфичности). С.И. Жукова с соавт. [143] установили, что в препаратах водо-растворимых антигенов, "смытых" с клеток штаммов EV (Fra<sup>+</sup>), K-1 (Fra<sup>+</sup>) и 927/80 (Fra<sup>-</sup>), содержание белков колебалось в пределах 10-14 % от сухого остатка. По данным РНГА содержание FI в изучаемых антигенных фракциях Fra<sup>+</sup> штаммов составляло 5-10 %. Анализ препаратов в дискэлектрофорезе "показал, что

<sup>91</sup> М.М. Титенко с соавт. [326] показали, что содержащийся в культуральной среде питательный субстрат и, в первую очередь, аминокислоты и полипептиды при "значениях рН в диапазоне 7,8-3,6" остаются в растворенном состоянии, а в состав образующегося преципитата входят только продукты жизнедеятельности бактерий.

фракции антигенов из штаммов EV и 927/80 содержали 6-7, а из штамма К-1 - 10-11 протеиновых компонентов". В наших экспериментах также было показано, что "протеинограммы" внеклеточных белков различных штаммов чумного микроба, выращенных в одинаковых условиях, заметно отличались друг от друга.

Л.Н. Сердобинцев [299] показал, что капсульный антиген способен формировать твердофазное образование по типу полупроницаемой мембраны, и высказал предположение, что капсула *Y. pestis* с функцией полупроницаемой мембраны может играть определяющую роль в физиологических процессах, связанных с клеточной поверхностью. Прежде всего, он имел в виду поглощение питательных веществ и секрецию синтезируемых бактерией биомолекул. Полученные нами данные не противоречат его гипотезе (рис. 27). В штаммах, образующих "классическую" капсулу, последняя препятствует переходу в культуральную среду большинства транслоцируемых на клеточную поверхность белков, но периферические участки капсулы свободно растворяются, обогащая окружающий бактерии раствор, в первую очередь, типичным капсульным антигеном. При закислении среды культивирования функции упорядоченного агрегата субъединиц CafI "берет" на себя капсула, сформированная из филогенетически родственных им субъединиц PsaA, и соответственно рН6 антиген становится основным компонентом бактерий, секретлируемым в окружающую среду. В штаммах же, дефектных по генам оперонов *fra* (М-493, EVpFra/pFBK7, И-2422FraГ<sup>-</sup> и др.) или *psa* (KM278), не происходит образование упорядоченных структур, препятствующих поступлению во внешнюю среду белков, транслоцируемых на клеточную поверхность, и они составляют значительный процент "суммарных секретлируемых белков".

Закономерно встает вопрос - входит ли в состав атипичных капсул вирулентных штаммов возбудителя чумы субъединица CafI? В отношении штамма И-2422FraГ<sup>-</sup>, лишенного структурного гена *cafI* (табл. 10), отрицательный ответ очевиден. Что же касается CafIM<sup>-</sup> штаммов, то этот вопрос требует более детального обсуждения. Основные доводы, свиде-

тельствующие о наличии или отсутствии продукта гена *cafI* в составе атипичных капсул возбудителя чумы, представлены в таблице 14.

Таблица 14. Аргументы за и против присутствия продукта гена *cafI* в составе атипичных капсул возбудителя чумы

ЗА	ПРОТИВ
<p>1. Бактерии с близкими хемотипами ЛПС и одинаковыми дефектами <i>fra</i> оперона – вирулентные <i>cafIM</i> штаммы <i>Y. pestis</i> 231pFra/pFBK7 и 231pFra/pFBK10, а также <i>cafIM</i> штаммы <i>E. coli</i> F583pFBK7 и F588pFBK7 по своей серологической специфичности отнесены нами к одному серовару – FI-3.</p> <p>2. Все <i>cafIM</i> энтеробактерии с S-формой ЛПС обладали одинаковой серологической специфичностью – реагировали в РДИД с моноспецифическими IgG против типичного капсульного антигена (серовар FI-1).</p> <p>3. При иммуноэлектронной микроскопии на поверхности одной из 10-20 <i>cafIM</i> клеток <i>Y. pestis</i> выявлены единичные частицы коллоидного золота, конъюгированного с моноклональными антителами против типичного капсульного антигена.</p> <p>4. Выявлено изменение культурально-морфологических свойств у <i>cafIM</i> энтеробактерий с R-формой ЛПС по сравнению с Fra<sup>+</sup> и Fra<sup>-</sup> бактериями.</p> <p>5. Выявлено изменение ЭКП у <i>cafIM</i> энтеробактерий с R-формой ЛПС по сравнению с Fra<sup>+</sup> и Fra<sup>-</sup> бактериями.</p>	<p>1. Отсутствие мажорной полосы с соответствующей молекулярной массой на протеинограммах в системе ПААГ с 0,1 % SDS.</p> <p>2. Отсутствие реакции в иммуноблотах суммарных секреторируемых белков с моноспецифическими IgG против типичного капсульного антигена.</p>

К нашим аргументам "ПРОТИВ" следует добавить и данные экспериментов В.А. Федоровой с соавт. [333], в которых с помощью ТИФА "ни на поверхности бактерий, ни в культуральной жидкости" Fra<sup>+</sup> штаммов *Y. pestis* "Ф1 не выявлялась. Однако при разрушении мутантных клеток концентрация капсульного антигена в испытанных образцах превышала его содержание в лизатах, на наружной клеточной стенке и в среде культивирования микробов вакцинного штамма EV НИИЭГ".

Таким образом, с учетом имеющихся у нас экспериментальных данных, поставленный выше вопрос о присутствии субъединицы CafI в составе капсул CafIM<sup>-</sup> вариантов возбудителя чумы нельзя считать окончательно решенным. В последующем мы планируем проведение серии экспериментов: 1) по выявлению субъединицы CafI в составе внешних мембран *cafIM* штаммов *Y. pestis* и 2) по определению аминокислотной последовательности N-концевых участков индивидуальных мажорных компонентов суммарных секреторируемых

белков из штаммов с атипичными капсулами с целью их последующей идентификации с учетом данных о полной нуклеотидной последовательности генома возбудителя чумы [479]. Тем не менее, результаты представленных в настоящем разделе экспериментов с учетом данных других исследователей, на наш взгляд, позволяют сделать заключение о том, что капсула *Y. pestis* представляет собой сложную надмолекулярную структуру, состоящую из целого ряда белков и ЛПС. Основным компонентом "классической" капсулы штаммов возбудителя чумы "дикого" типа, выращиваемых при температуре 37 °С и рН 7,2 *in vitro*, является капсульный антиген FI. При закислении среды культивирования при температуре 37 °С *in vitro* образуется капсула, состоящая в основном из антигена рН6. В Caf1M<sup>-</sup> штаммах при температуре 37 °С *in vitro* образуется атипичная капсула, в состав которой входит целый спектр белков, большая часть из которых не идентифицирована. Учитывая данные о высокой адгезивной активности *Y. pestis* [131]; способности рН6 антигена связывать 500-kDa аполиппротеин В100 из неиммунной сыворотки крови человека и животных [410] и реагировать с субъединицами Fc иммуноглобулинов человека подклассов G1, G2 и G3 [362, 607]; а также то, что плазмокоагулирующая способность может являться фактором, который в какой-то мере экранирует клеточную стенку бактерии за счет образования вокруг микробной клетки фибринового сгустка [118,119], можно предположить, что *in vivo* в состав капсулы входят не только продукты метаболизма чумного микроба, но и биомолекулы, "сорбированные" из организма хозяина.

В экспериментах по изучению роли продукта гена *caf1M* в патогенезе и иммуногенезе чумы было установлено, что по сравнению с исходными штаммами варианты *Y. pestis*, дефектные по гену *caf1M*, обладали селективными преимуществами в организме белых мышей, предварительно иммунизированных живой чумной вакциной. Живая вакцина обеспечивала защиту белых мышей от исходного штамма *Y. pestis* 231, но не от его вариантов 231pFra/pFBK7 и 231pFra/pFBK10, дефектных по *caf1M* гену, или "природного" изолята М-493.

Логично предположить, что наибольшим протективным эффектом в отношении вирулентных штаммов с атипичной капсулой должны обладать гомологичные препараты капсульных белков, выделенные из *cafIM* мутантов *Y. pestis*. Однако препараты четырех серологических вариантов капсульных белков в дозах 15 мкг белка на одну белую мышь не обеспечивали достоверного уровня защиты, хотя сопоставимые дозы "классического" капсульного антигена обладали выраженным протективным эффектом в отношении вирулентных штаммов с типичной капсулой [110, 313, 317, 326, 368, 382, 567]. Увеличение иммунизирующей дозы до 80 мкг белка на животное, введение изучаемых препаратов капсульных белков с адьювантом<sup>92</sup> или использование убитой "формолвакцины", приготовленной на основе штамма 231pFra/pFBK10 аналогично вакцине USP, в дозах от  $10^3$  до  $10^8$  микробных клеток на животное не позволили выявить достоверного протективного эффекта указанных препаратов в отношении использованного для заражения гомологичного штамма 231pFBK10.<sup>93</sup> Отсутствие протективного эффекта при иммунизации мышей препаратами "атипичного капсульного антигена", приготовленными из штамма 231pFra/pFBK10, и последующего заражения этим же штаммом может быть объяснено присутствием в них рН6 антигена.<sup>94</sup> Ранее нами было выявлено [309, 311, 312, 348], а позднее подтверждено С.О. Водопьяновым с соавт. [81] отсутствие протективной активности у рН6 антигена в отношении белых мышей и морских свинок. Более того, при иммунизации лабораторных животных антигеном рН6 совмест-

<sup>92</sup> Следует отметить, что и в опытах других исследователей комплексы "экстрацеллюлярных" антигенов из Fga<sup>+</sup> штаммов обладали выраженной протективностью в отношении белых мышей, в то время как аналогичный препарат из Fga<sup>-</sup> штамма практически не обладал защитными свойствами [143].

<sup>93</sup> Интересно, что в экспериментах Л.Н. Шаниной [354] по иммунизации белых мышей аттенуированными Fga<sup>+</sup> и Fga<sup>-</sup> производными штамма 358 "оба авирулентных варианта ... предохраняли большинство подопытных мышей от заражения вирулентным и полноценным в антигенном отношении штаммом (358P+III), однако, они не сообщали мышам иммунитет к вирулентным бактериям чумы, утратившим способность синтезировать фракцию I и "мышинный" токсин" (358/12P+III).

<sup>94</sup> Излагая, задним числом, последовательность событий, исследователь часто невольно становится логиком и делает из экспериментальных данных выводы, которые из них следуют, казалось бы, с полной очевидностью, но вовсе не обязательно были сделаны в свое время. Такое представление возникает лишь в результате искусственной реконструкции. Так, отсутствие выраженной протективной активности у препаратов белков, выделенных из штаммов с атипичными капсулами, первоначально мы были склонны объяснять иначе. Было высказано предположение что, в отсутствии стабилизирующего влияния шаперона CafIM в микробной клетке или в различных бактериях популяции капсула может, по-видимому, образовываться из нескольких нестабильных конформантов белка CafI с различными антигенными эпитопами, что, в свою очередь, может препятствовать возникновению напряженного иммунитета [20-22, 374].

но с антигеном FI, происходило снижение протективных свойств последнего примерно в четыре раза, по сравнению с протективностью индивидуального капсульного антигена [348].

Атипичные варианты капсулы, обладая определенными антигенными свойствами (способность индуцировать образование антител у иммунных животных), тем не менее, оказались неэффективными в опытах по активной защите мышей от гибели, вызванной штаммом *Y. pestis* 231pFra/pFBK10. При патоморфологическом исследовании внутренних органов интактных и иммунных белых мышей, павших в результате заражения штаммами возбудителя чумы с серологически атипичной капсулой, выявлены морфологические признаки острого инфекционного процесса, не уступающие таковым при заражении исходным штаммом. Представленные результаты, в сочетании с данными о неэффективности иммунизации живой чумной вакциной, свидетельствуют о том, что сероварияция капсулы может с высокой эффективностью препятствовать элиминации *cafIM* вариантов *Y. pestis* из макроорганизма, имевшего контакт с типичными или *cafIM* формами чумного микроба. Принципиальная возможность участия штаммов с атипичной капсулой в развитии эпизоотического процесса предопределяет необходимость целенаправленного поиска подобных вариантов *Y. pestis* в природных очагах чумы.

До последнего времени было известно несколько типов механизмов, регулирующих на геномном уровне серологическую специфичность патогенных микроорганизмов, опосредованную поверхностными белками [419, 542]. К наиболее типичным можно отнести следующие.

1. Генная конверсия - механизм, приводящий к антигенной изменчивости пилей *Neisseria gonorrhoeae* [575], вариабельного "мажорного" протеина *Borrelia* [505] и основных поверхностных гликопротеинов *Trypanosoma* [530, 549] за счет рекомбинации кодирующих их структурных генов с гомологичными последовательностями ДНК из того же генома.

2. Внутригеновая рекомбинация, обусловленная повторами ДНК и обеспечивающая изменчивость протеинов М стрептококков группы А [473].

3. Трансформация экзогенной ДНК с последующей рекомбинацией по участкам гомологии [572].

4. Спонтанные точечные мутации в структурном гене главного белка внешней мембраны P2 у бескапсульных вариантов *Haemophilus influenzae* [424].

Феномен изменчивости антигенной специфичности капсулы *Y. pestis*, вызванный инактивацией гена *cafIM*, отличается от описанных ранее. Остаются неясными детальные механизмы, приводящие к образованию атипичных капсул в *cafIM* дефектных штаммах. Выявленная корреляция между формой ЛПС Caf1M<sup>-</sup> штамма-продуцента и серологической специфичностью синтезируемой им капсулы позволяет предположить, что ее свойства в значительной степени определяются именно структурой ЛПС бактериальной клетки.

Глава 6. КОНСТРУИРОВАНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА С  
УЧЕТОМ ДАННЫХ О СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ  
*fra* ОПЕРОНА *Y. pestis*

В настоящее время при производстве диагностических и вакцинных препаратов используют капсульный антиген, выделенный из авирулентных штаммов *Y. pestis*: EV, K-1, K-2, Tjiwidej и др. [4]. С целью повышения выхода FI неоднократно проводились работы по отбору наиболее продуктивных субклонов исследуемых штаммов, оптимизации состава питательных сред и температуры культивирования [256]. Однако ауксотрофность *Y. pestis* и невысокая скорость роста, наиболее выраженные при температуре 37 °С, в сочетании с 37-градусным температурным оптимумом синтеза FI вводят значительные ограничения в повышение эффективности “классических” продуцентов капсульного антигена.

Из селекционных подходов, как правило, ограниченных рутинным тестированием уровня продукции FI у большого количества клонов из популяции штамма-продуцента [256], выделяются методы пассирования культур *Y. pestis* в организме чувствительных животных или в их макрофагах. Так пассирование вакцинного штамма чумного микроба через макрофаги морских свинок увеличивает количество антигена FI, определяемое в РНГА, на два порядка по сравнению с исходными субкультурами [122]. Однако использование в производстве процедур, связанных с гибелью животных должно быть сведено к минимуму как с точки зрения этики [361], так и из экономических соображений.

Бурное развитие генетики и молекулярной биологии в последние десятилетия позволило исследователям накопить значительные сведения о генетических механизмах вирулентности возбудителей инфекционных заболеваний, а также дало в их руки современные методы воздействия на наследственный аппарат патогенных микроорганизмов. Одной из важнейших задач генетической инженерии является изучение условий, обеспечивающих эффективную экспрессию клонируемых в бактериях генов. Разработка путей оптимизации

такой экспрессии - важный шаг к получению бактериальных штаммов-продуцентов биологически активных веществ. Повышенная продукция белков, детерминированных клонированными генами, достигается при выполнении ряда условий.

\* Во-первых, большинство генов предпочтительно клонировать в многокопийных векторах, так как при этом в клетке изучаемый ген находится в высокой дозе, что обычно обуславливает повышение уровня выхода белкового продукта в 25-100 раз [190, 383].

\* Во-вторых, клонируемую кодирующую последовательность необходимо помещать под контроль промотора, который эффективно узнается РНК-полимеразой клетки, что в свою очередь увеличивает выход белка в 30-50 раз [571].

\* В-третьих, синтезируемая мРНК должна быть относительно стабильной и эффективно транслироваться [360].

\* В-четвертых, чужеродный белок, синтезируемый в клетках, не должен подвергаться быстрой деградации бактериальными протеазами, что достигается или получением мутантов реципиентных штаммов с нарушениями в ферментной системе деградации мРНК [452] или конструированием мутантов со сниженной активностью протеаз [564]. Необходимо отметить, что существенное влияние на активность тех или иных протеаз клетки оказывают условия культивирования бактерий, и, прежде всего, состав питательных сред [135].

В разное время предпринимались попытки получения продуцентов FI *Y. pestis* на основе близко и отдаленно родственных микроорганизмов. О.А. Проценко и М.С. Веренковым [272] была изучена способность продуцировать антиген FI трансконъюгантами, полученными при скрещивании чумного (донорного) и псевдотуберкулезного (реципиентного) микробов. При этом было установлено, что способность клеток *Y. pseudotuberculosis* продуцировать FI и отмеченный температурозависимый характер синтеза этого антигена следует оценивать как результат функционирования детерминанта FI, имеющего плазмидную природу. Перспективность использования полученного штамма в качестве продуцента FI не рассматривалась.

С.А. Лебедевой с соавт. [208] была установлена способность продуцировать капсульный антиген и “мышинный” токсин трансконъюгантами *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* с интенсивностью, аналогичной исходному штамму чумного микроба. Исследованные в этих работах иммунохимические и протективные свойства капсульного антигена из рекомбинантных штаммов иерсиний не отличались от таковых антигена F1 из *Y. pestis*.

Л.В. Коссе с соавт. [185, 187] в эксперименте получены трансконъюганты *K. pneumoniae* K-2, *C. freundii*, способные продуцировать антиген F1 после приобретения рУТ в составе коинтегративной конъюгативной плазмиды рLS759. Анализ препаратов капсульного антигена, выделенных из штаммов *Y. pestis* EV, *K. pneumoniae* K-2 и *C. freundii*, показал их принципиальное сходство по ряду физико-химических свойств и иммунохимической специфичности. Антиген F1 из трансконъюгантов вступал в серологические реакции в титре, превышающем на порядок титр аналогичного препарата из штамма EV76, а также обладал высокой протективностью при заражении 200 Dсl вирулентного штамма чумного микроба. Повышение протективной активности препаратов F1, выделенных из гетерологичных продуцентов, по мнению С.А. Лебедевой, может быть связано с наличием в них примесей ЛПС [207], обладающего выраженными адьювантными свойствами [107, 170].

Клонирование кластера генов *fra* оперона в составе мультикопийных плазмид и подбор реципиентных штаммов позволил получить целый ряд суперпродуцентов F1 на основе штаммов *E. coli*: XL1-blue [567], K802 [165, 268] и HB101 [99, 163]. По мнению Ю.А. Попова [268], повышение уровня синтеза F1 на один-два порядка, вероятно, связано с увеличением выхода бактериальной массы с единицы объема питательной среды, по сравнению со штаммом *Y. pestis* EV. О.А. Кириллиной [165] было показано, что уровень синтеза капсульного антигена в условиях, оптимальных для роста клеток *E. coli*, достигал 400 мкг/мл культуральной жидкости, что, по данным ее экспериментов, в 66 раз превышало продуктивность штамма EV линии НИИЭГ. Сотрудниками Ростовского ПЧИ был получен штамм кишечной па-

лочки *E. coli* DH5 $\alpha$ /pMB15, продуцирующий фракцию I в количестве 15 мкг/мл, что в 2 раза больше чем у вакцинного штамма EV [91].

Штаммы-продуценты капсульного антигена были также сконструированы И.В. Маракулиным с соавт. [217, 218] на основе кишечной палочки (штамм 803), бесплазмидного варианта EV чумного и авирулентного бесплазмидного штамма P1 псевдотуберкулезного микроба. Рекомбинантные штаммы продуцировали FI в 4-8 раз больше, чем штамм EV линии НИИЭГ. Гибридная плазида, введенная в вышеперечисленные штаммы, при многократных пересевах, длительном поддержании и хранении культур проявляла высокую структурную и сегрегационную стабильность в штаммах иерсиний, но не кишечной палочки. В опытах на лабораторных животных показано, что препараты очищенного FI антигена, полученные из культуральной жидкости рекомбинантных штаммов, имели не меньшую протективность, чем препараты, выделенные из культур штамма EV линии НИИЭГ, и содержали меньшее количество контаминирующих антигенов.

Одной из проблем при конструировании генно-инженерных вакцин является стабилизация клонированных генов в составе реципиентных штаммов. Та же задача стоит перед разработчиками высокоэффективных штаммов-продуцентов компонентов химических вакцин. Однако в подавляющем большинстве цитированных исследований были использованы плазмиды с генами *fra* оперона, не способные стабильно наследоваться в клетках энтеробактерий. Стабилизация генов протективных антигенов в клетках векторных микроорганизмов возможна при их интеграции с хромосомой реципиентного штамма или за счет их клонирования в составе рекомбинантных плазмид, стабильно наследующихся в бактериальных клетках. Второй путь, на наш взгляд, более целесообразен, т.к. он дает возможность использовать мультিকопийные плазмиды, что, в свою очередь, может увеличить выход протективного антигена за счет повышения числа копий, кодирующего его гена.

Известно, что конъюгационный перенос плазмид является решающим фактором, обеспечивающим стабильное поддержание плазмид, даже в том случае, если бесплазмидные клетки имеют преимущество в скорости роста [52, 342]. Аналогичный подход для стабилизации наследования в реципиентных клетках генов *fra* оперона был использован в работе И.В. Дармова с соавт. [111], в которой для клонирования и стабилизации локуса *fra* была использована конъюгативная плаزمида R388, и в цикле исследований сотрудников Ростовского ПЧИ [185, 187, 208], передававших в клетки *K. pneumoniae* и *S. freundii* полный репликон рУТ в составе коинтегративной конъюгативной плазмиды рLS759.

Перспективным может оказаться и использование стабильных резидентных плазмид энтеробактерий. Так относительно небольшой размер плазмиды пестициногенности, ее мультикопийность и высокая стабильность наследования в клетках *Y. pestis* дают возможность использования этой плазмиды в качестве векторной молекулы для конструирования штаммов-продуцентов биологически активных веществ [17, 239, 349]. Последний подход с учетом данных о структурно-функциональной организации *fra* оперона *Y. pestis*, представленных в главах 3 и 5, и был использован в наших экспериментах.

#### 6.1. КОНСТРУИРОВАНИЕ НА ОСНОВЕ ПЛАЗМИДЫ ЧУМНОГО МИКРОБА рPst РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ СТАБИЛЬНОЕ НАСЛЕДОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА *Y. pestis* В РЕЦИПИЕНТНЫХ КЛЕТКАХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ

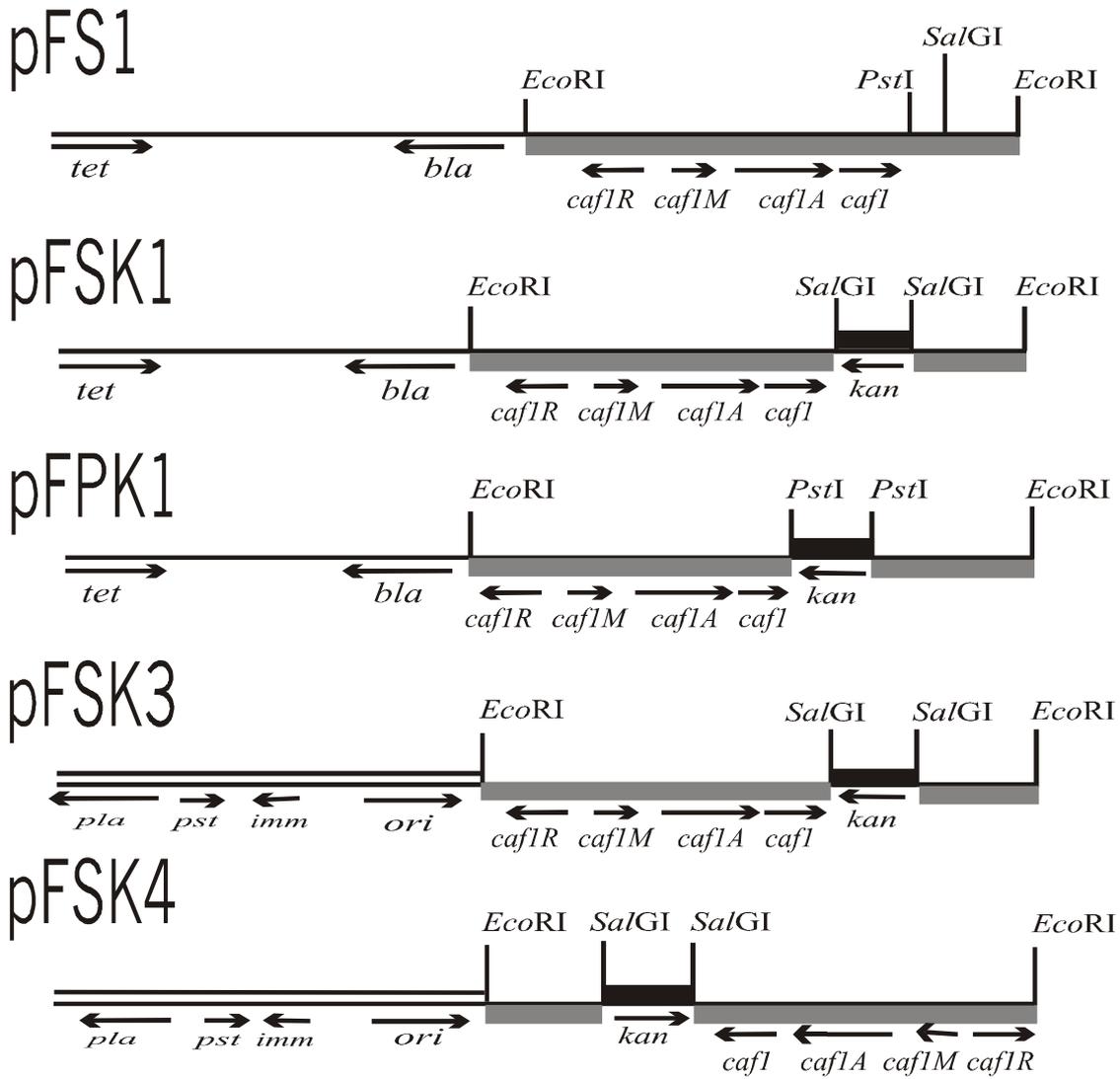
В серии предварительных исследований, проведенных нами совместно с И.Г. Дроздовым на базе РосНИПЧИ "Микроб" в 1985 г.,<sup>95</sup> были использованы кодирующие основные факторы патогенности (иммуногенности) *Y. pestis* гены, клонированные ранее сотрудниками отдела генетики ВНИИ прикладной микробиологии (Оболенск). Для определения протективности рекомбинантных антигенов возбудителя чумы, белых мышей иммунизировали

подкожно живыми клетками штаммов *E. coli* HB101, несущих плазмиды pPW14, pVH65 [17] или pVF2 [614] с генами (1)  $pla^+,pst^+,imm^+,cat^+$ , (2)  $lcrV^+,pla^+,pst^+,imm^+,cat^+$  и (3)  $cafI^+,cafIA^+,cafIM^+,cafIR^+,lcrV^+,pla^+,pst^+,imm^+,cat^+,tet^+$  соответственно в дозе  $10^8$  КОЕ на животное. Стабильность наследования в реципиентных клетках обеспечивалась за счет наличия в гибридных конструкциях области начала репликации *ori* из плазмиды pPst. Через 30 сут после иммунизации проводили подкожное заражение животных штаммами *Y. pestis* 231 и 358/12. Штаммы *E. coli* HB101pPW14 и HB101pVH65 предохраняли от гибели соответственно 5 % и 10 % мышей, зараженных 100 Dcl *Y. pestis* 231. Экспериментальный вакцинный штамм HB101pVF2 защищал от гибели 100 % мышей, зараженных 100 Dcl, и 70 % животных, зараженных 1000 Dcl *Y. pestis* 231. Заражение 100 Dcl бескапсульного штамма 358/12 приводило к гибели 100 %, 95 % и 95 % мышей, иммунизированных штаммами *E. coli* HB101pPW14, HB101pVH65 и HB101pVF2 соответственно. Полученные в этих опытах приоритетные данные о высокой протективности рекомбинантного капсульного антигена в отношении типичных штаммов *Y. pestis* были позднее подтверждены другими исследователями [207, 218, 317, 368, 567] и послужили основанием для продолжения наших экспериментов, направленных на конструирование стабильных суперпродуцентов FI.

Для встраивания в репликон pPst был выбран *EcoRI* фрагмент плазмиды pFSK1, содержащий локус *fra* оперона, маркированный геном *kan*. Его лигировали с *EcoRI* фрагментом плазмиды пестициногенности, включающим в себя область репликации плазмиды *ori* и гены, кодирующие коагулазную и фибринолитическую активности, продукцию пестицина и иммунность к пестицину. Полученную конструкцию, обеспечивающую эффективную экспрессию генов *fra* оперона, обозначили pFSK3 (рис. 42, 43). Интересно, что при обратной ориен-

---

<sup>95</sup> Неопубликованные данные.



Генетические и рестрикционные карты рекомбинантных плазмид

- - фрагмент плазмиды pUC4K
- - фрагмент плазмиды pFra
- ▬▬ - фрагмент плазмиды pPst
- - плаزمида pHC79

Рисунок 42. Схема конструирования плазмид pFPK1, pFSK1, pFSK3 и pFSK4

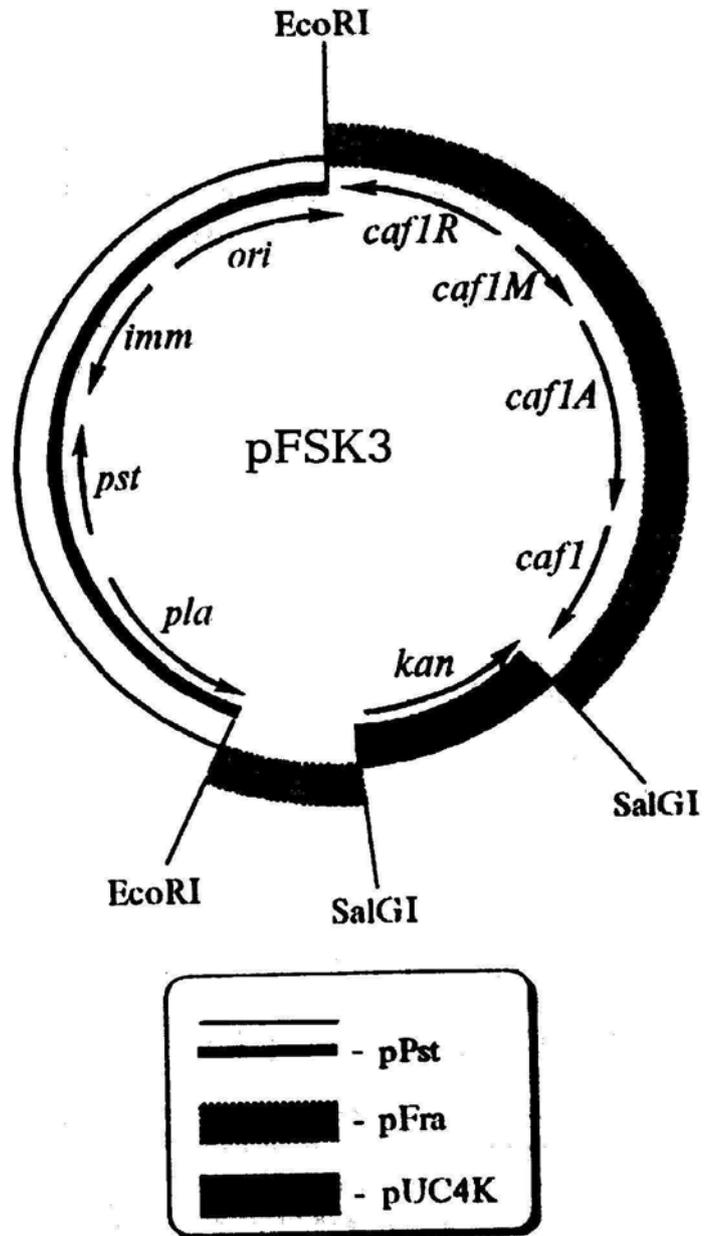


Рисунок 43. Карта гибридной плазмиды pFSK3

тации клонированного *EcoRI* фрагмента плазмиды pFSK1 в составе плазмиды pFSK4 (рис. 42) с помощью РНГА продукцию капсульного антигена определить не удалось. Данные о продукции FI в штаммах *E. coli* DH1 и HB101 с вышеописанными плазмидами представлены в таблице 15 (см. также табл. 3 раздела 3.2).

## 6.2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СКОНСТРУИРОВАННЫХ ШТАММОВ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ ПО УРОВНЮ ПРОДУКЦИИ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА

В настоящее время в России, как уже отмечалось выше, источником получения FI в препаративных количествах является вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ. Однако он обладает как минимум двумя технологическими недостатками.

\* Во-первых, возникает необходимость дополнительной очистки препаратов антигена FI, полученных из этого штамма, от примесей других непротективных антигенов *Y. pestis*, продуцируемых при аналогичных условиях культивирования.

\* Во-вторых, невысокая скорость роста клеток чумного микроба характерна именно для температуры  $\geq 37$  °C - оптимальной для биосинтеза FI.

В этом разделе представлены результаты оценки эффективности экспрессии и стабильности наследования *fra* оперона в клетках сконструированных нами штаммов энтеробактерий.

### 6.2.1. ПРОДУЦЕНТЫ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА НА МОДЕЛИ *Escherichia coli*

В настоящее время наиболее изученными в качестве реципиента при проведении молекулярно-генетических экспериментов с рекомбинантными ДНК грамотрицательных бактерий и потому представляющими как теоретический, так и практический интерес по-прежнему являются клетки *E. coli*. Однако ряд авторов столкнулся с невозможностью экспрессии капсульного антигена в клетках *E. coli* при передаче *fra* локуса, клонированного в составе раз-

личных векторных систем [91, 111, 358]. Было высказано предположение, что "продукт гена *fra* токсичен для клеток, изученных в качестве реципиентов штаммов *E. coli* (803, С600, НВ101), вследствие чего первоначально высокий уровень продукции FI-антигена резко снижается, в популяции продуцентов быстро накапливаются клетки, утратившие способность синтезировать фракцию I в результате разного рода рекомбинационных событий, в том числе за счет встраивания в ген *fra* IS-последовательностей, присутствующих в бактериальной хромосоме" [111].

В то же время в работах W.J. Simpson *et al.* [567], А.В. Карлышева с соавт. [162, 163], П.А. Черепанова с соавт. [350], О.А. Кириллиной [165], А.Ю. Гончарова [91] и G.P. Andrews *et al.* [368] показано, что клонированный в клетках *E. coli* в составе различных векторных плазмид *fra* оперон обеспечивает уровни экспрессии входящих в его состав генов даже превышающие таковые у исходных штаммов возбудителя чумы. На наш взгляд, это можно объяснить штаммовыми отличиями использованных для молекулярного клонирования последовательностей ДНК, кодирующих капсулообразование. В наших экспериментах был использован *fra* локус из плазмиды pFS1, заведомо экспрессирующийся в клетках *E. coli* [162, 163] (см. также главу 3).

Для изучения продукции FI в клетках кишечной палочки мы использовали два штамма *E. coli*: НВ101 и ДН1. Данные, полученные в результате исследования рекомбинантных штаммов в реакции непрямой гемагглютинации, представлены в таблице 15.

Обращает на себя внимание тот факт, что высокий уровень выработки капсульного антигена отмечался непосредственно после трансформации и в ближайшие 50-100 генераций, затем уровень секреции заметно снижался. При дальнейших пересевах титры продукции капсульного антигена снижались и не превышали предельных величин секреции контрольного штамма EV, хотя наличие маркеров антибиотикоустойчивости свидетельствовало о сохранении в клетках рекомбинантной плазмиды pFSK3 (рис. 44).

**Таблица 15. Уровни продукции капсульного антигена клетками кишечной палочки,**

### несущими рекомбинантные плазмиды

(обратные титры по данным РНГА)

Штаммы <i>E. coli</i>	37 °С 24 ч	37 °С 48 ч	28 °С 24 ч	28 °С 48 ч
DH1pFSK3	4096	8192	4096	4096
HB101pFSK3	4096	8192	4096	4096
HB101pFS1	4096	8192	4	8
EV линии НИИЭГ	128	512	8	16
C802pAF10-23 <sup>96</sup>	1024	2048	–	–

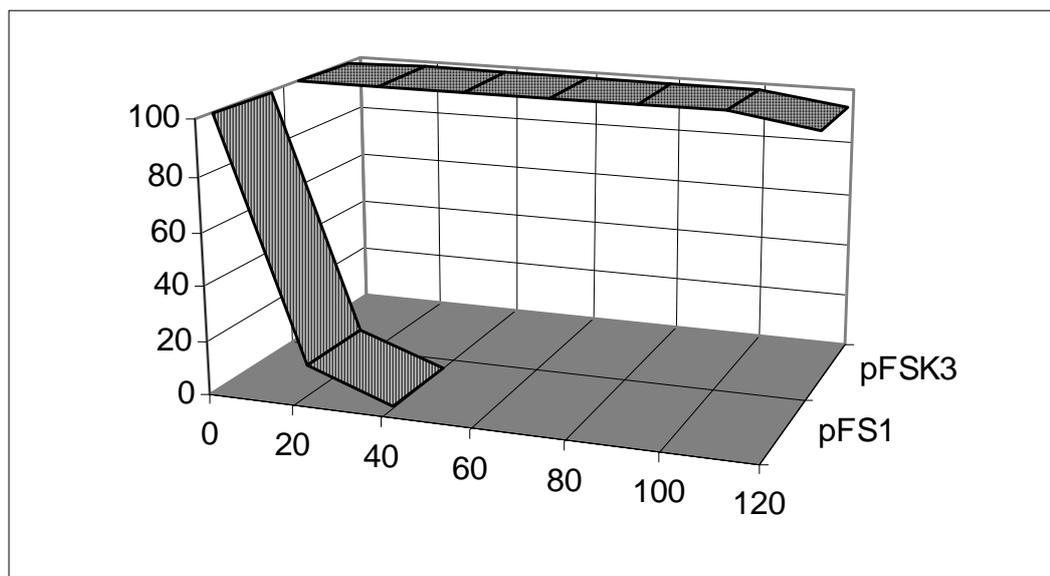


Рисунок 44. Элиминация гибридных плазмид в течение 120 поколений в неселективных условиях в бульоне Хоттингера из клеток *E. coli* DH1

В связи с этим, мы столкнулись с необходимостью селекции из гетерогенной популяции клонов, стабильно наследующих рекомбинантные плазмиды. Известно, что антигены, расположенные на клеточной поверхности, определяют электроповерхностные свойства бактерий [384]. Метод ЭФСП позволил нам отобрать из низкопродуктивной в целом популяции субпопуляцию с наименьшим отрицательным зарядом, обладающую способностью секретировать FI на уровне свежеполученных трансформантов. Использованный нами для ЭФСП прибор Elphor-Var5 позволил разделить исследуемые образцы на 90 фракций. В предварительных экспериментах исследовали убитые клетки, инактивированные мертиолятом натрия

<sup>96</sup> Штамм любезно предоставлен О.А. Кириллиной.

в концентрации 1:10000 с последующим прогреванием при температуре 56 °С в течение 30 мин. Было установлено, что клетки, лишенные FI антигена, находились во фракциях 29-39, а обладающие меньшим поверхностным зарядом продуценты FI - в 48-54. Концентрацию микробных клеток во фракциях определяли измерением оптической плотности образцов с помощью спектрофотометра СФ-26. На основании данных, полученных при изучении убитых клеток, для дальнейшего исследования использовали фракции с 28 по 56. Наличие микробных клеток во фракциях, получаемых после электрофореза, определяли путем посева образцов на плотные питательные среды. Отобранные субпопуляции секретировали капсульный антиген в том же количестве, что и исходные трансформанты штамма *E. coli* DH1pFSK3, и в течение 50 генераций у них не наблюдалось снижения уровня продукции фракции I.

#### 6.2.2. ПРОДУЦЕНТЫ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА НА МОДЕЛИ *Salmonella* spp.

Одним из направлений современной прикладной микробиологии является конструирование поливалентных вакцин, защищающих одновременно от возбудителей нескольких инфекций. В последнее время с этой целью широко используются в качестве носителей чужеродных протективных антигенов штаммы *S. typhimurium*, зависящие от ароматических аминокислот. Локус *aroA* является одним из генов, кодирующих ферменты, которые образуют предхоризматический путь биосинтеза - единственный путь, посредством которого бактерии могут синтезировать ароматические соединения. Для роста мутантам *aroA* необходимы аминокислоты аминобензойная и дигидроксibenзойная кислота и все три ароматические аминокислоты. В клетках млекопитающих синтез ароматических соединений отсутствует. *AroA* мутанты нескольких видов сальмонелл оказались эффективными аттенуированными оральными вакцинами для нескольких видов животных [459]. При использовании модели белых мышей при оральном применении *aro* мутанты *S. typhimurium* вызвали ограниченную инфекцию в ретикулоэндотелиальной системе, и у животных развивался иммунитет к повторному заражению вирулентным штаммом *S. typhimurium* [484]. Перспектива конструирования живой оральной

чумной вакцины на основе аттенуированного сальмонеллезного штамма предопределила наш интерес к изучению возможности экспрессии генов капсульного антигена чумного микроба в клетках сальмонелл.

С этой целью мы осуществили передачу плазмиды pFS1, несущей функционально активный участок *fra* оперона плазмиды pFra чумного микроба в штаммы *S. typhimurium* TT9914 (Ago<sup>-</sup>) и TT9916 (Ago<sup>-</sup>). Синтез FI чумного микроба в клетках *S. typhimurium* TT9914 и TT9916 определяли в РНГА с коммерческим диагностикумом эритроцитарным чумным моноклональным антифракционным иммуноглобулиновым. Продукция капсульного антигена в клетках *S. typhimurium* сохраняла температурную зависимость также как и в штаммах *Y. pestis* "дикого" типа. Уровень секреции FI в клетках *S. typhimurium* TT9914 был в четыре раза выше (1:1024), чем у контрольного вакцинного штамма *Y. pestis* EV (1:256).

Следующим этапом было введение в штаммы *S. typhimurium* плазмид, стабильно наследующихся в энтеробактериях без селективного давления, так как плазида pFS1 не отвечает вышеупомянутым требованиям (менее 5 % клеток сохраняло плазмиду при пассировании на искусственных питательных средах без селективного давления в течение 24 генераций).

Однако нам не удалось осуществить передачу плазмиды pFSK3 в штаммы *S. typhimurium* TT9913, TT9914, TT9915, TT9916. Следует отметить, что в предварительных экспериментах с рекомбинантными плазмидами pFS1 и pFS2, несущими фрагменты ДНК плазмиды pFra *Y. pestis*, было установлено, что в клетках *S. typhi* Tu21a и *S. minnesota* R595 способна реплицироваться плазида pFS1, но не ее делеционный вариант - pFS2 [7], хотя последняя конструкция реплицировалась в клетках кишечной палочки и чумного микроба [162, 163]. Использование вместо криотрансформации [7] метода электропорации позволило в некоторых случаях (плазмиды, содержащие Km<sup>R</sup> маркер) получить колонии трансформантов *Salmonella*, несущих плазмиды с дефектами в *SalGI-EcoRI* области. Эти колонии имели

измененную морфологию (неровный, фестончатый край). Попытки выращивания следующих поколений этих  $Km^R$  бактерий успехом не увенчались.

Учитывая данные описанных выше экспериментов при создании конструкции, обеспечивающей стабильную экспрессию и наследование генов *fra* оперона в клетках сальмонелл, было решено использовать интактный 8,6-kb фрагмент плазмиды pFra, клонированный в составе плазмиды pFS1. Для этого продукты неполного гидролиза рестриктазой *EcoRI* плазмиды pFS1 лигировали с продуктами неполного гидролиза этой же рестриктазой плазмиды pPst, предварительно меченной по сайту *PstI* ген-блоком  $Km^R$  из плазмиды pUC4K и включающей в себя область репликации плазмиды (*ori*), гены *pla*, *pst* и *imm*. Полученную конструкцию обозначили pAE1. Эта плазида в клетках штамма *S. minnesota* R595pAE1 по данным РНГА обеспечивала в условиях отсутствия селективного давления синтез FI на уровне вакцинного штамма *Y. pestis* EV (1:256). Плазида pAE1 стабильно сохранялась в клетках штамма *S. minnesota* R595pAE1 без селективного давления *in vitro* (рис. 45) и обеспечивала уровни продукции FI, выявляемые в РНГА (1:256).

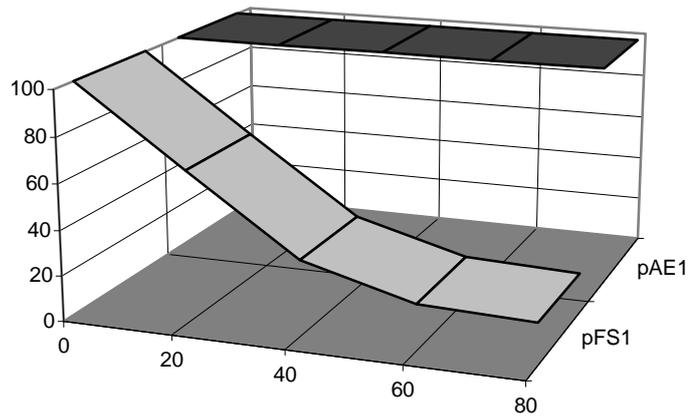


Рисунок 45. Элиминация гибридных плазмид в течение 80 генераций в неселективных условиях в бульоне Хоттингера из клеток *S. minnesota* R595

### 6.2.3. ПРОДУЦЕНТЫ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА НА ОСНОВЕ *Y. pestis*

Как было отмечено выше, в настоящее время в качестве продуцента FI используется штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, обладающий повышенными питательными потребностями и невысокой скоростью роста при температуре 37 °С. И.В. Дармовым с соавт. [111] получен штамм *Y. pestis* EV(3P<sup>-</sup>)(R388Fra), несущий в своем составе гибридный репликон - плазмиду pM16, в составе которой гены *fra* оперона претерпели определенные структурные изменения. Этот штамм обеспечивал продукцию капсульного антигена в 2-4 раза большую, чем у вакцинного штамма *Y. pestis* EV.

В серии предварительных экспериментов при передаче интактного *fra* оперона, клонированного в составе плазмиды pFS1 в реципиентный штамм *Y. pestis* EV11M нами был получен рекомбинантный вариант - *Y. pestis* EV11MpFS1, значительно превышающий все остальные исследованные штаммы по уровню секреции капсульного антигена [15, 245]. Интересно, что синтез и секрецию FI отмечали при культивировании бактерий как при температуре 28 °С, так и при 37 °С. По своей продуктивности штамм EV11MpFS1 превосходил вакцинный штамм EV на три порядка (табл. 16). Однако было отмечено, что через 100-200 генераций после трансформации секреция в химерных клетках снижалась до уровня, превы-

шающего секреторную способность штамма EV всего в 2-4 раза, хотя и сохраняла температурнезависимый характер. Еще одним технологическим недостатком штамма EV11MpFS1 являлась невозможность стабильного наследования в его клетках плазмиды pFS1 в неселективных условиях.

Следующим этапом работы явилось конструирование штаммов *Y. pestis* - продуцентов капсульного антигена, несущих в своем составе плазмиду pFSK3. После передачи указанной плазмиды все реципиентные штаммы приобрели способность к секреции капсульного антигена, причем уровни продукции были намного выше, чем у вакцинного штамма EV (табл. 16). Так как штамм EV11MpFSK3 обладал максимальной способностью к синтезу FI на агаре Хоттингера, он был выбран для более детального изучения его продуктивности не только на плотной, но и на жидкой питательной среде при разных температурах культивирования (табл. 17). Сравнение штаммов *Y. pestis* EV11MpFS1 и EV11MpFSK3 показало, что уровень секреции фракции I у штамма EV11MpFSK3 несколько превышал уровень продукции у штамма *Y. pestis* EV11MpFS1. В обоих случаях продукция FI была температурнезависимой.

Таблица 16. Характеристика использованных в работе штаммов *Y. pestis*

по уровню секреции FI-антигена

(обратные титры по данным РНГА)<sup>97</sup>

Штамм <i>Y. pestis</i>	Уровень секреции FI-антигена	
	28 °С	37 °С
EVНИИЭГ	8	512
EV11M	–	–
EV11MpFS1	4194304	524288
EV11MpFSK3	16777216	524288
HarbinpFSK3	16777216	4096
231pFSK3* <sup>98</sup>	65536	1024
358pFSK3*	16777216	65536

<sup>97</sup> Уровни секреции FI антигена у гибридных штаммов определяли через 80 поколений после трансформации.

<sup>98</sup> \* Штаммы обладали генотипом - pFra<sup>-</sup>pCad<sup>-</sup>pPst<sup>-</sup>.

Таблица 17. Сравнительная оценка продукции фракции I штаммами *Y. pestis*, содержащими в своем составе различные плазмиды с *fra* опероном чумного микроба

(обратные титры по данным РНГА)<sup>99</sup>

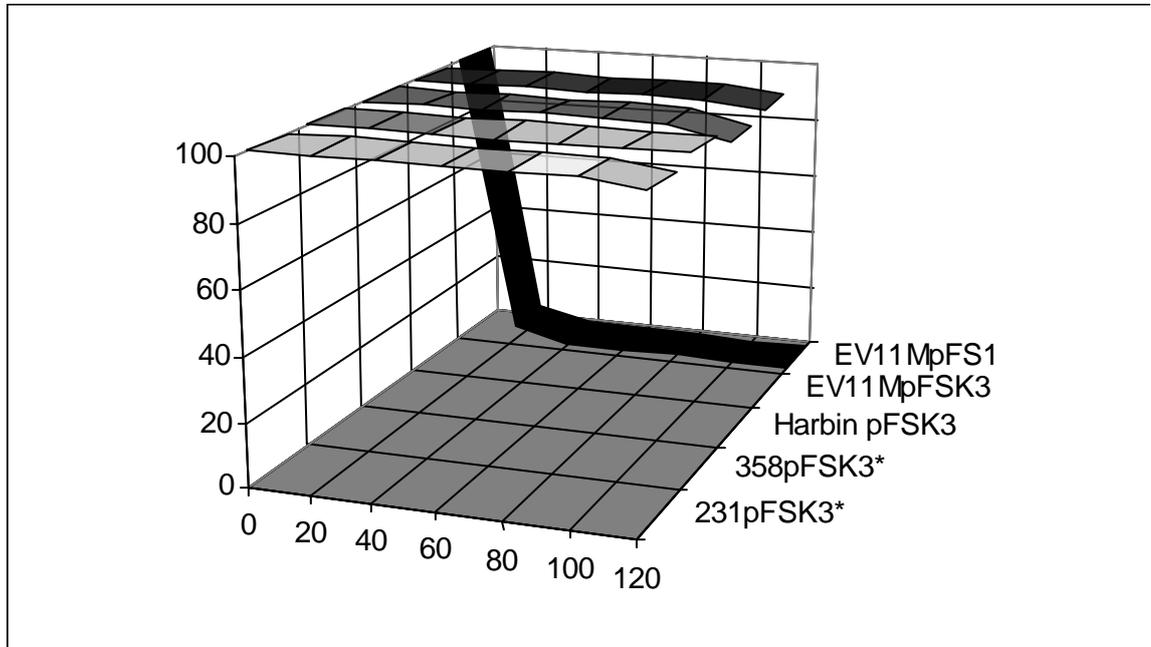
Штамм <i>Y. pestis</i>	Время культивирования	Уровень продукции FI-антигена							
		жидкая среда				плотная среда			
		культуральная жидкость		клеточный осадок		элюирующий раствор		клеточный осадок	
		28 °С	37 °С	28 °С	37 °С	28 °С	37 °С	28 °С	37 °С
EV11MpFSK3	18 ч	8×10 <sup>6</sup>	256	1024	256	8×10 <sup>6</sup>	256	2048	256
	36 ч	16×10 <sup>6</sup>	4096	4096	512	16×10 <sup>6</sup>	4096	8192	512
EVНИИЭГ	18 ч	8	32	4	4	32	32	16	4
	36 ч	16	256	8	16	4	256	2	16
EV11MpFS1	18 ч	5×10 <sup>5</sup>	256	16	256	5×10 <sup>5</sup>	256	2048	256
	36 ч	1×10 <sup>6</sup>	4096	32	4096	1×10 <sup>6</sup>	4096	4096	4096

Анализ уровня синтеза и секреции FI антигена в клетках *Y. pestis* EV11pFSK3 показал, что по своей продуктивности указанный штамм значительно превосходил вакцинный штамм EV (табл. 16, 17). Следует отметить, что максимальные уровни продукции FI антигена отмечались на плотных питательных средах при температуре 28 °С.

В отличие от плазмиды rFS1, плазида rFSK3 сохранялась в клетках возбудителя чумы на протяжении 150-200 генераций без селективного давления (рис. 46).

При сравнении эффективности продукции капсульного антигена штаммами чумного микроба, несущими различные генно-инженерные конструкции с *fra* опероном чумного микроба, была использована и любезно предоставленная нам О.А. Кириллиной плазида rAF10-23, содержащая в своем составе гены, ответственные за признак капсулообразования, клонированные в составе векторной молекулы rAT153. В качестве реципиентных использовали те же самые штаммы, что и для плазмиды rFSK3, чтобы иметь достоверный контроль экспрессии продуктов *fra* оперонов различного происхождения в идентичных штаммах. После трансформации нами были отобраны клоны штаммов чумного микроба, секретирующие,

по данным РНГА, наибольшие количества капсульного антигена. Анализ данных, представленных в таблице 18, показал, что плазида pAF10-23 в клетках *Y. pestis* 231pFra<sup>-</sup>pCad<sup>-</sup>pPst<sup>-</sup>, 358pFra<sup>-</sup>pCad<sup>-</sup>pPst<sup>-</sup>, Harbin, EV11M обеспечивала меньшие уровни синтеза фракции I, чем плазида pFSK3 в аналогичных штаммах.



\* – штаммы обладали генотипом - pFra<sup>-</sup>pCad<sup>-</sup>pPst<sup>-</sup>.

Рисунок 46. Элиминация гибридных плазмид в течение 120 генераций в неселективных условиях в бульоне Хоттингера из клеток рекомбинантных штаммов *Y. pestis*.

Таблица 18. Титры продукции капсульного антигена различными штаммами чумного микроба

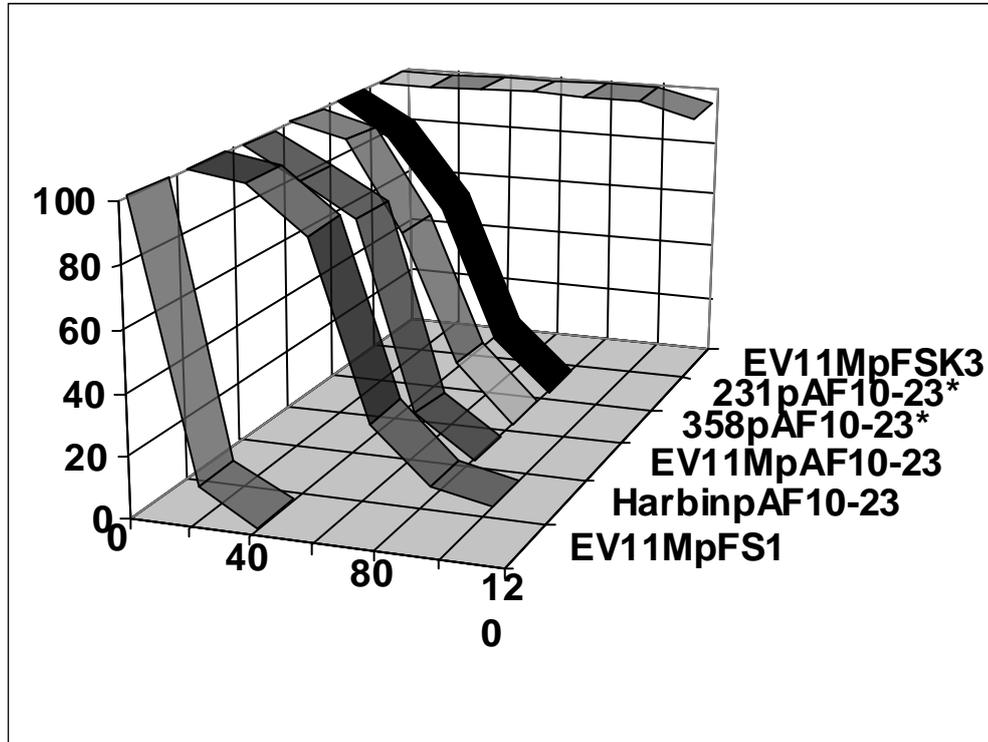
(обратные титры по данным РНГА)

Штамм <i>Y. pestis</i>	Уровень секреции FI-антигена	
	28 °C	37 °C
EVНИИЭГ	8	512
EV11M	–	–
EV11MpAF10-23	4096	1024
HarbinpAF10-23	512	64
231pAF10-23* <sup>100</sup>	512	256
358pAF10-23*	512	256

<sup>99</sup> В таблице указаны среднеарифметические показатели для трех серий опытов.

<sup>100</sup> \* Штаммы обладают генотипом - pFra<sup>-</sup>pCad<sup>-</sup>pPst<sup>-</sup>.

Параллельно с определением предельных величин продуктивности рекомбинантных штаммов нами была изучена стабильность плазмиды pAF10-23 в клетках различных представителей вида *Y. pestis* (рис. 47). Обращает на себя внимание более выраженная элиминация плазмиды pAF10-23 из клеток чумного микроба по сравнению с плазмидой pFSK3.



\* – штаммы обладали генотипом - pFra<sup>-</sup>pCad<sup>-</sup>pPst<sup>-</sup>.

Рисунок 47. Элиминация плазмиды pAF10-23 в течение 120 поколений в неселективных условиях в бульоне Хоттингера из клеток рекомбинантных штаммов *Y. pestis*.

Несмотря на высокую стабильность наследования плазмиды pFSK3 и высокий уровень продукции капсульного антигена в штаммах *Y. pestis* 231pFra<sup>-</sup>pCad<sup>-</sup>pPst<sup>-</sup>, 358pFra<sup>-</sup>pCad<sup>-</sup>pPst<sup>-</sup>, Harbin все эти штаммы имеют один существенный технологический недостаток - они являются ауксотрофами. В то же время штамм *Y. pestis* EV11M обладал способностью расти при температуре 28 °С не только на полноценных, но и на голодных питательных средах (табл. 19) и продуцировал на последних фракцию I в количествах, более чем в два раза превышающих таковые у вакцинного штамма EV на агаре Хоттингера (при темпе-

ратуре 37 °С). Причем этот штамм рос не только на среде А<sup>101</sup> с цистеином, но и на 2 %-ом агаре фирмы “Difco” с добавлением 20 мл 20 % глюкозы в качестве энергетического субстрата.

Таблица 19. **Продукция капсульного антигена штаммом чумного микроба**

**EV11MpFSK3 на голодных питательных средах**

(обратные титры по данным РНГА)

Штамм <i>Y. pestis</i>	Уровень секреции FI антигена	
	28 °С	37 °С
EVНИИЭГ (агар X-ра) <sup>102</sup>	8	512
EV11MpFSK3	1024	512

6.2.4. ПРОДУЦЕНТЫ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА НА ОСНОВЕ *Yersinia enterocolitica*

*Y. enterocolitica* является прототрофом, что может существенно сократить себестоимость выделяемых из ее рекомбинантных вариантов антигенов *Y. pestis*. С другой стороны, авирулентные штаммы этого микроорганизма можно использовать в качестве векторных клеток при конструировании оральных чумных вакцин. В опытах использовали штамм *Y. enterocolitica* КМ33, авирулентный для белых мышей в дозе  $2 \times 10^8$  КОЕ на животное при оральном способе заражения и содержащий плазмиду кальцийзависимости. После передачи плазмиды pFSK3 в этот штамм, в реакции РНГА нами был выявлен уровень секреции фракции I превышающий в 8-16 раз аналогичный показатель продукции для вакцинного штамма EV (табл. 20).

Эти данные были получены при наращивании бактериальной биомассы на полных питательных средах (агар Хоттингера, LB). При выращивании на голодном агаре (среде А) предельные величины секреции капсульного антигена штаммом *Y. enterocolitica* КМ33pFSK3 несколько снизились, но все равно превышали аналогичный уровень для вакцинного штамма

<sup>101</sup> В среде А источником энергии роста служит глюкоза (0,2 %), углерода - цитрат натрия и глюкоза, азота - сернокислый аммоний, серы - сернистая магnezия [222].

EV в два-четыре раза. Плазмида pFSK3 в этом штамме при пассировании без селективного давления в течение 120 генераций стабильно сохранялась на постоянном уровне - у 95-96 % клонов от общего числа клеток популяции.

Таблица 20. **Продукция капсульного антигена рекомбинантным штаммом**

***Y. enterocolitica* на различных питательных средах**

(обратные титры по данным РНГА)

Штамм	Уровень секреции FI антигена	
	28 °С	37 °С
<i>Y. pestis</i> EVНИИЭГ (на агаре Хоттингера)	8	512
<i>Y. enterocolitica</i> KM33pFSK3 (на агаре Хоттингера)	4096	4096
<i>Y. enterocolitica</i> KM33pFSK3 (на среде А)	512	512
<i>Y. enterocolitica</i> KM33 (на обеих средах)	–	–

#### 6.2.5. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПРЕПАРАТОВ РЕКОМБИНАНТНОГО КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА И КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА ИЗ ШТАММА *Y. pestis* EV ЛИНИИ НИИЭГ

Для изучения протективных свойств очищенных препаратов рекомбинантного капсульного антигена из штаммов *Y. pestis*, обладающих суперпродукцией этого антигена, было отобрано три штамма: EV11MpFSK3, EVpFra<sup>-</sup>pCad<sup>-</sup>pPst<sup>-</sup>pFSK3, 358pFra<sup>-</sup>pCad<sup>-</sup>pPst<sup>-</sup>pFSK3. В качестве контрольного использовали штамм *Y. pestis* KM227, который, по данным И.А. Дятлова [131], “в условиях малообъемных экспериментов” при температуре 37 °С позволял получать в 2,0-2,3 раза больше FI, чем при использовании исходного штамма EV. Экспериментальные штаммы культивировали при температуре 28 °С, а штамм KM227 – при 37 °С. После проведения культивирования с использованием бифазных систем агар-бульон [340] на сре-

<sup>102</sup> "(агар X-ра)" - штамм EV линии НИИЭГ выращивали на агаре Хоттингера.

дах Хоттингера, были выделены препараты капсульного антигена из всех вышеперечисленных штаммов. Результаты, полученные в ходе эксперимента, представлены таблице 21.

Таблица 21. **Накопление биомассы и FI<sup>103</sup> исследуемыми штаммами *Y. pestis***

Штамм	Выход биомассы 10 <sup>9</sup> КОЕ/см <sup>3</sup>	Секрция в среду мкг/10 <sup>9</sup> КОЕ	Продукция FI в среду мкг/см <sup>3</sup>	Содержание FI в клетках мкг/см <sup>3</sup>
EV11MpFSK3	18	227	5000	5000
358pFSK3* <sup>104</sup>	48,8	25,5	1250	625
EVpFSK3*	45	112	5000	2500
KM227	54,8	35	1900	1900

Очищенные препараты фракции I из генно-инженерных штаммов в РНГА давали те же титры, что и очищенный капсульный антиген из вакцинного штамма EV.

Протективная активность полученных антигенов (без адьювантов) изучалась на белых мышах в дозах 0,2, 1, 5, 25 мкг на одно животное, по четыре белых мышки на каждую дозу. Результаты, полученные в ходе работы, представлены в таблице 22.

Таблица 22. **Протективная активность очищенных препаратов капсульного антигена, выделенных из различных штаммов чумного микроба<sup>105</sup>**

Штаммы <i>Y. pestis</i>	ImD <sub>50</sub> (мкг)
EV	1
EV11MpFSK3	3
EVpFra <sup>-</sup> pCad <sup>-</sup> pPst <sup>-</sup> pFSK3	2
358pFra <sup>-</sup> pCad <sup>-</sup> pPst <sup>-</sup> pFSK3	4

<sup>103</sup> Количество белка подсчитывали по формуле:

$$P_{\text{мкг}} = \frac{AxBxC}{T}, \quad (3)$$

где P<sub>мкг</sub> – количество белка, мкг;  
 A – содержание FI в стандартном растворе, мкг/мл;  
 B – обратный титр исследуемого раствора;  
 C – степень разведения среды, 1000;  
 T – обратный титр стандартного раствора.

<sup>104</sup> \* – бесплазмидный вариант исходного штамма.

<sup>105</sup> В таблице указаны среднееарифметические значения для двух серий опытов.

### 6.3. ОБСУЖДЕНИЕ

Как было показано в серии предварительных исследований, капсульный антиген в составе рекомбинантных клеток *E. coli* HB101 с высокой эффективностью защищал иммунизированных белых мышей от гибели при заражении их возбудителем чумы "дикого" типа. Указанное свидетельствует о том, что капсульный антиген действительно иммунодоминантен для этих животных, а его синтез в клетках отдаленнородственных микроорганизмов не приводит к нарушению протективных антигенных эпитопов. *A priori* можно было предположить, что аналогичными протективными свойствами будут обладать и продуценты активатора плазминогена и V антигена, т.к. эти очищенные или частично очищенные антигены, по данным ряда исследователей, обладали способностью индуцировать противочумный иммунитет у белых мышей [73, 581].<sup>106</sup> В наших опытах рекомбинантные  $Pla^+FI^-$  и  $Pla^+V^+FI^-$  штаммы значительно уступали по протективности продуцентам FI, что еще раз подтверждает ведущую роль капсульного антигена в иммуногенезе чумы у белых мышей. Казалось бы, этому противоречат более поздние данные R.R. Brubaker *et al.* [488, 514, 515] и S.E.C. Leary *et al.* [366, 494], свидетельствующие о значительной иммуногенной активности препаратов рекомбинантного V антигена. Однако в этих работах для иммунизации животных использовали устойчивые к протеолизу "слитные" белки: протеин A-V антиген [488, 514, 515] или глютамин-S-трансфераза-V антиген [366, 494]. В наших же экспериментах в клетках *E. coli* V антиген синтезировался с интактного *lcrV* гена и, соответственно, был подобен V антигену, образуемому клетками *Y. pestis* и который по данным R.R. Brubaker *et al.* [615] высокочувствителен к действию протеаз.<sup>107</sup>

Следует отметить, что иммуногенные свойства аттенуированных штаммов *Y. pestis* зависят от их "остаточной" или "латентной" вирулентности, т.е. способности в течение огра-

<sup>106</sup> Следует отметить, что  $ImD_{50}$  препаратов фибринолизина составляла более 80 мкг [73], а при использовании V антигена была получена пассивная защита всего лишь от 10 DIm вирулентного штамма [581].

<sup>107</sup> V антиген является полифункциональным белком, обладающим и регуляторной активностью [431], а метаболическая нестабильность - свойство многих регуляторных белков [228].

ниченного срока "обсеменить" ткани иммунизируемых животных [267, 323]. Использованный же в наших экспериментах реципиентный штамм *E. coli* HB101 является *recA* мутантом, а *recA* мутации сопряжены со значительным снижением способности к колонизации тканей макроорганизма и иммуногенности вакцинных штаммов [481]. Если также учитывать, что все лабораторные штаммы *E. coli*, предназначенные для генной инженерии, должны быть нежизнеспособны в окружающей среде, то иммунизация их рекомбинантными производными может быть приравнена к иммунизации "убитыми" вакцинами, которые для индукции напряженного иммунного ответа требуют неоднократного введения [110, 527]. Таким образом, количества FI, однократно введенной в составе рекомбинантных клеток кишечной палочки, оказалось достаточно для защиты большинства иммунизированных белых мышей от заражения штаммом *Y. pestis* 231.<sup>108</sup> В случае иммунизации животных продуцентами V антигена, по-видимому, произошел протеолиз последнего, а продукты протеолиза не смогли индуцировать релевантную перестройку иммунной системы.

Указанные выше соображения послужили основой для конструирования эффективных продуцентов именно капсульного антигена. Для повышения выхода фракции I из рекомбинантных клеток *E. coli* была использована амплификация кодирующих ее генов за счет клонирования в составе собственной мультикопийной плазмиды *Y. pestis* - pPst. Тот факт, что на продукцию FI оказывает влияние ориентация встраивания блока генов *fra-kan* по отношению к генам плазмиды pPst возбудителя чумы, косвенно подтверждает высказанное нами выше предположение о возможных механизмах этого феномена (см. раздел 3.3). Так, при совпадении ориентации гена *pla* плазмиды пестициногенности и гена *caf1R* оперона *fra* (pFSK3) отмечали высокие уровни продукции фракции I (титры в РНГА - 1:4096-1:8192), при противоположных направлениях (рис. 42, pFSK4), способствующих транскрипции с распо-

---

<sup>108</sup> Однако, как уже отмечалось в обзоре литературы, производные аттенуированного штамма *S. typhimurium* SL3261, несущие рекомбинантные плазмиды с полным *fra* опероном, были способны персистировать в организме лабораторных животных в течение как минимум семи дней с момента заражения [448, 577], а рекомбинантные клетки *E. coli*, способные образовывать капсулу *Y. pestis*, были устойчивы к фагоцитозу мышинными перитонеальными макрофагами [437].

ложенного между их промоторами фрагмента ДНК двух способных к гибридизации цепей мРНК, продукция FI не обнаружена. Хотя действительная природа выявленной закономерности может быть установлена лишь после проведения специальных исследований, нам кажется, что эти данные необходимо учитывать и при конструировании продуцентов других биологически активных веществ.<sup>109</sup>

Плазмида rFSK3 в отличие от исходного репликона rFS1 обеспечивала в клетках *E. coli* температурнезависимую продукцию FI. Возможно, это связано с влиянием на клонированный *fra* локус генов плазмиды пестициногенности, расположенных на векторной части конструкции, однако специальных исследований в этом направлении мы не проводили. Следует отметить, что И.А. Дятловым [131] на модели изогенных производных штамма *Y. pestis* EV было установлено положительное влияние присутствия плазмиды rPst на интенсивность секреции FI, но синтез капсульного антигена сохранял температурозависимый характер.

Оценка стабильности наследования и экспрессии плазмиды rFSK3 в клетках *E. coli* в неселективных условиях показала, что, несмотря на стабильное сохранение маркера Km<sup>R</sup> даже после 100-120 генераций рекомбинантных клеток, их способность к продукции FI постепенно снижалась. С одной стороны, это можно объяснить тем, что для повышения выхода конечного продукта была использована амплификация кодирующих его генов. По мнению В.Г. Дебабова [112], амплификация генов "приводит к генетической нестабильности штамма, поскольку в отсутствие селективного давления в результате процесса рекомбинации множественные копии гена, а вместе с ними и повышенная продуктивность утрачиваются". С другой стороны, причиной нестабильности может явиться наличие в рекомбинантной плазмиде повторяющихся последовательностей, гомологичных участкам хромосомы реципиента [228]. Как уже было отмечено выше, И.В. Дармов с соавт. [111] также объясняют снижение продукции капсульного антигена популяциями гибридных клеток *E. coli* накоплением мутантов,

---

<sup>109</sup> Ранее мы столкнулись со сходной проблемой при клонировании *lcrV* локуса репликона rCad в составе вектора rBR322. Плазмида rV9 обеспечивала, получившим ее реципиентным клеткам *E. coli*, V<sup>+</sup>Tc<sup>S</sup>Ap<sup>R</sup> фенотип

образующихся в результате встраивания в гены *fra* оперона IS-последовательностей, присутствующих в бактериальной хромосоме. Независимо от механизмов образования клеток, утративших способность синтезировать FI, перед нами стояла задача по удалению мутантных бактерий из популяции штамма-продуцента. Возникшая проблема была успешно решена путем прямой селекции из гетерогенной популяции клонов, сохранивших максимальную способность к продукции FI, с помощью ЭФСП. Тот факт, что высокая продуктивность полученной таким образом субпопуляции сохранялась как минимум на протяжении следующих 50-ти клеточных генераций, позволяет нам рекомендовать указанный методический подход для включения в качестве обязательного этапа в технологию производства FI *Y. pestis* на стадии подготовки посевной культуры штамма-продуцента.

Данные экспериментов по передаче рекомбинантных плазмид с опероном *fra* в клетки *Salmonella* spp. (табл. 23) позволили нам предположить, что в результате делеции *SalGI* фрагмента ДНК в плазмиде pFS2 нарушается структура неидентифицированного гена. Продукт этого дефектного гена, по-видимому, является избирательно токсичным для представителей рода *Salmonella*, но не для *E. coli* и *Y. pestis*. Интересно, что природа векторной части изучаемых плазмид не оказывает влияния на репликацию. Учитывая все вышесказанное, можно предположить, что наследуется без репликации только одна копия *kan* гена, переданная в составе рекомбинантной плазмиды и достаточная для инактивации канамицина на ограниченном участке в среде выращивания вокруг клетки, на котором в дальнейшем растут бесплазмидные варианты трансформируемого штамма, образуя “псевдоколонию”. При дальнейших пересевах единичная родительская клетка утрачивается, а переносятся бактерии из области вторичного роста.

---

[17], а при обратной ориентации вставки конструкция pVг - фенотип V<sup>-</sup>Tc<sup>R</sup>Ap<sup>R</sup>.

Таблица 23. Репликация различных плазмид, несущих в своем составе *fra* оперон, в клетках сальмонелл, кишечной палочки и чумного микроба

Схемы плазмид	Репликация в клетках	
	<i>E. coli</i> , <i>Y. pestis</i>	<i>Salmonella spp.</i>
<p><b>рFS1 (рFsub1) и рAE1</b></p>	+	+
<p><b>рFS2 (рFsub2)</b></p>	+	-
<p><b>рFBK7 и рFBK10</b></p>	+	+
<p><b>рFSK1 и рFSK3</b></p>	+	-
<p><b>рФПК1</b></p>	+	-

Обозначения: ..... - векторная часть плазмиды (рHC79 или рPst); ———— - *fra*-локус из плазмиды рFra; ≡≡≡≡ локус с *kan* геном из плазмиды рUC4K; B - *Bam*HI; C - *Cla*I; E - *Eco*RI; P - *Pst*I; X - *Xho*I. рFsub1 и рFsub2 – первоначальные названия плазмид рFS1 и рFS2.

Следует отметить, что хотя до 1997 г. в доступной нам литературе не было данных о получении рекомбинантных сальмонеллезных штаммов, стабильно наследующих и экспрессирующих гены *fra* оперона *Y. pestis*, это направление исследований не теряет своей актуальности. До последнего времени продолжался интересный цикл исследований Т.А. Гремяковой

с соавт. [97, 99, 101, 102, 105, 106, 313, 314] по конструированию цельноклеточной и “молекулярной” вакцин на основе сконструированного нами совместно штамма *S. minnesota* R595/GSA (GSA - Т.А. Gremyakova, V.N. Stepanshina, А.Р. Anisimov - [102]). Из-за нестабильности указанного штамма в опытах имеет смысл использовать только убитую вакцину, что сводит на нет преимущества оральных сальмонеллезных вакцин. Для исключения влияния нестабильности наследования плазмид на протективность вакцинных штаммов некоторые исследователи используют селективное давление на клетки непосредственно в организме животного. Так группой английских ученых из Porton Down [525] для стабилизации плазмиды, несущей рекомбинантный *cafI* ген чумного микроба, в клетках штамма *S. typhimurium* SL3261 *aroA* использовалось введение экспериментальным животным ампициллина в течение пяти дней для успешного завершения выработки специфических антител к капсульному антигену. Без селективного давления плазмиды рFGAL2а была также нестабильна, как и плазмиды рFS1, что, по всей видимости, обусловлено векторной частью генно-инженерных конструкций. Однако в последних публикациях R.W. Titball *et al.* [577] и Т.А. Гремяковой с соавт. [448] приведены данные, свидетельствующие о возможности стабилизации наследования и экспрессии плазмид рАН34L и рFS1 соответственно в клетках *aroA* штамма *S. typhimurium* SL3261. Этого эффекта удалось добиться путем парентерального заражения мышей и последующим высевам рекомбинантных бактериальных клеток из печени и селезенки умерщвленных на 1-7-ые сутки с момента заражения животных. Напротив, при культивировании *in vitro* отмечали резкое снижение продукции FI и элиминацию плазмид. По-видимому, дополнительный фактор патогенности<sup>110</sup> обеспечивал обладающим им бактериальным клеткам значительные селективные преимущества в организме интактных животных, что и позволило добиться искомого результата.

---

<sup>110</sup> В отличие от P.C.F. Oyston *et al.* [525], использовавших конструкцию, обеспечивающую внутриклеточный синтез только структурной субъединицы CafI, R.W. Titball *et al.* [577] и Т.А. Гремякова с соавт. [448] воспользовались плазмидами, обеспечивающими образование в реципиентных клетках энтеробактерий функционально полноценной капсулы.

Данные цитированной выше публикации вместе с результатами наших экспериментов по сравнительной оценке стабильности наследования и экспрессии репликонов pFS1 и pAE1 в клетках реципиентного штамма *S. minnesota* R595 *in vitro* (рис. 45) свидетельствуют, что использование нашей плазмиды pAE1 в сочетании с методом ЭФСП позволят значительно упростить технологию и удешевить производство F1 или чумных вакцин на основе сальмонеллезных рекомбинантных штаммов. Немаловажным аспектом этого упрощения нам кажется исключение этапа селекции наиболее продуктивных клонов в организме лабораторных животных и, соответственно, умерщвления последних.

В опытах по конструированию продуцентов F1 на основе авирулентных штаммов чумного микроба показано, что увеличение дозы гена сопровождается значительным увеличением выхода конечного продукта. Парадоксальное, на первый взгляд, снижение продукции капсульного антигена при повышении температуры культивирования с 28 °С до 37 °С может быть связано с дальнейшим возрастанием синтеза F1, приводящим к угнетению жизнедеятельности бактерий и накоплению в популяции микроорганизмов спонтанных мутаций, приводящих к снижению их продуктивности [360]. Интересен тот факт, что в рекомбинантных штаммах *Y. pestis* выявлялась секреция капсульного антигена, превышающая таковую у штамма *Y. pestis* EV в 5000 раз по данным РНГА.<sup>111</sup> Этот исключительный результат в полной мере не может объясняться увеличением продукции белка Caf1 - субъединицы белкового компонента фракции I. Экспериментально показано, что при максимальной скорости синтеза протеина его доля в общем белке клетки не превышает 8 %. При дальнейшем увеличении синтеза этого белка рост клетки вначале замедлится, а затем ее выживание станет невозможным [112]. По другим данным, уровень суперпродукции белковых продуктов генов, чья экспрессия была оптимизирована методами генной инженерии, может составлять от не-

---

<sup>111</sup> Позднее наши данные о возможности конструирования штаммов чумного микроба со сверхвысокой серологической активностью были подтверждены И.Л. Мартиневским [223]. В результате индуцированного нитрозогуанидином мутагенеза им был получен штамм 671-S, обладающий "повышенной (более чем в 3000 раз), по сравнению с EV, продукцией F1".

скольких единиц до 40 % от суммарных белков бактерии [228]. Если учитывать, что в клетках *Y. pestis* дикого типа при температуре 37 °С FI составляет 1-15 % от суммарного количества клеточного белка [91, 110] или 0,47-1,4 % от исходной “воздушно-сухой” бактериальной массы [108], то получается, что в нашем опыте отмечался синтез капсульного белка, составляющий 5000-75000 % от общего белкового синтеза или 2350-7000 % от сухой бактериальной массы, что лишено физического смысла. На первый взгляд кажутся странными диспропорциональность и отсутствие прямой корреляционной зависимости между уровнями продукции фракции I, которые регистрировались в РНГА, и количеством очищенного белка капсульного антигена. Уровень секреции FI в штамме EV11MpFSK3 превышал по содержанию белка предельные цифры продуктивности вакцинного штамма EV всего в 4-6 раз.<sup>112</sup> Невольно встает вопрос - как сочетаются вышеперечисленные цифры с данными, полученными по результатам РНГА, где выявлялось 1000-10000-кратное преимущество экспериментальных штаммов. Следует отметить, что по данным В.И. Тыняновой с соавт. [330] агрегаты субъединиц фракции I с более высокой молекулярной массой увеличивают свою иммунохимическую активность в 10-1000 раз по сравнению с низкоагрегированной формой капсульного антигена. Связь между молекулярной массой биополимера и его антигенной активностью отмечали и другие исследователи [196, 368]. По-видимому, в наших суперпродуцентах образуется FI с молекулярной массой значительно превышающей таковую у FI из штаммов *Y. pestis* дикого типа, а в процессе использованного нами способа выделения и очистки происходила фрагментация капсульного антигена, приводящая, в свою очередь, к многократному снижению его иммунохимической активности.

С одной стороны, представленные данные свидетельствуют о необходимости совершенствования процедуры выделения препаратов капсульного антигена из культуральной

---

<sup>112</sup> Четырех-шестикратная разница в уровнях продукции рекомбинантных и вакцинного штамма EV рассчитана на основании двух-трехкратной разницы между штаммами EV11MpFSK3, EVpFra<sup>-</sup>pCad<sup>-</sup>pPst<sup>-</sup>pFSK3 и штаммом KM227, который, по данным И.А. Дятлова [131], в 2,0-2,3 раза превосходил по продуктивности вакцинный штамм EV.

жидкости и замены преципитации белка в изоэлектрической точке на другие более щадящие методы, что позволит значительно повысить специфическую активность диагностических и вакцинных препаратов сконструированных на основе FI.

С другой стороны, Е.Ю. Марков с соавт. [220] на основании анализа собственных данных и литературных источников отмечают, "что очищенные антигены или их отдельные детерминанты по разным причинам значительно уступают в иммуногенности изолированным поверхностным структурам бактериальной клетки". Высокая иммунохимическая активность именно живых продуцентов FI и культуральной среды, содержащей секретированный ими белок, свидетельствуют о целесообразности использования выявленного феномена при конструировании живых вакцин на основе иерсиний. Этому вопросу и посвящена следующая глава.

В заключение хочется обратить внимание на несовпадение высокого уровня секреции FI в среду штаммом EV11MrFSK3 (в пересчете на  $10^9$  КОЕ) с незначительным выходом биомассы с единицы объема питательной среды. На наш взгляд, это можно объяснить следующим: сверхсинтез продуктов метаболизма идет только в ограниченных условиях питания и, как правило, во вторую фазу роста периодических культур. Рост биомассы замедляется или даже останавливается, а сверхсинтез витаминов, ферментов и других практически важных продуктов начинается и ускоряется. Сверхсинтез и рост являются антагонистами. Условия, улучшающие размножение уже выросших клеток, приводят к снижению выхода продуктов сверхсинтеза [280].

Глава 7. ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ  
ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ - СУПЕРПРОДУЦЕНТОВ КАПСУЛЬНОГО  
АНТИГЕНА *Y. pestis*

Между инактивированными (убитыми) и аттенуированными (живыми) вакцинами имеются существенные различия. Важным параметром, влияющим на эффективность убитой вакцины, является количество содержащегося в ней антигена. Чтобы добиться напряженного иммунного ответа, убитые и химические вакцины приходится вводить в виде нескольких доз. В противоположность этому микроорганизмы, содержащиеся в живой вакцине, размножаются после введения в организм иммунизируемого индивидуума. Количество антигенного материала в живых вакцинах невелико, но в результате размножения число микроорганизмов в организме вакцинированного животного или человека увеличивается в тысячи раз. Во время вакцинального процесса иммунный ответ развивается на многие из антигенов микроорганизма. Однако резистентность к инфекции зависит, главным образом, от иммунного ответа на небольшое число релевантных антигенов, располагающихся на клеточной поверхности. Очевидно, что используемые в настоящее время вакцины, которые состоят из живых и, особенно, из убитых бактерий, индуцируют в значительно большей степени нерелевантный иммунный ответ [84, 220].

Капсульный антиген - фракция I является основным компонентом капсулы *Y. pestis* "дикого" типа [407]. У инфицированных чумным микробом животных наибольшие титры антител выявляются именно на этот антиген [563]. Корреляция выраженности гуморального ответа на FI с протективностью несущих его в своем составе чумных вакцин свидетельствует о том, что он является основным иммуногеном *Y. pestis* [408]. Однако используемые в настоящее время живые и убитые вакцины могут вызывать побочные эффекты, что связывают с высоким содержанием в их составе "балластных", с точки зрения протективности, антигенов *Y. pestis* [243, 501, 539].

Целью настоящего раздела работы явилось конструирование и предварительная оценка иммуногенной активности экспериментальных штаммов *Y. pestis* и *Y. enterocolitica* с относительно пониженным содержанием “балластных” антигенов за счет суперпродукции основного протективного антигена возбудителя чумы - фракции I.

#### 7.1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ВАКЦИННЫЙ ШТАММ НА ОСНОВЕ *Y. pestis*

При конструировании экспериментального вакцинного штамма, на основе *Y. pestis*, в качестве реципиента использовали вариант штамма EV - KM217, обладающий единственной из резидентных плазмид - pCad. Введение в штамм KM217 плазмиды pFSK3 восстанавливало его способность к синтезу активатора плазминогена, кодируемого генами плазмиды пестициногенности. Этот фактор патогенности *Y. pestis* необходим для обеспечения эффективной инвазивности [446, 568] клеток экспериментального вакцинного штамма. Серологическая активность генно-инженерного штамма KM276 (KM217pFSK3) по данным РНГА с коммерческим диагностикумом эритроцитарным чумным моноклональным антикапсульным иммуноглобулиновым превышала таковую штамма EV линии НИИЭГ более чем в 1000 раз. Сконструированный штамм не продуцировал “мышинный” токсин, однако этот антиген, по данным ряда публикаций, или вообще не обладает протективной активностью [130, 230], либо вызывает только развитие напряженного антитоксического иммунитета у чувствительных к нему белых мышей [134].

Сравнительная оценка протективной эффективности штаммов KM276 и маточной культуры вакцинного штамма EV показала следующие результаты: ImD<sub>50</sub> штамма KM276 составила 86 (33-505) КОЕ, ImD<sub>50</sub> штамма EV - 2363 (906-16299) КОЕ. В соответствии с требованиями методических указаний “Основные критерии отбора вакцинных штаммов чумного микроба” [57] испытуемый штамм можно считать более иммуногенным, т.к. максимальный показатель ImD<sub>50</sub> меньше минимального показателя ImD<sub>50</sub> контрольного штамма.

## 7.2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ВАКЦИННЫЙ ШТАММ НА МОДЕЛИ *Y. enterocolitica*

В следующей серии опытов оценивали эффективность экспериментальной оральной чумной вакцины на основе штамма *Y. enterocolitica* KM33pFSK3 (см. раздел 6.2.4) - микроорганизма, приспособленного к выживанию в пищеварительном тракте, а также имеющего антигенное сходство с возбудителем чумы. Протективность штамма *Y. enterocolitica* KM33pFSK3 изучали на модели беспородных белых мышей при оральной иммунизации последних дозами от  $10^5$  до  $10^9$  КОЕ. Сравнительная оценка протективной эффективности штаммов *Y. enterocolitica* KM33pFSK3 и исходного штамма показала следующие результаты:  $ImD_{50}$  генно-инженерного штамма KM33pFSK3 была равна  $1 \times 10^7$  КОЕ, в то время как  $ImD_{50}$  исходного штамма -  $\geq 1 \times 10^9$  КОЕ.

## 7.3. ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что при иммунизации лабораторных животных живыми культурами *Y. pestis* EV, выращенными на различных средах при температурах 28 °C или 37 °C, значительные изменения содержания FI ( $10^2$ - $10^4$  раз) не отражались на их иммуногенности. Это объясняли нивелированием различий в содержании данного антигена при размножении бактерий в макроорганизме [356] или "тем, что микробные клетки, культивируемые при оптимальных условиях, попадая в макроорганизм, быстрее адаптируются и размножаются с последующим биогенезом Ф1 по сравнению с микробными клетками, выращенными при  $37 \pm 1$  °C" [55]. В наших опытах видна достоверная разница в протективной активности штаммов *Y. pestis*: вакцинного EV и экспериментального KM276. Простейшим объяснением выявленного эффекта может быть суперпродукция капсульного антигена, однако, как было показано в предыдущей главе, выход белка FI, по сравнению с вакцинным штаммом EV, увеличивался у рекомбинантных штаммов чумного микроба всего в четыре-шесть раз, а протективная и серологическая активность возрастали соответственно примерно в 30 и 1000 раз. В

то же время известно, что по мере увеличения в антигене эпитопной плотности (количества антигенных детерминант на одну молекулу) иммунный ответ растет, но до определенного предела [196, 368]. Высокая эпитопная плотность обеспечивает поливалентность прикрепления антигена к антителам и рецепторам чувствительных к нему клеток. Это, в свою очередь, с высокой эффективностью инициирует иммунный ответ. Что особенно интересно в плане настоящего исследования, к биологическим реакциям, в которых высокоавидные взаимодействия более эффективны, чем низкоавидные, относят непрямую (пассивную) гемагглютинацию и протективную способность против бактерий [319]. Это хорошо согласуется с предположением о более высокой степени агрегации FI в наших экспериментальных штаммах.

Следует отметить, что в последнее время многие исследователи работают над конструированием "химических" (субъединичных) чумных вакцин. Эти вакцины

- 1) позволяют за счет введения в их состав только иммунодоминантных антигенов значительно снизить реактогенность препарата в целом,
- 2) эффективны для ревакцинации,
- 3) могут быть использованы на фоне экстренной профилактики антибиотиками и
- 4) исключают возможность возникновения инфекционного процесса у лиц с нарушениями иммунного статуса.

Естественно возникает вопрос – в чем преимущество предлагаемого нами вакцинного препарата? Оно заключается в существенных недостатках "химических", антиидиотипических и ДНК вакцин, **индуцирующих иммунный ответ на один-два антигена.**<sup>113</sup>

Как уже отмечалось выше, основным иммуногеном *Y. pestis* и основным компонентом чумных вакцин является FI. "Микрограммовые" количества этого антигена защищают мышей от заражения штаммами "дикого" типа [НИ, 382, 561, 562 и др.], но бескапсульные клетки возбудителя чумы вызывают у иммунизированных капсульным антигеном животных ле-

---

<sup>113</sup> Существенными недостатками "химических" и антиидиотипических вакцин можно считать трудоемкость и высокую стоимость их производства, включающего обязательный этап очистки препаратов.

тальный инфекционный процесс [НИ, 354, 398, 437 и др.]. Более того, в организме иммунизированных F1 мышей происходит селекция именно  $Fra^-$  клеток *Y. pestis* [НИ, 398, 437, 367, 368 и др.]. Это дало основание Т.В. Вурговс еще в 1957 г. [398] сделать заключение, что оптимальная чумная вакцина должна включать в дополнение к F1 другие протективные антигены, являющиеся **обязательными факторами** патогенности *Y. pestis*.

В этом плане интересен цикл исследований А.А. Бывалова с соавт. [59, 60], предложивших новую бикомпонентную вакцину на основе антигенов F1 и Б. Выделенный и охарактеризованный ими Б антиген – это поверхностно расположенный крупномолекулярный полисахаридно-белково-липидный комплекс, детерминируемый хромосомой патогенных иерсиний. В клетках *Y. pestis* экспрессируется по данным РДИД только *in vivo*. При подкожном заражении морских свинок 100 LD<sub>50</sub> вирулентного штамма *Y. pestis* значение ImD<sub>50</sub> составило ≈ 16 мкг антигена. На модели белых мышей и морских свинок при первичной однократной иммунизации показана более высокая протективная активность комплексного препарата, содержащего F1 и Б антигены, по сравнению с таковой каждого из "моноантигенов" при подкожном заражении животных. Однократное подкожное введение комплексного препарата павианам гамадрилам (по 0,5 мг F1 и 0,34 мг Б на животное) защитило от гибели двух из четырех обезьян, зараженных респираторно в дозе 50-70 LD<sub>50</sub>. Две обезьяны, иммунизированные только 0,5 мг F1, погибли от первично-легочной чумы. К сожалению, данные об эффективности этой вакцины в отношении  $Fra^-$  бактерий в указанных публикациях отсутствуют.

В последнее время большие надежды возлагаются и на V антиген, способный защищать животных от заражения как  $Fra^+$  [366, 488, 494, 514, 515, 581], так и  $Fra^-$  штаммами *Y. pestis* [366]. Однако, по этому поводу, следует сделать два замечания.

1. V антиген ингибирует хемотаксис нейтрофилов [592]; супрессирует синтез таких цитокинов как  $\gamma$ -интерферон и фактор некроза опухолей  $\alpha$  [513], причем даже при использовании для иммунизации слитного белка протеин A-V антиген [514, 515] за счет стимуляции

продукции интерлейкина-10 - репрессора указанных выше цитокинов [516]. Эти свойства V антигена, выявленные в опытах на мышах, дают основание предположить, что на модели других животных может быть получен выраженный иммуносупрессивный эффект аналогичный таковому при иммунизации морских свинок микрограммовыми количествами FI [570]. Но так как в настоящее время известны иммунодоминантные эпитопы V [616, 617] и FI [517, 610] антигенов, то конструирование слитных белков, утративших свои патогенетические, но сохранившие протективные свойства не представляет значительных трудностей. Подобные химерные белки FI-V используются в последних исследованиях по созданию чумной субъединичной вакцины, проводимых военными учеными из США и Великобритании [600]. В то же время следует отметить, что продолжают появляться публикации об иммунизации животных комбинациями индивидуальных антигенов FI и V [601].

2. Недавно было показано, что в "полевочьих" штаммах *Y. pestis* V антиген представлен вариантом характерным для *Y. enterocolitica* O:3 серовара [603]. Оба серовара V антигена обладали выраженной протективной активностью в отношении штаммов с гомологичным вариантом V антигена, но не обеспечивали защиты животных при заражении штаммами *Y. pestis* другого серовара [449, 545].

Таким образом, вакцины, сконструированные на основе индивидуальных антигенов FI<sup>14</sup> и V или их комбинации, не являются идеальными, т.к. не могут обеспечить защиты от всех вирулентных вариантов возбудителя чумы. В то же время в разделе 4.3 показано, что вакцина живая чумная на основе штамма EV линии НИИЭГ способна обеспечивать защиту животных как от штаммов "дикого" типа (ИИ для белых мышей  $\approx 3,3 \times 10^4$ , для морских свинок  $\approx 1,4 \times 10^5$ ), так и от их бескапсульных вариантов (ИИ для белых мышей  $\approx 2,6 \times 10^2$ , для

---

<sup>14</sup> "Химическая" вакцина С.М. Дальвадянца [110] и "молекулярная" вакцина Т.А. Гремяковой [314] по сути своей являются комбинациями FI с бактериальными адьювантами полисахаридной природы: ОСА возбудителя псевдотуберкулеза или гликолипида хемотипа Re из штамма *S. minnesota* R595 соответственно, а оценку их протективных свойств проводили только в отношении штамма *Y. pestis* "дикого" типа 231. Интересно, что при иммунизации мышей смесью FI с антидиотипическими антителами к ЛПС *Y. pestis* "отображение" эпитопа ЛПС также обладало выраженным адьювантным действием [429].

морских свинок  $\approx 1,2 \times 10^6$ ). Есть данные, что вакцина живая чумная эффективна и в отношении "полевочьих" штаммов возбудителя чумы [1]. Это подтверждает, что наличие в живых вакцинах, сконструированных на основе аттенуированных штаммов, не только одного-двух иммунодоминантных, но и целого спектра сложных (комплекс белка с ЛПС и т.п.), конформационно-лабильных и минорных антигенов обеспечивает индукцию "гетерогенного" иммунного ответа, способного защитить макроорганизм от патогенных бактерий даже с частично измененной антигенной специфичностью. С учетом всего вышесказанного, сконструированный нами штамм *Y. pestis* KM276 может послужить основой для разработки новой вакцины живой чумной, содержащей меньшее количество "балластных" антигенов за счет использования меньшей иммунизирующей дозы.

Конечно, можно возразить, что  $\text{Fga}^-$  мутанты *Y. pestis* встречаются относительно редко, а "полевочьи" штаммы принято считать непредставляющими эпидемической опасности, но такие возражения не могут быть признаны убедительными.

- Бескапсульные штаммы составляют от 0,2 до 3 % всех выделяемых в природных очагах СНГ культур *Y. pestis* [4, 74, 155, 292].
- Более того, описан случай выделения подобного штамма от человека, погибшего в результате заражения чумой [602].
- Описано два бактериологически подтвержденных случая бубонной чумы, вызванной "полевочьими" штаммами [254].
- В последнее время значительно возросла опасность использования подобных "атипичных" штаммов биотеррористами [503].

Высказанные выше соображения являются, на наш взгляд, достаточным основанием для включения в программу испытаний новых отечественных чумных "химических", антиидиотипических и ДНК вакцин обязательной проверки их протективности в отношении не только традиционно используемых вирулентных тест-штаммов *Y. pestis* "дикого" типа, но и

высоковирулентных Fga<sup>-</sup> и "полевочьих" штаммов, тем более что "атипичные" по FI и V антигенам штаммы возбудителя чумы уже применяются американскими и английскими специалистами для оценки эффективности разрабатываемых ими вакцинных препаратов [366, 369, 449].

Использование в качестве векторов аттенуированных возбудителей инфекций, характеризующихся фекально-оральным путем передачи (сальмонеллы [105, 246, 525], иерсинии [217, 569] и т.п.), позволяет применять при вакцинации оральный способ аппликации. Этот способ привлекает целым рядом преимуществ.

- \* Во-первых, простотой применения вакцинного препарата (таблетки или капли).
- \* Во-вторых, отсутствием осложнений, присутствующих при парентеральном пути введения [243].
- \* В-третьих, показано, что оральная иммунизация мышей аттенуированным сальмонеллезным штаммом, продуцирующим FI, приводит к индукции синтеза не только IgG, но и секреторных IgA, что, в свою очередь, может способствовать эффективной защите в отношении легочной формы чумной инфекции [525]. Однако, на основании данных о высоком уровне протекции, обеспечиваемом IgG, было сделано заключение, что секреторные IgA не имеют существенного значения для защиты мышей от легочной чумы [367]. Более того, было показано, что защищающая иммунизированных животных от легочной чумы субъединичная вакцина, индуцирующая наработку антител к FI и V антигенам, повышала титр IgG не только в сыворотке и культуре клеток селезенки, но и в бронхиальных "смывах" [600].

Большую работу по изучению орального применения вакцинного штамма EV провела С.И. Заплата с соавт. [149]. Они показали, что однократная иммунизация морских свинок *Y. pestis* EV в дозе  $5 \times 10^9$  и  $50 \times 10^9$  микробов обеспечивала почти 100 % выживание животных при последующем подкожном заражении 100 Dcl вирулентного штамма *Y. pestis*. Причем длительность сохранения иммунитета при вакцинирующей дозе  $5 \times 10^{10}$  микробов составляла

6 месяцев. Срок наступления иммунитета при оральной вакцинации составляла 3 дня. Для устранения губительного действия желудочного сока использовали суспензии штамма EV в физиологическом растворе с добавлением 2 и 5 % гидрокарбоната натрия. Следует отметить, что сотрудниками НИИ микробиологии МО РФ разработана на основе вакцинного штамма EV и в настоящее время выпускается коммерческая чумная живая сухая вакцина НИИС для орального применения [353].

Однако для оральной иммунизации перспективнее использовать вакцинные штаммы на основе аттенуированных возбудителей инфекций с фекально-оральным путем передачи (бактерии псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза, сальмонеллы). Попытки иммунизации животных против чумы микробами псевдотуберкулеза, основанные на наличии у чумного и псевдотуберкулезного микробов общих антигенов [116], предпринимались И.В. Домарадским с соавт. [121]. Показано, что устойчивость морских свинок к чуме, создаваемая прививкой слабовирулентных псевдотуберкулезных микробов может достигать довольно высокой степени, приближаясь к таковой у животных, привитых чумным штаммом EV.

Логическим продолжением исследований И.В. Домарадского явилась работа И.В. Макарулина с соавт. [217]. На основании изучения протективных свойств ряда природных штаммов возбудителя псевдотуберкулеза был отобран штамм 164/84, перспективный для использования в качестве реципиентного. Аттенуацию отобранного штамма осуществляли поэтапно. Сначала был получен вариант лишенный плазмиды кальцийзависимости и устойчивый к рифампицину. Затем на его основе с использованием инсерционного мутагенеза был селекционирован ауксотрофный по триптофану мутант. Реактогенность бактерий этого штамма псевдотуберкулезного микроба снизилась до уровня, свойственного вакцинному штамму EV чумного микроба. В бактерии аттенуированного штамма осуществили перенос плазмиды кальцийзависимости *Y. pestis*, а также рекомбинантной плазмиды, несущей *fra* оперон чумного микроба. В опытах на лабораторных животных показано, что рекомбинантный штамм проявлял выраженные иммуногенные свойства. При оральной вакцинации белых

мышей наблюдалось формирование напряженного противочумного (ИИ= $4,6 \times 10^4$ ) и противопсевдотуберкулезного (ИИ=32) иммунитета в отношении подкожного заражения соответствующими возбудителями.

В наших опытах введение в клетки *Y. enterocolitica* KM33 плазмиды pFSK3 приводило к снижению  $\text{ImD}_{50}$  рекомбинантного штамма, по сравнению с исходным, на два порядка. К сожалению, в цитированных выше работах по оральной иммунизации против чумы для оценки иммуногенности вакцинных штаммов были использованы другие методики, что не позволяет провести корректное сравнение. Тем не менее, полученные нами данные свидетельствуют о перспективности продолжения исследований по конструированию оральных живых чумных вакцин на основе аттенуированных энтеропатогенных иерсиний.

## Глава 8. КЛАССИФИКАЦИЯ ФАКТОРОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ПЕРСИСТЕНЦИЮ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ В ПРИРОДЕ<sup>115</sup>

Так как комплекс факторов, обеспечивающих патогенность *Y. pestis*, к настоящему времени практически полностью определен, то возникает необходимость установить "тот минимум признаков, который необходим для обеспечения экспрессии вирулентности" [201], и подразделить все факторы патогенности возбудителя чумы на основные (обязательные) и дополнительные. Для этого необходимо напомнить, что патогенность - это форма **специализации** болезнетворных микроорганизмов, которая позволяет им за счет использования разнообразных механизмов преодоления защитных барьеров и систем хозяина проникать и размножаться в организме определенных видов животных, а затем передаваться новому хозяину [427; 434, 435].<sup>116</sup> Исходя из вышесказанного, к истинным факторам патогенности следует относить лишь те **особые** свойства болезнетворных микробов, которые обеспечивают их персистенцию в паразитарных системах и отсутствуют у непатогенных и условно-патогенных микроорганизмов. В случае возбудителя чумы<sup>117</sup> **обязательными факторами патогенности** являются:

- кодируемая плазмидой pCad система секреции III-го типа<sup>118</sup> и
- рН6 антиген,<sup>119</sup>

<sup>115</sup> Обсуждение рассматриваемого в этой главе вопроса начато еще в разделе 1.1.2, поэтому отдельные положения и доводы могут повторяться.

<sup>116</sup> В результате своей жизнедеятельности патогены повреждают клетки макроорганизма. Хотя во многих случаях повреждение отдельных клеток не проявляется клинически, у значительной части инфицированных животных отмечаются симптомы заболевания, а некоторые особи даже гибнут. Исход инфекционного процесса зависит как от иммунного статуса хозяина, так и от свойств патогена [427; 434, 435].

<sup>117</sup> Следует иметь в виду, что предлагаемая "классификация" справедлива лишь для исследованных пар: *Y. pestis*-белая мышь и *Y. pestis*-морская свинка.

<sup>118</sup> Обеспечивает патогенным иерсиниям способность противостоять неспецифическому иммунному ответу за счет нарушения фагоцитарной и сигнальной активности макрофагов и индукции апоптоза фагоцитарных клеток [413, 414].

<sup>119</sup> Примечательно, что штамм EV830, рН6<sup>-</sup> мутант вакцинного штамма EV линии НИИЭГ, полностью утратил свои протективные свойства в отношении морских свинок и белых мышей [259, 348]. Мы склонны связывать это с утратой им "латентной" вирулентности, т.е. способности ограниченного время размножаться в иммунизируемом организме. Количество же антигенного материала во вводимой дозе живых бактерий невелико и неспособно обеспечить развитие вакцинального процесса. Не меньший интерес вызывает тот факт, что рН6 антиген выявляли только у вирулентных штаммов *Y. pseudotuberculosis* [116].

а к **дополнительным факторам патогенности** следует отнести:

- капсульный антиген FI,
- мышинный токсин,
- активатор плазминогена.

После проведения исследований *in vivo* к **дополнительным факторам патогенности**, возможно, будут отнесены и предполагаемые факторы, выявленные на основании анализа генома *Y. pestis in silico* и обладающие структурной гомологией с факторами патогенности других болезнетворных бактерий [460, 479, 496].

Относительно кодируемого хромосомой признака Pgm<sup>+</sup> хочется еще раз отметить (см. раздел 1.1.2), что он, прежде всего, отвечает за удовлетворение питательных потребностей клеток *Y. pestis* в железе за счет двух различных механизмов. Первый из них определяется кластером генов *hms* и обеспечивает сорбцию гемина на поверхности микробной клетки. Следует подчеркнуть, что у других микроорганизмов (за исключением *Y. pseudotuberculosis*) пока не выявлено структурных аналогов ни для одного из четырех кодируемых этим локусом белков [527], а функционально аналогичные железосвязывающие белки выявлены и у ряда других патогенных бактерий [435]. Это является достаточно веским основанием для отнесения геминсорбирующей активности к факторам патогенности, но существование высоковирулентных Hms<sup>-</sup> мутантов *Y. pestis* [3, 200, 203, 214, 226, 487] свидетельствует о том, что этот механизм поглощения железа не может быть обязательным для возбудителя чумы. Второй механизм определяется сидерофором - "иерсиниабактином" (yersiniabactin). Основанием для ошибочного, на наш взгляд, признания его одним из основных факторов патогенности послужил тот факт, что мутации по генам *irp2*, *psn* и *ybtE*, приводящие к нарушению биосинтеза или транспорта иерсиниабактина, сопровождаются утратой вирулентности [527]. Однако железо в одинаковой степени является необходимым фактором роста для всех про- и эукариотических клеток, а при физиологических значениях "рН соли железа (Fe<sup>3+</sup>) образуют почти нерастворимую гидроокись железа Fe(OH<sub>3</sub>)" [303]. Для

усваивания той незначительной части железа, которая все же находится в растворенном состоянии, как в организме млекопитающих, так и в микроорганизмах синтезируются специальные железосвязывающие белки - сидерофоры. Они не являются уникальными для патогенных бактерий, т.к. найдены практически у всех исследованных представителей царства прокариот [303, 435]. Поэтому продукция сидерофоров, на наш взгляд, не может рассматриваться в качестве фактора патогенности как, впрочем, и другие жизненно важные свойства бактерий,<sup>120</sup> обязательные для полноценного функционирования любой бактериальной клетки. Интересно, что "необходима для полной вирулентности" и еще одна недавно выявленная транспортная система, обеспечивающая поступление в клетки *Y. pestis* железа и марганца [385]. С другой стороны, HmuTUV система, необходимая для использования в качестве источников железа гемина, гемин-альбумина и миоглобина, но не гемоглобина, гемоглобин-гаптоглобина или гем-гемопексина, не играет существенной роли в развитии инфекции у мышей [576].

При тщательном анализе данных литературных источников видно, что специалисты чумологи пугающе часто расходятся во мнениях о том, что нужно считать детерминантами вирулентности или факторами патогенности *Y. pestis*. Нам кажется, что предлагаемая ниже классификация факторов возбудителя чумы, обеспечивающих его персистенцию в природе, сможет примерить сторонников различных точек зрения. Более того, в ней представлены не только биомолекулы, органеллы и системы бактерии, обеспечивающие реализацию патогенных свойств, но и другие факторы необходимые для жизнедеятельности клеток *Y. pestis*.

---

<sup>120</sup> Сюда следует также отнести транспортные системы, обеспечивающие импорт питательных веществ, таких как микроэлементы, витамины, сахара и т.д. [107, 454], способность синтезировать *de novo* биомолекулы (в том числе пурины и ароматические аминокислоты), необходимые для построения хромосомы и других клеточных органелл, и механизмы, ответственные за дыхание, клеточное деление и репарацию.

## КЛАССИФИКАЦИЯ ФАКТОРОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ЕГО ПЕРСИСТЕНЦИЮ В ПРИРОДЕ

### I. Факторы, обеспечивающие персистенцию в организме хозяина

#### Факторы патогенности

1. Факторы, предотвращающие инициирование раннего иммунного ответа хозяина и/или препятствующие опсонизации

##### 1.1. Экранирование ЛПС:

- типичная [550, 561, 562, 605, 606] и атипичные капсулы [НИ, 347, 411];
- образование вокруг бактерии фибринового сгустка [118, 119];
- формирование капсулоподобного слоя за счет связывания рН6 антигеном сывороточного 500-kDa аполипопротеина В100 [410] и Fc субъединиц иммуноглобулинов [362, 607].

1.2. Антигенная мимикрия [45, 53, 77, 95, 145];

1.3. Образование L-форм [157].

1.4. Факторы, способные инактивировать иммунокомпетентные клетки или их продукты:

- FI [66, 317, 368, 544, 599, 608];
- Ymt [238];
- V [513, 516, 592];
- Yops [413, 414];
- Pla [554, 557, 568];
- рН6 [80, 85, 309, 311, 390].

2. Адгезивная активность:

- рН6 [78-80, 390, 497];
- Pla [483, 490];

- FI [300].

### 3. Антигенная изменчивость:

- способность образовывать бескапсульные формы [НИ, 191, 398 и др.];
- способность образовывать серологически атипичные капсулы [НИ, 347, 411];
- сероварияция V антигена [449, 545, 603].

4. Защита капсулированных бактерий от захвата интактными нейтрофилами хозяина [334, 399, 403, 437, 469].

5. Переживание внутри макрофагов [195, 279, 328, 403] за счет инактивации компонентов кислородзависимой системы бактерицидности:

- каталаза [115, 397, 399, 401, 543];
- пероксидаза [115, 222];
- супероксиддисмутаза [123, 357];
- FI [82, 320].

**Факторы, обеспечивающие обратимый переход в частично аттенуированные формы, вызывающие хроническое течение инфекции [118, 119, 264, 527].**

1. Внутригеномные перестройки, обусловленные IS-элементами [336, 337, 432, 533] или бактериофагами [258].

2. Обратимая интеграция плазмид с хромосомой [174, 437, 527, 534, 590].

**Факторы, обеспечивающие антибиотикоустойчивость**

1. Конъюгативные R плазмиды [439].
2. Отсутствие продукции FI [372, 555, 556].

**Факторы питания**

1. Гемолитическая активность Pla, обеспечивающая бактериям дополнительный источник железа [56].

2. Системы, обеспечивающие накопление и поглощение клетками *Y. pestis* железа [385, 527, 576] и марганца [385].

3. Пестицин обеспечивает селективные преимущества клеткам *Y. pestis* в конкуренции с другими патогенными иерсиниями, обладающими сходными механизмами поглощения неорганического железа и гема [526].

4. Способность прекращать при температуре 37 °С эндогенный синтез ряда аминокислот [32, 116] и значительно увеличивать поглощение аминокислот из среды культивирования [242].

## **II. Факторы, обеспечивающие персистенцию в организме блохи,**

### **блокообразование и трансмиссивную передачу**

#### **Факторы, обеспечивающие персистенцию**

Полагают, что переход в L-формы значительно увеличивает сроки переживания *Y. pestis* в блохах [182].

#### **Факторы, обеспечивающие блокообразование**

1. Hms<sup>+</sup> [456, 457, 487].
2. Ymt<sup>+</sup> [5, 174, 179].
3. Pla<sup>+</sup> [177, 483, 504].
4. FI<sup>+</sup> [5, 154, 176, 177, 480].
5. pH6<sup>+</sup> [180].

## **III. Факторы, обеспечивающие персистенцию в окружающей среде**

Образование некультивируемых форм [237].

Предполагаемая способность сохраняться в цистах простейших [119, 120].

Предполагаемая способность существовать в фитофазе - в корнях растений-ксерофитов [282].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для постоянной циркуляции в природных очагах возбудитель чумы должен проникнуть в организм хозяина, противодействовать защитным бактерицидным системам грызуна и размножиться для обеспечения бактериемии, необходимой для дальнейшей передачи блохами новому хозяину. Каждый из этих этапов циклического существования *Y. pestis* обеспечивается множеством факторов возбудителя чумы, которые могут действовать совместно или индивидуально. Каждый из этих факторов, в свою очередь, может участвовать в различных стадиях инфекционного процесса или трансмиссии. Но только **в совокупности** эти факторы обеспечивают персистенцию возбудителя чумы в природных очагах, каким бы значительным или незначительным не был их индивидуальный эффект.

Во всем мире за последние годы можно видеть новый пик интереса к исследованиям, посвященным изучению факторов и механизмов патогенности болезнетворных бактерий. Он не случаен, так как на фоне быстрого развития методологии молекулярной биологии – возможности определения полной нуклеотидной последовательности генома отдельных микроорганизмов, появления технологии ПЦР, разработки новых методов клеточной биологии и клеточной иммунологии, более широкого использования кристаллографии и других способов изучения структурно-функциональной организации отдельных биомолекул, появляется возможность по-новому оценить, казалось бы, полностью изученные бактериальные факторы патогенности. Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей отдельных факторов патогенности различных видов бактерий в ряде случаев позволяет выявить их филогенетическое родство, вскрывает существующие в природе взаимосвязи, дает обобщенную картину путей эволюции микроорганизмов.

С начала 80-ых гг. изучение возбудителя чумы опиралось в основном на исследование собственных резидентных плазмид: выявление их в различных штаммах; изучение полиморфизма их размеров и рестрикционных карт; выявление их интегративной способности; опре-

деление с помощью инсерционного или делеционного мутагенеза и молекулярного клонирования кодируемых ими генов и особенностей их экспрессии. Причем наибольшее внимание, особенно в работах зарубежных исследователей, уделялось плазмиде кальцийзависимости. На основе неизогенных или изогенных наборов "природных изолятов" или экспериментальных штаммов *Y. pestis*, отличающихся по набору собственных плазмид и хромосомным мутациям, было проведено значительное количество иммунологических исследований и экспериментов по определению вирулентности изучаемых культур возбудителя чумы. Доступные нам литературные источники послужили основой для проведения анализа комплекса факторов, определяющих патогенность и вирулентность возбудителя чумы. При планировании и проведении настоящего исследования мы исходили из предпосылки, что только детальный анализ каждого из этих факторов лежит в основе системного подхода при изучении патогенности и вирулентности *Y. pestis*. Это объясняется исключительной сложностью биологических систем и необходимостью решать такие задачи, в которых, как заранее известно, действуют многие факторы, но конкретно они зачастую не выяснены. Более того, им свойственна чрезвычайная изменчивость и неустойчивость характеризующих их параметров. Наибольшее внимание в настоящей работе было уделено капсульному антигену FI, который принято считать основным структурным компонентом капсулы, одним из факторов патогенности и главным иммуногеном возбудителя чумы.

Цель настоящей работы состояла в получении новых сведений о молекулярно-генетических механизмах образования капсулы *Y. pestis*, ее функциональной значимости в патогенезе и иммуногенезе чумы, а также механизмах изменчивости антигенной специфичности капсулы возбудителя чумы.

Основным итогом методической части настоящей работы является создание комплекса методических приемов, позволяющих проводить направленное конструирование неревертирующих  $Fra^-$ , *cafIM* или  $pFra^-$  мутантов *Y. pestis*. Разработанный нами подход сочетает использование локализованного мутагенеза *in vitro*, гомологичной рекомбинации *in vivo*, се-

лекции рекомбинантных клеток в организме иммунного животного и позволяет получать достоверные данные о роли признака капсулообразования в проявлении патогенных и иммунных свойств возбудителя чумы. Также оптимизированы способы стабилизации наследования и экспрессии генетической информации в клетках *Y. pestis* и сконструированы плазмиды, обеспечивающие стабильную суперпродукцию капсульного антигена в клетках энтеробактерий. Разработана методика прямой электрофоретической селекции трансформантов, содержащих последовательности ДНК, кодирующие поверхностные структуры бактерий. Общим принципом разработанных методических приемов является **направленное** изменение генома, позволяющее получать рекомбинантные микроорганизмы со строго определенными генетическими отличиями от исходных штаммов. Включение в схему конструирования вирулентных вариантов чумного микроба с заданными свойствами обязательного этапа ани-мализации не только позволило отобрать из популяций рекомбинантных клеток *Y. pestis* наиболее вирулентные клоны, но и доказать стабильность утраты экспрессии генов, подвергнутых локальному мутагенезу.

В главе 3 описан структурно-функциональный анализ клонированного *EcoRI* фрагмента ДНК, содержащего полный набор генов, необходимых для воспроизведения феномена капсулообразования в клетках *E. coli*. Исследования проводили с помощью метода потери функции. Для инсерционного мутагенеза использовали ген канамицинофосфотрансферазы из плазмиды pUC4K.  $Km^R$  локус в этой плазмиде фланкирован с обеих сторон полилинкерами для рестриктаз: *EcoRI*, *BamHI* и *SalGI*. В ряде случаев использовали аналогичный  $Km^R$  ген-блок, несущий во фланкирующих полилинкерах дополнительный сайт узнавания для эндонуклеазы *HindIII*. Экспрессию генов серии конструкций, полученных путем встраивания маркера  $Km^R$  в различные сайты 8,6-тпн фрагмента плазмиды pFga, клонированного в составе репликона pFS1, и делеционных производных этой плазмиды изучали в клетках *E. coli*. Исследование способности производных плазмиды pFS1 определять синтез капсульного антигена и образование капсулы проводили с помощью РДИД, РНГА, РНАт и световой микро-

скопии по Гинсу-Бури. В результате исследований установлены минимальные размеры фрагментов плазмиды pFga, необходимые для полноценной экспрессии локуса *fra* в составе гибридных плазмид в клетках *E. coli*. Определены гены, нарушение структуры которых приводит к образованию серологически атипичных капсул. При анализе собственных результатов и данных литературных источников предложен ряд гипотез, объясняющих тонкие механизмы секреции и сероварии капсульного антигена в *cafIM* штаммах кишечной палочки, что открывает перспективы их целенаправленной экспериментальной проверки. Результаты, полученные в настоящем разделе работы, легли в основу разработки оригинального способа конструирования Fga<sup>-</sup> вариантов возбудителя чумы и явились основанием для изучения биологической значимости атипичных капсул на модели *Y. pestis*. Кроме того, они учитывались при конструировании продуцентов FI и экспериментальных вакцинных штаммов.

Глава 4 посвящена конструированию и изучению биологических свойств высоковирулентных Fga<sup>-</sup> вариантов чумного микроба. При выполнении этого раздела исследований мы исходили из того, что ценность и убедительность полученных результатов возрастает, если они воспроизводятся в разных опытах, выполняемых на разных моделях. Поэтому на первом этапе работы *cafI* мутанты *Y. pestis* были получены на основе пяти высоковирулентных штаммов различного происхождения. Вирулентность всех сконструированных Fga<sup>-</sup> вариантов *Y. pestis* для белых мышей и морских свинок при подкожном заражении сохранилась на уровне исходных штаммов. Двадцатикратные пересевы на плотных и жидких питательных средах без антибиотиков, десятикратные пассажи на белых мышах и пятикратные – на морских свинках показали, что Fga<sup>-</sup> фенотип стабильно сохранялся у всех проверенных клонов. Изогенные наборы на основе штаммов 231 и 358, включающие варианты с различными сочетаниями мутаций по факторам патогенности, были исследованы более детально. В этих опытах подтверждены данные о том, что основными и обязательными факторами патогенности, необходимыми для проявления вирулентности *Y. pestis* на моделях белых мышей и морских свинок, являются рН6 антиген и продукты, кодируемые плазмидой pCad. Впервые дока-

зано, что направленное "выключение" генов, ответственных за капсулообразование, не приводит к снижению абсолютных величин LD<sub>50</sub> высоковирулентных штаммов "дикого" типа независимо от их происхождения по сравнению с исходными штаммами. Однако у животных, зараженных рядом штаммов с фенотипом Fra<sup>-</sup>, отмечали достоверную задержку сроков гибели. Выраженность перехода чумной инфекции в подострую форму зависела от вида животных и исходного штамма *Y. pestis*.

Важно отметить, что Fra<sup>-</sup> клетки *Y. pestis* обладают селективными преимуществами не только в организмах белых мышей, предварительно иммунизированных штаммами "дикого" типа или "классическим" капсульным антигеном, но и в организмах морских свинок, переболевших экспериментальной чумой, вызванной штаммами "дикого" типа, но не в организмах морских свинок, однократно вакцинированных живой чумной вакциной. Это, на наш взгляд, подчеркивает разницу между поствакцинальным и постинфекционным иммунитетом при чуме и свидетельствует о необходимости оценки эпидемиологической значимости изменения антигенной структуры *Y. pestis* именно на модели переболевших животных.

До последнего времени было общепризнанно, что образуемая клетками *Y. pestis* при температуре 37 °С капсула сформирована в основном из капсульного антигена FI, а Fra<sup>-</sup> штаммы, неагглютинирующиеся капсульной антисывороткой и не реагирующие с другими серологическими диагностическими препаратами, сконструированными на основе FI или анти-FI-антител, не образуют видимой под микроскопом капсулы. Материалы, представленные в 5 главе свидетельствуют, что попытки канонизировать те или иные представления на основании того, что они признаются в настоящее время большинством ученых или наиболее авторитетными из них, нельзя считать ни серьезными, ни продуктивными. Прогресс молекулярной микробиологии приводит к непрерывному генерированию новых гипотез и теорий, пытающихся адекватно объяснить накопленные наукой факты. В сущности, каждая из этих гипотез и теорий выступает как попытка исследователя субъективно осмыслить определенные научные факты, приблизиться к познанию объективной истины. Однако объективная

реальность в том виде, в котором она представляется данному исследователю, далеко не всегда очевидна для других ученых. В истории биологии нередко бывали случаи, когда то, что казалось очевидным большинству ученых, опровергалось дальнейшими исследованиями. При выявлении капсул у 31 штамма *Y. pestis*, включающих  $Fra^+$ ,  $Fra^-$  и  $Fra^\pm$  варианты бактерий, с помощью световой и у 11 из них – иммуноэлектронной микроскопии, а также исследовании секретируемых белков из ряда штаммов, выращенных при различных значениях pH, были получены неожиданные данные, позволяющие сделать следующие заключения. Истинно бескапсульные варианты выявлены нами лишь среди специально сконструированных экспериментальных штаммов возбудителя чумы. В популяциях "природных изолятов" с  $Fra^-$  или  $Fra^\pm$  фенотипами наряду с определенным количеством бескапсульных бактерий содержалось от 10 % до 97 % клеток, образующих атипичные капсулы, не реагирующие с антителами к FI. Капсула *Y. pestis* представляла собой сложную надмолекулярную структуру, состоящую из целого ряда компонентов. Основным компонентом "классической" капсулы штаммов *Y. pestis* "дикого" типа, выращиваемых при температуре 37 °C и pH 7,2 *in vitro*, являлся капсульный антиген FI. При закислении среды культивирования при температуре 37 °C *in vitro* формировалась капсула, состоящая в основном из антигена pH6. В *cafIM* штаммах при температуре 37 °C *in vitro* образовывалась атипичная капсула, в состав которой входил целый спектр белков, большая часть из которых не идентифицирована.

Комплексное использование набора иммунохимических, биохимических, биофизических методов, световой и электронной микроскопии позволили установить, что в рекомбинантных клетках *E. coli* и *Y. pestis*, дефектных по синтезу шаперона CafIM, происходит образование капсулы, отличающейся от органеллы "дикого" типа по антигенности, протективности и электрокинетическому потенциалу. *CafIM* мутанты вирулентных штаммов были способны вызывать у животных инфекционный процесс, не отличающийся от "классической" чумы, но не индуцировали перестройки иммунной системы, защищающей от последующего заражения гомологичными штаммами. Хотя полученные результаты и не могут дать целост-

ного представления о течении сложных эпизоотических процессов в природных условиях, они с большой долей вероятности позволяют предположить возможность участия штаммов возбудителя чумы с атипичными капсулами в развитии инфекционного процесса, а также в формировании затяжных форм чумной инфекции в популяциях диких грызунов, имеющих значительную иммунную прослойку. Это, на наш взгляд, следует учитывать при разработке стратегии и тактики эпизоотологического обследования энзоотичных территорий и профилактики чумы.

Разумеется, пока еще множество важных фактов, касающихся образования атипичных капсул у возбудителя чумы, нам неизвестно, требуется дальнейшая работа по сбору недостающих сведений. Но и на современном этапе очевидна возможность плодотворных обобщений. Тот факт, что действительно бескапсульные штаммы нам удалось обнаружить только среди специально сконструированных экспериментальных вариантов, сохранявших вирулентность на уровне исходных штаммов, а все исследованные  $Fra^-$  или  $Fra^\pm$  "природные изоляты" содержали в своих популяциях как бескапсульные, так и капсульные формы бактерий, свидетельствует, что капсула (типичная или атипичная) необходима *Y. pestis* именно для циркуляции в природных очагах чумы.

Вопрос об эпизоотологическом значении атипичных штаммов должен решаться с точки зрения наличия у них свойств, определяющих способность возбудителя чумы циркулировать в популяции грызунов по схеме трансмиссивного заболевания. Возможность циркуляции бактерий по схеме **грызун-блоха-грызун** определяется, в конечном счете, их способностью вызывать интенсивную бактериемию в организме носителей и образованием блока преджелудка у блох. Мы установили, что  $Fra^-$  и *cafIM* варианты *Y. pestis* способны вызывать генерализованный инфекционный процесс, морфологические признаки которого соответствовали таковым при заражении изогенным бескапсульным вариантом или исходным штаммом "дикого" типа.

В этой связи перспективным направлением дальнейших исследований является проведение экспериментов с генетически охарактеризованными изогенными  $Fra^+$ ,  $Fra^-$  и *caf1M* вариантами *Y. pestis*, для окончательного выяснения роли капсульного антигена в процессе блокообразования у разных видов блох. Особенный интерес могут представлять эксперименты с изогенными наборами штаммов, утративших и другие факторы *Y. pestis*, которые расцениваются рядом исследователей как потенциально влияющие на блокообразование. Основой для проведения таких исследований могут служить полученные в данном исследовании наборы изогенных высоковирулентных штаммов чумного микроба, которые по своей представительности с учетом изогенных им вариантов *Y. pestis*, полученных другими авторами, значительно превышают все ранее описанные аналоги. Разработанная методика локализованного мутагенеза, позволяющая с высокой эффективностью получать необходимые мутанты *Y. pestis*, делает возможным изучение значимости каждого из предполагаемых факторов блокообразования в различных экотипах "систем" *Y. pestis*-блоха-грызун.

В главе 6 приводятся результаты экспериментов по конструированию продуцентов типичного капсульного антигена. Для большинства биотехнологических задач геном клетки должен быть перестроен таким образом, чтобы переориентировать пути биосинтеза на производство необходимого продукта, а не на непрерывное самовоспроизводство. Для недостаточно изученных микроорганизмов единственным способом повышения их продуктивности является ступенчатый отбор спонтанных или индуцированных мутантов. Подобные селекционные работы очень трудоемки и могут занимать многие годы. Тем не менее, следует отметить, что подобная методология позволила повысить в десятки и даже сотни раз выход антибиотиков из промышленных продуцентов антибиотиков по сравнению с микроорганизмами "дикого" типа.

Развитие генной инженерии, позволяющей манипулировать с отдельными генами, значительно расширило возможности реорганизации микробных геномов. С учетом данных о структурно-функциональной организации *fra* оперона нами сконструирована серия проду-

центов на основе различных штаммов *E. coli*, *Salmonella* spp., *Y. pestis* и *Y. enterocolitica*. В частности, впервые получены продуценты FI на основе *Yersinia* spp., обладающие по данным РНГА в  $10^3$ - $10^4$  раз большей серологической активностью, чем природные штаммы *Y. pestis*. Штаммы *Y. pestis* KM277 и *Y. enterocolitica* KM33pFSK3 способны продуцировать капсульный антиген на голодных средах при температурах от 28 °С до 37 °С в количествах, в два-четыре раза превосходящих продуктивность вакцинного штамма EV, выращиваемого на богатых питательных средах. Часть из сконструированных рекомбинантных штаммов предназначена для производства капсульного антигена, входящего в состав диагностических и вакцинных препаратов, другая – является основой для последующего конструирования живых чумных вакцин.

В главе 7 затронуты вопросы вакцинопрофилактики, а именно, конструирования экспериментальных вакцинных штаммов и проверки их иммуногенной активности. Основное внимание уделено изучению экспериментального генно-инженерного штамма *Y. pestis* KM276. Этот штамм обеспечивал за счет суперпродукции капсульного антигена, обладающего повышенной серологической активностью, в 27 раз большую протективность, чем маточная культура эталонного вакцинного штамма чумного микроба. В дальнейшем мы предполагаем осуществить конструирование рекомбинантного вакцинного чумного штамма для орального способа аппликации на основе прототрофного варианта *Y. pestis* EV11M. Для повышения его протективных свойств, восстановления "латентной" вирулентности и приобретения способности колонизировать кишечник иммунизируемых в штамм планируется передать плазмиды pFSK3, pCad (из вакцинного штамма EV) и гены, отвечающие за продукцию фактора колонизации кишечной палочки CFA.

В этом же разделе рассматриваются вопросы оценки эффективности интенсивно разрабатываемых в последнее время "химических", антиидиотипических и ДНК вакцин, индуцирующих иммунный ответ на один-два антигена. Приводится целый ряд доводов, являющихся достаточным основанием для включения в программу испытаний подобных вакцин

обязательной проверки их протективности в отношении не только традиционно используемых вирулентных тест-штаммов *Y. pestis* "дикого" типа, но и высоковирулентных  $\text{Fra}^-$  и "полечочьих" штаммов. В частности, в этих целях возможно использование сконструированных в ходе настоящего исследования высоковирулентных  $\text{Fra}^-$  и *cafIM* штаммов *Y. pestis*.

Важным этапом проведенной работы, который мы хотим отметить в заключение, является предпринятая в главе 8 попытка решения, на первый взгляд, чисто терминологической проблемы. С момента открытия болезнетворных бактерий начались дискуссии о том, какую терминологию использовать для описания патогенных свойств микроорганизмов. К концу 30-ых годов XX-го века большинству исследователей удалось добиться "консенсуса" по вопросу о значении терминов "патогенность" и "вирулентность", хотя надо признать, что и в наше время встречаются отдельные специалисты, полагающие возможным определять вирулентность *in vitro*. Изучение конкретных факторов, определяющих патогенность и вирулентность микроорганизмов, было начато в 50-е годы циклом исследований T.W. Burrows, постулировавшим "детерминанты вирулентности" чумного микроба. Однако до сих пор нет единого мнения по поводу наименования этих факторов. В работах по медицинской и ветеринарной микробиологии можно встретить термины: "детерминанты вирулентности", "детерминанты патогенности", "факторы патогенности", "элементы патогенности", "агрессивные факторы" и т.д., причем в публикациях, посвященных возбудителю чумы, до последнего времени явно лидировали "детерминанты вирулентности". Популярность данного термина может быть объяснена следующими причинами. Важность изучения молекулярных механизмов патогенеза и иммуногенеза чумы в той или иной форме подчеркивается во вводных разделах всеми авторами работ, посвященных изучению микробиологии, биохимии или иммунологии чумы. Но, увы, в подавляющем большинстве случаев основная часть текста обзоров литературы представляет конгломерат сведений, описывающих, прежде всего, отдельные плазмиды *Y. pestis* и некоторые из кодируемых ими и хромосомой факторов патогенности и антигенов. При такой постановке вопроса действительно справедливо говорить о "де-

терминантах" или "генах вирулентности", а также о целых "вирулонах". Однако, в отличие от вирусных заболеваний, при бактериальных инфекциях с организмом хозяина взаимодействует не непосредственно геном микроба, а кодируемые им продукты. Течение и исход заболевания определяется не местом локализации, а экспрессией "генов вирулентности". Поэтому корректнее было бы говорить о "факторах вирулентности", подразумевая под этим понятием не только биомолекулы, органеллы и системы бактерии, обеспечивающие реализацию патогенных свойств, но и различные факторы **макроорганизма** необходимые для реализации этих свойств микроорганизма. Как известно, вирулентность это – лишь степень патогенности конкретного штамма в отношении животных определенного вида (или даже определенной популяции) при стандартных условиях естественного или искусственного заражения. Поэтому к **бактериальным** "факторам вирулентности" следует отнести любые биомолекулы, органеллы и системы бактерии, повреждение которых приводит к снижению жизнестойкости даже непатогенных микробов, и которые, скорее, должны быть предметом изучения физиологии микроорганизмов. Решению указанных выше противоречий и посвящена представленная на суд читателей классификация факторов возбудителя чумы, обеспечивающих его персистенцию в природе.

В заключение следует отметить, что при обсуждении результатов исследований, представленных в различных разделах данной диссертационной работы, мы пытались вкратце остановиться на том, какое значение может иметь разбираемый в соответствующей главе феномен в патогенезе и иммуногенезе чумы, и как теоретические знания о конкретных феноменах могут быть использованы в совершенствовании диагностики и профилактики чумы. Необходимо также подчеркнуть, что пока многие научные идеи, обсуждаемые в этих главах, являются упрощенными и схематичными, но мы надеемся, что они сыграют роль рабочих гипотез, возбуждая и направляя научную мысль.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан оригинальный комплекс методических приемов для проведения генетического анализа признака капсулообразования чумного микроба. Методическая схема включает в себя: - способы направленного конструирования неревертирующих вирулентных штаммов чумного микроба, дефектных по синтезу капсульного антигена, либо образующих атипичную капсулу или лишенных плазмиды pFra; - стабилизацию наследования и экспрессии генетической информации в клетках *Y. pestis* за счет клонирования "целевых" генов в составе собственной плазмиды чумного микроба – pPst; - этап "анимализации", обеспечивающий отбор клонов, сохранивших вирулентность на уровне реципиентных штаммов; - электрофорез в свободном потоке суспензий бактерий для обогащения клеточных популяций штаммов-продуцентов FI клонами, обладающими максимальными уровнями синтеза и секреции капсульного антигена, и освобождения от мутантных клеток, утративших указанные свойства. Разработанные методические подходы могут быть легко адаптированы для изучения других бактериальных факторов патогенности и иммуногенности.

2. Создана уникальная коллекция генетически маркированных штаммов, включающая 42 штамма *Y. pestis*, 1 штамм *Y. enterocolitica*, 41 штамм *E. coli* и 10 штаммов *Salmonella* spp., которая вместе с исходными штаммами стала основой для детального изучения роли признака капсулообразования в патогенезе и иммуногенезе чумы, эпидемиологической значимости штаммов *Y. pestis*, отличающихся по способности образовывать капсулу. Создан набор из 21 рекомбинантной плазмиды, включающий конструкции с полной последовательностью *fra* оперона и его вариантами, полученными с помощью делеционного или инсерционного мутагенеза; инсерционные плазмиды, обеспечивающие целенаправленное выключение определенных генов *fra* оперона в клетках трансформируемого штамма возбудителя чумы; конструкции, обеспечивающие стабильное наследование и экспрессию генов *fra* оперона в реципиентных клетках энтеробактерий.

3. Впервые с помощью комплекса иммунохимических, биофизических методов и световой микроскопии получены экспериментальные доказательства образования капсулы, сформированной из серологически атипичного капсульного антигена, в клетках *E. coli*, несущих оперон *fra*, дефектный по генам *caf1R* или *caf1M*. Выявлено, что перемещение субъединиц капсульного антигена Caf1 на поверхность микробной клетки может проходить без участия шаперона Caf1M. Впервые показано, что "серологический" вариант капсульного антигена в Caf1M<sup>-</sup> бактериях определяется особенностями клеточной поверхности штамма-продуцента и, в первую очередь, формой его ЛПС.

4. Впервые доказано, что основным продуктом плазмиды pFra, влияющим на  $\xi$ -потенциал клеток *Y. pestis*, выращенных при температуре 37 °С, является капсульный антиген. Подтверждена способность типичной капсулы *Y. pestis* экранировать заряды других поверхностных биомолекул и снижать  $\xi$ -потенциал авирулентных капсульных штаммов энтеробактерий по сравнению с их бескапсульными вариантами. Впервые выявлено, что наличие "классической" капсулы *Y. pestis* у вирулентных штаммов *Y. pestis* и *S. enteritidis* сопровождалось повышением абсолютных значений  $\xi$ -потенциала в отличие от изогенных бескапсульных вариантов. Впервые установлено, что у энтеробактерий, отличающихся по наличию генов *fra* оперона, приобретение способности образования атипичных капсул сопровождалось изменениями электрокинетического потенциала по сравнению с бескапсульными вариантами, направленность которых менялась в зависимости от использованных изогенных пар бактерий.

5. Изменение структуры ЛПС не оказывает влияния на серологическую специфичность капсульного антигена, кодируемого интактным *fra* опероном рекомбинантных энтеробактерий. Передача в реципиентные микроорганизмы гибридных плазмид, несущих *fra* оперон с дефектами генов *caf1R* или *caf1M*, приводит к образованию в рекомбинантных штаммах с S-формой ЛПС капсулы серовара FI-1, а в клетках бактерий с R-формой ЛПС - капсу-

лы нескольких сероваров; выявлена связь между серологической специфичностью капсулы и степенью редуцированности ЛПС.

6. Капсула *Y. pestis* представляет собой сложную надмолекулярную структуру, состоящую из целого ряда белков и ЛПС. Основным компонентом "классической" капсулы штаммов возбудителя чумы "дикого" типа, выращиваемых при температуре 37 °С и pH 7,2 *in vitro*, является капсульный антиген FI. Закисление среды культивирования при температуре 37 °С *in vitro* ведет к образованию капсулы, состоящей в основном из антигена рН6. В Caf1M штаммах при температуре 37 °С *in vitro* образуется атипичная капсула, в состав которой входит целый спектр белков, большая часть которых не идентифицирована.

7. Впервые доказано, что избирательное "выключение" синтеза капсульного антигена не приводит к снижению вирулентности мутантных штаммов *Y. pestis* в отношении белых мышей и морских свинок. У лабораторных животных, зараженных рядом Fra<sup>-</sup> штаммов, выявлена достоверная задержка сроков гибели. Выраженность перехода чумной инфекции в подострую форму зависит от вида животных и исходного штамма *Y. pestis*. Fra<sup>-</sup> клетки *Y. pestis* обладают селективными преимуществами в организмах белых мышей, предварительно иммунизированных штаммами "дикого" типа или "классическим" капсульным антигеном, и в организмах морских свинок, переболевших экспериментальной чумой, вызванной штаммами "дикого" типа, но не в организме морских свинок, вакцинированных живой чумной вакциной.

8. Впервые установлено, что штаммы *Y. pestis* с атипичными капсулами обладают селективными преимуществами в организмах белых мышей, предварительно иммунизированных штаммами "дикого" типа или "классическим" капсульным антигеном. Препараты серологически атипичного капсульного антигена обладают слабой протективной активностью в отношении гомологичного серовара возбудителя чумы. При патоморфологическом исследовании внутренних органов интактных и иммунных белых мышей, павших в результате заражения штаммами возбудителя чумы с серологически атипичной капсулой, выявлены морфо-

логические признаки острого инфекционного процесса, соответствующие таковым при заражении исходным штаммом. Полученные данные свидетельствуют о принципиальной возможности участия штаммов с атипичной капсулой в развитии эпизоотического процесса и необходимости целенаправленного поиска подобных вариантов *Y. pestis* в природных очагах чумы.

9. Впервые показано, что рекомбинантный капсульный антиген, синтезируемый в клетках *E. coli*, обладает выраженной протективной активностью в отношении вирулентных штаммов *Y. pestis* "дикого" типа.

10. Сконструированная на основе резидентной плазмиды *Y. pestis* pPst и полной последовательности *fra* оперона рекомбинантная плазида pFSK3 наследуется без селективного давления в течение не менее 100 генераций у 95 % клонов микробной популяции реципиентных штаммов *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *E. coli* и обеспечивает стабильную экспрессию входящих в ее состав генов *fra* оперона. Для репликации рекомбинантных плазмид с генами *fra* оперона в клетках сальмонелл необходимо наличие в них последовательности ДНК протяженностью около 0,5 MDa, непосредственно примыкающей к оперону со стороны гена *cafI*. С учетом этих данных сконструирована плазида pAE1, которая обеспечивает по данным РНГА в клетках штамма *S. minnesota* KM139 в условиях отсутствия селективного давления стабильный синтез FI на уровне вакцинного штамма *Y. pestis* EV.

11. В клетках представителей рода *Yersinia*, но не в клетках других исследованных энтеробактерий (*E. coli*, *Salmonella* spp.), увеличение копийности *fra* оперона приводит к температурнезависимому синтезу и секреции капсульного антигена. По своей серологической активности подобные генно-инженерные штаммы превосходят вакцинный штамм EV линии НИИЭГ в 1000-10000 раз (по данным РНГА). На модели белых мышей экспериментальный генно-инженерный чумной штамм KM276 обеспечивает за счет суперпродукции капсульного антигена и относительного снижения балластных антигенов протективность в 27 раз боль-

шую, чем маточная культура коммерческой вакцины живой чумной (штамм EV линии НИИЭГ).

12. Рекомбинантные штаммы, сконструированные на основе прототрофных представителей рода *Yersinia*, продуцируют независимо от температуры культивирования на голодных питательных средах с добавками глюкозы в качестве источника энергии капсульный антиген в количествах, превышающих уровень продукции капсульного антигена вакцинным штаммом EV на полноценных питательных средах в два-четыре раза. Их использование позволит значительно упростить и удешевить производство капсульного антигена для приготовления диагностических и профилактических препаратов.

13. Факторы, обеспечивающие персистенцию возбудителя чумы в природе, по своей функциональной значимости разделены на три группы. - **Факторы, обеспечивающие персистенцию в организме хозяина:** а) факторы патогенности; б) факторы, отвечающие за обратимый переход в частично аттенуированные формы, вызывающие хроническое течение инфекции; в) факторы, определяющие антибиотикоустойчивость и г) факторы питания. - **Факторы, обеспечивающие персистенцию в организме блохи, блокообразование и трансмиссивную передачу.** - **Факторы, обеспечивающие персистенцию в окружающей среде.**

## БЛАГОДАРНОСТИ

Приношу глубокую благодарность научному руководителю моей кандидатской диссертации д.м.н., проф. К.И. Волковому, за пробужденный во мне интерес к научному творчеству.

Считаю своим приятным долгом выразить искреннюю благодарность всем моим соавторам - сотрудникам ГНЦ прикладной микробиологии РАО "Биопрепарат" (Оболенск, Московская обл.), РосНИПЧИ "Микроб" (Саратов), АООТ "Институт инженерной иммунологии" РАО "Биопрепарат" (Любучаны, Московская обл.) и ГИСК им. Л.А. Тарасевича (Москва), принимавшим участие в планировании и проведении экспериментов, обсуждении их результатов и оказывавшим помощь в оформлении диссертации.

Благодарю директора ГНЦ ПМ д.м.н., проф. Н.Н. Уракова, бывшего директора РосНИПЧИ "Микроб" д.м.н., проф. А.В. Наумова, директора АООТ "Институт инженерной иммунологии" д.м.н., проф. В.П. Завьялова за создание условий для проведения экспериментов, представленных в настоящей работе, и директора РосНИПЧИ "Микроб" д.м.н., с.н.с. В.В. Кутырева за предоставленную возможность завершить данную работу и защитить диссертацию на Специализированном Совете Д 074.32.01 по присуждению ученой степени доктора медицинских наук при РосНИПЧИ "Микроб".

Пользуясь поводом, приношу искреннюю признательность всем рецензентам настоящей работы за многочисленные замечания, вопросы и поправки, которые, по возможности, были учтены и, в ряде случаев, помогли уточнить, а иногда и пересмотреть некоторые положения и формулировки.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абгарян Г.П. Характеристика некоторых штаммов чумного микроба, выделенных на Армянском нагорье от обыкновенных полевков: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. - Саратов, 1966. – 16 с.
2. Абдурахманов Г.А., Асваров Б.М., Бессмертная Ф.С. и др. Характеристика штаммов чумного микроба, выделенных в природном очаге чумы Центрального Кавказа // Особо опасные инфекции на Кавказе: Тез. докл. III научно-практической конфер. противочум. учрежд. Кавказа по природной очаговости, эпидемиол. и профилакт. особо опасных инфекций (14-16 мая 1974 г.). - Ставрополь, 1974. - С. 12-14.
3. Авдеева Н.Г., Карасева З.Н., Солодовников Н.С. Характеристика природного штамма чумного микроба М-777 по признаку пигментсорбции // Микробиология, лабораторная диагностика и специфическая профилактика карантинных инфекций. - Саратов, 1989. - С. 18-21.
4. Айманова О.Я., Канатов Ю.В., Анискина Г.П. и др. О критериях оценки выработки фракции I различными штаммами чумного микроба // Матер. регионального совещания противочумных учреждений по эпидемиологии, эпизоотологии и профилактике особо опасных инфекций (19-20 декабря 1989 г., г. Уральск). – Куйбышев, 1990. - С. 12-14.
5. Акимович В.В., Кондрашкина К.И., Лапина Н.Ф. и др. Роль фракции I и мышинового токсина возбудителя чумы для приживаемости в организме блох // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1969. - Вып. 3 (7). - С. 149-155.
6. Акимович В.В., Шанина Л.Н. Варианты чумного микроба, не образующие капсульного антигена // Вопросы микробиологии и лабораторной диагностики особо опасных инфекций. - Саратов, 1965. - С. 54-58.
7. Алимов А.П., Гремякова Т.А., Ковалев Ю.Н., Анисимов А.П. Клонирование и экспрессия капсульного антигена чумного микроба в клетках *Salmonella typhi* Tu21a и *Salmonella minnesota* Re 595 // Новые технологии и биосистемы. Достижения и перспективы. Материалы XIV научно-практической конференции: Тез. докл. (21-23 мая 1991 г., Оболенск). – Оболенск, 1991. - С. 6-8.
8. Алтухов А.А., Гражданов А.К. Патогенность штаммов возбудителя чумы, лишенных некоторых детерминант вирулентности, для полуденных песчанок // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1969. - Вып. 4 (8). - С. 159-160.

9. Анисимов А.П. К вопросу ускоренного определения вирулентности культур *Y. pestis* при эпизоотологическом обследовании природных очагов чумы // Военно-медицинский журнал. - 1993. - № 11. - С. 47.
10. Анисимов А.П., Андрющенко Б.Н. Напряженность противочумного иммунитета у белых мышей, привитых различными сероварами капсульного антигена *Yersinia pestis*, в отношении вирулентного штамма серовара FI-3 // Профилактика и меры борьбы с чумой. Материалы межгосударственной научной конференции, посвященной 100-летию открытия возбудителя чумы (6-7 сентября 1994 г., Алматы). Алматы, 1994. - С. 59.
11. Анисимов А.П., Гремякова Т.А., Амельченко В.В. Изучение протективности "химической" и убитой экспериментальных вакцин серовара FI-3 в отношении гомологичного штамма *Y. pestis* // Профилактика и меры борьбы с чумой. Материалы межгосударственной научной конференции, посвященной 100-летию открытия возбудителя чумы (6-7 сентября 1994 г., Алматы). Алматы, 1994. - С. 59-60.
12. Анисимов А.П., Гремякова Т.А., Андрющенко Б.Н. и др. Протективная активность препаратов серологически атипичных вариантов капсульного антигена в отношении возбудителя чумы с атипичной капсулой // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1994. - Вып. 4 (74). - С. 210-218.
13. Анисимов А.П., Дятлов И.А. Новый механизм антибиотикорезистентности? // Материалы научно-практической конференции, посвященной 100-летию образования противочумной службы России (16-18 сентября 1997 г.). - Саратов, 1997. - Т. 2. - С. 3-4.
14. Анисимов А.П., Ежов И.Н., Захарова Н.М. и др. Изучение функциональной организации *fra*-оперона *rFra* возбудителя чумы методом направленного мутагенеза // Генетика и биохимия вирулентности возбудителей особо опасных инфекций. – Волгоград, 1992. - С. 6.
15. Анисимов А.П., Захарова Н.М. Сероварияция капсульного антигена возбудителя чумы // Молекул. генетика. - 1992. - № 9-10. - С. 26-29.
16. Анисимов А.П., Захарова Н.М., Говорунов И.Г. Модификация капсулы возбудителя чумы, изменяющая ее иммунохимические свойства // Новые технологии и биосистемы. Достижения и перспективы. Материалы XIV научно-практической конференции: Тез. докл. (21-23 мая 1991 г., Оболенск). – Оболенск, 1991. - С. 13-15.
17. Анисимов А.П., Карлышев А.В., Павлов В.М. и др. Конструирование рекомбинантных плазмид, стабильно наследующихся в клетках *Yersinia pestis* // Генетика, микробиология и совершенствование методов лабораторной диагностики особо опасных инфекций. - Саратов, 1991. - С. 18-25.

18. Анисимов А.П., Коннов Н.П., Демченко Т.А. Субмикроскопическая структура FI-2 сероварианта капсулы *Yersinia pestis* // Профилактика и меры борьбы с чумой. Материалы межгосударственной научной конференции, посвященной 100-летию открытия возбудителя чумы (6-7 сентября 1994 г., Алматы). Алматы, 1994. - С. 60.
19. Анисимов А.П., Маркова В.Ю. Замечания по поводу “новых данных, относящихся к специфичности и генетическому контролю капсульного антигена (F1) *Yersinia pestis*” // Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных болезней. Биотехнология. Ветеринария: Материалы юбилейной научной конференции, посвященной 70-летию НИИ микробиологии МО РФ (Киров, 30 ноября-1 декабря 1998 г.). – Киров, 1998. - С. 45-47.
20. Анисимов А.П., Маркова В.Ю. Изменчивость антигенной специфичности капсулы *Yersinia pestis* и ее влияние на персистенцию бактерий в организме иммунного хозяина // Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. - Вып. 1, юбилейный. Алматы, 1999. - С. 13-18.
21. Анисимов А.П., Маркова В.Ю. Новый механизм антигенной изменчивости бактерий // Материалы VII съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (28-31 января 1997 г., Москва). - Т. 1. - Москва, 1997. - С. 173-174.
22. Анисимов А.П., Маркова В.Ю. Феномен изменчивости антигенной специфичности капсулы *Yersinia pestis* // Материалы научно-практической конференции, посвященной 100-летию образования противочумной службы России (16-18 сентября 1997 г.). - Саратов, 1997. - Т. 2. - С. 4-5.
23. Анисимов А.П., Михина Л.В. Патоморфологические изменения у интактных и иммунных мышей, зараженных вариантами возбудителя чумы, отличающимися по способности синтезировать капсульный антиген // Профилактика и меры борьбы с чумой. Материалы межгосударственной научной конференции, посвященной 100-летию открытия возбудителя чумы (6-7 сентября 1994 г., Алматы). Алматы, 1994. - С. 61.
24. Анисимов А.П., Нечитайло Т.А., Дашенко В.Ф. и др. Селекция мутантов чумного микроба с атипичной капсулой в организме иммунных мышей // Генетика и биохимия вирулентности возбудителей особо опасных инфекций. – Волгоград, 1992. - С. 70.
25. Анисимов А.П., Никифоров А.К., Еремин С.А. и др. Конструирование штамма *Yersinia pestis* с повышенной протективностью // БЭБМ. - 1995. - № 11. - С. 532-534.
26. Анисимов А.П., Никифоров А.К., Корсуков В.Н. Метод прямой селекции трансформантов, содержащих последовательности ДНК, кодирующие поверхностные структуры бактерий // Генетика. - 1994. - Т. 30. (Приложение). - С. 8.

27. Анисимов А.П., Фомченков В.М., Фурсова Н.К. и др. Электрокинетический потенциал клеток *Yersinia pestis* и *Escherichia coli* с интактным или дефектным геном *ucaA (cafIM) fra*-оперона возбудителя чумы // Генетика. - 1994. - Т. 30. - № 9. - С. 1160-1165.
28. Анисимов А.П., Фурсова Н.К. Иммунохимическая активность штаммов *Yersinia pestis*, отличающихся по экспрессии гена *ucaA (cafIM) fra*-оперона // Иммунология и специфическая профилактика особо опасных инфекций. Материалы Российской научной конференции. - Саратов, 1993. - С. 4-5.
29. Анисимов П.И. Цитология чумного микроба в процессе его изменчивости // Журн. микробиол. - 1958. - № 8. - С. 24-30.
30. Анисимов П.И., Сердобинцев Л.Н., Иванов Ю.В. и др. Некоторые физико-химические особенности капсульного белка чумного микроба // Молекул. генетика. - 1987. - № 2. - С. 24-27.
31. Апарин Г.П., Голубинский Е.П. Микробиология чумы. Руководство. - Иркутск, Иркутский государственный университет, 1989. - 92 с.
32. Арыпкаева У.Т. Особенности питания возбудителя чумы из разных природных очагов в условиях культивирования при 37°C: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. - Саратов, 1980. - 22 с.
33. Асеева Л.Е., Мишанькин М.Б., Гончаров Е.К. и др. Некоторые особенности действия "мышинного" токсина и фракции I *Yersinia pestis* на клетки чувствительных к чуме животных // БЭБМ. - 1995. - № 2. - С. 193-195.
34. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. - Л.: Государственное издательство медицинской литературы, 1962. - С. 85-104.
35. Баканурская Т.Л., Семиотрочев В.Л. Недиагностируемые формы микроба чумы обнаружены в межэпизоотический период // Вторая международная конференция, посвященная 75-летию института им. Пастера "Идеи Пастера в борьбе с инфекциями" (Санкт-Петербург, 2-4 сентября 1998 г.). - Санкт-Петербург, 1998. - С. 153.
36. Балахонов С.В., Лясоцкий Л.Л. Апробация ПЦР для детекции *FraG* вариантов возбудителя чумы // Материалы научно-практической конференции, посвященной 100-летию образования противочумной службы России (16-18 сентября 1997 г.). - Саратов, 1997. - Т. 2. - С. 159-160.
37. Балахонов С.В., Цэнджав С., Эрдэнэбат А. Новые плазмидовары штаммов возбудителя чумы, изолированных в Монголии // Молекул. генетика. - 1991. - № 11. - С. 22-29.

38. Басова Н.Н., Герасюк Л.Г. К изучению иммуноотормозящего действия фракции I чумного микроба // Профилактика особо опасных болезней: Тез. докл. межинститутской научн. конфер. (20-22 ноября 1963 г.). - Ростов-н/Д, 1963. - С. 17-18.
39. Бахрах Е.Э., Вейнблат В.И. Соматические полисахаридсодержащие антигены чумного микроба // Журн. микробиол. - 1972. - № 3. - С. 12-16.
40. Безсонова А.А., Ленская Г.Н. Бульон мутящие варианты *B. pestis* (Материалы по диссоциации *B. pestis*) // Вестник микробиологии, эпидемиологии и паразитологии. - 1929. - Т. 8. - Вып. 3. С. 270-279.
41. Бейер А.П. К характеристике фенотипической изменчивости чумного микроба в блохе: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. - Саратов, 1979. - 18 с.
42. Бейер А.П., Брюханова Г.Д., Грижебовский Г.М. и др. Некоторые аспекты взаимоотношений чумного микроба с организмом переносчика // Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных болезней. Биотехнология. Ветеринария: Материалы юбилейной научной конференции, посвященной 70-летию НИИ микробиологии МО РФ (Киров, 30 ноября-1 декабря 1998 г.). Киров, 1998. - С. 354-356.
43. Беляков В.Д., Голубев Д.Б., Каминский Г.Д., Тец В.В. Саморегуляция паразитарных систем (молекулярно-генетические механизмы). Л.: Медицина, 1987. - 240 с.
44. Беляков В.Д. Проблема саморегуляции паразитарных систем и механизм развития эпидемического процесса // Вестн. АМН СССР. -1983. - № 5. - С. 3-9.
45. Белякова Н.И., Шанина Л.Н., Пономарев Н.Г. и др. Перекрестно-реагирующие антигены у чумного микроба и грызунов с различной естественной резистентностью к чуме // Микробиология, биохимия и специфическая профилактика карантинных инфекций. - Саратов, Коммунист, 1990. - С. 96-99.
46. Бибикова В.А., Алексеев А.Н. Зараженность и блокообразование блох в зависимости от количества попавших в них микробов чумы // Паразитология. - 1969. - Т. 8. - С. 196-202.
47. Бибикова В.А., Классовский Л.Н. Развитие популяции чумного микроба в организме блох // Паразитология. - 1972. - Т. 6. - № 3. - С. 229-234.
48. Бичуль О.К., Лебедева С.А., Алексеева Л.П. и др. Получение моноклональных антител к антигену F1 и их использование для тестирования природных и экспериментальных штаммов иерсиний // Микробиология лаб. диагност., спец. проф. карантинных инфекций. - Саратов, 1989. - С. 44-49.
49. Благодатских А.Я., Говорунов И.Г., Фомченков В.М., Анисимов А.П. Фенотипические особенности штаммов возбудителя чумы с мутациями *fra*-оперона // Генетика и биохимия вирулентности возбудителей особо опасных инфекций. Материалы Российской на-

- учной конференции: Тез. докл. (21-22 октября 1992 г., Волгоград). - Волгоград, 1992. - С. 10.
50. Бобров А.Г., Филиппов А.А., Проценко О.А. и др. Перестройки оперона капсулопродукции, приводящие к Fra<sup>±</sup>-фенотипу // Материалы научно-практической конференции, посвященной 100-летию образования противочумной службы России (16-18 сентября 1997 г.). - Саратов, 1997. - Т. 2. - С. 15.
51. Боровикова Т.П. Характеристика специфических полисахаридсодержащих комплексов субкультур штамма ЕВ чумного микроба: Дис. ... канд. биол. наук. - Саратов, 1972. - 155 с.
52. Боронин А.М., Филонов А.Е., Ерова Т.Е. Роль конъюгационного переноса R-плазмид в конкурентных взаимоотношениях плазмидосодержащего и бесплазмидного штаммов *Escherichia coli* в условиях непрерывного культивирования // Антибиотики. - 1985. - Т. 30. - № 1. - С. 22-27.
53. Бочко Г.М., Гончарова Н.С., Некляев В.Н. и др. Перекрестно реагирующие антигены, сходные для возбудителей особо опасных инфекций и тканей человека // Иммунол. и иммунопрофилактика чумы и холеры: Тез. докл. на Всесоюз. конфер. - Саратов, 1980. - С. 28-29.
54. Браун В. Генетика бактерий. - М.: Наука, 1968. - 445 с.
55. Будыка Д.А., Тинкер А.И., Фунтикова Т.Н. Специфическая активность препаратов чумной вакцины ЕВ, обогащенной протективным антигеном // Иммунология и специфическая профилактика особо опасных инфекций. Материалы Российской научной конференции (21-23 сентября 1993 г., Саратов). - Саратов, 1993. - С. 147.
56. Булгакова Е.Г. Генетическая детерминированность гемолитической активности возбудителя чумы // Материалы научно-практической конференции, посвященной 100-летию образования противочумной службы России (16-18 сентября 1997 г.). - Саратов, 1997. - Т. 2. - С. 17-19.
57. Бургасов П.Н., Анисимова Т.И., Кузнецова О.Р. и др. Основные критерии отбора вакцинных штаммов чумного микроба (методические указания) / Утверждены зам. министра здравоохранения СССР А.И. Бурназяном 8 марта 1974 г. - Саратов, 1976. - 34 с.
58. Бухарин О.В. Биомедицинские аспекты персистенции бактерий // Журн. микробиол. - 1994. - Приложение. - С. 4-13.
59. Бывалов А.А., Дармов И.В., Евстигнеев В.И. Антиген, защищающий морских свинок от экспериментальной чумы // Материалы научно-практической конференции, посвященной

- 100-летию образования противочумной службы России (16-18 сентября 1997 г.). - Саратов, 1997. - Т. 1. - С. 192-193.
60. Бывалов А.А., Евстигнеев В.И., Пименов Е.В. и др. Использование комплексного препарата, включающего антигены Ф1 и Б, для иммунизации экспериментальных животных против чумы // Там же. - С. 194.
61. Бывалов А.А., Паутов В.Н., Чичерин Ю.П. и др. Эффективность ревакцинации павианов гамадрилов чумной живой сухой вакциной НИИС и фракцией 1 чумного микроба // Журн. микробиол. - 1984. - № 4. - С. 74-76.
62. Варвашевич Т.Н., Сидорова В.Е. Популяционная изменчивость и биологические свойства бактерий - функция условий культивирования // Вопросы микробиологии, патогенеза и лабораторной диагностики иерсиниозов. - Новосибирск: СО АМН СССР, 1985. - С. 3.
63. Вариводина Т.А., Кудинова Т.П., Кузнецова К.А. и др. Чувствительность серых сурков к дефектным штаммам чумного микроба и особенности иммунологических реакций у этих животных // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1969. - Вып. 6 (10). - С. 51-54.
64. Васильев А.М., Яканкин В.Г., Спирина Г.В. и др. Структурно-функциональные свойства рекомбинантных F1 и I - антигенов чумного микроба // Актуальные вопросы профилактики опасных инфекционных заболеваний: Тез. докл. к Межведомственной научной конференции (26-28 марта 1991 г., Киров). - Киров, 1991. - С. 173-174.
65. Васильев А.М., Яканкин В.Г., Чикиндас С.Е. и др. Изучение механизмов полимеризации капсульного F1 антигена чумного микроба // Генетика и биохимия вирулентности возбудителей особо опасных инфекций. Материалы Российской научной конференции: Тезисы докладов. (Волгоград, 21-22 октября 1992 г.). - Волгоград, 1992. - С. 79.
66. Васильева Г.И., Пустовалов В.Л., Дорошенко Е.П. Влияние антигена F1A чумного микроба на рецепторы Т-лимфоцитов // Проблемы медицинской и санитарной микробиологии города: Тез. докл. областной конференции (Ростов-н/Д, 4 мая 1987 г.). - Ростов-н/Д, 1987. - С. 39-40.
67. Васильева Г.И., Пустовалов В.Л., Киселева А.К. и др. Оценка вирулентности штаммов *Yersinia pestis* по индексу завершенности фагоцитоза // Журн. микробиол. - 1987. - № 6. - С. 117.
68. Вейнблат В.И. Антигены *Yersinia pestis* (Биохимические и иммунологические аспекты): Дисс. ... док. мед. наук. - Саратов, 1974. - 324 с.

69. Вейнблат В.И., Белобородов Р.А., Боровикова Т.П. и др. Характеристика фрагментов капсульного антигена, растворимых в трихлоруксусной кислоте // Проблемы особо опасных инфекций. – Саратов, 1974. - Вып. 4 (38). - С. 22-27.
70. Вейнблат В.И., Веренков М.С., Васенин А.С. Получение капсульного антигена из живых чумных микробов // Иммунол. и иммунопрофилактик. чумы и холеры. - Саратов, 1980. - С. 36-39.
71. Вейнблат В.И., Дальвадянец С.М., Веренков М.С. Методы получения и очистки капсульного антигена и эндотоксина возбудителя чумы // Лабор. дело. - 1983. - № 12. - С. 37-39.
72. Вейнблат В.И., Никифоров В.В., Кормилицин А.В. Гидродинамическая характеристика капсульного антигена возбудителя чумы // Вопросы генетики, молекулярной биологии и микробиологии чумы и холеры. - Саратов, Коммунист, 1985. - С. 37-42.
73. Вейнблат В.И., Палагин А.Ю., Веренков М.С. и др. Иммунобиологические свойства препаратов фибринолизина чумных микробов // Биотехнология, иммунология и биохимия особо опасных инфекций. - Саратов, 1989. - С. 14-19.
74. Величко Л.Н., Кокушкин А.М. Частота выявления атипичных штаммов возбудителя чумы в природных очагах // Материалы научно-практической конференции, посвященной 100-летию образования противочумной службы России (16-18 сентября 1997 г.). - Саратов, 1997. - Т. 1. - С. 21.
75. Вершинина Т.И. О популяционной гетерогенности возбудителя чумы из природных очагов Горного Алтая и Северо-Западной Монголии: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. - Саратов. - 1986. – 16 с.
76. Ветчинин С.С., Гремякова Т.А., Шайхутдинова Р.З. и др. Специфичность моноклональных антител к липополисахаридам *Yersinia pestis* // Материалы научно-практической конференции, посвященной 100-летию образования противочумной службы России (16-18 сентября 1997 г.). - Саратов, 1997. - Т. 1. - С. 198-199.
77. Видяева Н.А., Кутырев В.В., Шанина Л.Н. и др. Перекрестно реагирующие антигены возбудителя чумы и человека // Генетика и биохимия вирулентности возбудителей особо опасных инфекций. Материалы Российской научной конференции: Тезисы докладов. (Волгоград, 21-22 октября 1992 г.). - Волгоград, 1992. - С. 80.
78. Водопьянов С.О., Атарова Г.Т., Олейников И.П. и др. Фибронектин связывающая способность *Yersinia pestis* // Журн. микробиол. - 1993. - № 3. - С. 6-12.
79. Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н. Пили адгезии у *Yersinia pestis* // Журн. микробиол. - 1985. - № 6. - С. 13-17.

80. Водопьянов С.О., Попова Г.О., Васильева Г.И. и др. Феномен пилеобразования при взаимодействии *Yersinia pestis* с макрофагами экспериментальных животных // Журн. микробиол. - 1990. - № 3. - С. 3-6.
81. Водопьянов С.О., Рыбьянец А.А., Веркина Л.М. и др. Изучение протективной активности пилей адгезии *Yersinia pestis* // Журн. микробиол. - 1995. - № 5. - С. 26-29.
82. Воронцов Е.Д., Барсуков А.А., Годков М.А. и др. Подавление кислородного метаболизма фагоцитов капсульным белком // II Всесоюзная конференция "Актуальные вопросы теоретической и прикладной инфекционной иммунологии; механизмы противоинфекционного иммунитета" (Саратов, 27-28 октября 1987 г.): Тез. докл. - М., 1987. - С. 36.
83. Воронцов Н.Н. Популяции // БМЭ. - М., 1983. - Т. 20. - С. 257.
84. Галазка А. Общая иммунология. Иммунологические основы иммунизации. - Женева: Всемирная организация здравоохранения, 1993. - 28 с.
85. Галактионов В.Г., Хромых Л.М., Василенко Р.Н. и др. Изучение влияния рекомбинантного белка I (антигена рН 6,0) *Yersinia pestis* на различные звенья иммунитета // Генетика и биохимия вирулентности возбудителей особо опасных инфекций. Материалы Российской научной конференции: Тезисы докладов. (Волгоград, 21-22 октября 1992 г.). - Волгоград, 1992. - С. 85.
86. Гвозденко Н.А., Рыжков В.Ю., Павлович Н.В. Получение и характеристика вариантов чумного микроба, не продуцирующих капсульного антигена // Микробиол. журн. - 1990. - Т. 52. - № 6. - С. 13-17.
87. Голковский Г.М., Загнибородова Е.Н., Бахаева А.В. Возможность образования блока и передачи чумного микроба восприимчивым животным при инфицировании блох авирулентным штаммом ЕВ // Вопросы микробиологии и лабораторной диагностики особо опасных инфекций. - Саратов, 1965. - С. 121-124.
88. Головлев Е.Л. Метастабильность фенотипа у бактерий // Микробиология. - 1998. - Т. 67. - С. 149-155.
89. Голубинский Е.П., Рублев Б.Д., Герасюк Л.Г. и др. К характеристике иммуногенности конъюгированных антигенов чумного микроба // Совр. аспекты профилакт. зоон. инфекций. - Иркутск, 1984. - Ч. 2. - С. 20-21.
90. Гольдфарб Л.М., Пунский Е.Е., Левина А.А. и др. Выявление атипичных штаммов чумного микроба среди культур, выделенных на территории Туркмении в 1966-1969 годах // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1971. - Вып. 4 (20). - С. 18-21.

91. Гончаров А.Ю. Структурно-функциональная организация участка ДНК рУТ плазмиды, ответственного за синтез фракции I чумного микроба: Дисс. ... канд. мед. наук. - Ростов-н/Д, 1995. – 144 с.
92. Гончаров А.Ю., Гончаров Е.К., Алутин И.М. и др. Локализация ответственного за синтез фракции I участка ДНК на плазмиде рУТ чумного микроба // Молекул. генетика. - 1992. - № 11-12. - С. 10-14.
93. Гончаров А.Ю., Гончаров Е.К., Марченков В.И. Физическое картирование плазмиды рУТ чумного микроба // Эпидем., микробиол. и иммунол. бакт. и вирус. инф.: Тезисы обл. научн. конфер. молодых ученых. - Ростов-н/Д, 1989. - С. 144-145.
94. Гончарова Н.А., Иванова В.С., Лебедева С.А. и др. Генетический анализ высокомолекулярных плазмид полевоочьих штаммов чумного микроба // Эпидемиол., микробиол. и иммунол. бакт. и вирусн. инф.: Тез. докл. - Ростов-н/Д, 1989. - С. 145-147.
95. Гончарова Н.С., Анисимов П.И., Шанина Л.Н. и др. Гетерогенные антигены возбудителей чумы и холеры, общие с тканями человека // Профилактика особо опасных инфекций. - Вып. 3. – Саратов, 1977. - С. 85-90.
96. Гребцова Н.Н., Чернявская А.С., Лебедева С.А. и др. Изучение фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов в отношении *Yersinia pestis* с дефектными и полноценными *fra*-генами // Журн. микробиол. - 1990. - № 5. - С. 7-11.
97. Гремякова Т.А., Амельченко В.А., Анисимов Г.А. Ранняя защита от экспериментальной чумы животных, иммунизированных рекомбинантной чумной вакциной // БЭБМ. - 1995. - № 1. - С. 54-57.
98. Гремякова Т.А., Анисимов А.П. Серологическая активность антигена "фракция I" *Yersinia pestis* определяется его белковым компонентом // Гомеостаз и инфекционный процесс: Тезисы докладов к международной конференции. - Саратовский государственный медицинский университет, Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб", Саратов, 1996. - С. 319.
99. Гремякова Т.А., Анисимов А.П., Говорунов И.Г. Секреция капсульного антигена возбудителя чумы в энтеробактериях // Новые технологии и биосистемы. Достижения и перспективы. Материалы XIV научно-практической конференции: Тез. докл. (21-23 мая 1991 г., Оболенск). – Оболенск, 1991. - С. 9-11.
100. Гремякова Т.А., Анисимов А.П., Захарова Н.М. Взаимосвязь способности к экспрессии различных серовариантов капсульного антигена *Yersinia pestis* со степенью редуцированности липополисахарида бактериальных клеток // Журн. микробиол. - 1995. - № 1. - С. 3-6.

101. Гремякова Т.А., Анисимов А.П., Степаншина В.Н. и др. Экспрессия капсульного антигена чумного микроба в микроорганизмах с S- и R- формами липополисахаридов // Актуальные вопросы профилактики опасных инфекционных заболеваний: Тез. докл. к Межведомственной научной конференции (26-28 марта 1991 г., Киров). – Киров, 1991. - С. 198-199.
102. Гремякова Т.А., Анисимов А.П., Степаншина В.Н. и др. Новый штамм-продуцент капсульного антигена *Yersinia pestis* // Новые технологии и биосистемы. Достижения и перспективы. Материалы XIV научно-практической конференции: Тез. докл. (21-23 мая 1991 г., Оболенск). – Оболенск, 1991. - С. 73-75.
103. Гремякова Т.А., Волковой К.И., Степанов А.В. и др. Температуро-опосредованное изменение иммунохимической специфичности липополисахаридов *Yersinia pestis* и чувствительности клеток к R-специфическим фагам // Материалы научно-практической конференции, посвященной 100-летию образования противочумной службы России (16-18 сентября 1997 г.). - Саратов, 1997. - Т. 2. - С. 28.
104. Гремякова Т.А., Орлов М.Ф., Ковалев Ю.Н., Анисимов А.П. Изучение гуморального иммунитета при экспериментальной чуме у мышей // Иммунология и специфическая профилактика особо опасных инфекций. Материалы Российской научной конференции (21-23 сентября 1993 г., Саратов). - Саратов, 1993. - С. 20-21.
105. Гремякова Т.А., Степаншина В.Н., Коробова О.В. и др. Протективная активность рекомбинантного штамма *Salmonella minnesota* R595/GSA, синтезирующего капсульный антиген чумного микроба, при экспериментальной чуме у мышей // Молекул. генетика. - 1994. - № 1. - С. 23-26.
106. Гремякова Т.А., Степаншина В.Н., Негрий В.Ф. и др. Сравнительная характеристика препаратов капсульного антигена F1 *Yersinia pestis*, полученных из штаммов-продуцентов с различной структурой липополисахаридов // Журн. микробиол. - 1994. - № 3. - С. 10-14.
107. Громов Б.В. Строение бактерий. Л.: Издательство Ленинградского университета, 1985. - 190 с.
108. Губарев Е.М., Пустовалов В.Л., Коннова А.М. и др. Изучение количественного содержания и свойств фракций IA и IB вирулентных и авирулентных штаммов чумного микроба // Профилактика особо опасных болезней: Тез. докл. межинститутской научн. конфер. (20-22 ноября 1963 г.). - Ростов-н/Д, 1963. - С. 28-29.

109. Гузев В.С., Голубев В.И., Звягинцев Д.Г. Обнаружение микрокапсул у микроорганизмов и контролирование полноты их декапсулирования методом микроэлектрофореза // Микробиология. - 1972. - Т. 41. - С. 115-120.
110. Дальвадянец С.М., Дробышева Т.М. Сравнительное изучение напряженности противочумного иммунитета у белых мышей, привитых "химической", убитой и живыми чумными вакцинами // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1977. - Вып. 6 (58). - С. 31-33.
111. Дармов И.В., Маракулин И.В., Янов С.Н. и др. Конструирование штаммов-продуцентов антигенов F1 и T чумного микроба // Биотехнология. - 1992. - № 6.- С. 59-62.
112. Дебабов В.Г., Лившиц В.А. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. М.: Высшая школа, 1988. – 208 с.
113. Денесюк А.И., Завьялова Г.А., Абрамов В.М. и др. Компьютерный анализ структуры и иммунобиологической активности Ф1-антигена чумного микроба // Актуальные вопросы профилактики опасных инфекционных заболеваний. – Киров, 1991. - С. 175-176.
114. Дертева И.И., Кондрашкина К.И., Веренков М.С. Возможность обнаружения капсулообразующих и бескапсульных вариантов чумного микроба в инфицированных блохах иммуно-флюоресцентным методом // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1970. - Вып. 3 (13). - С. 143-147.
115. Джапаридзе М.Н. Каталазная и пероксидазная активность чумного и псевдотуберкулезного микробов: Дисс. ... канд. мед. наук. - Саратов, 1953. – 205 с.
116. Домарадский И.В. Возбудители пастереллезов и близких к ним заболеваний. М.: Медицина, 1971. – 288 с.
117. Домарадский И.В. О "побочных" эффектах плазмид (R-плазмиды и вирулентность) // Молекул. генетика. - 1987. - № 6. - С. 3-9.
118. Домарадский И.В. Очерки патогенеза чумы. М.: Медицина, 1966. – 272 с.
119. Домарадский И.В. Чума. - М.: Медицина, 1998. – 176 с.
120. Домарадский И.В. Чума: современное состояние, гипотезы, проблемы. Саратов: Саратовский медицинский институт, 1993. – 130 с.
121. Домарадский И.В., Колесник Р.С., Клец Э.И. и др. Попытка иммунизации против чумы псевдотуберкулезными микробами в комбинации с чумными // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1970. - Вып. 5 (15). - С. 12-16.
122. Дорошенко Е.П. Изменение биологических свойств чумного микроба при пассировании в макрофагах экспериментальных животных: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. - Саратов. - 1994. – 11 с.

123. Дробков В.И., Погорельский И.П., Дармов И.В. Локализация супероксиддисмутаза в клетках чумного микроба // Материалы научно-практической конференции, посвященной 100-летию образования противочумной службы России (16-18 сентября 1997 г.). - Саратов, 1997. - Т. 2. - С. 37-38.
124. Дробышева Т.М. Влияние селективных факторов хозяина на популяционную изменчивость чумного микроба // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1974. - Вып. 5 (39). - С. 134-139.
125. Дроздов И.Г., Ежов И.Н., Анисимов А.П. и др. Характеристика вирулентных свойств бесфракционных штаммов чумного микроба, полученных методом сайтспецифичного делеционного мутагенеза // Генетика и биохимия вирулентности возбудителей особо опасных инфекций. Материалы Российской научной конференции: Тез. докл. (21-22 октября 1992 г., Волгоград). - Волгоград, 1992. - С. 16.
126. Дроздов И.Г., Ежов И.Н., Самойлова С.В., Анисимов А.П. и др. Получение бескапсульных вариантов возбудителя чумы способом направленного делеционного мутагенеза // Российский н.-и. противочумн. ин-т "Микроб" - Саратов, 1992 г. - Деп. в ВИНТИ 13.05.92, № 1577- В92 - В. - 12 с.
127. Дроздов И.Г., Ежов И.Н., Самойлова С.В., Анисимов А.П. и др. Способ получения бескапсульных вариантов возбудителя чумы // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1993. - Вып. 3 (73). - С. 187-195.
128. Дроздов И.Г., Ежов И.Н., Самойлова С.В., Анисимов А.П. и др. Оценка биологических свойств бескапсульных вариантов возбудителя чумы // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1993. - Вып. 1-2 (71-72). - С. 154-159.
129. Дубичев А.Г., Воронцов Е.Д., Сердобинцев Л.Н. и др. Некоторые особенности белок-белковых взаимодействий в молекулах капсульного антигена чумного микроба // Микробиология, иммунология и биохимия особо опасных инфекций. - Саратов, 1987. - С. 41-45.
130. Дудина С.И. О роли "мышинного" токсина в иммуногенезе при чуме // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1976. - Вып. 3 (49). - С. 17-20.
131. Дятлов И.А. Разработка новых технологий экспериментального и производственного аппаратного культивирования чумного микроба: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. - Саратов, 1992. - 42 с.
132. Дятлов И.А., Кутырев В.В. Исследование влияния экспрессии плазмид и некоторых хромосомных генов на электроповерхностные свойства возбудителя чумы // Генетика и биохимия вирулентности возбудителей особо опасных инфекций. Материалы Российской

- научной конференции: Тез. докл. (Волгоград, 21-22 октября 1992 г.). - Волгоград, 1992. - С. 37.
133. Дятлов И.А., Филиппов А.Ф., Бондаренко Л.Н. и др. Использование изогенной системы штаммов чумного микроба в технологии получения антигенов // Генетика, микробиология и совершенствование методов лабораторной диагностики особо опасных инфекций. - Саратов, 1991. - С. 71-77.
134. Евстигнеев В.И., Чичерин Ю.В., Бывалов А.А. и др. Иммуногенная активность "мышинного" токсина чумного микроба в эксперименте на животных // Журн. микробиол. - 1981. - № 3. - С. 39-42.
135. Егоров Н.С., Лория Ж.К., Ландау Н.С. Биосинтез микроорганизмами нуклеаз и протеаз. - М.: Наука, 1979. - 271 с.
136. Езепчук Ю.В. Биомолекулярные основы патогенности бактерий. М.: Наука, 1977. - 216 с.
137. Езепчук Ю.В. Патогенность как функция биомолекул. - М.: Медицина, 1985. - 238 с.
138. Елкин Ю.М., Петров П.А. Палеогенезис Закавказского высокогорного очага чумы в связи с различиями в вирулентности штаммов чумного микроба полевочьей разновидности из разных ландшафтно-географических участков Кавказа // Особо опасные инфекции на Кавказе: Тез. докл. III научно-практической конфер. противочум. учрежд. Кавказа по природной очаговости, эпидемиол. и профилакт. особо опасных инфекций (14-16 мая 1974 г.). - Ставрополь, 1974. - С. 43-45.
139. Еремин С.А., Дроздов И.Г., Ежов И.Н. и др. Изучение электростимулируемой трансформации ДНК гетерогенных и собственных плазмид в клетки чумного микроба // Генетика, микробиология и совершенствование методов лабораторной диагностики особо опасных инфекций. - Саратов, 1991. - С. 55-62.
140. Еремин С.А., Никифоров А.К., Корсуков В.Н., Анисимов А.П. Особенности конструирования продуцентов капсульного антигена *Yersinia pestis* на основе сальмонеллезных штаммов // Материалы научно-практической конференции, посвященной 100-летию образования противочумной службы России (16-18 сентября 1997 г.). - Саратов, 1997. - Т. 2. - С. 46.
141. Ермакова Г.В., Тараненко Т.М., Наумов А.В. и др. Изучение протективной активности различных по химическому составу препаратов капсульного антигена чумного микроба // Микробиол., биохим. и специфическая профилактика карантинных инф.- Саратов, 1990. - С. 84-89.

142. Желтенков А.И. О чумном токсине, анатоксине, противочумной антитоксической сыворотке и методах стандартизации их на белых мышах // Вестник микробиологии, эпидемиологии и паразитологии. - Саратов: Саратовское областное государственное издательство, 1939. - Т. XVII. - С. 272-301.
143. Жукова С.И., Метлин В.Н., Жаркова В.А. Иммунохимические и протективные свойства экстрацеллюлярных антигенов возбудителя чумы // Иммунология и иммунопрофилактика чумы и холеры: Тез. докл. на Всесоюзной конференции. - Саратов, 1980. - С. 42-44.
144. Жуков-Вережников Н.Н. Иммунология чумы (Основы специфической терапии и профилактики бубонной и легочной чумы). - М.-Л.: Медгиз, 1940. - С. 109-113.
145. Жуков-Вережников Н.Н., Адамов А.К., Анисимов П.И. и др. Гетерогенные антигены чумного и холерного микробов, сходные с антигенами тканей человека и животных // БЭБМ. - 1972. - № 4. - С. 63-65.
146. Жуков-Вережников Н.Н., Липатова Т.И. Иммунология чумы. 1. О сравнительной оценке противочумных сывороток в связи с изучением с помощью феномена Shwartzman значения отдельных фракций *B. pestis* в патогенезе чумы // Вестник микробиологии, эпидемиологии и паразитологии. - Сталинград: Нижневолжское краевое издательство, 1933. - Т. XII. - С. 257-267.
147. Заднова С.П., Анисимов А.П., Щербаков А.А. Применение коаггутинации для детекции вариантов возбудителя чумы с серологически атипичными капсулами // Профилактика и меры борьбы с чумой. Материалы межгосударственной научной конференции, посвященной 100-летию открытия возбудителя чумы (6-7 сентября 1994 г., Алматы). Алматы, 1994. - С. 94-95.
148. Зайцев А.А. Серодиагностика гаптена чумного микроба // Материалы научно-практической конференции, посвященной 100-летию образования противочумной службы России (16-18 сентября 1997 г.). - Саратов, 1997. - Т. 2. - С. 178-179.
149. Заплатина С.И., Терновой В.И., Хохлова А.М. и др. К бактериологии и патоморфологии вакцинного процесса при энтеральной иммунизации штаммом *P. pestis* EB // Диагностика особо опасных инфекций. - Ростов Н/Д, 1968. - С. 12-15.
150. Заренков М.И. Транспозоны в анализе генома чумного микроба: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. - Саратов, 1984. - 22 с.
151. Заренков М.И., Гончарова Н.А. Способ получения мутантов чумного микроба, дефектных по синтезу оболочечного антигена "фракции 1": А. С. № 1439122, кл. С 12 N

- 15/00. Заявка № 4123258/28-13. Приоритет изобретения 26.09.86, зарегистрировано в Государственном реестре изобретений СССР 23.11.88.
152. Заренков М.И., Лебедева С.А. Получение маркированных транспозонами плазмид *Yersinia pestis* // Молекул. генетика. - 1985. - № 10. - С. 20-25.
153. Заренков М.И., Лебедева С.А., Гуревич Г.К. Особенности поведения бактериофага P1 *cml clr 100ts* в *Yersinia pestis*, позволяющие использовать его как удобный инструмент для исследования генома чумного микроба // Матер. Всесоюз. симпоз., посв. 60-летию Тбилисского науч.-исслед. ин-та вакцин и сывороток. - Тбилиси, 1984. - С. 123-125.
154. Захаров А.И. Изучение биологии возбудителя чумы из Урало-Эмбенского автономного очага: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. - Саратов, 1989. – 20 с.
155. Захаров А.И. Основные свойства штаммов возбудителя чумы, выделенных в Урало-Эмбенском очаге в 1973-1983 гг. // 12 межреспубликанская научно-практическая конференция противочумных учреждений Средней Азии и Казахстана по профилактике чумы. - Алма-Ата, 1985. - С. 16-18.
156. Золотарев А.Г., Кедров В.А., Паутов В.Н. Изучение локализации антигена Ф1 *Yersinia pestis* EB иммуноферритиновым методом // Журн. микробиол. - 1983. - № 7. - С. 62-64.
157. Зыкин Л.Ф. Итоги 15-летнего изучения персистенции L-форм *Yersinia pestis* // Журн. микробиол. - 1994. - Приложение. - С. 68-71.
158. Исин Ж.М. Влияние капсульного антигена чумного микроба на функциональную активность макрофагов перитонеального экссудата (ПЭ) мышей в тесте восстановления нитросинего тетразолия // Тезисы XII межреспубликанской научно-практич. конфер. противочумных учреждений Средней Азии и Казахстана по профилактике чумы. - Алма-Ата, 1985. - С. 64-65.
159. Исин Ж.М., Тугамбаев Т.И. Структурно-функциональные свойства и биологическая активность капсульного антигена, "мышинного" токсина и эндотоксина *Yersinia pestis* // Журн. микробиол. - 1987. - № 4. - С. 91-98.
160. Канчух А.А., Иванова В.С. Очистка токсина чумного микроба хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе солевого экстракта // Проблемы особо опасных инфекций. – Саратов, 1971. - Вып. 3 (19). - С. 100-106.
161. Карасева З.Н., Анисимов П.И. Использование детерминант наследственности при отборе вакцинных штаммов чумного микроба // Генетика микроорганизмов: Труды второго симпозиума по генетике микроорганизмов (Москва, 20-24/VII 1965 г.). – М.: Медицина, 1966. – С. 30-36.

162. Карлышев А.В., Кравченко В.И., Красильникова В.М., Анисимов А.П. Способ получения мутантов чумного микроба дефектных по синтезу капсульного антигена фракции I: А. С. № 1754779, кл. С 12 N 15/00. Заявка № 4863570. Приоритет изобретения 22.06.90, зарегистрировано в Государственном реестре изобретений СССР 15.04.92.
163. Карлышев А.В., Красильникова В.М., Кравченко В.И., Анисимов А.П. и др. Рекомбинантная плазмидная ДНК, кодирующая капсульный белок - антиген F1 чумного микроба и штамм бактерий *E. coli* - продуцент белка - антигена F1 чумного микроба: А.с. № 327782, кл. С 12 N 15/00. Заявка № 4525100. Приоритет изобретения 28.12.1989, зарегистрировано в Государственном реестре изобретений СССР 09.07.91.
164. Кац Л.Н. О субмикроскопической структуре *Pasteurella pestis* // Журн. микробиол. - 1966. - № 7. - С. 84-86.
165. Кириллина О.А. Физическое картирование ДНК плазмиды rFga чумного микроба, клонирование области, ответственной за синтез капсульного антигена: Дисс. ... канд. биол. наук. - Саратов, 1992. – 103 с.
166. Классовский Л.Н., Бибикова В.А. Влияние повышенного содержания сахара в крови грызунов на процесс блокообразования у блох // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1970. - Вып. 2 (12). - С. 220-222.
167. Классовский Л.Н., Петров В.С. Об эволюционной адаптации возбудителя чумы к существованию в системе грызун-блоха // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1968. - Вып. 4 (4). - С. 172-179.
168. Классовский Л.Н., Петров В.С. О классификации проявлений изменчивости возбудителя чумы на экологической основе // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1970. - Вып. 5 (15). - С. 5-13.
169. Классовский Л.Н., Степанов В.М., Мартиневский И.Л. и др. Наставление по изучению свежесыведенных штаммов возбудителя чумы. - Алма-Ата, 1972. – 36 с.
170. Книрель Ю.А., Кочетков Н.К. Строение липополисахаридов грамотрицательных бактерий. I. Общая характеристика липополисахаридов и структура липида А // Биохимия. - 1993. - Т. 58. - С. 166-201.
171. Козлов М.П. Чума (природная очаговость, эпизоотология, эпидемиологические проявления). - М.: Медицина, 1979. – 192 с.
172. Козлов М.П., Розанова Г.Н. Зависимость образования чумного блока у блох от видовых особенностей эритроцитов животных // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1976. - Вып. 5 (51). - С. 53-57.

173. Козлов М.П., Розанова Г.Н., Савельев В.Н. и др. К механизму образования чумного блока у блох // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1975. - Вып. 5 (45). - С. 29-33.
174. Кокушкин А.М. Социальные и биологические аспекты эпидемиологии чумы: Дисс. ... докт. мед. наук. - Саратов, 1995. - 392 с.
175. Кокушкин А.М. Трансформирующая активность плазмид чумного микроба: Дисс. ... канд. мед. наук. - Саратов, 1983. - 183 с.
176. Кокушкин А.М., Величко Л.Н., Князева Т.В. и др. Изучение роли собственных плазмид и признака пигментсорбции в способности бактерий чумы инфицировать блох и вызывать у них блокообразование // Природно-очаговые инфекции и их профилактика. - Саратов, 1991. - С. 110-118.
177. Кокушкин А.М., Величко Л.Н., Князева Т.В. и др. Влияние концентрации возбудителя чумы на зараженность блох и блокообразование // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1993. - Вып. 1-2 (71-72). - С. 45-50.
178. Кондрашкина К.И. Болеют ли блохи чумой? // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1969. - Вып. 5 (9). - С. 212-223.
179. Кондрашкина К.И., Николаев Н.И., Гольдфарб Л.М. и др. Место атипичных штаммов в механизмах саморегуляции эпизоотического процесса при чуме // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1971. - Вып. 4 (20). - С. 5-17.
180. Коннов Н.П. Ультраструктурно-функциональный анализ чумного микроба и его взаимоотношения с организмом блохи: Дисс. ... д-ра биол. наук. Саратов, 1990. - 316 с.
181. Коннов Н.П., Анисимов П.И., Синичкина А.А. Субмикроскопическая структура клеточной стенки возбудителя чумы // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1975. - Вып. 1 (41). - С. 78-82.
182. Коннов Н.П., Демченко Т.А., Анисимов П.И. и др. Патогенное действие чумного микроба на организм блохи *Xenopsylla cheopis* и ультраструктура возбудителя в различные сроки пребывания в переносчике // Паразитол. - 1986. - Т. 20. - С. 19-22.
183. Коробков Г.Г. Некоторые особенности развития противочумного иммунитета // Доклады Иркутского противочумного института: Материалы научной конфер. посвященной 50-летию Читинской противочумной станции. - Вып. 6, Чита, 1963. - С. 94-95.
184. Корсуков В.Н., Коровкин С.А., Попов Ю.А. и др. Электрофоретические свойства клеток штаммов чумного микроба с различным плазмидным составом. - М., 1990. - 14 С. - Деп. в ВИНТИ 09.07.90, № 3782-В90.

185. Коссе Л.В. Характеристика препаратов капсульного антигена чумного микроба, выделенных из генетически различающихся штаммов-продуцентов: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. - Саратов, 1992. – 18 с.
186. Коссе Л.В., Лебедева С.А., Кузнецова Л.С. и др. Новые данные, относящиеся к специфичности и генетическому контролю капсульного антигена (F1) *Yersinia pestis* // Журн. микробиол. - 1997. - № 2. - С. 29-33.
187. Коссе Л.В., Лебедева С.А., Титенко М.М. и др. Изучение протективного антигена Ф1 оболочки чумного микроба, экспрессированного в трансконъюганте нетипичного хозяина // Эпидемиология, микробиология и иммунология бактериальных и вирусных инфекций: Тез. научн. конфер. - Ростов-н/Д, 1989. - С. 29-30.
188. Кочкарева А.В., Голковский Г.М. Образование чумного блока и заражающая способность блох большой песчанки, инфицированных бескапсульным штаммом чумного микроба // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1977. - Вып. 2 (54). - С. 56-58.
189. Кочкарева А.В., Кочетов А.Х., Левина А.А. Образование чумного блока и заражающая способность блох большой песчанки, инфицированных бескапсульным штаммом чумного микроба // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1972. - Вып. 2 (24). - С. 25-31.
190. Красных В.Н., Ильичев А.А., Щелкунов С.Н. Анализ активности  $\beta$ -галактозидазы в клетках *E. coli*, содержащих клонированные гены *lacZ* // Метаболические плазмиды бактерий. - Таллин, 1982. - С. 119-120.
191. Кудинова Т.П. Свойства штаммов чумного микроба, выделенных осенью 1963 года в Или-Каратальском междуречье: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. - Алма-Ата, 1968. – 18 с.
192. Кудлай Д.Г., Лиходед В.Г. Бактериоциногенез. - Л.: Медицина, 1966. – 204 с.
193. Кузьмиченко И.А., Вейнблат В.И. О выделении вариантов чумного микроба штамма ЕВ НИИЭГ, не содержащих фракции I и "мышинного" токсина // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1968. - Вып. 3. - С. 107.
194. Куклева Л.М., Карасева З.Н., Кондрашин Ю.И. Фагоцитоз штаммов чумного микроба перитонеальными макрофагами интактных и иммунизированных животных // Вопросы генетики, молекулярной биологии и микробиологии чумы и холеры. Саратов, 1985. - С. 42-48.
195. Куклева Л.М., Проценко О.А. Фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов по отношению к штаммам чумного микроба с разным плазмидным составом // Иммуно-

- морфология, аллергология и иммунология особо опасных инфекций. Саратов, 1985. - С. 33-40.
196. Кульберг А.Я. Молекулярная иммунология. - М.: Высшая школа, 1985. – 288 с.
197. Куница Н.К. К вопросу о патогенности трансформирующихся в L-формы культур чумного микроба // Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. - Вып. 1, юбилейный. Алматы, 1999. - С. 201-202.
198. Кутырев В.В. Генетический анализ факторов вирулентности возбудителя чумы: Дисс. ... д-ра. мед. наук. Саратов, 1992. – 332 с.
199. Кутырев В.В., Е.Г. Булгакова, Филиппов А.А. и др. Современные представления о молекулярной организации генома возбудителя чумы // Проблемы санитарно-эпидемиологической охраны территории стран Содружества Независимых Государств. Саратов, 1998. - С. 139-140.
200. Кутырев В.В., Куличенко А.Н., Проценко О.А. Вирулентные Pgm<sup>-</sup> мутанты чумного микроба // Профилактика природноочаговых инфекций. - Ставрополь, 1983. - С. 304.
201. Кутырев В.В., Филиппов А.А., Шавина Н.Ю. и др. Генетический анализ и моделирование вирулентности *Yersinia pestis* // Молекул. генетика. - 1989. - № 8. - С. 42-47.
202. Кутырев В.В., Филиппов А.А., Проценко О.А. Изучение плазмидного состава донорного штамма возбудителя чумы // Вопросы генетики, молекулярной биологии и микробиологии чумы и холеры. Саратов, 1985. – С. 15-21.
203. Лалазарова И.Г., Розанова Г.Н., Елкин Ю.М. Способность штаммов чумного микроба полевоочей разновидности к накоплению пигментов на среде с гемином и связь ее с вирулентностью // Особо опасные инфекции на Кавказе. - Вып. 1. - Ставрополь, 1974. - С. 91-93.
204. Ларионов Г.М., Пейсахис Л.А. К эпизоотологической роли трансмиссии штаммов возбудителя чумы, не продуцирующих фракцию 1 // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1972. - Вып. 1 (23). - С. 23-28.
205. Ларионов Г.М., Пейсахис Л.А. О роли некоторых детерминант вирулентности возбудителя чумы в проявлении этого признака для разных видов грызунов // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1971. - Вып. 4 (20). - С. 22-27.
206. Ларионов Г.М., Погасий Н.И. Экспериментальное изучение возможности трансмиссивной передачи атипичных штаммов чумного микроба среди серых крыс // Природная очаговость, микробиология и профилактика зоонозов. - Саратов, Коммунист, 1989. - С. 103-108.

207. Лебедева С.А. Гетерологичные плазмиды и фаги в анализе генома возбудителя чумы *Yersinia pestis*: Дисс. ... д-ра. мед. наук. Ростов-н/Д, 1993. – 450 с.
208. Лебедева С.А., Кузнецова Л.С., Бичуль О.К. и др. Изучение зависимости экспрессии генов плазмиды 65 MD чумного микроба от генома бактериального хозяина // Молекул. генетика. - 1991. - № 4. - С. 7-10.
209. Лившиц Ю.И. Требования к качеству лабораторных грызунов и условия их содержания // Руководство по вакцинному и сывороточному делу. - М.: Медицина, 1978. - С. 24-36.
210. Лобанов В.Н. Патологическая анатомия и патогенез чумы у человека. М.: Государственное издательство медицинской литературы, 1956. – 175 с.
211. Лопатина Н.В., Мишанькин Б.Н., Москвитина Э.А. Эпизоотическое состояние природных очагов чумы, расположенных на территориях России и других стран СНГ // ЗНиСО. - 1995. - № 9 (30). - С. 9-12.
212. Лухнова Л.Ю., Казакбаева Р.А. Приживаемость и конкурентная способность штаммов возбудителя чумы в организме разных переносчиков // 12-я межресп. науч.-практ. конфер. противочумн. учрежд. Средней Азии и Казахстана по профилактике чумы. - Алма-Ата, 1985. - С. 69-71.
213. Ляшенко В.А., Воробьев А.А. Молекулярные основы иммуногенности антигенов. – М.: Медицина, 1982. – 272 с.
214. Маевский М.П., Иннокентьева Т.И., Калиновский А.И. Биологические свойства штаммов чумного микроба, выделенных из почвы в Сайлюгемском очаге // Современные аспекты профилактики зоонозных инфекций. - Иркутск, 1984. - Ч. 2. - С. 58-59.
215. Майоров В.А., Кожич А.Т., Василенко Р.Н. и др. Использование синтетических пептидов для экспериментальной локализации Т- и В-клеточных эпитопов F1 антигена чумного микроба // Актуальные вопросы профилактики опасных инфекционных заболеваний: Тез. докл. к Межведомственной научной конференции (26-28 марта 1991 г., Киров). – Киров, 1991. - С. 171-172.
216. Максюттов А.З., Загребельный С.Н. Антигенные детерминанты белков. Гуморальный иммунный ответ // Молекулярная биология. - 1993. - Т. 27. - С. 980-991.
217. Маракулин И.В., Погорельский И.П., Дармов И.В. и др. Конструирование рекомбинантного вакцинного штамма псевдотуберкулезного микроба, обеспечивающего одновременную защиту от чумы и псевдотуберкулеза // Актуальные вопросы профилактики опасных инфекционных заболеваний: Тез. докл. к Межведомственной научной конференции (26-28 марта 1991 г., Киров). – Киров, 1991. - С. 130-131.

218. Маракулин И.В., Янов С.Н., Дармов И.В. и др. Клонирование генов фракции 1 и мышинового токсина чумного микроба и конструирование штаммов-продуцентов антигенов Ф1 и Т // Там же. - С. 129-130.
219. Марин С.Н., Камнев П.И., Трофимов А.С. Некоторые механизмы саморегуляции эпизоотии чумы среди больших песчанок // Эпидемиология и эпизоотология чумы. - Саратов, 1980. - С. 8-14.
220. Марков Е.Ю., Урбанович Л.Я., Калиновский А.И. и др. Теоретические и прикладные аспекты разработки новых иммуногенных препаратов на основе антигенов поверхностных структур бактериальной клетки возбудителей особо опасных инфекций // Материалы научно-практической конференции, посвященной 100-летию образования противочумной службы России (16-18 сентября 1997 г.). - Саратов, 1997. - Т. 1. - С. 231-232.
221. Маркова В.Ю., Анисимов А.П., Федотов Э.А. и др. Природный штамм *Yersinia pestis* с новым механизмом антигенной изменчивости // Гомеостаз и инфекционный процесс: Тез. докл. к международной конференции. - Саратовский государственный медицинский университет, Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб", Саратов, 1996. - Т. 1. - С. 172.
222. Мартиневский И.Л. Биология и генетические особенности чумного и близкородственных ему микробов. - М.: Медицина, 1969. - 295 с.
223. Мартиневский И.Л. Гладкие формы возбудителя чумы // Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. - Вып. 1, юбилейный. Алматы, 1999. - С. 211-212.
224. Мартиневский И.Л. К вопросу об ауксотрофных и гипотрофных вариантах чумного микроба // Материалы 4 научной конференции по природной очаговости и профилактике чумы. - Алма-Ата, 1965. - С. 149.
225. Мартиневский И.Л. Новые экологические группы возбудителя чумы // X Всесоюзная конференция по природной очаговости болезней: Тез. докл. - Душанбе, 1979. - Ч. 2. - С. 135-137.
226. Мартиневский И.Л. Пигментсорбция у возбудителя чумы и ее роль в проявлении вирулентности // Среднеазиат. н.-и. противочумн. ин-т. - Алма-Ата, 1988 г. - Деп. в ВИНТИ 13.10.88, № 7376- В88. - 26 с.
227. Матаков М.И. К вопросу формирования чумным микробом блока преджелудка у блох // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1979. - Вып. 4 (68). - С. 61-63.
228. Машко С.В. Оптимизация экспрессии чужеродных генов в клетках *E. coli* // Биотехнология. - 1998. - № 6. - С. 3-23.

229. Мельников И.Ф. Характеристика штаммов чумного микроба, выделенных в Кызылкумах, и взаимоотношения Р<sup>+</sup> и Р<sup>-</sup> форм бактерий чумы с организмами носителей и переносчиков: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. - Саратов, 1971. – 16 с.
230. Метлин В.Н. Роль мышинового токсина в вирулентности и иммуногенности чумного микроба: Дисс. ... канд. мед. наук. - Саратов, 1968. – 265 с.
231. Метлин В.Н. Характеристика вирулентности и токсичности чумного микроба, утратившего способность к синтезу фракции I Бейкера // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1968. - Вып. 3. - С. 39-44.
232. Милин В.М., Исин Ж.М., Кравченко Н.П. и др. Изучение некоторых адаптивных изменений, происходящих в поселениях больших песчанок при чуме // Песчанки - важнейшие грызуны аридной зоны СССР: Материалы III Всесоюзн. совещ. - Ташкент, 1989. - С. 247-248.
233. Милин В.М., Канатов Ю.В. К вопросу о вероятности обнаружения Ф1 чумного микроба и антител к ней в крови больших песчанок в связи с предшествующей эпизоотической ситуацией на участках вылова этих животных // Тезисы Всесоюзн. научно-практ. конфер. - Ставрополь, 1986. - Ч. I. - С. 222-225.
234. Милин В.М., Канатов Ю.В., Овчаров В.И. и др. Чувствительность диких грызунов к "мышинному" токсину чумного микроба в видовых и популяционных аспектах // Четвертый съезд Всесоюзного териологического общества (Москва, 27-31 января 1986 г.): Тез. докл. - М., 1986. - Т. 2. - С. 281-282.
235. Михина Л.В., Анисимов А.П., Андрущенко Б.Н. и др. Патоморфологические изменения у интактных и иммунных белых мышей, зараженных вариантами возбудителя чумы, отличающимися по способности синтезировать капсульный антиген // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1994. - Вып. 5 (75). - С. 107-112.
236. Мишанькин Б.Н. Интегративный характер вирулентности *Yersinia pestis* // Журн. микробиол. - 1987. - № 2. - С. 102-108.
237. Мишанькин Б.Н., Сучков И.Ю. Вирулентность некультивируемых форм *Yersinia pestis* // Материалы научно-практической конференции, посвященной 100-летию образования противочумной службы России (16-18 сентября 1997 г.). - Саратов, 1997. - Т. 2. - С. 89-90.
238. Мишанькин М.Б., Васильева Г.И., Козловский В.Н. и др. "Мышиный" токсин *Yersinia pestis* как биологически активная полифункциональная молекула // Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных болезней. Биотехнология. Ветеринария: Мате-

- риалы юбилейной научной конференции, посвященной 70-летию НИИ микробиологии МО РФ (Киров, 30 ноября-1 декабря 1998 г.). – Киров, 1998. - С. 171-172.
239. Можаров О.Т. Молекулярно-биологическая характеристика плазмиды пестициногенности чумного микроба: Дисс. ... канд. биол. наук. - Саратов, 1983. – 171 с.
240. Моргунов И.Н. Противобактериальный и антиоксидантный иммунитет // Многотомное руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней. - М.: Медицина, 1964. - Т. 3. - С. 297-317.
241. Наркевич М.И., Онищенко Г.Г., Наумов А.В. и др. Характеристика эпидемических проявлений чумы в СССР за период с 1920 по 1989 г. // Журн. микробиол. - 1991. - № 12. - С. 31-33.
242. Наумов А.В., Кондрашин Ю.И. Метаболические аспекты вирулентности чумного микроба // Иммунология и иммунопрофилактика чумы и холеры: Тез. докл. на Всесоюзной конференции. - Саратов, 1980. - С. 3-6.
243. Наумов А.В., Ледванов М.Ю., Дроздов И.Г. Иммунология чумы. Саратов, 1992. – 172 с.
244. Незаметдинова В.З., Полуэктова Е.У., Савченко Г.В. и др. Включение функционирующего гена человека в геном бактериальной клетки // Молекулярные механизмы генетических процессов. - М., Наука, 1990. - С. 174-183.
245. Никифоров А.К., Анисимов А.П., Сергеева Г.М. и др. Сравнение уровня синтеза капсульного антигена *Yersinia pestis* в клетках вакцинного штамма EV и суперпродуцента EV11MrFS1 // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1994. - Вып. 6 (76). - С. 127-131.
246. Никифоров А.К., Дроздов И.Г., Еремин С.А., Ерошенко Г.А., Ежов И.Н., Анисимов А.П. и др. Экспрессия капсульного антигена чумного микроба и В-субъединицы холерного токсина в клетках *S. typhimurium* // Иммунология и специфическая профилактика особо опасных инфекций. Материалы Российской научной конференции (21-23 сентября 1993 г., Саратов). - Саратов, 1993. - С. 287-288.
247. Никифоров В.В., Сердобинцев Л.Н., Меркулова Т.К. и др. Физико-химическая характеристика капсульного белка *Yersinia pestis* // Регуляция микробного метаболизма: Всесоюзная конференция (12-14 июня 1989 г., Пущино). - Пущино, 1989. - С. 30-31.
248. Николаев Н.И. Чума (клиника, диагностика, лечение и профилактика). - М.: Медицина, 1968. – 240 с.

249. Николаев Н.И., Гольдфарб Л.М., Земцова И.Н. и др. К вопросу об изучении антигенной структуры чумного микроба // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1969. - Вып. 5 (9). - С. 5-8.
250. Новиков Г.С. Чувствительность и восприимчивость больших песчанок из Или-Картальского междуречья к штаммам чумного микроба с различными свойствами: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. - Алма-Ата, 1975. - 20 с.
251. Норкина О.В. Детекция возбудителя чумы с использованием полимеразной цепной реакции: Дисс. ... канд. мед. наук. - Саратов, 1993. - 178 с.
252. Обголец А.А. Механизмы персистенции бактерий // Журн. микробиол. - 1992. - № 4.- С. 70-76.
253. Обзор рецензий на рукопись И.С. Солдаткина, Ю.В. Руденчика, С.В. Ефимова "Эпизоотический процесс в природных очагах чумы (обзор данных и ревизия концепции)" // Вопросы паразитологии и неспецифической профилактики зоонозов / Под. ред. Эйгелиса Ю.К. - Саратов, 1988. - С. 76- 83.
254. Овасапян О.В., Шехикян М.Т. Случаи заболевания бубонной чумой в высокогорном природном очаге Армении // Эпидемиология, микробиология и иммунология бактериальных и вирусных инфекций: Тез. докл. обл. науч. конфер. молодых ученых (17-20 октября 1989 г., Ростов-н/Д). - Ростов-н/Д, 1989. - С. 193-195.
255. Олькова Н.В. Классификация изменчивости инфекционной чувствительности животных к возбудителю чумы // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1978. - Вып. 6 (34). - С. 22-27.
256. Орлова Г.М. Принципы анализа гетерогенных популяций *P. pestis* и селекция вариантов по капсульному антигену: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. - Саратов, 1966. - 17 с.
257. Пак Г.Ю., Айкимбаев А.М., Степанов В.М. и др. К вопросу об уреазной активности штаммов чумного микроба, выделенных от красных сурков в Западном Тянь-Шане // Биохимия, патофизиология и микробиология особо опасных инфекций. - Саратов, 1983. - С. 30-33.
258. Пак Г.Ю., Степанов В.М., Сатыбалдиев Н.А. и др. К роли бактериофагов в саморегулирующейся системе энзоотии чумы // Журн. микробиол. - 1990. - № 9. - С. 97-100.
259. Панферцев Е.А., Черепанов П.А., Каримова Г.А. Конструирование штаммов *Yersinia pestis*, дефектных по синтезу антигена рН6 // Новые технологии и биосистемы. Достижения и перспективы. Материалы XIV научно-практической конференции: Тез. докл. (21-23 мая 1991 г., Оболенск). - Оболенск, 1991. - С. 22-24.

260. Пейсахис Л.А., Ларионов Г.М. Штаммы возбудителя чумы, лишённые детерминанты вирулентности  $P^+$ , и их эпизоотическая роль // Журн. микробиол. - 1971. - № 12. - С. 67-70.
261. Петрова Б.Ю., Шалаева А.Ф. Роль капсулы в иммуногенности живой противочумной вакцины // Специфич. профилакт. особо опасных инфекций. - Саратов, 1964. - С. 133-138.
262. Петровская В.Г. Проблема вирулентности бактерий. - Л.: Медицина, 1967. - 264 с.
263. Петровская В.Г., Бондаренко М.М. Роль хромосомы и ее взаимодействия с внехромосомными детерминантами в процессе генетического контроля патогенности бактерий // Молекул. генетика. - 1994. - № 5. - С. 3-8.
264. Пилипенко В.Г., Тарасова В.В., Попов В.А. О циркуляции антител Ф1 чумного микроба у горных сусликов, перенесших однократное заражение возбудителем, и значение этого фактора в формировании бактерионосительства после повторного заражения чумой // Профилактика природноочаговых инфекций. – Ставрополь, 1983. - С. 129-131.
265. Плотников О.П. Трансдуцирующая система на модели чумного и псевдотуберкулезного микроба // Молекулярная биология и генетика возбудителей особо опасных инфекций. – Ч. 2. – Саратов: Издательство Саратовского университета, 1982. – С. 52-56.
266. Погасий Н.И., Ларионов Г.М. Вирулентность чумного микроба при сочетанной утрате детерминант этого признака // Особо опасные и редко встречающиеся тропические инфекции. - Волгоград, 1980. - С. 58-59.
267. Поляков К.В., Филиппов А.Ф. Зависимость между иммуногенными и инвазивными свойствами штаммов чумного микроба ЕВ и К-1 // Иммунология и иммунопрофилактика чумы и холеры: Тез. докл. на Всесоюзной конференции. - Саратов, 1980. - С. 6-8.
268. Попов Ю.А. Структурная и функциональная организация плазмид чумного микроба и генно-инженерные разработки на этой модели: Дисс. ... док. биол. наук. - 1991. – 248 с.
269. Прозоров А.А. Геном бактерий: нуклеотид, хромосома, нуклеотидная карта // Микробиология. - 1998. - Т. 67. - С. 437-451.
270. Прокопьева Е.Д., Прокопьев А.А., Дальвадянц С.Н. и др. Изучение индукции интерлейкина-1 и фактора некроза опухоли мышинными макрофагами под воздействием капсульного антигена возбудителя чумы // Микробиол., биохим. и специфическая профилакт. карантинных инфекций. - Саратов, 1990. - С. 77-84.
271. Проценко О.А., Анисимов П.И., Можаров О.Т. и др. Выявление и характеристика плазмид чумного микроба, детерминирующих синтез пестицина 1, антигена фракция 1 и экзотоксина "мышинного" токсина // Генетика. - 1983. - Т. 19. - № 7. - С. 1081-1090.

272. Проценко О.А., Веренков М.С. Серологические свойства эксконъюгантов псевдотуберкулезного микроба, получивших свойство синтеза фракции I // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1977. - Вып. 4 (56). - С. 10-12.
273. Проценко О.А., Кузьмиченко И.А., Кутырев В.В. и др. Генетический контроль синтеза фосфолипазы D *Yersinia pestis* // Генетика. - 1994. - Т. 30. - Приложение. - С. 128.
274. Проценко О.А., Кутырев В.В. Влияние плазмиды F'*lac* на выражение признака Ca<sup>2+</sup>-зависимости чумного микроба // Селекция и генетика возбудителей особо опасных инфекций. – Саратов, 1982. – С. 3-7.
275. Проценко О.А., Филиппов А.А., Кутырев В.В. Гетерогенность популяций штаммов возбудителя чумы по плазмидному составу // Молекул. генетика. - 1992. - № 3-4. - С. 20-24.
276. Пунский Е.Е., Адаменко Н.И. Эпизоотологическое значение атипичных по синтезу фракции I штаммов возбудителя чумы // Медико-географические проблемы аридной зоны. - Ашхабад, 1982. - С. 36-38.
277. Пунский Е.Е., Левина А.А., Андреева В.Ф. и др. Характеристика атипичных штаммов чумного микроба, выделенных на территории Туркмении // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1977. - Вып. 4 (56). - С. 68-69.
278. Пунский Е.Е., Левина А.А., Вологина И.И. и др. Потеря способности возбудителя чумы синтезировать фракцию I при длительном нахождении его в организме большой песчанки // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1972. - Вып. 2 (24). - С. 20-24.
279. Пустовалов В.Л., Васильева Г.И., Киселева А.К. Определение антифагоцитарной активности антигенов чумного микроба // Патологическая физиология, иммунол. и аллергол. ООИ. - Саратов, 1984. - С. 8-12.
280. Работнова И.Л., Позмогова И.Н. Питание микроорганизмов // Журн. микробиол. - 1993. - № 5. - С. 112-116.
281. Радченко Г.А., Захаров А.И. О свойствах атипичных штаммов из Урало-Эмбенского автономного очага чумы // 12-я межресп. науч.-практ. конфер. противочумн. учрежд. Сред. Азии и Казахстана по профилакт. чумы. - Алма-Ата, 1985. - С. 33-35.
282. Ривкус Ю.З., Митропольский О.В., Бочкарев В.М. и др. Новая концепция природной очаговости чумы // Материалы регионального совещания противочумных учреждений по эпидемиологии, эпизоотологии и профилактике особо опасных инфекций (19-20 декабря 1989 г., г. Уральск). – Куйбышев, 1990. – С. 179-180.

283. Розанова Г.Н., Грамотина Л.И., Сучков Ю.Г. и др. Питательные потребности возбудителя чумы из очагов полевого типа // Селекция и генетика возбудителей особо опасных инфекций. - Саратов, ВНИПЧИ "Микроб", 1982. - С.73-76.
284. Романова Ю.М., Чегаева Е.В., Гинцбург А.Л. Некультивируемое состояние у патогенных бактерий: известные и возможные факторы индукции обратимого процесса // Молекул. генетика. – 1998. - № 3. – С. 3-8.
285. Руднев Г.П. Клиника чумы. Ростов-н/Д: Ростовское областное книгоиздательство, 1938. – 268 с.
286. Рудник М.П., Лебедева С.А., Алутин И.М. и др. О природе эпитопов капсульного антигена возбудителя чумы // Эпидемиология, микробиология и иммунология бактериальных и вирусных инфекций: Тез. докл. обл. науч. конфер. молодых ученых (17-20 октября 1989 г., Ростов-н/Д). - Ростов-н/Д, 1989. - С. 98-99.
287. Руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях. - Женева: Всемирная организация здравоохранения, 1985. – 127 с.
288. Руководство по профилактике чумы / Под ред. А.В. Наумова, Л.В. Самойловой. – Саратов, 1992. – 278 с.
289. Руководство по профилактике чумы / Под ред. Н.И. Николаева. – Саратов, 1972. – 200 с.
290. Сагимбеков У.А., Пошевина Г.О. К вопросу о механизме саморегуляции эпизоотии чумы в Муюнкумах // Проблема изучения механизма энзоотии чумы: Тез. докл. на Всесоюзной Конференции. - Саратов, 1980. - С. 39-44.
291. Сагимбеков У.А., Пошевина Г.О., Красноусова Н.В. Свойства атипичных штаммов чумного микроба, выделенных весной 1977 г. в Муюнкумах и Саксауловой Даче // Патологическая физиология особо опасных инфекций. - Саратов, 1981. - С. 82-86.
292. Сагимбеков У.А., Рапопорт Л.П. Об особенностях штаммов возбудителя чумы, выделенных в различных популяциях больших песчанок в Муюнкумах // Микробиология, генетика и иммунология чумы и холеры. - Саратов, 1983. - С. 11-13.
293. Самойлова Л.В., Пионтковский С.А., Кузнецова К.А. и др. О формировании прививочного и постинфекционного иммунитета к чуме // Иммунология и иммунопрофилактика чумы и холеры: Тез. докл. на Всесоюзной конференции. - Саратов, 1980. - С. 50-54.
294. Самойлова С.В. Влияние условий культивирования на популяционный состав штаммов чумного микроба, обладающих различным плазмидным профилем: Дисс. ... канд. мед. наук. - Саратов, 1991. – 157 с.

295. Самойлова С.В., Ежов И.Н., Еремин С.А., Никитин А.Н., Дроздов И.Г. Получение и характеристика вирулентных производных штамма *Y. pestis* 231, обладающих различным набором детерминант патогенности // Эпидемиология, микробиология и иммунология бактериальных и вирусных инфекций: Тез. докл. обл. науч. конфер. молодых ученых (17-20 октября 1989 г., Ростов-н/Д). - Ростов-н/Д, 1989. - С. 152-153.
296. Самоходкина Э.Д., Рыжко И.В. Сравнительное изучение каталазной активности изогенных культур чумного микроба 231 и 231 Ф1<sup>-</sup> // Материалы научно-практической конференции, посвященной 100-летию образования противочумной службы России (16-18 сентября 1997 г.). - Саратов, 1997. - Т. 2. - С. 121.
297. Сатыбалдиев Н.А., Исин Ж.М. К вопросу об антилизоцимной активности микроорганизмов рода *Yersinia* // Иерсиниозы: микробиология, эпидемиология, клиника, патогенез, иммунология: Тез. Всесоюзной научно-практической конференции (Владивосток, 28-29 августа 1986 г.). - Владивосток, 1986. - С. 63-64.
298. Свердлов Е.Д. Очерки современной молекулярной генетики. Очерк 5. Трансгеноз и новая молекулярная генетика // Молекул. генетика. - 1996. - № 4. - С. 3-32.
299. Сердобинцев Л.Н. Полиморфизм капсульного антигена чумного микроба: Дисс. ... канд. мед. наук. - Саратов, 1984. - 165 с.
300. Сердобинцев Л.Н., Карпунина Л.В., Коннов Н.П. и др. Изучение гемагглютинирующей активности препаратов капсульного белка чумного микроба // Биотехнология, иммунология и биохимия особо опасных инфекций. - Саратов, Коммунист, 1989. - С. 25-31.
301. Сердобинцев Л.Н., Тараненко Т.М., Веренков М.С. и др. Получение капсульного антигена методом одноэтапной гелевой фильтрации // Вопросы профилактики природно-очаговых инфекций. - Саратов, Коммунист, 1983. - С. 37-41.
302. Сердобинцев Л.Н., Тараненко Т.М., Терентьев С.А. К вопросу о макромолекулярной организации капсульного антигена // Диагностика и профилактика особо опасных инфекций. - Саратов, 1983. - С. 39-44.
303. Смирнов Г.Б. Генетический контроль систем поглощения железа у бактериальных клеток; механизмы процесса и его роль в патогенности // Молекул. генетика. - 1986. - № 7. - С. 3-14.
304. Соколова Н.М. Спонтанный переход отдельных клеток вакцинного штамма ЕВ в вид псевдотуберкулезного микроба // Материалы к конференции, посвященной 50-летию института "Микроб". - Саратов, 1968. - С. 84-85.
305. Степанов В.М. Факторы питания и их роль в проявлении вирулентности и иммуногенности возбудителя чумы: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. - Саратов, 1975. - 39 с.

306. Степанов В.М., Классовский Л.Н., Пак Г.Ю., и др. Изучение влияния фазы эпизоотического процесса на изменчивость возбудителя чумы // 11 межреспубликанская научно-практическая конференция противочумных учреждений Средней Азии и Казахстана по профилактике чумы. - Алма-Ата, 1981. - С. 110-112.
307. Степанов В.М., Хрусцелевская Н.М. Влияние факторов питания на способность возбудителя чумы вызывать блок преджелудка у блох // Эпидемиология и эпизоотология чумы. - Саратов, 1980. - С. 44-48.
308. Степаншина В.Н., Анисимов А.П. Стерилизация капсульного и рН6 антигенов, выделенных из чумного микроба // Новые технологии и биосистемы. Достижения и перспективы. Материалы XIV научно-практической конференции: Тез. докл. (21-23 мая 1991 г., Оболенск). – Оболенск, 1991. - С. 72-73.
309. Степаншина В.Н., Гремякова Т.А., Анисимов А.П. Биологическая активность нативного и модифицированного рН6 антигена чумного микроба // Там же. - С. 11-13.
310. Степаншина В.Н., Гремякова Т.А., Анисимов А.П. и др. Сравнительная характеристика препаратов капсульного антигена возбудителя чумы, выделенных из штаммов-продуцентов с S- и R-формами липополисахаридов // Актуальные вопросы профилактики опасных инфекционных заболеваний: Тез. докл. к Межведомственной научной конференции (26-28 марта 1991 г., Киров). – Киров, 1991. - С. 197-198.
311. Степаншина В.Н., Гремякова Т.А., Анисимов А.П. и др. Выделение и свойства рН6 антигена чумного микроба // Новые технологии и биосистемы. Достижения и перспективы. Материалы XIV научно-практической конференции: Тез. докл. (21-23 мая 1991 г., Оболенск). – Оболенск, 1991. - С. 78-80.
312. Степаншина В.Н., Гремякова Т.А., Анисимов А.П. и др. Физико-химическая и биологическая характеристика рН6-антигена *Yersinia pestis*, выделенного иммуносорбционным методом // Журн. микробиол. - 1993. - № 3. - С. 12-17.
313. Степаншина В.Н., Гремякова Т.А., Коробова О.В. и др. Взаимосвязь между составом капсульного антигена *Yersinia pestis* и его протективной активностью // Журн. микробиол. - 1995. - № 2. - С. 124.
314. Степаншина В.Н., Гремякова Т.А., Коробова О.В. и др. Изучение возможности создания молекулярной противочумной вакцины // Генетика и биохимия вирулентности возбудителей особо опасных инфекций. Материалы Российской научной конференции: Тез. докл. (21-22 октября 1992 г., Волгоград). - Волгоград, 1992. - С. 63.
315. Степаншина В.Н., Коробова О.В., Анисимов А.П. Выделение капсульного антигена из производных штамма *Yersinia pestis* EV, дефектных по *ucaA* (*cafIM*) гену *fra*-оперона //

- Иммунология и специфическая профилактика особо опасных инфекций. Материалы Российской научной конференции (21-23 сентября 1993 г., Саратов). - Саратов, 1993. - С. 67-68.
316. Степаншина В.Н., Коробова О.В., Анисимов А.П. и др. Изучение препаратов капсульного антигена, выделенных из иммунохимически атипичных штаммов возбудителя чумы // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1994. - Вып. 5 (75). - С. 94-96.
317. Степаншина В.Н., Кудрявцева Т.Ю., Негрий В.Ф. и др. Сравнительная характеристика капсульных антигенов, выделенных из вакцинного штамма *Y. pestis* и рекомбинантного штамма *E. coli* // Генетика, микробиология и совершенствование методов лабораторной диагностики особо опасных инфекций. - Саратов, 1991. - С. 65-68.
318. Струков А.И., Серов В.В. Патологическая анатомия. М.: Медицина, 1985. - С. 465-467.
319. Структура и функции антител // Пер. с англ. / Под ред. Л. Глинна, М. Стьюарда. - М.: Мир, 1983. - 200 с.
320. Стукова Н.Ю., Ледванов М.Ю., Шведун Г.П. и др. Влияние капсульного антигена и "мышинного" токсина на функцию бактерицидных систем макрофагов // 2-ая Всесоюз. конфер. "Бактериальные токсины" (27-30 ноября 1989 г.): Тез. докл. - Юрмала, 1989. - С. 124.
321. Тимаков В.Д., Гольдфарб Д.М. Основы экспериментальной медицинской бактериологии. - М.: Медгиз, 1958.
322. Тинкер А.И., Гончарова М.Н., Заревина Л.И. "Латентная" вирулентность чумных вакцинных штаммов в зависимости от их антигенной структуры // Болезни с природной очаговостью на Кавказе. - Ставрополь, 1982. - С. 147-148.
323. Тинкер А.И., Печникова И.В., Гончарова М.Н. и др. Величины "остаточной" и "латентной" вирулентности как показатели иммуногенности чумных вакцинных штаммов // Иммунология и иммунопрофилактика чумы и холеры: Тез. докл. на Всесоюзной конференции. - Саратов, 1980. - С. 8-11.
324. Тинкер И.С., Алешина Е.Н., Дрожжевкина М.С. и др. Экспериментальное изучение иммунологической эффективности некоторых фракций чумного микроба // Профилактика особо опасных болезней: Тез. докл. межинститутской научн. конфер. (20-22 ноября 1963 г.). - Ростов-н/Д, 1963. - С. 10-12.
325. Тинкер И.С., Алешина Е.Н., Канчух А.А. и др. Об антимикробном и антитоксическом иммунитете при экспериментальной чуме // Профилактика особо опасных болезней: Тез. докл. межинститутской научн. конфер. (20-22 ноября 1963 г.). - Ростов-н/Д, 1963. - С. 9.

326. Титенко М.М., Вейнблат В.И., Веренков М.С. и др. Препаративный метод выделения и очистки капсульного антигена возбудителя чумы при помощи изоэлектрической преципитации // Диагн. и профилакт. особо опасных инф. - Саратов, 1983. - С. 34-39.
327. Титенко М.М., Новохатский А.С., Коссе Л.В. и др. Новые данные по характеристике препарата F1A капсульного антигена возбудителя чумы // Вестник Всесоюзного микробиологического общества (Ростовское отделение). - 1989. - Вып. 1. - С. 118-123.
328. Титенко М.М., Сидорова И.В., Новохатский А.С. и др. Некоторые свойства компонентов оболочечного вещества чумного микроба // Эпидемиология, микробиология и иммунология бактериальных и вирусных инфекций: Тез. докл. обл. науч. конфер. молодых ученых (17-20 октября 1989 г., Ростов-н/Д). - Ростов-н/Д, 1989. - С. 48-50.
329. Топорков В.П., Леви М.И., Белобородов Р.А. и др. Результаты комплексного исследования больших песчанок в фазу завершения эпизоотии чумы // Совершенствование методов диагностики и профилактики чумы и холеры. - Саратов, 1987. - С. 23-29.
330. Тынянова В.И., Демидова Г.В., Плетницкий А.Э. и др. Влияние биологически активного вещества эритроцитов на капсульную субстанцию бактерий чумы // Материалы межгосударственной научно-практической конференции, актуальные вопросы профилактики чумы и других инфекционных заболеваний, посвященной 100-летию открытия возбудителя чумы. Актуальные вопросы профилактики чумы и других инфекционных заболеваний. - Ставрополь, 1994. - С. 88-89.
331. Тюлембаев М.А., Атчабаров Б.Б., Соорбеков О.С. Влияние аминокислот, витаминов, урацила и некоторых солей на синтез фракции 1 чумного микроба // Патологическая физиология, иммунология и аллергология ООИ. - Саратов, 1984. - С. 27-30.
332. Фаг лямбда / Под ред. Б.Н. Ильяшенко. - М.: Мир, 1975. - С. 21-64.
333. Федорова В.А., Бобров А.Г., Девдариани З.Л. и др. Капсульный антиген (Фракция 1) чумного микроба у дефектных по гену *cafIM* штаммов локализован внутриклеточно // Chinese J. of Control of Endemic Disease. - 1999. - V. 14 (Special issue). - P. 180-181.
334. Филимонова Ю.А. Видовые особенности фагоцитарной активности нейтрофилов крови экспериментальных животных // Особо опасные инфекции на Кавказе: Тез. докл. III науч.-практ. конфер. противочумн. учрежд. Кавказа по природной очаговости, эпидемиол. и профил. особо опасных инфекций (Ставрополь, 14-16 мая 1974 г.). - Ставрополь, 1974. - Вып. 1. - С. 111-112.
335. Филимонова Ю.А. Получение варианта EV-1290, лишённого фракции 1 // Генетика, биохимия и иммунохимия особо опасных инфекций. - Ростов-н/Д, 1967. - С. 172-175.

336. Филиппов А.А., Бобров А.Г., Кутырев В.В. и др. Влияние IS285 на функции плазмидных генов вирулентности возбудителей чумы и псевдотуберкулеза // Материалы VII съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 28-31 января 1997). - Т. 1. - Москва, 1997. - С. 315-316.
337. Филиппов А.А., Олейников П.Н., Дроздов А.В. и др. Роль IS-элементов *Yersinia pestis* (*Lehmann, Neumann*) в возникновении мутаций кальцийнезависимости // Генетика. - 1990. - Т. 26. - С. 1740-1748.
338. Филиппов А.А., Солодовников Н.С., Куклева Л.М. и др. Изучение плазмидного состава штаммов возбудителя чумы из разных природных очагов // Журн. микробиол. - 1992. - № 3. - С.10-13.
339. Филиппов А.А., Солодовников Н.С., Куклева Л.М. и др. Содержание плазмид в штаммах возбудителя чумы - представителей разных природных очагов // Эпидемиол., микробиол. и иммунол. бакт. и вирусн. инф.: Тез. докл. - Ростов-н/Д, 1989. - С. 159-160.
340. Филиппов А.Ф., Жемчугов В.Е. Многофазные питательные среды и перспективы их применения для выращивания чумного микроба // Микробиология и биохимия возбудителей особо опасных инфекций. - Саратов, 1982. - С. - 36-41.
341. Филиппов А.Ф., Николаев Н.И., Пономарев Н.Г. и др. Сравнительное изучение иммуногенности фракции I чумного микроба и чумной живой вакцины для морских свинок // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1973. - Вып. 4 (32). - С. 57-61.
342. Филонов А.Е., Рублевская И.Н., Боронин А.М. Стабильность и динамика R-плазмид в популяциях *Escherichia coli* в условиях непрерывного культивирования // Микробиология. - 1985. - Т. 54. - С. 227-232.
343. Хесин Р.Б. Непостоянство генома. М.: Наука, 1984. - 472 с.
344. Хлебцов Н.Г., Никифоров В.В., Мельников А.Г. и др. Спектроскопия упругого рассеяния растворов капсульного белка чумного микроба // Биополимеры и клетки. - 1990. - Т. 6. - С. 81-87.
345. Ходаковская В.Н., Мишанькин Б.Н., Кудрякова Т.А. Совершенствование диагностики чумы экспрессными методами // Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных болезней. Биотехнология. Ветеринария: Материалы юбилейной научной конференции, посвященной 70-летию НИИ микробиологии МО РФ (Киров, 30 ноября-1 декабря 1998 г.). Киров, 1998. - С. 252-253.
346. Черепанов П.А., Каримова Г.А., Михайлова Т.Г. и др. Основные факторы вирулентности и иммуногенности *Yersinia pestis* // Иммунология и специфическая профилактика

- особо опасных инфекций: Материалы Российской научной конференции (21-23 сентября 1993 г.). - Саратов, 1993. - С. 140-141.
347. Черепанов П.А., Каримова Г.А., Михайлова Т.Г. и др. Молекулярный анализ *psa* оперона, кодирующего синтез рН6 антигена *Yersinia pestis* // Новые технологии и биосистемы. Достижения и перспективы. Материалы XIV научно-практической конференции: Тез. докл. (21-23 мая 1991 г., Оболенск). – Оболенск, 1991. - С. 20-22.
348. Черепанов П.А., Каримова Г.А., Михайлова Т.Г., Панферцев Е.А., Степаншина В.Н., Анисимов А.П. рН6 антиген как один из основных факторов вирулентности чумного микроба и его протективные свойства // Актуальные вопросы профилактики опасных инфекционных заболеваний: Тез. докл. к Межведомственной научной конференции (26-28 марта 1991 г., Киров). – Киров, 1991. - С. 207-208.
349. Черепанов П.А., Михайлова Т.Г., Каримова Г.А. Конструирование стабильно наследующихся векторных молекул для клеток класса иерсиний с целью создания поливалентных живых вакцин // Актуальные вопросы профилактики опасных инфекционных заболеваний: Тез. докл. к Межведомственной научной конференции (26-28 марта 1991 г., Киров). – Киров, 1991. - С. 204-205.
350. Черепанов П.А., Михайлова Т.Г., Каримова Г.А. и др. *Fra*-оперон: полная нуклеотидная последовательность // Новые технологии и биосистемы. Достижения и перспективы. Материалы XIV научно-практической конференции: Тез. докл. (21-23 мая 1991 г., Оболенск). - Оболенск, 1991. - С. 17-20.
351. Черепанов П.А., Михайлова Т.Г., Каримова Г.А. и др. Клонирование и детальное картирование *fra-ymt*-области плазмиды pFra *Yersinia pestis* // Молекул. генетика. - 1990. - № 12. - С. 19-26.
352. Черепанов П.А., Панферцев Е.А., Каримова Г.А. и др. Исследование взаимодействия рН6 антигена *Yersinia pestis* с сывороткой неиммунных животных // Генетика и биохимия вирулентности возбудителей особо опасных инфекций. Материалы Российской научной конференции: Тезисы докладов. (Волгоград, 21-22 октября 1992 г.). - Волгоград, 1992. - С. 147.
353. Чичерин Ю.В., Евстигнеев В.И., Черкасов Н.А. и др. Физико-химические и биологические свойства чумной живой сухой вакцины НИИС для орального применения // Актуальные вопросы профилактики опасных инфекционных заболеваний: Тез. докл. к Межведомственной научной конференции (26-28 марта 1991 г., Киров). – Киров, 1991. - С. 122.

354. Шанина Л.Н. Характеристика вариантов чумного микроба, не продуцирующих капсульного антигена и "мышинного" токсина: Дисс. ... канд. мед. наук. - Саратов, 1967. - 199 с.
355. Шашаев М.А. О бактериальных хозяевах фагов, лизирующих возбудителей чумы и псевдотуберкулеза // Профилактика природноочаговых инфекций. - Ставрополь, 1983. - С. - 328-329.
356. Шеремет О.В., Милютин В.Н., Терентьев А.Н. и др. Иммуногенность чумного микроба, выращенного на некоторых питательных средах при 28 и 37°C // Журн. микробиол. - 1987. - № 7. - С. 63-68.
357. Шиманюк Н.Я., Асеева Л.Е., Мишанькин Б.Н. Супероксиддисмутазная активность у иерсиний // Иерсиниозы: микробиология, эпидемиология, клиника, патогенез, иммунология: Тез. Всесоюзной научно-практической конференции (Владивосток, 28-29 августа 1986 г.). - Владивосток, 1986. - С. 83-84.
358. Шишкина О.Г., Кириллина О.А., Попов Ю.А. Получение рекомбинантных молекул ДНК, содержащих фрагменты плазмиды рFga чумного микроба // Микробиология и биохимия особо опасных инфекций. - Саратов, 1988. - С. 11-16.
359. Шлегель Г. Общая микробиология. - М.: Мир, 1987. 566 с.
360. Щелкунов С.Н. Конструирование гибридных молекул ДНК. - Новосибирск, 1987. - 243 с.
361. Этические и правовые проблемы клинических испытаний и научных экспериментов на человеке и животных: Сборник материалов к конференции. - Москва, 1994. - 170 с.
362. Яканкин В.Г., Спирина Г.В., Черновская Т.В. и др. Иммуноглобулин-связывающие свойства белка I чумного микроба // Генетика и биохимия вирулентности возбудителей особо опасных инфекций. Материалы Российской научной конференции: Тезисы докладов. (Волгоград, 21-22 октября 1992 г.). - Волгоград, 1992. - С. 175.
363. Яшечкин Ю.И., Кириллина О.А., Попов Ю.А. и др. Физическое картирование 65 МД плазмиды *Yersinia pestis* 231 // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1993. - Вып. 1-2 (71-72). - С. 149-153.
364. Ames G.F.-L. Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism and evolution // Annu. Rev. Biochem. - 1986. - V. 55. - P. 397-425.
365. Amies C.R. The envelope substance of *Pasteurella pestis* // Br. J. Exp. Pathol. - 1951. - V. 32. - P. 259-273.

366. Anderson G.W., Leary S.E.C., Williamson E.D. *et al.* Recombinant V antigen protects mice against pneumonic and bubonic plague caused by F1-capsule-positive and F1-capsule-negative strains of *Yersinia pestis* // *Infect. Immun.* - 1996. - V. 64. - P. 4580-4585.
367. Anderson G.W., Jr, Worsham P.L., Bolt C.R. *et al.* Protection of mice from fatal bubonic and pneumonic plague by passive immunization with monoclonal antibodies against the F1 protein of *Y. pestis* // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* - 1997. - V. 56. - P. 471-473.
368. Andrews G.P., Heath D.G., Anderson G.W., Jr. *et al.* Fraction 1 capsular antigen (F1) purification from *Yersinia pestis* CO92 and from an *Escherichia coli* recombinant strain and efficacy against lethal plague challenge // *Infect. Immun.* - 1996. - V. 64. - P. 2180-2187.
369. Andrews G.P., Strachan S.T., Benner G.E. *et al.* Protective efficacy of recombinant *Yersinia* outer proteins against bubonic plague caused by encapsulated and nonencapsulated *Yersinia pestis* // *Infect. Immun.* - 1999. - 67. - P. 1533-1537.
370. Anisimov A.P. Factors promoting persistence of *Yersinia pestis* // *Medische Microbiologie (Nederlands Tijdschrift voor)*. - 1998. - V. 6 (Suppl. II). - P. S4.
371. Anisimov A.P., Amel'chenko V.V., Andryushchenko B.N. *et al.* *CafIM*-mutant *Yersinia pestis* variant avoid immunity induced by its own subunit or killed vaccine preparations // *Ibid.* - P. S35.
372. Anisimov A. P., Dyatlov I. A. A novel mechanism of antibiotic resistance in plague? // *J. Med. Microbiol.* - 1997. - V. 46. - P. 887-889.
373. Anisimov A.P., Gremyakova T.A. Lipopolysaccharide (LPS) structure determines the sero-variant of epitope-loss capsular antigen in enterobacteria carrying *cafIM*-damaged *fra* operon from *Yersinia pestis* // *Medische Microbiologie (Nederlands Tijdschrift voor)*. - 1998. - V. 6 (Suppl. II). - P. S17.
374. Anisimov A.P., Markova V.Yu. A novel chaperone-dependent mechanism of antigen variability in plague? // *Ibid.* - P. S18.
375. Anisimov A.P., Mikhina L.V. *CafIM*-mutant *Yersinia pestis* variants avoid immunity induced by commercial live plague vaccine // *Ibid.* - P. S35.
376. Antonova O.A., Dyatlov I.A., Konnov N.P., Anisimov A.P. Isolation and characterization of the novel surface glycoprotein from *Yersinia pestis* // *Ibid.* - P. S30.
377. Aronson M., Bichowsky-Slomnicki L. Temperature and pH-dependent changes of electrophoretic mobility of *Pasteurella pestis* // *J. Bacteriol.* - 1960. - V. 79. - P. 734-740.
378. Atshabar B., Suleimenov B.M., Tugambaev T.I. *et al.* Natural variability of *Yersinia pestis* // *Ibid.* - P. S29.

379. Bacot A.W., Martin C.J. Observation on the mechanism of the transmission of plague by fleas // *J. Hyg., Plague Suppl.* - 1914. - V. 3. - P. 423-439.
380. Bahmanyar M., Cavanaugh D.C. *Plague Manual.* - Geneva: World Health Organization, 1976. – 78 p.
381. Baker E.E., Sommer H., Foster L.E. *et al.* Antigenic structure of *Pasteurella pestis* and the isolation of a crystalline antigen // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* - 1947. - V. 64. - P. 139-141.
382. Baker E.E., Sommer H., Foster L.E. *et al.* Studies on immunization against plague. I. The isolation and characterization of the soluble antigen of the *Pasteurella pestis* // *J. Immunol.* - 1952. - V. 68. - P. 131-145.
383. Barker D.G. Cloning and amplified expression of the tyrosyl-tRNA synthetase genes of *Bacillus stearothermophilus* and *Escherichia coli* // *Eur. J. Biochem.* - 1982. - V. 125. - P. 357-360.
384. Bayer M.E., Sloyer J.L. The electrophoretic mobility of Gram-negative and Gram-positive bacteria: an electrokinetic analysis // *J. General Microbiol.* - 1990. - V. 136. - P. 867-874.
385. Bearden S.W., Perry R.D. The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague // *Mol. Microbiol.* - 1999. - V. 32. - P. 403-414.
386. Beesley E.D., Surgalla M.G. Pesticinogeny: a characteristic useful for presumptive identification and isolation of *Pasteurella pestis* // *Appl. Microbiol.* - 1970. - V. 19. - P. 915-918.
387. Bengoechea J.A., Brandenburg K., Seydel U. *et al.* *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* show increased outer membrane permeability to hydrophobic agents which correlates with lipopolysaccharide acyl-chain fluidity // *Microbiology.* - 1998. - V. 144. - P. 1517-1526.
388. Bennett L.G., Tornabene T.G. Characterization of the antigenic subunits of the envelope protein of *Yersinia pestis* // *J. Bacteriol.* - 1974. - V. 117. - P. 48-55.
389. Bertin Y., Girardeau J.-P., Der Vartanian M. *et al.* The ClpE protein involved in biogenesis of the CS31A capsule-like antigen is a member of a periplasmic chaperone family in Gram-negative bacteria // *FEMS Microbiol. Lett.* - 1993. - V. 108. - P. 59-68.
390. Bichowsky-Slomnicki L., Ben-Efraim S. Biological activities in extracts of *Pasteurella pestis* and their relation to the "pH 6 antigen" // *J. Bacteriol.* - 1963. - V. 86. - P. 101-111.
391. Birnboim H.C., Doly I. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // *Nucl. Acids Res.* - 1979. - V.7. - P. 1515-1523.
392. Bordet C., Bruneteau M., Michel G. Lipopolysaccharides d'une souche a virulence attenuée de *Yersinia pestis* // *Eur. J. Biochem.* – 1977. V. 79. - P. 443-449.
393. Brenner S., Horne R.W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 1959. – V. 34. – P. 103-110.

394. Brown S.D., Montie T.C. Beta-adrenergic blocking activity of *Yersinia pestis* murine toxin // *Infect. Immun.* - 1977. - V. 18. - P. 85-93.
395. Brubaker R. R. Factors promoting acute and chronic diseases caused by *Yersinia* // *Clin. Microbiol. Rev.* - 1991. - V. 4. - P. 309-324.
396. Brubaker R.R. Mutation rate to nonpigmentation in *Pasteurella pestis* // *J. Bacteriol.* - 1969. - V. 98. - P. 1404-1406.
397. Brubaker R.R. The Genus *Yersinia*: Biochemistry and Genetics of virulence // *Current Top. Microbiol. Immunol. Berlin-Heidelberg.* - 1972. - V. 57. - P. 111-158.
398. Burrows T.W. Virulence of *Pasteurella pestis* // *Nature.* - 1957. - V. 179. - P. 1246-1247.
399. Burrows T.W. Virulence of *Pasteurella pestis* and immunogenicity to plaque // *Ergeb. Mikrobiol. Immun. Exp. Ther.* - 1963. - V. 37. - P. 59-113.
400. Burrows T.W., Bacon G.A. The effects of loss of different virulence determinants on the virulence and immunogenicity of strains of *Pasteurella pestis* // *Brit. J. Exp. Pathol.* - 1958. - V. 39. - P. 278-291.
401. Burrows T.W., Farrell J.M.F., Gillett W.A. The catalase activities of *Pasteurella pestis* and other bacteria // *Brit. J. Exp. Pathol.* - 1964. - V. 45. - P. 579-588.
402. Burrows T.W., Gillett W.A. Host specificity of Brazilian strains of *Pasteurella pestis* // *Nature.* - 1971. - V. 229. - P. 51-52.
403. Cavanaugh D.C., Randall R. The role of multiplication of *Pasteurella pestis* in mononuclear phagocytes in the pathogenesis of fleaborne plague // *J. Immunol.* - 1959. - V. 83. - P. 348-371.
404. Charnetzky W.T., Shuford W.W. Survival and growth of *Yersinia pestis* within macrophages and on effect of the loss of the 47-megadalton plasmid on growth in macrophages // *J. Infect. Immun.* - 1985. - V. 47. - P. 234-241.
405. Chen C.H., Johnson A.G., Kasai N., *et al.* Geterogenity and biological activity of endotoxic glycolipid from *Salmonella minnesota* // *J. Infec. Dis.* - 1973. - V. 1288. - P. 43-51.
406. Chen T.H., Elberg S.S. Scanning electron microscopic study of virulent *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* type I // *Infect. Immun.* - 1977. - V. 15. - P. 972-977.
407. Chen T.H., Elberg S.S., Boyles J. *et al.* *Yersinia pestis*: correlation of ultrastructure and immunological status // *Infect. Immun.* - 1975. - V. 11. - P. 1382-1390.
408. Chen T.H., Elberg S.S., Eisler D.M. Immunity in plague: protection induced in *Cercopithecus aethiops* by oral administration of live, attenuated *Yersinia pestis* // *J. Infect. Dis.* - 1976. - V. 133. - P. 302-309.
409. Chen T.H., Meyer K.F. Susceptibility and antibody response of *Rattus* species to experimental plague // *J. Infect. Dis.* - 1974. - V. 129. - P. S62-S71.

410. Cherepanov P.A., Forsberg A. Interactions between pH6 antigen of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* and low density lipoproteins and membranes of eukaryotic cells // *Medische Microbiologie (Nederlands Tijdschrift voor)*. - 1998. - V. 6 (Suppl. II). - P. S20.
411. Cherepanov P.A., Rosqvist R., Forsberg A. Regulation of pH6 expression in *Yersinia pestis* // *Ibid.* - P. S8.
412. Cohen S.N., Chang A.C.Y. Recircularization and autonomous replication of a sheared R-factor DNA segment in *Escherichia coli* transformants // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1973. - V. 70. - P. 1293-1295.
413. Cornelis G.R. The *Yersinia* deadly kiss // *J. Bacteriol.* - 1998. - V. 180. - P. 5495-5504.
414. Cornelis G.R., Boland A., Boyd A.P. *et al.* The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* -1998. - V. 62. - P. 1315-1352.
415. Crocker T.T., Chen T.H., Meyer K.F. Electron microscopic study of the extracellular materials of *Pasteurella pestis* // *J. Bacteriol.* - 1956. - V. 72. - P. 851-857.
416. Davis K.J., Fritz D.L., Pitt M.L. *et al.* Pathology of experimental pneumonic plague produced by fraction 1-positive and fraction 1-negative *Yersinia pestis* in African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) // *Arch. Pathol. Lab. Med.* - 1996. - V. 120. - P. 156-163.
417. Demerec M., Adelberg E.A., Clark A.J. *et al.* A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics // *Genetics.* - 1966. - V. 54. - P. 61-79.
418. Devignat R. Variétés de l'espèce *Pasteurella pestis*. Nouvelle hypothèse // *Bull. OMS.* - 1951. - V. 4. - P. 247-263.
419. DiRita V.J., Mekalanos J.J. Genetic regulation of bacterial virulence // *Annu. Rev. Genet.* - 1989. - V. 23. - P. 455-482.
420. Dodd D.C., Eisenstein B.I. Dependence of secretion and assembly of type 1 fimbrial subunits on normal protein export // *J. Bacteriol.* - 1984. - V. 159. - P. 1077-1079.
421. Donovan J.E., Nam D., Fukui G. *et al.* Role of the capsule of *Pasteurella pestis* in bubonic plague in the guinea pig // *J. Infect. Dis.* - 1961. - V. 109. - P. 154-157.
422. Drozdov I.G., Anisimov A.P., Samoilova S.V. *et al.* Virulent non-capsulate *Yersinia pestis* variants constructed by insertion mutagenesis // *J. Med. Microbiol.* - 1995. - V. 42. - P. 264-268.
423. Du Y., Galyov E., Forsberg A. Genetic analysis of virulence determinants unique to *Yersinia pestis* // *Contrib. Microbiol. Immunol. (Basel, Karger)* - 1995. - V. 13. - P. 321-324.
424. Duim B., van Alphen L., Eijk P. *et al.* Antigenic drift of non-encapsulated *Haemophilus influenzae* major outer membrane protein P2 in patients with chronic bronchitis is caused by point mutations // *Mol. Microbiol.* - 1994. - V. 11. - P. 1181-1189.
425. Ellis R.J. Chaperoning nascent proteins // *Nature.* - 1984. - V. 370. - P. 96-97.

426. Englesberg E., Levy J.B. Studies on immunization against plague. VI. Growth of *Pasteurella pestis* and the production of the envelope and other soluble antigens in a casein hydrolyzate mineral glucose medium // J. Bacteriol. - 1954. - V. 67. - P. 438-449.
427. Falkow S. What is a pathogen? // ASM News. - 1997. - V. 63. - P. 359-365.
428. Feodorova V.A., Devdariani Z.L. Some serological properties of F1 *Yersinia pestis* galactolipid // Medische Microbiologie (Nederlands Tijdschrift voor). - 1998. - V. 6 (Suppl. II). - P. S19.
429. Feodorova V.A., Devdariani Z.L., Nazarova L.S. Adjuvant effect of anti-idiotypic antibodies to *Yersinia pestis* lipopolysaccharide // J. Med. Microbiol. - 1999. - V. 48. - P. 751-756.
430. Ferber D.M., Brubaker R.R. Mode of action of pesticin: N-acetylglucosaminidase activity // J. Bacteriol. - 1979. - V. 139. - P. 495-501.
431. Fields A.K., Straley S.C. Intracellular delivery of *Yersinia pestis* V antigen // Medische Microbiologie (Nederlands Tijdschrift voor). - 1998. - V. 6 (Suppl. II). - P. S6-S7.
432. Filippov A.A., Oleinikov P.N., Motin V.L. *et al.* Sequencing of two *Yersinia pestis* IS elements, IS285 and IS100 // Contrib. Microbiol. Immunol. - 1995. - V. 13. - P. 306-309.
433. Filippov A.A., Solodovnikov N.S., Kookleva L.M. *et al.* Plasmid content in *Yersinia pestis* strains of different origin // FEMS Microb. Lett. - 1990. - V. 67. - P. 45-48.
434. Finlay B.B., Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity // Microbiol. Rev. - 1989. - V. 53. - P. 210-230.
435. Finlay B.B., Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited // Microbiol. Mol. Biol. Rev. - 1997. - V. 61. - P. 136-169.
436. Fox E.N., Higuchi K. Synthesis of the fraction I antigenic protein by *Pasteurella pestis* // J. Bacteriol. - 1958. - V. 75. - P. 209-216.
437. Friedlander A.M., Welkos S.L., Worsham P.L. *et al.* Relationship between virulence and immunity as revealed in recent studies of the F1 capsule of *Yersinia pestis* // Clin. Inf. Dis. - 1995. - V. 21 (Suppl. 2). - P. S178-S181.
438. Fukui G.M., Lawton W.D., Janssen W.A. *et al.* Response of guinea pig lungs to *in vivo* and *in vitro* cultures of *Pasteurella pestis* // J. Infect. Dis. - 1957. - V. 100. - P. 103-107.
439. Galimand M., Guiyoule A., Gerbaud G. *et al.* Multiple antibiotic resistance in *Yersinia pestis* mediated by a self-transferable plasmid // N. Engl. J. Med. - 1997. - V. 337. - P. 677-680.
440. Gallegos M.T., Michan C., Ramos J.L. The XylS/AraC family of regulators // Nucl. Acids Res. - 1993. - V. 21. - P. 807-810.
441. Galyov E.E., Hakansson S., Forsberg A. *et al.* A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant // Nature. - 1993. - V. 361. - P. 730-732.

442. Galyov E.E., Karlishev A.V., Chernovskaya T.V. *et al.* Expression of the envelope antigen F1 of *Yersinia pestis* is mediated by the product of *cafIM* gene having homology with the chaperone protein PapD of *Escherichia coli* // FEBS Lett. - 1991. - V. 286. - P. 79-82.
443. Galyov E.E., Smirnov O.Yu., Karlishev A.V. *et al.* Nucleotide sequence of the *Yersinia pestis* gene encoding F1 antigen and the primary structure of the protein. Putative T and B cell epitopes // FEBS Lett. - 1990. - V. 227. - P. 230-232.
444. Girardeau J.P., Der Vartanian M., Ollier J.L. *et al.* CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains // Infect. Immun. - 1988. - V. 56. - P. 2180-2188.
445. Glosnicka R., Gruszkiewicz E. Chemical composition and biological activity of the *Yersinia pestis* envelope substance // Infect. Immun. - 1980. - V. 30. - P. 506-512.
446. Goguen J.D., Hoe N.P., Subrahmanyam B.K. Proteases and bacterial virulence: a view from the trenches // Infect. Agents Dis. - 1995. - V. 4. - P. 47-54.
447. Goguen J.D., Yother J., Straley S.C. Genetic analysis of the low calcium response in *Yersinia pestis* Mud1 (*Ap lac*) insertion mutants // J. Bacteriol. - 1984. - V. 160. - P. 842-848.
448. Gremyakova T.A., Titareva G.M., Bakhteeva I.V. *et al.* *AroA Salmonella typhimurium* SL3261 expressing *Yersinia pestis* capsular F1 antigen: plasmid maintenance and protectivity // Medische Microbiologie (Nederlands Tijdschrift voor). - 1998. - V. 6 (Suppl. II). - P. S17.
449. Griffin K.F., Hill J., Murray K. *et al.* Protective efficacies of the V antigen variants in *Yersinia* // Medische Microbiologie (Nederlands Tijdschrift voor). - 1998. - V. 6 (Suppl. II). - P. S35.
450. Guan K., Dixon J.E. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia* // Science. - 1990. - V. 249. - P. 553-556.
451. Habig W., Hudson B.W., Marshall J.D. *et al.* Evidence for molecular heterogeneity of the specific antigen (fraction-1) of *Pasteurella pestis* // Infect. Immun. - 1971. - V. 3. - P. 498-499.
452. Hautala J.A., Bassett C.L., Giles N.H. *et al.* Increased expression of a eukaryotic gene in *Escherichia coli* through stabilization of its messenger RNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 1979. - V. 76. - P. 5774-5778.
453. Heesemann J. Chromosomal-encoded siderophores are required for mouse virulence of enteropathogenic *Yersinia* species // FEMS Microbiol. Lett. - 1987. - V. 48. - P. 229-233.
454. Higgins C.F. ABC transporters: from microorganism to man // Annu. Rev. Cell. Biol. - 1992. - V. 8. - P. 67-113.
455. Higuchi K., Smith J.L. Studies of the nutrition and physiology of *Pasteurella pestis* IV. A differential plating medium for the mutation rate to avirulence // J. Bacteriol. - 1961. - V. 81. - P. 605-606.

456. Hinnebusch J., Lillard J.W., Jr., Perry R.D. *et al.* An Hsm<sup>+</sup> phenotype is required for survival of *Yersinia pestis* in fleas // Abstracts of the 95<sup>th</sup> General Meeting of the American Society for Microbiology (Washington, DC, 21-25 May 1995). - Washington, DC, 1995. - P. 213.
457. Hinnebusch J., Perry R.D. Schwan T.G. Role of the *Yersinia pestis* hemin storage (*hms*) locus in the transmission of plague by fleas // Science. - 1996. - V.273. - P. 367-370.
458. Hohn B., Collins J. A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments // Gene. - 1980. - V. 11.- P. 291-298.
459. Hoiseth S.K., Stocker B.A.D. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines // Nature. - 1981. - V. 291. - P. 238-239.
460. Hu P., Elliott J., McCready P. *et al.* Structural organization of virulence-associated plasmids of *Yersinia pestis* // J. Bacteriol. 1998. - V. 180. - P. 5192-5202.
461. Hudson B.W., Kartman L., Prince F.M. *Pasteurella pestis* detection in fleas by fluorescent antibody staining // Bull. Wld Hlth Org. - 1966. - V. 34. - P. 709-714.
462. Hultgren S.J., Abraham S., Caparon M. *et al.* Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition // Cell. - 1993. - V. 73. - P. 887-901.
463. Hultgren S.J., Jones C.H. Utility of the immunoglobulin-like fold of chaperones in shaping organelles of attachment in pathogenic bacteria. The chaperone/usher pathway is a paradigm of certain facets of organelle development // ASM News. - 1995. - V. 61. - P. 457-464.
464. Ingram J.M., Cheng K.J., Costerton J.W. Alkaline phosphatase of *Pseudomonas aeruginosa*: the mechanism of secretion and release of the enzyme from whole cells // Can. J. Microbiol. - 1973. - V. 19. - P. 1407-1415.
465. Isaäcson M., Levy D., Te B.J. *et al.* Unusual cases of human plague in Southern Africa // S. Afr. Med. J. - 1973. - V. 47. - P. 2109-2113.
466. Isherwood K.E., Oyston P.C.F., Atkinson S. *et al.* Construction and characterisation of a quorum sensing mutant in *Yersinia pestis* // Medische Microbiologie (Nederlands Tijdschrift voor). - 1998. - V. 6 (Suppl. II). - P. S16.
467. Jackson S., Burrows T.W. The virulence enhancing effect of iron on non pigmented mutants of virulent strains of *Pasteurella pestis* // Br. J. Exp. Pathol. - 1956. - V. 37. - P. 577-583.
468. Janda J., Work E. A colorimetric estimation of lipopolysaccharides // FEBS Lett. - 1971. - V. 16. - P. 343-345.
469. Janssen W.A., Lawton W.D., Fukui G.M. *et al.* The pathogenesis of plague. I. A study of the correlation between virulence and relative phagocytosis resistance of some strains of *Pasteurella pestis* // J. Infect. Dis. - 1963. - V. 113. - P. 139-143.

470. Johnson A.G., Tomai M., Solem L. *et al.* Characterization of a nontoxic monophosphoryl lipid A // *Rev. Infect. Dis.* - 1987. - V. 98. - P. 8512-8516.
471. Jones C.H., Danese P.N., Pinkner J.S. *et al.* The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems // *EMBO J.* - 1997. - V. 16. - P. 6394-6406.
472. Jones I.M., Primrose S.B., Robinson A. *et al.* Maintenance of some ColE1-type plasmids in chemostat culture // *Mol. Gen. Genet.* - 1980. - V. 180. - P. 579-584.
473. Jones K.F., Hollingshead S.K., Scott J.R. *et al.* Spontaneous M6 protein size mutants of group A streptococci display variation in antigenic and opsonogenic epitopes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* - 1988. - V. 85. - P. 8271-8275.
474. Kadurugamuwa J.L., Beveridge T.J. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion // *J. Bacteriol.* - 1995. - V. 177. - P. 3998-4008.
475. Kagan B.L., Selsted M.E., Ganz T. *et al.* Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1990. - V. 87. - P. 210-214.
476. Karlyshev A., Galyov E., Smirnov O. *et al.* Structure and regulation of a gene cluster involved in capsule formation of *Y. pestis* // *Biological membranes: structure, biogenesis and dynamics. NATO ASI Series. Series H: Cell Biology, V. 82 / Jos A.F. Op den Kamp (ed.).* - Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1994. - P. 321-330.
477. Karlyshev A.V., Galyov E.E., Abramov V.M. *et al.* *Caf1R* gene and its role in the regulation of capsule formation of *Yersinia pestis* // *FEBS Lett.* - 1992. - V. 305. - P. 37-40.
478. Karlyshev A.V., Galyov E.E., Smirnov O.Yu. *et al.* A new gene of the *fl* operon of *Yersinia pestis* involved in the capsule biogenesis // *FEBS Lett.* - 1992. - V. 297. - P. 77-80.
479. Karlyshev A.V., Prentice M., Oyston P. *et al.* Random shot-gun cloning and sample sequencing of the *Yersinia pestis* CO-92 genome // *Medische Microbiologie (Nederlands Tijdschrift voor).* - 1998. - V. 6 (Suppl. II). - P. S18.
480. Kartman L., Quan S.F. Notes about the fate of avirulent strains *Pasteurella pestis* in fleas // *Frans Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* - 1964. - V. 58. - P. 363-365.
481. Ketley J.M., Kaper J.B., Herrington D.A. *et al.* Diminished immunogenicity of a recombination-deficient derivative of *Vibrio cholerae* vaccine strain CVD103 // *Infect. Immun.* - 1990. - V. 58. - P. 1481-1484.

482. Kiel J.A.K.W., Vossen J.P.M.J., Venema G. A general method for the construction of *Escherichia coli* mutants by homologous recombination and plasmid segregation // Mol. Gen. Genet. - 1987. - V. 207. - P. 294-301.
483. Kienle Z., Emody L., Svanborg C. *et al.* Adhesive properties conferred by the plasminogen activator of *Yersinia pestis* // J. Gen. Microbiol. - 1992. - V. 138. - P. 1679-1687.
484. Killar L.M., Eisenstein T.K. Immunity to *Salmonella typhimurium* infection in C3H/HeJ and C3H/HeNCrIBR mice: studies with an aromatic-dependent live *S. typhimurium* strain as a vaccine // Infect. Immun. - 1981. - V. 47. - P. 605-612.
485. Klemm P., Jørgensen B.J., Kreft B. *et al.* The export systems of type 1 and F1C fimbriae are interchangeable but work in parental pairs // J. Bacteriol. - 1995. - V. 177. - P. 621-627.
486. Krawiec S., Riley M. Organization of the bacterial chromosome // Microbiol. Rev. - 1990. - V. 54. - P. 502-539.
487. Kuttyrev V.V., Filippov A.A., Oparina O.S. *et al.* Analysis of *Yersinia pestis* chromosomal determinants Pgm<sup>+</sup> and Pst<sup>s</sup> associated with virulence // Microb. Pathog. - 1992. - V. 12. - P. 177-186.
488. Kuttyrev V.V., Motin V.L., Protsenko O.A. *et al.* Active protection of mice from plague with a fusion protein containing V antigen of *Yersinia pseudotuberculosis* // Abstracts of 6<sup>th</sup> International Symposium on *Yersinia* (September 26-28, 1994, Rome, Italy). - Rome, 1994. - P. 39A.
489. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. - 1970. - V. 227. - P. 680-685.
490. Lahteenmaki K., Virkola R., Saren A. *et al.* Expression of plasminogen activator Pla of *Yersinia pestis* enhances bacterial attachment to the mammalian extracellular matrix // Infect. Immun. - 1998. - V. 66. - P. 5755-5762.
491. Laird M.W., Kloser A.W., Misra R. Assembly of LambB and OmpF in deep rough lipopolysaccharide mutants of *Escherichia coli* K-12 // J. Bacteriol. - 1994. - V. 176. - P. 2259-2264.
492. Lawton W.D., Fukui G.W., Surgalla M.G. Studies on the antigens of *Pasteurella pestis* and *Pasteurella pseudotuberculosis* // J. Immunol. - 1960. - V. 84. - P. 475-479.
493. Lawton W.D., Stull H. Gene transfer in *Pasteurella pestis* harboring the F'Cm plasmid of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. - 1972. - V. 110. - P. 926-929.
494. Leary S.E.C., Williamson E.D., Griffin K.F. *et al.* Active immunization with recombinant V antigen from *Yersinia pestis* protects mice against plague // Infect. Immun. - 1995. - V. 63. - P. 2854-2858.

495. Levine M.M., Ristaino P., Marley G. *et al.* Coli surface antigens 1 and 3 of colonization factor antigen II-positive enterotoxigenic *Escherichia coli*: morphology, purification, and immune responses in humans // *Infect. Immun.* - 1984. - V. 44. - P. 409-420.
496. Lindler L.E., Plano G.V., Burland V. *et al.* Complete DNA sequence and detailed analysis of the *Yersinia pestis* KIM5 plasmid encoding murine toxin and capsular antigen // *Infect. Immun.* - 1998. - V. 66. - P. 5731-5742.
497. Lindler L.E., Tall B.D. *Yersinia pestis* pH 6 antigen forms fimbriae and is induced by intracellular association with macrophages // *Mol. Microbiol.* - 1993. - V. 8. - P. 311-324.
498. Lowry O.H., Rosenbrough N.R., Farr A.L. *et al.* Protein measurement with the folin phenol // *J. Biol. Chem.* - 1951. - V. 193. - P. 115-119.
499. Lucier T.S., Fetherston J.D., Brubaker R.R. *et al.* Iron uptake and iron-repressible polypeptides in *Yersinia pestis* // *Infect. Immun.* - 1996. - V. 64. - P. 3023-3031.
500. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual.* - N.Y., Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
501. Marshall J.D., Jr., Bartelloni P.J., Cavanaugh D.C. *et al.* Plague immunization. II. Relation of adverse clinical reactions to multiple immunizations with killed vaccine // *J. Infect. Dis.* - 1974. - V. 129. - P. 519-525.
502. May K.R., Druett H.A. A microthread technique for studying the viability of microbes in a simulated airborne state // *J. Gen. Microbiol.* - 1968. - V. 51. - P. 353-366.
503. McDade J.E., Franz D. Bioterrorism as public health threat // *Emerging Infectious Diseases.* - 1998. - V. 4. - P. 493-494.
504. McDonough K.A., Barnes A.M., Quan T.J. *et al.* Mutation in the *pla* gene of *Yersinia pestis* alters the course of the plague bacillus-flea (*Siphonaptera: Ceratophyllidae*) interaction // *J. Med. Entomol.* - 1993. - V. 30. - P. 772-780.
505. Meier J.T., Simon M.I., Barbour A.G. Antigenic variation is associated with DNA rearrangements in a relapsing fever *Borrelia* // *Cell.* - 1985. - V. 41. - P. 403-409.
506. Meyer K.F. The known and the unknown in plague // *Am. J. Trop. Med.* - 1942. - V. 22. - P. 9-36.
507. Meyer K.F., Cavanaugh D.C., Bartelloni P.J. *et al.* Plague immunization. I. Past and present trends // *J. Infect. Dis.* - 1974. - V. 129. - P. S13-S17.
508. Meyer K.F., Hightower J.A., McCrumb F.R. Plague immunization. VI. Vaccination with the fraction I antigen of *Yersinia pestis* // *J. Infect. Dis.* - 1974. - V. 129. - P. S41-S45.

509. Mishankin M., Vasilieva G., Kozlovsky V. *et al.* The computer analysis of amino acid sequence of *Yersinia pestis* "murine" toxin (MT) // *Medische Microbiologie (Nederlands Tijdschrift voor)*. - 1998. - V. 6 (Suppl. II). - P. S19.
510. Missiakas D., Raina S. Protein folding in the bacterial periplasm // *J. Bacteriol.* - 1997. - V. 179. - P. 2465-2471.
511. Moulder J.W. Intracellular parasitism: life in an extreme environment // *J. Infect. Dis.* - 1974. - V. 130. - P. 300-306.
512. Muller-Eberhard H.J. Complement // *Ann. Rev. Biochem.* - 1975. - V. 44. - P. 695-724.
513. Nakajima R., Brubaker R.R. Association between virulence of *Yersinia pestis* and suppression of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha // *Infect. Immun.* - 1993. - V. 61. - P. 23-31.
514. Nakajima R., Motin V.L., Brubaker R.R. Active immunity to *Yersinia* and inhibition of cytokine synthesis *in vivo* mediated by a protein A-V antigen // Abstracts of 6<sup>th</sup> International Symposium on *Yersinia* (September 26-28, 1994, Rome, Italy). - Rome, 1994. - P. 39.
515. Nakajima R., Motin V.L., Brubaker R.R. Suppression of cytokines by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization // *Infect. Immun.* - 1995. - V. 63. - P. 3021-3029.
516. Nedialkov Yu.A., Motin V.L., Brubaker R.R. Resistance to lipopolysaccharide mediated by the *Yersinia pestis* V antigen-polyhistidine fusion peptide: amplification of interleukin-10 // *Infect. Immun.* - 1997. - V. 65. - P. 1196-1203.
517. Neubauer H., Aleksis S., Meyer H. *et al.* Mapping of B-cell epitopes of the F1 capsular antigen of *Y. pestis* // *Medische Microbiologie (Nederlands Tijdschrift voor)*. - 1998. - V. 6 (Suppl. II). - P. S10-11.
518. Nikaido H., Vaara M. Outer membrane // *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology, V. 1 / F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, H.E. Umbarger (ed.). - American Society for Microbiology: Washington, D.C., 1987. - P. 7-22.
519. Norkina O.V., Kulichenko A.N., Gintsburg A.L. *et al.* Development of a diagnostic test for *Yersinia pestis* by the polymerase chain reaction // *J. Appl. Bacteriol.* - 1994. - V. 76. - P. 240-245.
520. Novik R., Clowes R., Cohen S. *et al.* Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal // *Bacteriol. Rev.* - 1976. - V. 40. - P. 168-189.
521. Ogata M. Ueber die pestepidemie in Formosa // *Zbl. Bakt.* - 1897. - V. 21. - P. 769-777.

522. Öuchterlony O. Antigen-antibody reaction in gels // *Acta Pathologica et microbiologica Scandinavica*. - 1949. - V. 26. - P. 505-515.
523. Oyston P.C.F., Dorrell N., Li S.R. *et al.* Construction and characterisation of a *phoP* mutant from *Yersinia pestis* // *Medische Microbiologie (Nederlands Tijdschrift voor)*. - 1998. - V. 6 (Suppl. II). - P. S7.
524. Oyston P.C.F., Russell P., Williamson E.D. *et al.* An *aroA* mutant of *Yersinia pestis* is attenuated in guinea-pigs, but virulent in mice // *Microbiology*. - 1996. - V. 142. - P. 1847-1853.
525. Oyston P.C.F., Williamson E.D., Leary S.E.C. *et al.* Immunization with live recombinant *Salmonella typhimurium aroA* producing F1 antigen protects against plague // *Infect. Immun.* - 1995. - V. 63. - P. 563-568.
526. Perry R.D. Acquisition and storage of inorganic iron and hemin by the yersiniae // *Trends Microbiol.* - 1993. - V. 1. - P. 142-147.
527. Perry R.D., Fetherston J.D. *Yersinia pestis* - etiologic agent of plague // *Clin. Microbiol. Rev.* - 1997. - V. 10. - P. 35-66.
528. Phillips A.P., Morris B.C., Hall D. *et al.* Identification of encapsulated and non-encapsulated *Yersinia pestis* by immunofluorescence tests using polyclonal and monoclonal antibodies // *Epidemiol. Infect.* - 1988. - V. 101. - P. 59-73.
529. Pirt S.T., Theckerey E.T., Harris-Smith R. The influence of environment on antigen production by *Pasteurella pestis* studies by means of the continuous flow culture technique // *J. Gen. Microbiol.* - 1961. - V. 25. - P. 119-130.
530. van der Ploeg L.H.T., Gottesdiener K., Lee M. *et al.* Antigenic variation in African trypanosomes // *Trends Genet. Rev.* - 1992. - V. 8. - P. 452-457.
531. Pollitzer R. Plague. - Geneva: World Health Organization, 1954. - 698 p.
532. Portnoy D.A., Blank H.F., Kingsbury D.T. *et al.* Genetic analysis of essential plasmid determinants of pathogenicity in *Yersinia pestis* // *J. Infect. Dis.* - 1983. - V. 148. - P. 297-304.
533. Portnoy D.A., Falkow S. Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis* // *J. Bacteriol.* 1981. - V. 148. - P. 877-883.
534. Protsenko O.A., Filippov A.A., Kuttyrev V.V. Integration of the plasmid encoding the synthesis of capsular antigen and murine toxin into *Yersinia pestis* chromosome // *Microb. Pathogen.* - 1991. - V. 11. - P. 123-128.
535. Pugsley A.P. The complete general secretion pathway in Gram-negative bacteria // *Microbiol. Rev.* - 1993. - V. 57. - P. 50-108.

536. Rakin A., Pelludat C., Schubert S. *et al.* Evolutionary changes in the "high pathogenicity island" // *Medische Microbiologie (Nederlands Tijdschrift voor)*. - 1998. - V. 6 (Suppl. II). - P. S7.
537. Rakin A., Saken E., Harmsen D. *et al.* The pesticin receptor of *Yersinia enterocolitica*: a novel virulence factor with dual function // *Mol. Microbiol.* - 1994. - V. 13. - P. 253-263.
538. Reddin K.M., Easterbrook T.J., Robinson A. *et al.* Large-scale purification of the F1 antigen of *Yersinia pestis* // *Contrib. Microbiol. Immunol.* - 1995. - V. 13. - P. 329-330.
539. Reisman R.E. Allergic reactions due to plague vaccine // *J. Allergy.* - 1970. - V. 46. - P. 49-55.
540. Reisner B.S., Straley S.C. *Yersinia pestis* YopM: thrombin binding and overexpression // *Infect. Immun.* - 1992. - V. 60. - P. 5242-5252.
541. Richards P.A., Richards A.G. Acanthae: a new type of cuticular process in the proventriculus of *Mecoptera* and *Siphonaptera* // *Zool. J. Anat.* - 1969. - V. 86. - P. 158-176.
542. Robertson B.D., Meyer T.F. Genetic variation in pathogenic bacteria // *Trends Genet. Rev.* - 1992. - V. 8. - P. 422-427.
543. Rockenmacher M. Relationship of catalase activity to virulence in *Pasteurella pestis* // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* - 1949. - V. 71. - P. 99-101.
544. Rodrigues C.G., Carneiro C.M., Barbosa C.T. *et al.* Antigen F1 from *Yersinia pestis* forms aqueous channels in lipid bilayer membranes // *Braz. J. Med. Biol. Res.* - 1992. - V. 25. - P. 75-79.
545. Roggenkamp A., Geiger A.M., Leitritz L. *et al.* Passive immunity to infection with *Yersinia* spp. mediated by anti-recombinant V antigen is dependent on polymorphism of V antigen // *Infect. Immun.* - 1997. - V. 65. - P. 446-451.
546. Rosqvist R., Bolin I., Wolf-Watz H. Inhibition of phagocytosis in *Yersinia pseudotuberculosis*: a virulence plasmid-encoded ability involving the Yop2b protein // *Infect. Immun.* - 1988. - V. 56. - P. 2139-2143.
547. Rosqvist R., Forsberg A., Wolf-Watz H. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption // *Infect. Immun.* - 1991. - V. 59. - P. 4562-4569.
548. Rosqvist R., Forsberg A., Wolf-Watz H. The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence // *Mol. Microbiol.* - 1990. - V. 4. - P. 657-667.
549. Roth C., Bringaud F., Layden R.E. *et al.* Active late-appearing variable surface antigen genes in *Trypanosoma equiperdum* are constructed entirely from pseudogenes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* - 1989. - V. 86. - P. 9375-9379.

550. Rowland S. The morphology of the plague bacillus // *J. Hyg.* - 1914. - V. 13 (Plague, Suppl. 3). - P. 418-422.
551. Russell A.D., Furr J.R., Maillard J.-Y. Microbial susceptibility and resistance to biocides // *ASM News.* - 1997. - V. 63. - P. 481-487.
552. Sali A., Shakhnovich E., Karplus M. How does a protein fold? // *Nature.* - 1994. - V. 369. - P. 248-251.
553. Salmond G.P.C., Reeves P.J. Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria // *Trends. Biochem. Sci.* - 1993. - V. 18. - P. 7-12.
554. SamoiloVA S.V., SamoiloVA L.V., Yezhov I.N., Drozdov I.G., Anisimov A.P. Virulence of pPst<sup>+</sup> and pPst<sup>-</sup> strains of *Yersinia pestis* for guinea-pigs // *J. Med. Microbiol.* - 1996. - V. 45. - P. 440-444.
555. Samokhodkina E.D., Ryzhko I.V., Shcherbaniuk A.I. *et al.* Doxycycline in the prevention of experimental plague induced by plague microbe variants // *Antibiot. Khimioter.* - 1992. - V. 37. - P. 26-28.
556. Samokhodkina E.D., Ryzhko I.V., Tsurava R.I. *et al.* Beta-lactam antibiotics (ampicillin, cefotaxime) in prevention of experimental plague in albino mice, caused by non-fractionated strains of the pathogen // *Antibiot. Khimioter.* - 1994. - V. 39. - P. 20-23.
557. Sample A.K., Friedlander A.M. Degradation of proinflammatory cytokines by the plasminogen activator protease of *Yersinia pestis* // Abstracts of the 96<sup>th</sup> General Meeting of the American Society for Microbiology (New Orleans, Calif., 19-23 May 1996). - New Orleans, Calif., 1996. - P. 191.
558. Saunders N.J., Peden J.F., Moxon E.R. The development of a graphical computer analysis system for whole bacterial genomes // *J. Infection.* - 1998. - V. 36. - P. A32.
559. Sayapina L.V., Anisimova T.I., Kasina I.V., Malahaeva A.N., Adamova G.V., Garanina S.B., Mayorov N.V., Tuchkov I.V., Kulichenko A.N., Darmov I.V., Vorobyov A.A., Shvedun G.P., Anisimov A.P., Sergeeva G.M., Plotnikov O.P. Study of diagnostic value of new test-system for *Yersinia pestis* detection by polymerase chain reaction // *Chinese J. of Control of Endemic Disease.* - 1999. - V. 14 (Special issue). - P. 76-77.
560. Schmidt G., Jann B., Jann K. Immunochemistry of R lipopolysaccharides of *Escherichia coli*. Studies on R mutants with an incomplete core, derived from *E. coli* O8:K27 // *Eur. J. Biochem.* - 1970. - V. 16. - P. 382-392.
561. Schütze H. Studies in *Bacterium pestis* antigens. I. The antigens and immunity reactions of *B. pestis* // *Br. J. Exp. Pathol.* - 1932. - V. 13. - P. 284-288.

562. Schütze H. Studies on *Bacterium pestis* antigens. III. The prophylactic value of the envelope and somatic antigens of *B. pestis* // Br. J. Exp. Pathol. - 1939. - V. 19. - P. 293-298.
563. Shepherd A.J., Hummitzsch D.E., Leman P.A. *et al.* Comparative tests for detection of plague antigen and antibody in experimentally infected rodents // J. Clin. Microbiol. - 1986. - V. 24. - P. 1075-1078.
564. Shineberg B., Zipser D. The *lon* gene and degradation of  $\beta$ -galactosidase nonsense fragments // J. Bacteriol. - 1973. - V. 155. - P. 1469-1471.
565. Simond P.L. La propagation de la peste // Ann. Inst. Past. - 1898 - V. 12. - P. 625-687.
566. Simonet M., Richard S., Berche P. Electron microscopic evidence for *in vivo* extracellular localization of *Yersinia pseudotuberculosis* harboring the pYV plasmid // Infect. Immun. - 1990. - V. 58. - P. 841-845.
567. Simpson W.J., Thomas R.E., Schwan T.G. Recombinant capsular antigen (fraction 1) from *Yersinia pestis* induces a protective antibody response in BALB/c mice // Am. J. Trop. Med. Hyg. - 1990. - V. 43. - P. 389-396.
568. Sodeinde O.A., Subrahmanyam Y.V., Stark K. *et al.* A surface protease and the invasive character of plague // Science. - 1992. - V. 258. - P. 1004-1007.
569. Sory M.-P., Hermand P., Vaerman J.P. *et al.* Oral immunization of mice with a live recombinant *Yersinia enterocolitica* 0:9 strain that produces the cholera toxin B subunit // Infect. Immun. - 1990. - V. 58. - P. 2420-2428.
570. Spivack M.L., Foster L., Larson A. *et al.* The immune response of the guinea pigs to the antigens of *Pasteurella pestis* // J. Immunol. - 1958. - V. 80. - P. 132-141.
571. Steffen D., Schleif R. In vitro construction of plasmids which result in overproduction of the protein product of the *aroC* gene of *Escherichia coli* // Mol. Gen. Genet. - 1977. - V. 157. - P. 341-344.
572. Stewart G.J., Carlson C.A. The biology of natural transformation // Annu. Rev. Microbiol. - 1986. - V. 40. - P. 211-235.
573. Straley S.C., Perry R.D. Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in *Yersinia* // Trends Microbiol. - 1995. - V. 3. - P. 310-317.
574. Surgalla M.J. Properties of virulent and avirulent strains of *Pasteurella pestis* // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 1960. - V. 88. - P. 1136-1145.
575. Swanson J., Bergstrom S., Barrera O. *et al.* Pilus<sup>-</sup> gonococcal variants: evidence for multiple forms of piliation control // J. Exp. Med. - 1985. - V. 162. - P. 729-744.

576. Thompson J.M., Jones H.A., Perry R.D. Molecular characterization of the hemin uptake locus (*hmu*) from *Yersinia pestis* and analysis of *hmu* mutants for hemin and hemoprotein utilization // Infect. Immun. - 1999. - V. 67. - P. 3879-3892.
577. Titball R.W., Howells A.M., Oyston P.C.F. *et al.* Expression of the *Yersinia pestis* capsular antigen (F1 antigen) on the surface of an *aroA* mutant of *Salmonella typhimurium* induces high levels of protection against plague // Infect. Immun. - 1997. - V. 65. - P. 1926-1930.
578. Towbin H., Staehlin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose: procedure and some applications // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1979. - V. 76. - P. - 4350-4354.
579. Travers A. Regulation by anti-sense RNA // Nature. - 1984 - V. 311. - P. 410.
580. Tsukano H., Wake A., Sakakibara Y. Plasmid-like properties of the four virulence-associated factors of *Yersinia pestis* // Microbiol. Immunol. - 1986. - V. 30. - P. 837-848.
581. Une T., Brubaker R.R. Roles of V antigen in promoting virulence and immunity in *Yersinia* // J. Immunol. - 1984. - V. 133. - P. 2226-2230.
582. Van Oss C.J. Phagocytosis as a surface phenomenon // Ann. Rev. Microbiol. - 1978. - V. 32. - P. 19-39.
583. Vieira J., Messing J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers // Gene. - 1982. - V. 19. - P. 259-268.
584. Vorontsov E.D., Dubichev A.G., Serdobintsev L.N. *et al.* Association-dissociation processes and supermolecular organization of the capsule antigen (protein 1) of *Yersinia pestis* // Biomed. Sci. - 1990. - V. 1. - P. 391-396.
585. Wake A., Misawa M., Matsui A. Siderochrome production by *Yersinia pestis* and its relation to virulence // Infect. Immun. - 1975. - V. 12. - P. 1211-1213.
586. Walker R.V. Studies on the immune response of guinea pigs to the envelope substance of *Pasteurella pestis*. I. Immunogenicity and persistence of large doses of fraction I in guinea pig observed with fluorescent antibody // J. Immunol. - 1962. - V. 88. - P.153-163.
587. Walker R.V. Studies on the immune response of guinea pigs to the envelope substance of *P. pestis*. II. Fluorescent antibody studies of cellular and tissue response in mice and guinea pigs to large doses of fraction I // J. Immunol. - 1962. - V. 88. - P. 164-173.
588. Walker R.V. Studies on the immune response of guinea pigs to the envelope substance of *P. pestis*. III. Immune unresponsiveness to high concentrations of fraction I in oil // J. Immunol. - 1962. - V. 88. - P. 174-183.

589. Welkos S., Andrews G. Mu d1 insertion mutagenesis of the F1-capsule encoding plasmid pFra of *Yersinia pestis* // Abstracts of the 95<sup>th</sup> General Meeting of the American Society for Microbiology (Washington, DC, 21-25 May 1995). - Washington, DC, 1995. - P. 212.
590. Welkos S.L., Davis K.M., Pitt L.M. *et al.* Studies on the contribution of the F1 capsule-associated plasmid pFra to the virulence of *Yersinia pestis* // Contrib. Microbiol. Immunol. - 1995. - V. 13. - P. 299-305.
591. Welkos S.L., Friedlander A.M., Davis K.J. Studies on the role of plasminogen activator in systemic infection by virulent *Y. pestis* strain C092 // Microb. Pathog. - 1997. - V. 23. - P. 211-223.
592. Welkos S.L., Friedlander A.M., McDowell D. *et al.* V antigen of *Yersinia pestis* inhibits neutrophil chemotaxis // Microb. Pathogen. - 1998. - V. 24. - P. 185-196.
593. Williams J.E., Cavanaugh D.C. Chronic infections in laboratory rodents from inoculation of nonencapsulated plague bacilli (*Yersinia pestis*) // Experientia. - 1983. - V. 39. - P. 408-409.
594. Williams J.E., Cavanaugh D.C. Potential for rat plague from nonencapsulated variants of the plague bacillus (*Yersinia pestis*) // Experientia. - 1984. - V. 40. - P. 739-740.
595. Williams J.E., Harrison D.N., Cavanaugh D.C. Cryptic infection of rats with non-encapsulated variants of *Yersinia pestis* // Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg. - 1974. - V. 69. - P. 171-172.
596. Williams J.E., Harrison D.N., Quan Th.J. *et al.* Atypical plague bacilli isolated from rodents, fleas and man // Amer. J. Public Health. - 1978. - V. 68. - P. 262-264.
597. Williams J.E., Hudson B.W., Turner R.W. *et al.* Plague in Central Java, Indonesia // Bull. WHO. - 1980. - V. 58. - P. 459-468.
598. Williams J.E., Marshall J.D., Jr., Schaberg D.M. *et al.* Antibody and resistance to infection with *Yersinia pestis* in the progeny of immunized rats // J. Infect. Dis. - 1974. - V. 129. - P. S41-S45.
599. Williams R.C., Gewurz H., Quie P.G. Effects of fraction 1 from *Yersinia pestis* on phagocytosis *in vitro* // J. Infect. Dis. - 1972. - V. 126. - P. 235-241.
600. Williamson E.D., Eley S.M., Stagg A.J. *et al.* A sub-unit vaccine elicits IgG in serum, spleen cell cultures and bronchial washings and protects immunized animals against pneumonic plague // Vaccine. - 1997. - V. 15. - P. 1079-1084.
601. Williamson E.D., Vesey P.M., Gillhespy K.J. *et al.* An IgG<sub>1</sub> titre to the F1 and V antigens correlates with protection against plague in the mouse model // Clin. Exp. Immunol. - 1999. - V. 116. - P. 107-114.

602. Winter C., Cherry W., Moody M. An unusual strain of *Pasteurella pestis* isolated from a fatal human case of plague // Bull. WHO. - 1960. - V. 23. - P. 408-409.
603. Worsham P.L., Hunter M. Characterization of pestoides F, an atypical strain of *Yersinia pestis* // Medische Microbiologie (Nederlands Tijdschrift voor). - 1998. - V. 6 (Suppl. II). - P. S34-35.
604. Worsham P.L., Stein M.-P., Welkos S.L. Construction of defined F1 negative mutants of virulent *Yersinia pestis* // Contrib. Microbiol. Immunol. - 1995. - V. 13. - P. 299-305.
605. Yersin A. Bacille de la peste // Ann. Inst. Pasteur. - 1894. - V. 8. - P. 666.
606. Yersin A. La peste bubonique à Hong-Kong // Ann. Inst. Pasteur. - 1894. - V. 8. - P. 662-667.
607. Zav'yalov V.P., Abramov V.M., Cherepanov P.A. *et al.* pH6 antigen (PsaA protein) of *Yersinia pestis*, a novel bacterial Fc-receptor // FEMS Immunol. Med. Microbiol. - 1996. - V. 14. - P. 53-57.
608. Zav'yalov V.P., Chernovskaya T.V., Navolotskaya E.V. *et al.* Specific high affinity binding of human interleukin 1 $\beta$  by Caf1A usher protein of *Yersinia pestis* // FEBS Lett. - 1995. - V. 371. - P. 65-68.
609. Zav'yalov V.P., Chernovskaya T.V., Chapman D.A.G. *et al.* Influence of the conserved disulphide bond, exposed to the putative binding pocket, on the structure and function of the immunoglobulin-like molecular chaperone Caf1M of *Yersinia pestis* // Biochem J. - 1997. - V. 324. - P. 571-578.
610. Zav'yalov V.P., Denesyuk A.I., Zav'yalova G.A. *et al.* Molecular modeling of the steric structure of the envelope F1 antigen of *Yersinia pestis* // Immunol. Lett. - 1995. - V. 45. - P. 19-22.
611. Zav'yalov V.P., Zav'yalova G.A., Denesyuk A.I. *et al.* Modelling of steric structure of a periplasmic molecular chaperone Caf1M of *Yersinia pestis*, a prototype member of a subfamily with characteristic structural and functional features // FEMS Immunol. Med. Microbiol. - 1995. - V. 11. - P. 19-24.
612. Zhenya F., Xiang Z., Yunheng L. *et al.* Studies on a new virulence determinant of *Yersinia pestis* // Medische Microbiologie (Nederlands Tijdschrift voor). - 1998. - V. 6 (Suppl. II). - P. S18.
613. Zhenya F., Xiang Z., Yunheng L. *et al.* The plague of vole (*Microtus brandti*) is harmless to human being // Ibid. - P. S42.

## ДОПОЛНЕНИЕ К СПИСКУ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

614. Анисимов А.П., Карлышев А.В., Кравченко В.И. и др. Получение авирулентных вариантов *Yersinia pestis* с Fra<sup>+</sup>, V<sup>+</sup>, Cad<sup>+</sup>, Fib-Coa<sup>+</sup>, PstI<sup>+</sup>, Psb<sup>+</sup> фенотипом // Генетика, микробиология и совершенствование методов лабораторной диагностики особо опасных инфекций. - Саратов, 1991. - С. 18-25.
615. Brubaker R.R., Sample A.K., Yu D.Z. *et al.* Proteolysis of V antigen from *Yersinia pestis* // Microb. Pathog. – 1987. – V. 2. – P. 49-62.
616. Hill J., Leary S.E., Griffin K.F. *et al.* Regions of *Yersinia pestis* V antigen that contribute to protection against plague identified by passive and active immunization // Infect. Immun. - 1997. – V. 65. – P. 4476-4482.
617. Pullen J.K., Anderson G.W. Jr., Welkos S.L. *et al.* Analysis of the *Yersinia pestis* V protein for the presence of linear antibody epitopes // Infect. Immun. - 1998. - V. 66. - P. 521-527.