

АНИСИМОВ Андрей Павлович

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

03.00.07-микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Саратов - 2000

Работа выполнена в Российском научно-исследовательском противочумном институте “Микроб” МЗ РФ (Саратов) и Государственном научном центре прикладной микробиологии МЗ РФ (Оболенск).

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор Б.Н. Мишанькин,

доктор медицинских наук, старший научный сотрудник С.М. Дальвадянц,

доктор биологических наук, профессор В.И. Панасенко.

Ведущая организация:

научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи.

Защита состоится 1 марта 2000 г. в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 074.32.01 по присуждению ученой степени доктора (кандидата) наук при Российском научно-исследовательском противочумном институте “Микроб” МЗ РФ (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46).

Автореферат разослан 27 января 2000 г.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке РосНИПЧИ “Микроб”.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор биологических наук, профессор

Г.А. Корнеев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (Burrows, 1957, 1963; Мишанькин, 1987; Vrubaker, 1991). 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 (Finlay, 1989; Бухарин, 1994). Капсула, образованная из FI (Chen, 1977), защищает клетки *Y. pestis* от захвата интактными нейтрофилами хозяина (Cavanaugh, 1959; Burrows, 1963). Это согласуется с общепризнанной ролью бактериальных капсул, препятствующих поглощению бактерий фагоцитарными клетками макроорганизма (Van Oss, 1978). С одной стороны, капсулы экранируют пептидогликан или ЛПС бактериальной клетки, препятствуя инициации альтернативного пути активации комплемента (Muller-Eberhard, 1975), с другой стороны, повышение устойчивости к фагоцитозу обычно коррелирует с увеличением отрицательного заряда микробной клетки, способствующего электростатическому отталкиванию от одноименно заряженных фагоцитов (Van Oss, 1978). Но FI истощает систему комплемента за счет избирательной активации C² и C⁴ компонентов системы комплемента и таким образом препятствует комплемент-опосредованной опсонизации бактерий (Williams, 1972), а синтез капсулы, сопровождался снижением отрицательного заряда клеточной поверхности (Корсуков, 1990; Дятлов, 1992). Более того, отсутствие FI у некоторых штаммов *Y. pestis* обуславливало снижение эффективности захвата бактерий макрофагами морских свинок, но не белых мышей (Гребцова, 1990). В то же время известно, что размножение клеток *Y. pestis* внутри макрофагов является обязательным этапом патогенеза чумы (Каганова, Покровская, 1947; Cavanaugh, 1959), 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 (Коробков, 1963; Шанина, 1968; Charnetzky, 1985; Куклева, 1985; Васильева, 1987). Показано, что FI способна образовывать в двухслойных фосфолипидных мембранах поры, проницаемые для воды (Rodrigues, 1992). 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-НСI и глюкуроновой кислотой (Сердобинцев, 1989), что может объяснить гипотетическое участие капсульного антигена в образовании клейких скоплений микробов и образовании блока в преджелудке блохи (Kartman, 1964).

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 (Burgows, 1957, 1958, 1963; Surgalla, 1960; Погасий, 1980; Сагимбеков, 1980, 1981; Топорков, 1987; Кутырев, 1989; Welkos, 1995). В Или-Каратальском междуречье (Южное Прибалхашье) выделены Fra^- штаммы, авирулентные для белых мышей и морских свинок, слабо вирулентные для краснохвостых и гребенчиковых, но высоко вирулентные для больших песчанок (Кудинова, 1968). В то же время описаны Fra^- штаммы 358/12 (Акимович, Шанина, 1965) и И-2422 (Кутырев, 1992), обладающие универсальной вирулентностью для лабораторных животных. Таким образом, вопрос о корреляции Fra^+ признака с вирулентностью *Y. pestis* требует дальнейшего изучения.

О.А. Проценко с соавт. (1983) показали, что гены, ответственные за синтез FI, локализованы на плазмиде pFra. *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 г. (цитируется по П.А. Черепанову (1993)). Секвенирование и определение структурно-функциональной организации *fra* локуса, клонированного в составе этой плазмиды, независимо друг от друга проводилось группами А.В. Карлышева (1990-1992) и П.А. Черепанова (1991) 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 (Simpson, 1990; Черепанов, 1991; Karlyshev, 1994; Гончаров, 1995; Коссе, 1997; Домарадский, 1998). 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. Оучтерлони и РНАт, но не в РНГА (Черепанов, 1991). Большинство исследователей считает, что в *CafIM* энтеробактериях происходит лишь нарушение секреции капсульного антигена и не происходит образования капсулы (Galyov, 1991; Protsenko, 1991; Кутырев, 1992; Karlyshev, 1994; Perry, 1997).

Классическая иммунодиагностика чумы построена на выявлении капсульного антигена FI или анти-FI-антител (Brubaker, 1972; Руководство по профилактике чумы, 1972, 1992; Bahmanyar, 1976; Наумов, 1992; Домарадский, 1993; Perry, 1997). Капсульный антиген *Y. pestis* является важнейшим составным компонентом подавляющего большинства современных коммерческих и экспериментальных чумных вакцин. Показана его ведущая роль в создании напряженного иммунитета у белых мышей, морских свинок, приматов и человека (Baker, 1952; Lawton, 1960; Филиппов, 1973; Meyer, 1974; Williams, 1980; Бывалов, 1984; Голубинский, 1984; Simpson, 1990; Дальвадянц, 1991; Andrews, 1996 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* HB101 (Карлышев, 1989; Гремякова, 1991), XL1-blue (Simpson, 1990), K802 (Попов, 1991, Кириллина, 1992) и *Salmonella minnesota* R595 (Гремякова, 1991). 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* (Заренков, Лебедева, 1985; Шишкина, 1988; Дармов, 1992; Гончаров, 1995). 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 (Дармов, 1992).

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 F1 чумного микроба, и штамма бактерий *E. coli* - продуцента белка - антигена F1 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 *caf1R* или *caf1M*. Выявлено, что перемещение субъединиц капсульного антигена Caf1 на поверхность микробной клетки может проходить и без участия шаперона Caf1M. Впервые показано, что "серологический" вариант капсульного антигена в Caf1M⁻ 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⁻ 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 ζ-потенциала связано с формой ЛПС штамма-продуцента.

Впервые сконструированы продуценты капсульного антигена на основе *Yersinia* spp., обладающие по данным РНГА в 10³-10⁴ 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 копияности *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 нереревертирующих 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 ± 3) °С, 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 Государственной коллекции патогенных бактерий "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 *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 pFra *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 °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 *cafIM* штаммах при температуре 37 °С *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,

mentation. 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); 7th International Congress on *Yersinia* (Nijmegen, the Netherlands, 1998); XVII Российской конференции по электронной микроскопии (Черноголовка, 1998); 4th 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); International Symposium of Anti-Plague Strategy (Baicheng, China, 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 конце автореферата.

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 326 страниц. Текст иллюстрирован 23 таблицами и 47 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Раздел начинается с описания классификации факторов, обуславливающих персистенцию патогенных бактерий в организме хозяина. Затем, в соответствии с этой классификацией, представлены факторы патогенности возбудителя чумы. Далее содержится детальная характеристика капсульного антигена *Y. pestis*: история открытия, условия биосинтеза, выделение, очистка и физико-химические свойства; структурная организация; генетический контроль; роль в патогенезе; влияние на блокообразование; иммуногенные свойства; изменчивость синтеза капсульного антигена *Y. pestis* как частный случай изменчивости возбудителя чумы; филогенетическое родство кластера генов *fra* оперона и продуктов этих генов с аналогичными структурами, обеспечивающими образование пилевых и непилевых адгезинов энтеробактерий. Ссылки даются как на ранние, основополагающие работы, так и на самые последние оригинальные статьи и обзорные публикации.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы 81 штамм *Y. pestis*, 2 штамма *Y. enterocolitica*, 50 штаммов *E. coli* и 16 штаммов *Salmonella* spp., 29 плазмид, более 4000 белых мышей, более 2000 морских свинок и 12 кроликов породы шиншилла. Бактерии культивировали на жидких или плотных питательных средах Luria Bertani (LB) или Хоттингера с добавлением соответствующих антибиотиков.

Продукцию антигена FI и основные фенотипические характеристики штаммов определяли согласно "Наставлению по изучению свежевыделенных штаммов возбудителя чумы" (Алма-Ата, 1972). Генно-инженерные манипуляции выполняли в соответствии с руководством Т. Maniatis *et al.* (1982). 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 (1973), а в клетки

Y. pestis, *Y. enterocolitica* и *Salmonella* spp. методами криотрансформации в модификации А.М. Кокушкина (1983) или электростимулируемой трансформации (Еремин, 1991).

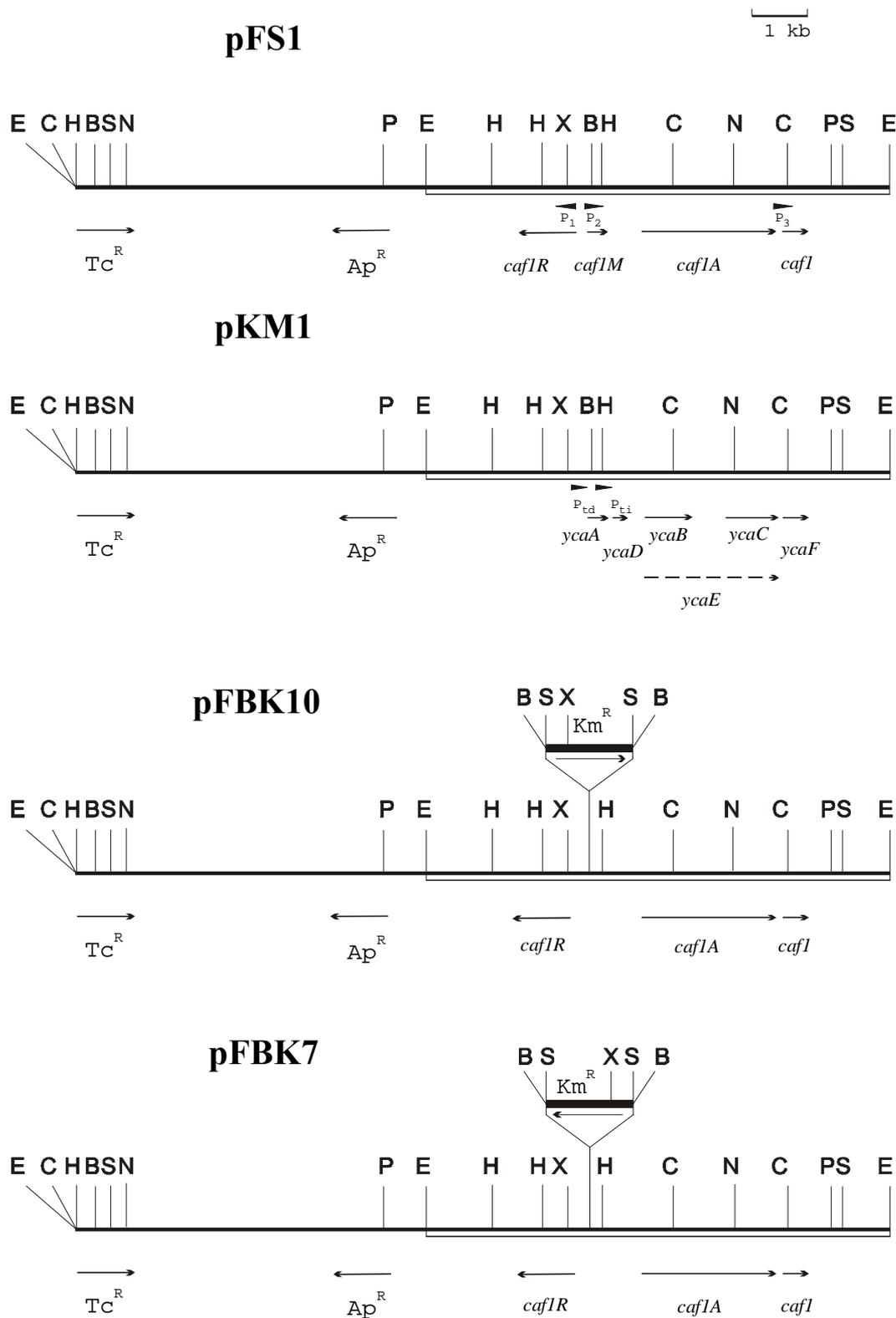
Для получения стабильных нереввертирующих Fra⁻ или *cafIM* мутантов *Y. pestis* проводили направленный мутагенез плазмиды pFra за счет гомологичной рекомбинации с аллельными интегративными векторами pFS23 (рис. 1) pFBK7 и pFBK10 (рис. 2), специально сконструированными нами на основе репликона pFS1 (Карлышев, 1989). В основе использованного подхода лежит метод локализованного мутагенеза, при котором все необходимые изменения вносятся в клонированный фрагмент ДНК *in vitro*. В структурный ген (или вместо него) встраивают ген устойчивости к антибиотику (в нашем случае Km^R). 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. Предварительное подкожное заражение смесью Km^R трансформантов (10⁸ КОЕ на животное) белых мышей, иммунизированных подкожно за 21 сут до заражения препаратами "классического" капсульного антигена без адьюванта (15 мкг на животное), значительно увеличивало процент искомым мутантов, образующихся в результате гомологичной рекомбинации.

Для селекции штаммов, 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. Потеря маркера Km^R сопровождалась задержкой роста. На 3-5 сут культивирования на пластинках агара при температуре 28 °С 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 (Birnboim, 1979) и ПЦР с использованием праймеров на ген *cafI* (Norkina, 1994). Для отбора из популяций рекомбинантов или клеток, утративших собственные плазмиды *Y. pestis*, клонов, обладающих вирулентностью на уровне исходных штаммов "дикого" типа использовали "анимализацию" в организме интактных лабораторных животных.

Вирулентность исследуемых штаммов для интактных, иммунных и переболевших животных, определяли при подкожном, внутрибрюшинном и ингаляционном заражении по показателю LD₅₀. Вычисление величин LD₅₀ и доверительного интервала (для вероятности 95 %) проводили по методу Kärber в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева (1962). Определение иммуногенной активности экспериментальных вакцинных штаммов проводили на беспородных белых мышах согласно методическим указаниям "Основные критерии отбора вакцинных штаммов чумного микроба" (1976). Во всех случаях животных иммунизировали однократно. Кусочки органов погибших животных (регионарные лимфатические узлы, селезенка, печень, легкое, почка, надпочечник) исследовали гистологическими методами.

Электрофорез в свободном потоке проводили на приборе Elphor-Vap5 (Germany). Электрокинетический потенциал микробных клеток определяли на приборе "Zetasizer-20" (Malvern, UK) методом лазерной доплеровской спектроскопии.

Наличие капсулы определяли с помощью световой, электронной или иммуноэлектронной микроскопии, используя негативное контрастирование микробных клеток. Капсульный антиген выделяли и очищали методом изоэлектрической преципитации (Титенко, 1983). Суммарные секретлируемые белки *Y. pestis* получали осаждением из культуральной жидкости 2,5 объемами этанола, охлажденного до температуры -20 °С. Электрофоретическое разделение белков в системе ПААГ с 0,1 % SDS осуществляли



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. $ycaA=cafIM$. $ycaF=cafI$.

pFS1. P₁, P₂ и P₃ - расположение промоторов (Karlyshev *et al.*, 1994).

pKM1. В начале оперона и в районе кодирующей области *ycaA* расположены два промотора: P_{td} - температурозависимый и P_{ti} - температурнезависимый (Черепанов с соавт., 1991).

Рисунок 1. Схема конструирования гибридных плазмид pFBK10 и pFBK7

по методу U.K. Laemmli (1970). Препараты белков для фореза готовили, как описано L.G. Bennett & T.G. Tornabene (1974). Иммуноблоттинг проводили по методу H. Towbin *et al.* (1979).

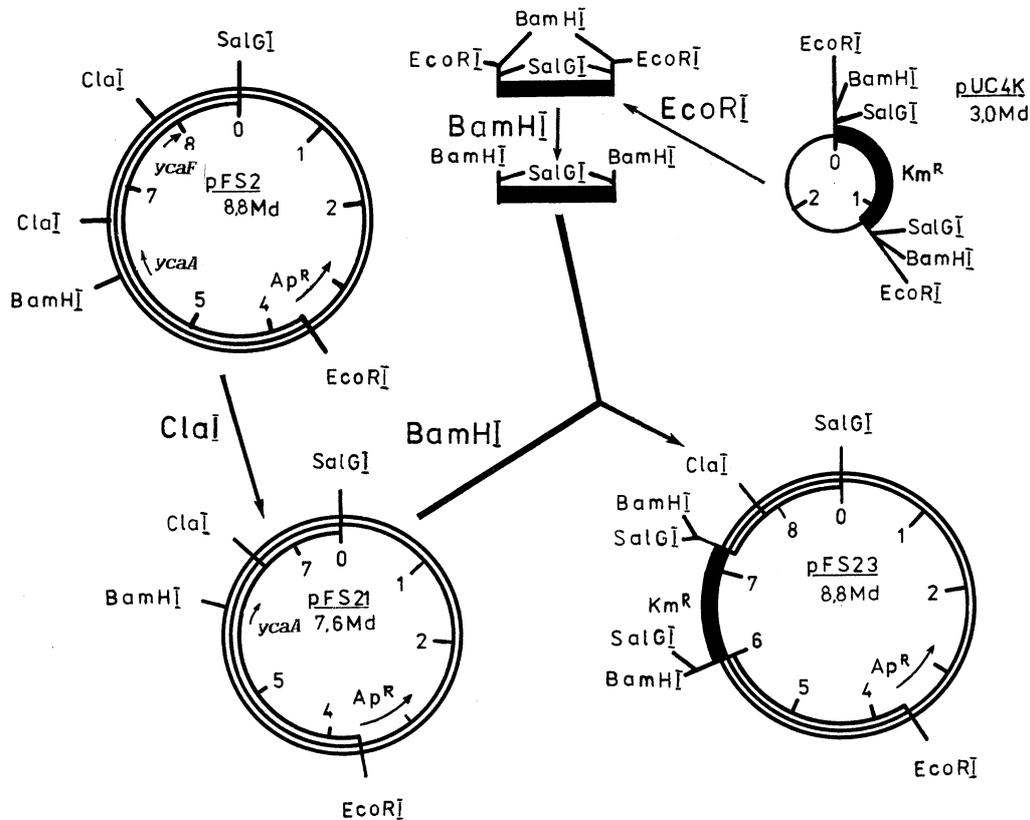


Рисунок 2. Схема конструирования плазмиды pFS23

Глава 3. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ *fra* ОПЕРОНА

Как уже было отмечено во введении, *fra* оперон был впервые клонирован из *EcoRI* банка “больших” плазмид *Y. pestis* сотрудниками отдела генетики ГосНИИ ПМ в 1982 году в составе космидного вектора рНС79 в клетках *E. coli* HB101. 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, выполнены группами А.В. Карлышева (1990-1992) и П.А. Черепанова (1991), независимо друг от друга, и не дали однозначных результатов. В этой главе представлены результаты исследований, начальный этап которых был выполнен автором диссертации во время работы в составе группы А.В. Карлышева, а затем исследования и оценка их результатов проводились автором самостоятельно.

Структурно-функциональный анализ клонированного *EcoRI* фрагмента ДНК, содержащего полный набор генов, необходимых для воспроизведения феномена капсулообразования в клетках *E. coli*, осуществляли с помощью метода потери функции. Для инсерционного мутагенеза использовали ген канамицинофосфотрансферазы (Km^R или *kan*) из плазмиды рUC4K. Km^R locus 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*. Серия конструкций, полученных путем встраивания маркера Km^R в различные сайты 8,6-тпн фрагмента плазмиды рFra, клонированного в составе репликона рFS1, и делеционных производных этой плазмиды представлена на рис. 3.

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

Плазмида 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.

Рисунок 3. Влияние различных дефектов *fra* оперона рекомбинантных плазмид на способность определять капсулообразование и иммунохимическую активность нелизированных клеток реципиентных штаммов *E. coli*

Исследование способности производных плазмиды pFS1 определять синтез капсульного антигена и образование капсулы проводили с помощью РДИД, РНГА, РНАт и световой микроскопии по Гинсу-Бури. Соответствие результатов наших исследований способности инсерционных и делеционных производных плазмиды pFS1 определять синтез капсульного антигена и образование капсулы *Y. pestis* в клетках *E. coli* данным А.В. Карлышева с соавт. (1990-1992, 1994), П.А. Черепанова с соавт. (1991), W.J. Simpson *et al.* (1990), О.А. Кириллиной (1992) и А.Ю. Гончарова (1995) отражено на рисунке 4.

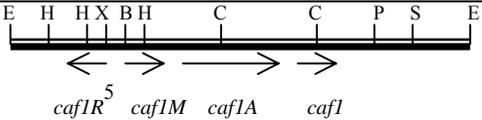
Результаты, полученные в настоящем разделе работы, легли в основу разработки оригинального способа конструирования Fra⁻ вариантов возбудителя чумы и явились основанием для изучения биологической значимости атипичных капсул на модели *Y. pestis*. Кроме того, они учитывались при конструировании продуцентов FI и экспериментальных вакцинных штаммов.

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

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. Ценность и убедительность полученных результатов возрастает, если они воспроизводятся в разных опытах, выполняемых на разных моделях. Наиболее достоверные сведения можно получить при использовании нескольких наборов генетически определенных изогенных мутантов, сконструированных на основе "родительских" штаммов различного происхождения. Но спонтанные мутации, затрагивающие отдельные "детерминанты вирулентности" относительно редки, а при 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.

Использование метода локализованного мутагенеза с помощью интегративной плазмиды pFS23 в сочетании с прямой селекцией Fra⁻ рекомбинантов *in vivo* позволило разработать простую и надежную методику получения высоковирулентных Fra⁻ вариантов *Y. pestis*, которую удалось воспроизвести на пяти произвольно выбранных вирулентных штаммах возбудителя чумы. Вирулентность всех сконструированных Fra⁻ 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 Fra⁻ 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 (табл. 1).

Полученные данные о необязательности продукции FI для "полной" вирулентности *Y. pestis* согласуются с данными В.В. Акимовича и Л.Н. Шаниной (1965) и **результатами** исследований В.В. Кутырева (1989, 1992), но противоречат данным подавляющего большинства исследователей, изучавших вирулентность Fra⁻ вариантов возбудителя чумы. На наш взгляд, значительное снижение вирулентности Fra⁻ штаммов в экспериментах большинства исследователей (Burgows, 1957, 1958, 1963; Кудинова, 1968; Вариводина, 1969; Сагимбеков, 1980; Топорков, 1987; Кутырев, 1989, 1992 и др.) может быть связано с наличием в изученных ими штаммах дополнительных неидентифицированных мутаций. В наших исследованиях на большом наборе штаммов *Y. pestis*, утративших способность к синтезу только FI или одновременно FI и мышинового токсина, а также других факторов патогенности, было показано, что абсолютные величины LD₅₀ достоверно не менялись по сравнению с исходными штаммами. Однако у животных, зараженных рядом штаммов с фенотипом Fra⁻, отмечали

Ссылки на литературу	Названия плазмид	Физические карты фрагментов ДНК	Наличие капсулы по данным				Внутриклеточный синтез FI по данным				
			световой микроскопии	РА	РДИД	РНГА	РНАт	ИФА	РДИД	РНГА	РНАт
1 2 3 НИ ⁴	pFS1 (pKM1, pYPR1)		+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	p12R		НД ⁶	+	НД	+	НД	+	НД	+	НД
	pFS2-13		НД	-	НД	-	НД	+/- ⁷	НД	+/-	НД
8	pAF10-23		НД	НД	НД	+	НД	НД	НД	+	НД
	pAFB10-23		НД	НД	НД	-	НД	НД	НД	-	НД
1	pKM6		+	НД	НД	+	+	НД	+	НД	НД
	НД		НД	НД	НД	-	+	НД	+	НД	НД
3	pYPR5		НД	НД	НД	НД	НД	+	НД	НД	НД
НИ	pFHK2		+	НД	+	+	+	НД	+	+	+
	pFXK1		+	НД	+	-	+/-	НД	+	+	+
	pFBK7		+	НД	+	-	+/-	НД	+	+	+
	pFPK1		+	НД	+	+	+	НД	+	+	+
9	pMB15 ¹⁰		- ¹¹	НД	+	+/-	НД	НД	+	+	НД

¹ – П.А. Черепанов с соавт. (1991). ² - A.V. Karlyshev *et al.* (1994). ³ - W.J. Simpson *et al.* (1990). ⁴ - Настоящее исследование. ⁵ - Генетическая карта представлена по данным A.V. Karlyshev *et al.* (1994), т.к. они были подтверждены более поздними исследованиями (Lindler, 1998, Ни, 1998). ⁶ - Нет данных. ⁷ - "+/-" по данным реакции в исследуемом препарате присутствовали следовые количества капсульного антигена. ⁸ - О.А. Кириллина (1994). ⁹ - А.Ю. Гончаров, (1995). ¹⁰ - В клетках *E. coli* синтез капсульного антигена отмечали только при температуре 28 °С. "При температуре выращивания культур 37° клетки фракцию 1 не синтезировали и после первого пассажа погибали" (Гончаров, 1995). ¹¹ - "Основываясь на результатах РНГА и люмикроскопии, клетки *E. coli* DH5α/pMB15 не способны формировать из фракции 1 капсулу, характерную для клеток *Y. pestis* EV-76(370)" (Гончаров, 1995).

Рисунок 4. Сводные данные изучения структурно-функциональной организации *fra* оперона *Y. pestis*, экспрессируемого в клетках реципиентных штаммов *E. coli*

достоверную задержку сроков гибели. Выраженность перехода чумной инфекции в подострую форму зависела от вида животных и исходного штамма *Y. pestis*.

Таблица 1. Вирулентность экспериментальных производных штаммов *Y. pestis* 231 и 358 для белых мышей и морских свинок

Штаммы <i>Y. pestis</i> (фенотип)	Вирулентность при подкожном способе заражения для			
	белых мышей		морских свинок	
	LD ₅₀ (КОЕ)	средние сроки жизни (сут)	LD ₅₀ (КОЕ)	средние сроки жизни (сут)
231 (Fra ⁺ Tox ⁺ Lcr ⁺ Pst ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺ pH6 ⁺)	3 (1-18)	7,3 (4-6)	4 (1-22)	8,1 (5-9)
231pPst⁻ (Fra ⁺ Tox ⁺ Lcr ⁺ Pst ⁻ Pla ⁻ Pgm ⁺ pH6 ⁺)	1 (1-4)	6,9 (4-7)	4 (1-21)	8,6 (5-9)
231Psb⁻ (Fra ⁺ Tox ⁺ Lcr ⁺ Pst ⁺ Pla ⁺ Hms ⁻ Pst ^S pH6 ⁺)	4 (1-21)	7,8 (5-8)	10 (2-24)	8,9 (6-10)
231pFra/pFS23 (Fra ⁻ Tox ⁺ Lcr ⁺ Pst ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺ pH6 ⁺)	5 (1-42)	8,2 (7-10)	27 (5-210)	10,2 (8-13)
231pFra⁻ (Fra ⁻ Tox ⁻ Lcr ⁺ Pst ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺ pH6 ⁺)	8 (2-41)	7,9 (7-10)	2 (1-5)	9,7 (8-10)
231Psb⁻pFra/pFS23 (Fra ⁻ Tox ⁺ Lcr ⁺ Pst ⁺ Pla ⁺ Hms ⁻ Pst ^S pH6 ⁺)	13 (3-63)	8,6 (6-12)	267 (67-966)	24,5 (9-26)
231pPst⁻pFra/pFS23 (Fra ⁻ Tox ⁺ Lcr ⁺ Pst ⁻ Pla ⁻ Pgm ⁺ pH6 ⁺)	1 (1-5)	6,3 (6-10)	9 (2-38)	12,7 (9-16)
231pFra⁻pPst⁻ (Fra ⁻ Tox ⁻ Lcr ⁺ Pst ⁻ Pla ⁻ Pgm ⁺ pH6 ⁺)	1 (1-4)	6,5 (6-11)	9 (1-45)	12,4 (9-15)
KM278 (Fra ⁺ Tox ⁺ Lcr ⁺ Pst ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺ pH6 ⁻)	> 10⁸	–	> 1,5×10¹⁰	–
231pCad⁻ (Fra ⁺ Tox ⁺ Lcr ⁻ Pst ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺ pH6 ⁺)	> 10⁸	–	> 1,5×10¹⁰	–
358 (Fra ⁺ Tox ⁺ Lcr ⁺ Pst ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺ pH6 ⁺)	7 (1-27)	4,6 (3-5)	13 (3-63)	8,6 (5-9)
358pPst⁻ (Fra ⁺ Tox ⁺ Lcr ⁺ Pst ⁻ Pla ⁻ Pgm ⁺ pH6 ⁺)	1 (1-2)	5,5 (4-6)	11 (2-68)	6,3 (5-9)
358pFra/pFS23 (Fra ⁻ Tox ⁺ Lcr ⁺ Pst ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺ pH6 ⁺)	5 (1-42)	7,8 (6-10)	13 (3-63)	11,2 (9-15)
358pFra⁻ (Fra ⁻ Tox ⁻ Lcr ⁺ Pst ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺ pH6 ⁺)	3 (1-18)	6,2 (6-8)	10 (2-15)	10,6 (8-13)
358pPst⁻pFra/pFS23 (Fra ⁻ Tox ⁺ Lcr ⁺ Pst ⁻ Pla ⁻ Pgm ⁺ pH6 ⁺)	2 (1-16)	9,2 (7-12)	26 (6-22)	13,8 (10-16)

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 LD₅₀. 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 штаммами “дикого” типа. 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 и проявляется в значительном снижении вирулентности.

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 вариативности 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.

В наших экспериментах (табл. 2) были подтверждены известные данные об иммунетепредолевающей способности Fra^- штаммов на модели белых мышей, предварительно иммунизированных Fra^+ штаммами, вакциной USP или антигеном FI (Burrows, 1957, 1958, 1963; Акимович, 1965; Шанина, 1967; Кокушкин, 1995; Friedlander, 1995; Andrews, 1996 и др.) и отсутствии селективных преимуществ у Fra^- штаммов на модели иммунизированных содержащими FI препаратами морских свинок (Шанина, 1967).

Таблица 2. Результаты заражения иммунных белых мышей и морских свинок экспериментальными штаммами возбудителя чумы

Штаммы <i>Y. pestis</i>	Показатели LD ₅₀ (КОЕ)		Средние сроки жизни (сут)	
	белые мыши	морские свинки	белые мыши	морские свинки
231 (Fra^+ Tox^+ Lcr^+ Pst^+ Pla^+ Pgm^+ pH6 ⁺)	1,0×10⁵ (2,0×10 ⁴ -6,0×10 ⁵)	5,6×10⁵ (1,2×10 ⁵ -1,9×10 ⁶)	5,8 (3-16)	11,0 (6-16)
231pPst⁻ (Fra^+ Tox^+ Lcr^+ Pst^- Pla^- Pgm^+ pH6 ⁺)	3,2×10⁵ (5,0×10 ⁴ -1,3×10 ⁶)	1,5×10⁶ (3,8×10 ⁵ -6,0×10 ⁶)	6,9 (5-18)	12,2 (7-23)
231Psb⁻ (Fra^+ Tox^+ Lcr^+ Pst^+ Pla^+ Hms^- Pst^S pH6 ⁺)	2,5×10⁵ (5,8×10 ⁴ - 8,7×10 ⁵)	1,0×10⁶ (2,6×10 ⁵ -4,0×10 ⁶)	6,2 (3-17)	11,5 (6-17)
231pFra/pFS23 (Fra^- Tox^+ Lcr^+ Pst^+ Pla^+ Pgm^+ pH6 ⁺)	1,0×10³ (2,0×10 ² -6,0×10 ³)	6,9×10⁵ (8,7×10 ⁴ -2,1×10 ⁶)	8,3 (6-30)	16,5 (8-30)
231pFra⁻ (Fra^- Tox^- Lcr^+ Pst^+ Pla^+ Pgm^+ pH6 ⁺)	2,1×10³ (4,0×10 ² -9,0×10 ³)	7,0×10⁵ (3,0×10 ⁵ -1,1×10 ⁶)	9,1 (7-30)	17,2 (7-30)
231Psb⁻pFra/pFS23 (Fra^- Tox^+ Lcr^+ Pst^+ Pla^+ Hms^- Pst^S pH6 ⁺)	2,5×10³ (5,8×10 ² -9,0×10 ³)	2,5×10⁶ (5,8×10 ⁵ -9,0×10 ⁶)	8,6 (6-28)	17,6 (8-30)
231pPst⁻pFra/pFS23 (Fra^- Tox^+ Lcr^+ Pst^- Pla^- Pgm^+ pH6 ⁺)	2,3×10³ (5,8×10 ² -9,3×10 ³)	1,6×10⁶ (4,0×10 ⁵ -6,2×10 ⁶)	9,5 (8-30)	16,7 (7-29)
358 (Fra^+ Tox^+ Lcr^+ Pst^+ Pla^+ Pgm^+ pH6 ⁺)	3,2×10⁵ (7,0×10 ⁴ -1,6×10 ⁶)	1,0×10⁶ (2,6×10 ⁵ -4,0×10 ⁶)	6,3 (3-15)	11,8 (5-21)
358pFra/pFS23 (Fra^- Tox^+ Lcr^+ Pst^+ Pla^+ Pgm^+ pH6 ⁺)	3,0×10² (7,3×10 ¹ -1,7×10 ³)	1,5×10⁶ (3,8×10 ⁵ -6,0×10 ⁶)	8,9 (6-28)	17,8 (6-30)
358pFra⁻ (Fra^- Tox^- Lcr^+ Pst^+ Pla^+ Pgm^+ pH6 ⁺)	2,7×10³ (5,2×10 ² -1,2×10 ⁴)	6,8×10⁵ (1,7×10 ⁵ -3,1×10 ⁶)	8,7 (7-27)	17,6 (6-30)
358pPst⁻pFra/pFS23 (Fra^- Tox^+ Lcr^+ Pst^- Pla^- Pgm^+ pH6 ⁺)	1,8×10³ (5,7×10 ² -8,6×10 ³)	1,7×10⁶ (4,2×10 ⁵ -6,4×10 ⁶)	9,3 (7-30)	18,0 (7-30)

Однако Fra^- бактерии *Y. pestis*, по нашим данным, имели селективные преимущества в организме морских свинок, выживших после заражения штаммами "дикого" типа (табл. 3). Это, на наш взгляд, еще раз подчеркивает разницу между поствакцинальным и постинфек-

ционным иммунитетом при чуме и свидетельствует о необходимости оценки эпидемиологической значимости изменения антигенной структуры *Y. pestis* именно на модели переболевших животных

Таблица 3. Результаты заражения иммунных и переболевших чумой морских свинок экспериментальными штаммами возбудителя чумы

Штаммы <i>Y. pestis</i>	Показатели LD ₅₀ (КОЕ)		Средние сроки жизни (сут)	
	иммунные	переболевшие	иммунные	переболевшие
231	3,6×10⁵ (9,1×10 ⁴ -1,4×10 ⁶)	1,6×10⁸ (4,1×10 ⁷ -6,5×10 ⁸)	11,1 (5-18)	13,1 (11-30)
231pFra/pFS23	4,1×10⁵ (1,0×10 ⁵ -1,6×10 ⁶)	6,1×10⁶ (1,5×10 ⁶ -2,4×10 ⁷)	15,9 (8-30)	17,6 (10-30)

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

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*. Однако экспериментальные данные П.А. Черепанова с соавт. (1991) об изменении иммунохимических свойств капсульного антигена, образуемого в рекомбинантных *cafIM* клетках *E. coli*, и широкое распространение явления антигенной изменчивости у большинства изученных патогенных бактерий предопределили наш интерес к конструированию *cafIM* штаммов *Y. pestis*, определению их биологических свойств и потенциальной способности циркулировать в природных очагах чумы. Параллельно с конструированием экспериментальных *cafIM* мутантов и их всесторонним изучением проводили целенаправленный поиск образующих атипичные капсулы "природных изолятов" возбудителя чумы в Государственной коллекции патогенных бактерий при РосНИПЧИ "Микроб".

Невозможность выявления атипичной капсулы коммерческими иммунодиагностическими послужила предпосылкой для получения набора антикапсульных сывороток. Исследованные *cafIM* дефектные варианты *Y. pestis*, *E. coli* и *Salmonella* spp. (табл. 4) 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). 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 (Rd₁- и Rd₂-хемотипы соответственно) обладали выраженной иммунохимической гомологией с таковыми у *cafIM* производных штаммов *Y. pestis* 231, 358/12P⁻ и Java (R-ЛПС). С другой стороны, все исследованные *cafIM* энтеробактерии с S-формой ЛПС образовывали капсулы FI-1 серовара.

На группе изогенных бескапсульных штаммов *E. coli*, для которых установлен состав коровых олигосахаридов редуцированного в различной степени ЛПС (Schmidt, 1970), нами была выявлена корреляция изменения величин ξ -потенциала бактериальных клеток с изменением структуры их ЛПС. Логично предположить, что отрицательные заряды этих поверхностно расположенных биополимеров будут вносить существенный вклад и в формирование электрокинетического потенциала (ЭКП) клеток энтеробактерий, 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 ξ -потенциала было выявлено в клетках штамма *S. minnesota* R595pFS1. Приведенные выше результаты наших экспериментов на модели ави-

Таблица 4. Иммунохимические реакции рекомбинантных штаммов энтеробактерий

Штаммы	РДИД с кроличьими антисыворотками, полученными к капсульным белкам, выделенным из штаммов				Титры реакций с коммерчески-ми иммунодиагностикумами		Форма ЛПС	Серовар
	EV	EVpFra/pFBK7	231pFra/pFBK10	R595pFBK7	РНГА	РНАт		
<i>Y. pestis</i>								
EV НИИЭГ	+	-	-	-	1 : 4096	1 : 8192	R	FI
EVpFra/pFBK7	-	+	-	-	-	1 : 64	R	FI-2
EV11MpFS1	+	-	-	-	> 1 : 8192	> 1 : 8192	S	FI
EV11MpFBK7	+	-	-	-	-	1 : 8	S	FI-1
358/12P ⁻ pFS1	+	-	-	-	> 1 : 8192	> 1 : 8192	R	FI
358/12P ⁻ 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
<i>E. coli</i>								
JM83pFS1	+	-	-	-	1 : 4096	1 : 4096	S	FI
JM83pFBK7	+	-	-	-	-	1 : 32	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 ₂	FI
F583pFBK7	-	-	+	-	-	-	Rd ₂	FI-3
F588pFS1	+	-	-	-	1 : 128	1 : 256	Rd ₁	FI
F588pFBK7	-	-	+	-	-	-	Rd ₁	FI-3
<i>S. minnesota</i>								
R595pFS1	+	-	-	-	1 : 8192	1 : 8192	Re	FI
R595pFBK7	-	-	-	+	-	1 : 8	Re	FI-4
R595pFBK10	-	-	-	+	-	1 : 8	Re	FI-4

Примечание: * – FI-? – неустановленный серовар.

рулентных бактерий подтверждают данные И.А. Дятлова (1992) о том, "что капсула чумного микроба полностью экранирует заряды других поверхностных антигенов". 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 pFra. 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 И.А. Дятлова (1992) доказывают, что основным продуктом плазмиды pFra, влияющим на ξ -потенциал клеток *Y. pestis*, выращенных при температуре 37 °С, является именно капсульный антиген FI.

При определении ЭКП вирулентных штаммов *Y. pestis* 231 и *S. enteritidis* PM1pFS1 было выявлено, что наличие "классической" капсулы сопровождалось повышением абсолютных значений ξ -потенциала на 1 мВ и 10 мВ соответственно, по сравнению с изогенными бескапсульными вариантами. Эти данные противоречат результатам И.А. Дятлова и В.В. Кутырева (1992), в работе которых клетки штамма 231, "несущие pFra и выращенные при 37 °С", обладали ξ -потенциалом меньшим, чем их изогенный бескапсульный вариант.

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 ξ -потенциала на 3-9 мВ.

До последнего времени было общепризнано, что образуемая клетками *Y. pestis* при температуре 37 °С капсула сформирована в основном из капсульного антигена FI, а Fra⁻ 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. При исследовании 31 штамма *Y. pestis*, включающих Fra⁺, Fra⁻ и Fra[±] варианты бактерий, с помощью световой и 11 из них – иммуноэлектронной микроскопии, а также исследовании секретируемых белков из ряда штаммов, выращенных при различных значениях pH, были получены следующие данные. Истинно бескапсульные варианты выявлены нами лишь среди специально сконструированных экспериментальных штаммов возбудителя чумы. В популяциях "природных изолятов" с Fra⁻ или Fra[±] фенотипами наряду с определенным количеством бескапсульных бактерий сохранилось от 10 % до 97 % клеток, образующих атипичные капсулы, не реагирующие с антителами к FI. Анализ капсулообразующей способности природных Fra⁻ и Fra[±] изолятов *Y. pestis* 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⁻pPst⁻pFSK3, EV11MpFSK3, 231/830 (экспериментальные);

2) экспериментальные штаммы, не обладающие серологической активностью и не содержащие в своих популяциях клеток с видимыми под световым микроскопом капсулами: а) штаммы, утратившие плазмиду pFra: EV11, 231pFra⁻pPst⁻, 358pFra⁻pPst⁻; б) штамм 231pFra/pFS23, в котором за счет локализованного мутагенеза *fra* оперон несет вставку гена *kan* в BamHI сайте гена *cafIM* и делецию *Clal* фрагмента, затрагивающую С-конец CafIA и N-конец CafI.

3) штаммы, не обладающие серологической активностью, 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 *VamHI* 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-2422. 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 метода изоэлектрической преципитации и идентификации их с помощью иммуноблотинга. Во всех препаратах капсульных белков содержались примеси ЛПС. Данные, полученные нами при исследовании Fga⁺ штаммов чумного микроба: EV и 231, выращенных при температуре 37 °С, pH 7,2-8,0, подтверждают общепризнанное мнение о том, что основным компонентом "классической" капсулы являются субъединицы CafI. Л.Н. Сердобинцев (1984) 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 поглощении питательных веществ и секреции синтезируемых бактерией биомолекул. Полученные нами данные согласуются с его гипотезой. 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 pH6 антиген становится основным компонентом бактерий, секретлируемым в окружающую среду. В штаммах же дефектных по генам оперонов *fra* (M-493, EVpFra/pFBK7, И-2422 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-2422, лишённого структурного гена *cafI*, отрицательный ответ очевиден. Что же касается *cafIM* штаммов, то этот вопрос требует более детального обсуждения. Основные доводы, свидетельствующие о наличии или отсутствии продукта гена *cafI* в составе атипичных капсул возбудителя чумы, представлены в таблице 5.

Таблица 5. 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>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 секретлируемых белков с моноспе-</p>

<p>4. Выявлено изменение культурально-морфологических свойств у <i>cafIM</i> энтеробактерий с R-формой ЛПС по сравнению с Fga⁺ и Fga⁻ бактериями.</p> <p>5. Выявлено изменение ЭКП у <i>cafIM</i> энтеробактерий с R-формой ЛПС по сравнению с Fga⁺ и Fga⁻ бактериями.</p>	<p>цифическими IgG против типичного капсульного антигена.</p>
--	---

Таким образом, с учетом имеющихся у нас экспериментальных данных, поставленный выше вопрос о присутствии субъединицы CafI в составе капсул *cafIM* 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 секретруемых белков из штаммов с атипичными капсулами с целью их последующей идентификации с учетом данных о полной нуклеотидной последовательности генома возбудителя чумы. Тем не менее, результаты представленных в настоящей работе 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 компонентов (белков, ЛПС и, возможно, других биомолекул). 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 *cafIM* штаммах при температуре 37 °C *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* (Дятлов, 1992); способности рН6 антигена связывать 500-kDa аполипопротеин В100 из неиммунной сыворотки крови человека и животных (Черепанов, 1998) и реагировать с субъединицами Fc иммуноглобулинов человека подклассов G1, G2 и G3 (Яканкин, 1992; Zav'yalov, 1996); 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 (Домарадский, 1966), 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 *cafIM* в патогенезе и иммуногенезе чумы было установлено, что по сравнению с исходными штаммами варианты *Y. pestis*, дефектные по гену *cafIM*, 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 231pFga/pFBK7 и 231pFga/pFBK10, дефектных по *cafIM* гену, или "природного" изолята М-493 (табл. 6).

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 однократно введенные препараты четырех серологических вариантов капсульных белков (без адьювантов) в дозах 15 мкг белка на животное не обеспечивали достоверного уровня защиты, хотя сопоставимые дозы "классического" капсульного антигена обладали выраженным протективным эффектом в отношении вирулентных штаммов с типичной капсулой (Baker, 1952; Титенко, 1983; Simpson, 1990 и др.). Увеличение иммунизирующей дозы до 80 мкг белка на животное, введение изучаемых препаратов капсульных белков с адьювантом или использование убитой "формолвакцины", приготовленной на основе штамма 231pFga/pFBK10 аналогично вакцине USP, в дозах от 10³ до 10⁸ микробных клеток на животное не позволили выявить достоверного протективного эффекта указанных препаратов в отношении использованного для заражения гомологичного штамма 231pFBK10. 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. Ранее нами было выявлено (Степаншина и др., 1991; Черепанов и др., 1991), а позднее подтверждено С.О. Водопьяновым с соавт. (1995) отсутствие протективной активности у рН6 антигена в отношении белых мышей и морских свинок. Более того, при иммунизации лабораторных животных антигеном рН6 совместно с антигеном FI, происходило снижение протективных свойств последнего примерно в четыре раза, по сравнению с протективностью индивидуального капсульного антигена (Черепанов, 1991).

Таблица 6. **Результаты заражения интактных и иммунизированных вакцинным штаммом EV белых мышей исследуемыми штаммами возбудителя чумы**

Штаммы <i>Y. pestis</i>	Показатели LD ₅₀ (КОЕ)		ИИ*	Средние сроки жизни (сут)	
	интактные	иммунные		интактные	иммунные
231	13 (1 - 35)	1,7×10⁵ (5,3×10 ⁴ – 5,3×10 ⁵)	13077	6,0	6,0
231pFra/pFS23	18 (4 - 65)	900 (280 – 2,8×10 ³)	50	7,6	5,3
231pFra/pFBK7	39 (11 - 142)	1,2×10⁴ (3,9×10 ³ – 3,9×10 ⁴)	308	5,7	7,8
231pFra/pFBK10	200 (55 - 730)	320 (64 - 800)	1,6	8,7	6,5
M-493	70 (14-444)	686 (137-4,3×10 ³)	9,8	6,1	7,2

Примечание: * - " ИИ" – индекс иммунитета – отношение показателя LD₅₀ иммунных животных к соответствующему показателю интактных.

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.

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

В серии предварительных исследований, проведенных нами на базе РосНИПЧИ "Микроб" в 1985 г., были использованы кодирующие основные факторы патогенности (иммуногенности) *Y. pestis* гены, клонированные ранее сотрудниками отдела генетики ВНИИ прикладной микробиологии (Оболонск). Для определения протективности рекомбинантных антигенов возбудителя чумы, белых мышей иммунизировали подкожно штаммами *E. coli* HB101, несущими плазмиды pPW14 (*pla*⁺, *pst*⁺, *imm*⁺, *cat*⁺), pVH65 (*lcrV*⁺, *pla*⁺, *pst*⁺, *imm*⁺, *cat*⁺) или pVF2 (*cafI*⁺, *cafIA*⁺, *cafIM*⁺, *cafIR*⁺, *lcrV*⁺, *pla*⁺, *pst*⁺, *imm*⁺, *cat*⁺, *tet*⁺) в дозе 10⁸ 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 (Simpson, 1990; Маракулин, 1991; Степаншина, 1991; Лебедева, 1993; Andrews, 1996) и послужили основанием для продолжения наших экспериментов, направленных на конструирование стабильных суперпродуцентов FI.

Для повышения выхода фракции I из рекомбинантных клеток *E. coli* была использована амплификация кодирующих ее генов за счет клонирования в составе собственной мультитопийной плазмиды *Y. pestis* - pPst. Таким образом, была получена плазида pFSK3 (рис. 5).

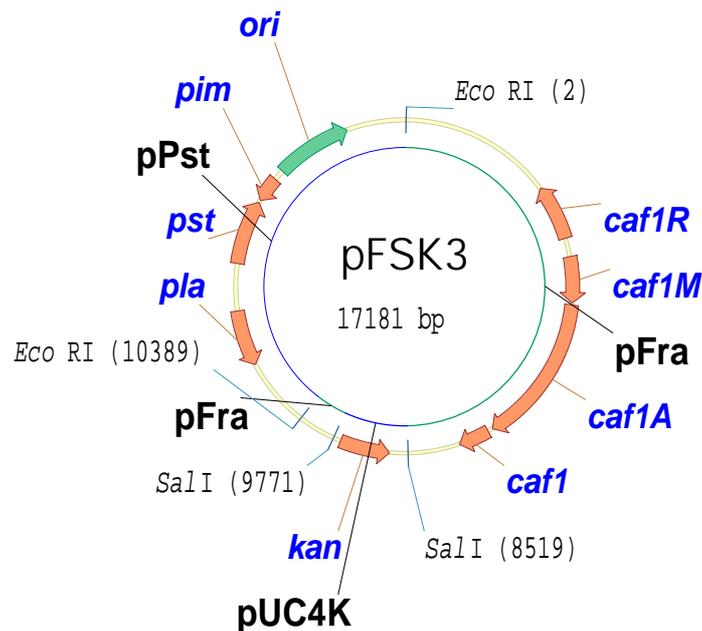


Рисунок 5. Карта гибридной плазмиды pFSK3

Использование этой плазмиды позволило нам сконструировать серию продуцентов на основе различных штаммов *E. coli*, *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 °C до 37 °C в количествах в два-четыре раза превосходящих продуктивность вакцинного штамма EV, выращиваемого на богатых питательных средах. Рекомбинантная плазида pFSK3 наследовалась без селективного давления в течение 100 генераций не менее чем у 95 % клонов микробной популяции реципиентных штаммов *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *E. coli* и обеспечивала стабильную экспрессию входящих в ее состав генов *fra* оперона.

Оценка стабильности наследования и экспрессии плазмиды pFSK3 в клетках *E. coli* в неселективных условиях показала, что, несмотря на стабильное сохранение маркера Km^R даже после 100-120 генераций рекомбинантных клеток, их способность к продукции FI постепенно снижалась. 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 и обладающих наименьшими отрицательными зарядами, с помощью электрофореза в свободном потоке. Тот факт, что высокая продуктивность полученных таким образом субпо-

пуляций 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.

Нам не удалось осуществить передачу плазмиды pFSK3 в штаммы *Salmonella* spp. 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, хотя последняя конструкция реплицировалась в клетках кишечной палочки и чумного микроба. Не удалось добиться передачи в клетки сальмонелл и других производных плазмиды pFS1, у которых была нарушена структура последовательности ДНК протяженностью около 0,5 MDa, непосредственно примыкающая к оперону со стороны гена *cafI*. 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, 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. Плазида pAE1 стабильно сохранялась в клетках штамма *S. minnesota* R595pAE1 без селективного давления *in vitro* и обеспечивала уровни продукции FI, выявляемые в РНГА (1:256).

В рекомбинантных штаммах *Y. pestis* выявлялась секреция капсульного антигена, превышающая таковую у штамма *Y. pestis* EV в 5000 раз по данным РНГА. Этот исключительный результат в полной мере не может объясняться увеличением продукции белка CafI - 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 (Дебабов, 1988). По другим данным, уровень суперпродукции белковых продуктов генов, чья экспрессия была оптимизирована методами генной инженерии, может составлять от нескольких единиц до 40 % от суммарных белков бактерии (Машко, 1998). Если учитывать, что в клетках *Y. pestis* дикого типа при температуре 37 °C FI составляет 1-15 % от суммарного количества клеточного белка (Дальвадянц, 1991; Гончаров, 1995) или 0,47-1,4 % от исходной "воздушно-сухой" бактериальной массы (Губарев, 1963), 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. 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. (1994) 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 (Кульберг, 1985; Andrews, 1996). 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 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. (1997) 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.

Глава 7. ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ – СУПЕРПРОДУЦЕНТОВ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА *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 (Sodeinde, 1992; Goguen, 1995) клеток экспериментального вакцинного штамма. Серологическая активность генно-инженерного штамма KM276 (KM217pFSK3) по данным РНГА с коммерческим диагностиком 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 (Метлин, 1968, Дудина, 1976), либо вызывает только развитие напряженного антитоксического иммунитета у чувствительных к нему белых мышей (Евстигнеев, 1981).

Сравнительная оценка протективной эффективности штаммов KM276 и маточной культуры вакцинного штамма EV показала следующие результаты: ImD₅₀ штамма KM276 составила 86 (33-505) КОЕ, ImD₅₀ штамма EV - 2363 (906-16299) КОЕ. В соответствии с требованиями методических указаний "Основные критерии отбора вакцинных штаммов чумного микроба" (1976) испытуемый штамм можно считать более иммуногенным, т.к. максимальный показатель ImD₅₀ меньше минимального показателя ImD₅₀ контрольного штамма.

В следующей серии опытов оценивали эффективность экспериментальной оральной чумной вакцины на основе штамма *Y. enterocolitica* KM33pFSK3 - 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 10⁵ до 10⁹ КОЕ. Сравнительная оценка протективной эффективности штаммов *Y. enterocolitica* KM33pFSK3 и исходного штамма показала следующие результаты: ImD₅₀ генно-инженерного штамма KM33pFSK3 была равна 1×10⁷ КОЕ, в то время как ImD₅₀ исходного штамма - ≥1×10⁹ КОЕ.

Известно, что при иммунизации лабораторных животных живыми культурами *Y. pestis* EV, выращенными на различных средах при температурах 28 °С или 37 °С, значительные изменения содержания FI (в 10²-10⁴ раз) не отражались на их иммуногенности. Это

объясняли нивелированием различий в содержании данного антигена при размножении бактерий в макроорганизме (Шеремет, 1987) 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 ± 1 °С" (Будька, 1993). 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 (Кульберг, 1985, Andrews, 1996). 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 высокоavidные взаимодействия более эффективны, чем низкоavidные, относят непрямую (пассивную) гемагглютинацию и протективную способность против бактерий [Steward, 1983]. Это хорошо согласуется с предположением о более высокой степени агрегации FI в наших экспериментальных штаммах.

Глава 8. КЛАССИФИКАЦИЯ ФАКТОРОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ЕГО ПЕРСИСТЕНЦИЮ В ПРИРОДЕ

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. Buttows, 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". У популярности данного термина могут быть следующие причины. 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 "детерминантах" 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 его 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 живот-

ных определенного вида (или даже определенной популяции) при стандартных условиях естественного или искусственного заражения. Поэтому к "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. Для ее составления в качестве источников информации использовали опубликованные научные труды и собственные данные.

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 и атипичные капсулы;
- образование вокруг бактерии фибринового сгустка;
- формирование капсулоподобного слоя за счет связывания рН6 антигеном сывороточного 500-kDa аполипопротеина В100 и Fc субъединиц иммуноглобулинов.

1.2. Антигенная мимикрия;

1.3. Образование L-форм.

1.4. Факторы, способные инактивировать иммунокомпетентные клетки или их продукты:

- капсульный антиген - FI;
- "мышинный" токсин - Ymt;
- V антиген;
- белки системы секреции III-го типа - Yops;
- протеаза Pla;
- рН6 антиген.

2. Адгезивная активность:

- рН6 антиген;
- протеаза Pla;
- капсульный антиген - FI.

3. Антигенная изменчивость:

- способность образовывать бескапсульные формы;
- способность образовывать серологически атипичные капсулы;
- сероварияция V антигена.

4. Защита капсулированных бактерий от захвата интактными нейтрофилами хозяина.

5. Переживание внутри макрофагов за счет инактивации компонентов кислородзависимой системы бактерицидности:

- каталаза;
- пероксидаза;
- супероксиддисмутаза;
- капсульный антиген - FI.

ФАКТОРЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ ОБРАТИМЫЙ ПЕРЕХОД В ЧАСТИЧНО АТТЕНУИРОВАННЫЕ ФОРМЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ХРОНИЧЕСКОЕ ТЕЧЕНИЕ ИНФЕКЦИИ.

1. Внутригеномные перестройки, обусловленные IS-элементами или бактериофагами.

2. Обратимая интеграция плазмид с хромосомой.

ФАКТОРЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТЬ

1. Конъюгативные R плазмиды.

2. Отсутствие продукции FI.

ФАКТОРЫ ПИТАНИЯ

1. Гемолитическая активность Pla, обеспечивающая бактериям дополнительный источник железа.
2. Системы, обеспечивающие накопление и поглощение клетками *Y. pestis* железа и марганца.
3. Пестицин обеспечивает селективные преимущества клеткам *Y. pestis* в конкуренции с другими патогенными иерсиниями, обладающими сходными механизмами поглощения неорганического железа и гема.
4. Способность прекращать при температуре 37 °С эндогенный синтез ряда аминокислот и значительно увеличивать поглощение аминокислот из среды культивирования.

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.

ФАКТОРЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ БЛОКООБРАЗОВАНИЕ

Полагают, что блокообразование связано со следующими фенотипами клеток *Y. pestis*: Hms⁺, Ymt⁺, Pla⁺, FI⁺, pH6⁺.

III. Факторы, обеспечивающие персистенцию в окружающей среде ОБРАЗОВАНИЕ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ ФОРМ.

ПРЕДПОЛАГАЕМАЯ СПОСОБНОСТЬ СОХРАНЯТЬСЯ В ЦИСТАХ ПРОСТЕЙШИХ.
ПРЕДПОЛАГАЕМАЯ СПОСОБНОСТЬ СУЩЕСТВОВАТЬ В ФИТОФАЗЕ – В КОРНЯХ РАСТЕНИЙ-КСЕРОФИТОВ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этом разделе подведены итоги работы, определены перспективы дальнейших исследований и практического использования результатов исследования. Отмечено, что новые сведения о молекулярно-генетических механизмах образования капсулы *Y. pestis*, вирулентности генетически определенных *fra* мутантов для интактных и иммунных лабораторных животных, а также механизмах изменчивости антигенной специфичности капсулы являются существенным вкладом в понимание природы патогенности и иммуногенности *Y. pestis*.

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⁻ бактериях определяется особенностями клеточной поверхности штамма-продуцента и, в первую очередь, формой его ЛПС.

4. Впервые доказано, что основным продуктом плазмиды pFra, влияющим на ξ -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 ξ -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 ξ -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 - капсулы 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⁻ штаммов, выявлена достоверная задержка сроков гибели. Выраженность перехода чумной инфекции в подострую форму зависит от вида животных и исходного штамма *Y. pestis*. Fra⁻ 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 морфологические 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 плаزمида 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 плазмида 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 большую, 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.**

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Дроздов И.Г., Ежов И.Н., Анисимов П.И., Карлышев А.В., Анисимов А.П., Волковой К.И. А.с. № 293939. Заявка № 4511453/323/31ИМ. Приоритет изобретения 04.07.88, зарегистрировано в Государственном реестре изобретений СССР 03.05.89.
2. Карлышев А.В., Красильникова В.М., Кравченко В.И., Анисимов А.П., Степаншина В.Н., Волковой К.И., Галев Э.Е., Смирнов О.Ю., Васильев А.М., Яканкин В.Г., Черновская Т.В., Спирина Г.В., Абрамов В.М., Завьялов В.П. 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.
3. 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.
4. Степаншина В.Н., Гремякова Т.А., Анисимов А.П., Коробова О.В., Кудрявцева Т.Ю. 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) / Под ред. Т.Г. Абдуллина. - Киров: НИИ микробиологии МО СССР, 1991. - С. 197-198.
5. Гремякова Т.А., Анисимов А.П., Степаншина В.Н., Говорунов И.Г. Экспрессия капсульного антигена чумного микроба в микроорганизмах с S- и R-формами липополисахаридов // Там же. - С. 198-199.
6. 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 // Там же. - С. 207-208.
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* Re595 // Новые технологии и биосистемы. Достижения и перспективы. Материалы XIV научно-практической конференции: Тез. докл. (21-23 мая 1991 г., Оболенск) / Под ред. Р.В. Боровика. - Оболенск: Медбиоэкономика, 1991. - С. 6-8.
8. Гремякова Т.А., Анисимов А.П., Говорунов И.Г. Секрция капсульного антигена возбудителя чумы в энтеробактериях // Там же. - С. 9-11.
9. Степаншина В.Н., Гремякова Т.А., Анисимов А.П. Биологическая активность нативного и модифицированного рН6 антигена чумного микроба // Там же. - С. 11-13.
10. Анисимов А.П., Захарова Н.М., Говорунов И.Г. Модификация капсулы возбудителя чумы, изменяющая ее иммунохимические свойства // Там же. - С. 13-15.
11. Степаншина В.Н., Анисимов А.П. Стерилизация капсульного и рН 6 антигенов, выделенных из чумного микроба // Там же. - С. 72-73.
12. Гремякова Т.А., Анисимов А.П., Степаншина В.Н., Говорунов И.Г., Кудрявцева Т.Ю., Коробова О.В. Новый штамм-продуцент капсульного антигена *Yersinia pestis* // Там же. - С. 73-75.
13. Степаншина В.Н., Гремякова Т.А., Анисимов А.П., Потапов В.Д. Выделение и свойства рН6 антигена чумного микроба // Там же. - С. 78-80.
14. Степаншина В.Н., Анисимов А.П. Способ стерилизации капсульного и рН 6,0 антигенов, выделенных из вакцинных штаммов чумного микроба // Тез. докл. IV Всероссийского съезда микробиологов, эпидемиологов и паразитологов. (Нижний Новгород, 1991 г.). - М., 1991. - Т. 2. - С. 141.
15. Анисимов А.П., Карлышев А.В., Павлов В.М., Кравченко В.И. Конструирование рекомбинантных плазмид, стабильно наследующихся в клетках *Yersinia pestis* // Генетика, мик-

- робиология и совершенствование методов лабораторной диагностики особо опасных инфекций / Под ред. П.И. Анисимова. - Саратов, 1991. - С. 18-25.
16. Анисимов А.П., Карлышев А.В., Кравченко В.И., Красильникова В.М., Кокушкин А.М. Получение авирулентных вариантов *Yersinia pestis* с Fra⁺, V⁺, Cad⁺, Fib-Coa⁺, PstI⁺, Psb⁺ фенотипом // Там же. - С. 29-33.
 17. Дроздов И.Г., Ежов И.Н., Самойлова С.В., Анисимов А.П., Карлышев А.В., Кравченко В.И., Красильникова В.М., Еремин С.А. 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.
 18. Анисимов А.П., Ежов И.Н., Захарова Н.М., Карлышев А.В., Кравченко В.И., Красильникова В.М., Самойлова С.В., Дроздов И.Г. Изучение функциональной организации *fra*-оперона возбудителя чумы методом направленного мутагенеза // Генетика и биохимия вирулентности возбудителей особо опасных инфекций. Материалы Российской научной конференции: Тез. докл. (21-22 октября 1992 г., Волгоград) / Под ред. Н.Г. Тихонова. - Волгоград, 1992. - С. 6.
 19. Благодатских А.Я., Говорунов И.Г., Фомченков В.М., Анисимов А.П. Фенотипические особенности штаммов возбудителя чумы с мутациями *fra*-оперона // Там же. - С. 10.
 20. Дроздов И.Г., Ежов И.Н., Анисимов А.П., Самойлова С.В., Карлышев А.В., Кравченко В.И., Красильникова В.М., Еремин С.А. Характеристика вирулентных свойств бесфракционных штаммов чумного микроба, полученных методом сайтспецифичного делеционного мутагенеза // Там же. - С. 16.
 21. Анисимов А.П., Нечитайло Т.А., Дашенко В.Ф., Андрющенко Б.Н. Селекция мутантов чумного микроба с атипичной капсулой в организме иммунных мышей // Там же. - С. 70.
 22. Анисимов А.П., Захарова Н.М. Серовариация капсульного антигена возбудителя чумы // Молекул. генетика. - 1992. - № 9-10. - С. 26-29.
 23. 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 (21-23 сентября 1993 г., Саратов) / Под ред. А.В. Наумова. - Саратов, 1993. - С. 4-5.
 24. Гремякова Т.А., Орлов М.Ф., Ковалев Ю.Н., Анисимов А.П. Изучение гуморального иммунитета при экспериментальной чуме у мышей // Там же. - С. 20-21.
 25. 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 // Там же. - С. 67-68.
 26. Дроздов И.Г., Анисимов А.П., Андрющенко Б.Н., Ежов И.Н., Никитин А.Н., Самойлова С.В. Оценка протективности живой чумной вакцины в отношении атипичных штаммов возбудителя чумы // Там же. - С. 169-170.
 27. Никифоров А.К., Дроздов И.Г., Еремин С.А., Ерошенко Г.А., Ежов И.Н., Анисимов А.П., Аленкина Т.В. Экспрессия капсульного антигена чумного микроба и В-субъединицы холерного токсина в клетках *S. typhimurium* // Там же. - С. 287-288.
 28. Ковалев Ю.Н., Фурсова Н.К., Анисимов А.П. Конструирование штаммов-продуцентов капсульного антигена *Yersinia pestis* на основе R-мутантов *Escherichia coli* // Там же. - С. 288-289.
 29. Дроздов И.Г., Ежов И.Н., Самойлова С.В., Анисимов А.П., Никифоров А.К. Оценка биологических свойств бескапсульных вариантов возбудителя чумы // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1993. - Вып. 1-2 (71-72). - С. 154-159.
 30. Степаншина В.Н., Гремякова Т.А., Анисимов А.П., Потапов В.Д. Физико-химическая и биологическая характеристика рН6-антигена *Yersinia pestis* выделенного иммуносорбционным методом // Журн. микробиол. - 1993. - № 3. - С. 12-17.

31. Дроздов И.Г., Ежов И.Н., Самойлова С.В., Анисимов А.П., Карлышев А.В., Кравченко В.И., Красильникова В.М., Еремин С.А., Никифоров А.К. Способ получения бескапсульных вариантов возбудителя чумы // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1993. - Вып. 3 (73). - С. 187-195.
32. Анисимов А.П. К вопросу ускоренного определения вирулентности культур *Y. pestis* при эпизоотологическом обследовании природных очагов чумы // Военно-медицинский журнал. - 1993. - № 11. - С. 47.
33. Анисимов А.П., Фомченков В.М., Фурсова Н.К., Ковалев Ю.Н. Электрокинетический потенциал клеток *Yersinia pestis* и *Escherichia coli* с интактным или дефектным геном *usaA (cafIM) fra*-оперона возбудителя чумы // Генетика. - 1994. - Т. 30. - С. 1160-1165.
34. Анисимов А.П., Гремякова Т.А., Андриющенко Б.Н., Амельченко В.В. 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.
35. Анисимов А.П., Андриющенко 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.
36. Анисимов А.П., Гремякова Т.А., Амельченко В.В. Изучение протективности "химической" и убитой экспериментальных вакцин серовара FI-3 в отношении гомологичного штамма *Yersinia pestis* // Там же. - С. 59-60.
37. Анисимов А.П., Коннов Н.П., Демченко Т.А. Субмикроскопическая структура FI-2 сероварианта капсулы *Yersinia pestis* // Там же. - С. 60.
38. Анисимов А.П., Михина Л.В. Патоморфологические изменения у интактных и иммунных мышей, зараженных вариантами возбудителя чумы, отличающимися по способности синтезировать капсульный антиген // Там же. - С. 61.
39. Анисимов А.П., Сергеева Г.М. Мутация по гену *cafIM* причина фагоустойчивости производных штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ // Там же. - С. 61-62.
40. Заднова С.П., Анисимов А.П., Щербаков А.А. Применение коаггутинации для детекции вариантов возбудителя чумы с серологически атипичными капсулами // Там же. - С. 94-95.
41. Никифоров А.К., Еремин С.А., Анисимов А.П. Конструирование плазмиды, обеспечивающей стабильную экспрессию *fra*-оперона *Yersinia pestis* в неселективных условиях в клетках гетерологичных реципиентов // Там же. - С. 114-115.
42. Никифоров А.К., Корсуков В.Н., Еремин С.А., Анисимов А.П. Сочетание генно-инженерных и биофизических методов при конструировании суперпродуцента антигена F1 *Yersinia pestis* // Там же. - С. 115.
43. Никифоров А.К., Сергеева Г.М., Анисимов А.П., Еремин С.А. Сравнительная оценка штаммов чумного микроба EV линии НИИЭГ и КМ-270 по уровню продукции капсульного антигена // Там же. - С. 115-116.
44. Никифоров А.К., Анисимов А.П., Еремин С.А., Дроздов И.Г. Конструирование генно-инженерной экспериментальной живой чумной вакцины // Актуальные вопросы профилактики чумы и других инфекционных заболеваний. Материалы межгосударственной научно-практической конференции, посвященной 100-летию открытия возбудителя чумы. - Ставрополь, 1994. - С. 66-67.
45. Степаншина В.Н., Коробова О.В., Анисимов А.П., Фурсова Н.К., Анисимова В.А. Изучение препаратов капсульного антигена, выделенных из иммунохимически атипичных штаммов возбудителя чумы // Проблемы особо опасных инфекций. - Саратов, 1994. - Вып. 5 (75). - С. 94-96.

46. Михина Л.В., Анисимов А.П., Андрищенко Б.Н., Нечитайло Т.А., Ежов И.Н., Самойлова С.В., Дроздов И.Г. Патоморфологические изменения у интактных и иммунных белых мышей, зараженных вариантами возбудителя чумы, отличающимися по способности синтезировать капсульный антиген // Там же. - С. 107-112.
47. 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.
48. Никифоров А.К., Анисимов А.П., Сергеева Г.М., Еремин С.А. 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.
49. 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.
50. Drozdov I.G., Anisimov A.P., Samoilova S.V., Yezhov I.N., Yeremin S.A., Karlyshev A.V., Krasilnikova V.M., Kravchenko V.I. Virulent non-capsulate *Yersinia pestis* variants constructed by insertion mutagenesis // J. Med. Microbiol. - 1995. - V. 42. - P. 264-268.
51. Анисимов А.П., Никифоров А.К., Еремин С.А., Дроздов И.Г. Конструирование штамма *Yersinia pestis* с повышенной протективностью // БЭБМ. - 1995. - № 11. - С. 532-534.
52. Konnov N.P., Baibyrin V.B., Anisimov A.P., Shcherbakov A.A., Volkov Y.P. Near-field scanning optical microscopy of plague and cholera microbes // SPIE Proceedings. - 1996. - V. 2839. - P. 50.
53. Samoilova S.V., Samoilova L.V., Yezhov I.N., Drozdov I.G., Anisimov A.P. Virulence of pPst⁺ and pPst⁻ strains of *Yersinia pestis* for guinea-pigs // J. Med. Microbiol. - 1996. - V. 45. - P. 440-444.
54. Маркова В.Ю., Анисимов А.П., Федотов Э.А., Киреев М.Н., Коннов Н.П., Дроздов И.Г. Природный штамм *Yersinia pestis* с новым механизмом антигенной изменчивости // Гомеостаз и инфекционный процесс: Тез. докл. к международной конференции / Под ред. И.А. Зайцевой, М.Ю. Ледванова. - Саратовский государственный медицинский университет, Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб", Саратов, 1996. - Т. 1. - С. 172.
55. Федорова В.А., Уткин Д.В., Анисимов А.П., Маркова В.Ю., Киреев М.Н., Дроздов И.Г., Девдариани З.Л. Изучение иммунореактивности капсульного антигена штаммов *Yersinia pestis*, дефектных по гену *cafIM*, с помощью иммуноферментного анализа // Гомеостаз и инфекционный процесс: Тез. докл. к международной конференции / Под ред. И.А. Зайцевой, М.Ю. Ледванова. - Саратовский государственный медицинский университет, Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб", Саратов, 1996. - Т. 2. - С. 264.
56. Гремякова Т.А., Анисимов А.П. Серологическая активность антигена "фракция Г" *Yersinia pestis* определяется его белковым компонентом // Там же. - С. 319.
57. Анисимов А., Маркова В. Новый механизм антигенной изменчивости бактерий // Материалы VII съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (28-31 января 1997 г., Москва) / Под ред. В.Ю. Литвина. - Москва, 1997. - Т. 1. - С. 173-174.
58. 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.
59. Анисимов А.П., Маркова В.Ю. Феномен изменчивости антигенной специфичности капсулы *Yersinia pestis* // Там же. - С. 4-5.

60. Еремин С.А., Никифоров А.К., Корсуков В.Н., Анисимов А.П. Особенности конструирования продуцентов капсульного антигена *Yersinia pestis* на основе сальмонеллезных штаммов // Там же. - С. 46.
61. Anisimov A.P., Dyatlov I.A. A novel mechanism of antibiotic resistance in plague? // J. Med. Microbiol. - 1997. - V. 46. - P. 887-889.
62. Anisimov A.P. Factors promoting persistence of *Yersinia pestis* // Medische Microbiologie (Nederlands Tijdschrift voor). - 1998. - V. 6. - Suppl. II. - P. S4.
63. Anisimov A.P., Mikhina L.V. *CafIM*-mutant *Yersinia pestis* variants avoid immunity induced by commercial live plague vaccine // Ibid. - P. S35.
64. Anisimov A.P., Gremyakova T.A. Lipopolysaccharide (LPS) structure determines the serovariant of epitope-loss capsular antigen in enterobacteria carrying *cafIM*-damaged *fra* operon from *Yersinia pestis* // Ibid. - P. S17.
65. Anisimov A.P., Markova V.Yu. A novel chaperone-dependent mechanism of antigen variability in plague? // Ibid. - P. S18.
66. Anisimov A.P., Amel'chenko V.V., Andryushchenko B.N., Gremyakova T.A. *CafIM*-mutant *Yersinia pestis* variant avoid immunity induced by its own subunit or killed vaccine preparations // Ibid. - P. S35.
67. Gremyakova T.A., Stepanshina V.N., Anisimov A.P., Potapov N.N. Characterization of native and modified *Yersinia pestis* pH6 antigen // Ibid. - P. S19-S20.
68. Анисимов А.П., Маркова В.Ю., Коннов Н.П. Исследование методами электронной и иммуноэлектронной микроскопии серологически отличающихся вариантов капсулы *Yersinia pestis* // XVII Российская конференция по электронной микроскопии (15-18 июня 1998, Черноголовка). Черноголовка, 1998. - С. 206.
69. Anisimov A.P. A novel mechanism of antigenic variation, which aids bacterial pathogens, including *Yersinia pestis*, to evade host defences // Abstracts of 4th John Humphrey Advanced Summer Programme in Immunology (14-18 September 1998, Pushchino). Pushchino, 1998. - P. 1.
70. Anisimov A.P. Enhanced protective activity of experimental *Yersinia pestis* strain due to overproduction of capsular antigen "fraction 1" // Ibid. - P. 2.
71. Gremyakova T.A., Stepanshina V.N., Anisimov A.P., Potapov N.N. Characterization of native and modified *Yersinia pestis* pH6 antigen // Ibid. - P. 24.
72. 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 / Под ред. Е.В. Пименова, И.В. Дармова (Киров, 30 ноября-1 декабря 1998 г.). Киров: НИИ микробиологии МО РФ, 1998. - С. 45-47.
73. 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 / Под ред. Л.А. Бурделова. Вып. 1, юбилейный. Алматы, 1999. - С. 13-18.
74. 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.
75. Анисимов А.П. Факторы, обеспечивающие блокообразующую активность *Yersinia pestis* // Молекула. генетика. - 1999. - № 4. - С. 11-15.

СПИСОК ДОКУМЕНТОВ ПО ВНЕДРЕНИЮ НАУЧНЫХ ДОСТИЖЕНИЙ В ПРАКТИКУ

1. Степаншина В.Н., Анисимов А.П. Стерилизация F и I антигенов, выделяемых из вакцинных штаммов чумного микроба. (Методика лабораторная). - Оболенск, 1990. – 5 с. Утверждена заместителем директора ВНИИПМ Р.В. Боровиком 22.05.1990 г.
2. Анисимов А.П., Степаншина В.Н. Способ стерилизации F и I антигенов, выделяемых из вакцинных штаммов *Yersinia pestis*. Удостоверение на рационализаторское предложение, принятое во ВНИИПМ, № 1570 от 13.06.1990 г.
3. Анисимов А.П. Криотрансформация вакцинных штаммов чумного микроба плазмидными ДНК. (Методика лабораторная). - Оболенск, 1990. – 5 с. Утверждена заместителем директора ВНИИПМ Р.В. Боровиком 27.09.1990 г.
4. Гремякова Т.А., Степаншина В.Н., Анисимов А.П., Ежов И.Н. Штамм *Salmonella minnesota* KM1 - продуцент капсульного антигена FI *Yersinia pestis*. Справка о депонировании охраноспособного штамма в Российской коллекции патогенных бактерий “Микроб” от 27.02.92 г.
5. Ежов И.Н., Анисимов А.П., Никифоров А.К., Дроздов И.Г., Шведун Г.П. Штамм *Yersinia pestis* KM271 - донор гибридной плазмиды rFBK7, способной к сайт-специфической рекомбинации с участком регуляторной области *fra*-оперона плазмиды rFga чумного микроба. Справка о депонировании авторского штамма в музее живых культур РосНИПЧИ “Микроб” от 19.04.93 г.
6. Ежов И.Н., Анисимов А.П., Никифоров А.К., Дроздов И.Г., Шведун Г.П. Штамм *Yersinia pestis* KM272 - донор гибридной плазмиды rFBK10, способной к сайт-специфической рекомбинации с участком регуляторной области *fra*-оперона плазмиды rFga чумного микроба, но несущей ген канамицинофосфотрансферазы в положении обратном плазмиде rFBK7. Справка о депонировании авторского штамма в музее живых культур РосНИПЧИ “Микроб” от 19.04.93 г.
7. Ежов И.Н., Шведун Г.П., Анисимов А.П., Захарова Н.М., Никифоров А.К., Дроздов И.Г., Самойлова С.В. Штамм *Yersinia pestis* KM270, синтезирующий капсульный антиген чумного микроба фракция I как при температуре 37°C, так и при температуре 28°C. Справка о депонировании охраноспособного штамма в музее живых культур РосНИПЧИ “Микроб” от 01.07.93 г.
8. Никифоров А.К., Анисимов А.П., Шведун Г.П. Штамм *Escherichia coli* KM104, продуцирующий FgaI чумного микроба в количествах, превышающих количество антигена, продуцируемого штаммом *Yersinia pestis* EV НИИЭГ в 6,3 раза. Справка о депонировании авторского штамма в Государственной коллекции патогенных бактерий I-II групп РосНИПЧИ “Микроб” от 23.05.95 г.
9. Никифоров А.К., Анисимов А.П., Шведун Г.П. Штамм *Yersinia pestis* KM276, обладающий повышенной продукцией антигена FI, что позволяет снижать среднюю иммунизирующую дозу в 23 раза по сравнению с вакцинным штаммом EV. Справка о депонировании авторского штамма в Российской коллекции патогенных бактерий “Микроб” от 19.09.95 г.
10. Никифоров А.К., Анисимов А.П., Шведун Г.П. Штамм *Yersinia pestis* KM277, обладающий способностью продуцировать антиген FI чумного микроба в количестве, в 1024 раза превышающем его продукцию у вакцинного штамма EV (по данным РПГА). Справка о депонировании авторского штамма в Российской коллекции патогенных бактерий “Микроб” от 19.09.95 г.
11. Анисимов А.П., Шведун Г.П. Штамм *Yersinia pestis* KM279, способный синтезировать капсульный антиген серовара FI-3 при 37°C. Справка о депонировании авторского штамма в Российской коллекции патогенных бактерий “Микроб” от 19.09.95 г.
12. Анисимов А.П., Шведун Г.П. Штамм *Yersinia pestis* KM280, способный синтезировать капсульный антиген серовара FI-3, независимо от температуры выращивания. Справка о

депонировании авторского штамма в Российской коллекции патогенных бактерий “Микроб” от 19.09.95 г.

13. Акт внедрения рекомбинантного штамма EB11MrFSK3 *Y. pestis* в НИР НИИ микробиологии МО РФ. Утвержден начальником НИИ микробиологии МО РФ Е.В. Пименовым 24.04.1998 г.
14. Корсуков В.Н., Ящечкин Ю.И., Попов Ю.А., Анисимов А.П., Еремин С.А., Никифоров А.К., Дроздов И.Г. Применение электрофореза в свободном потоке для отбора рекомбинантных бактериальных клеток, содержащих последовательности ДНК плазмиды rFga *Yersinia pestis*, экспрессирующие генетические детерминанты поверхностных биополимеров. (Пособие для научных сотрудников). - Саратов, 1998. – 13 с. Одобрено Ученым Советом РосНИПЧИ "Микроб" 02.10.1998 г.
15. Акт внедрения рекомбинантного штамма *Yersinia pestis* KM270 в НИР ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Утвержден директором ГИСК им. Л.А. Тарасевича Н.В. Медуницыным 20.10.1998 г.
16. Акт внедрения плазмид rFBK10 и rFBK7, несущих локус *cafIM*, в котором в нуклеотидной последовательности *cafIM* встроен ген канамицинфосфотрансферазы *kan* в противоположных ориентациях, в НИР АООТ "Институт инженерной иммунологии" РАО "Биопрепарат". Утвержден директором АООТ "Институт инженерной иммунологии" РАО "Биопрепарат" В.П. Завьяловым 20.10.1998 г.
17. Анисимова Т.И., Саяпина Л.В., Сергеева Г.М., Исупов И.В., Белобородов Р.А., Самойлова Л.В., Анисимов А.П., Ледванов М.Ю., Шведун Г.П., Касьян А.Ф., Кравцов А.Ю., Маракулин И.В., Ежов А.В., Дармова Е.М. Основные критерии оценки вакцинных штаммов чумного микроба. (Методические указания). - Саратов, 1999. - 61 с. Одобрены: Учеными Советами НИИ микробиологии МО РФ 11 ноября 1998 г. и Ставропольского НИПЧИ 30 апреля 1998 г.
18. Акт внедрения рекомбинантного штамма *Yersinia pestis* 231rFBK10 в НИР ГНЦ прикладной микробиологии. Утвержден директором ГНЦ прикладной микробиологии Н.Н. Ураковым 20.10.1998 г.
19. Анисимов А.П., Еремин С.А., Никифоров А.К., Корсуков В.Н. Штамм *Salmonella minnesota* KM139, стабильно наследующий и экспрессирующий гены *fra* оперона в неселективных условиях. Справка о депонировании авторского штамма в Российской коллекции патогенных бактерий “Микроб” от 11.02.99 г.
20. Маркова В.Ю., Анисимов А.П., Еремин С.А., Шведун Г.П. Штамм *Yersinia pestis* KM281 – Lsg⁻ вариант вирулентного экспериментального продуцента атипичного капсульного антигена. Справка о депонировании авторского штамма в Государственной коллекции патогенных бактерий “Микроб” от 05.05.99 г.
21. Анисимов А.П., Еремин С.А., Маркова В.Ю., Шведун Г.П. Вирулентный штамм *Yersinia pestis*, продуцирующий капсульный антиген F1 при температурах 28 °С и 37 °С. Справка о депонировании авторского штамма в Государственной коллекции патогенных бактерий “Микроб” от 05.05.99 г.
22. Маркова В.Ю., Анисимов А.П., Еремин С.А., Шведун Г.П. Штамм *Yersinia pestis* KM283 – Lsg⁻ вариант вирулентного природного продуцента атипичного капсульного антигена. Справка о депонировании авторского штамма в Государственной коллекции патогенных бактерий “Микроб” от 05.05.99 г.
23. Анисимов А.П., Плотников О.П., Солодовников Н.С., Анисимова Т.И., Сергеева Г.М., Саяпина Л.В., Кибирева Е.В., Миронин А.В., Григорьев А.А., Климов В.И., Бывалов А.А. Инструкция по изготовлению и контролю тест-заражающих культур вирулентных штаммов возбудителя чумы сухих. (Инструкция). - Москва, Саратов, Киров, 1999. – 21 с. Утверждены: начальником НИИ микробиологии МО РФ Е.В. Пименовым 21.09.1999 г., директором РосНИПЧИ "Микроб" В.В. Кутыревым 08.10.1999 г. и директором ГИСК им. Л.А. Тарасевича Н.В. Медуницыным 21.10.1999 г.

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.