

На правах рукописи

АРСЕНЬЕВА ТАТЬЯНА ЕВГЕНЬЕВНА

**ЭФФЕКТИВНЫЕ ПРИЁМЫ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ
АТИПИЧНЫХ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЧУМЫ,
ПСЕВДОТУБЕРКУЛЁЗА И ИХ РЕКОМБИНАНТОВ**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Оболенск – 2017

Работа выполнена в Федеральном казённом учреждении здравоохранения «Ростовский-на-Дону Ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека РФ

Научный

руководитель: **Лебедева Светлана Александровна**, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону Ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, лаборатория микробиологии чумы и других иерсиний, ведущий научный сотрудник

Официальные

оппоненты: **Саяпина Лидия Васильевна**, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, лаборатория особо опасных инфекции, заведующая;

Щербаков Анатолий Анисимович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова», кафедра микробиологии, биотехнологии и химии, профессор.

Ведущая

организация: Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека РФ

Защита состоится «29» сентября 2017 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека РФ по адресу: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, кор. №1, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Автореферат разослан «_____» _____ 2017 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Входящий в состав рода *Yersinia* генокомплекс «*Y. pseudotuberculosis*» объединяет, с учётом степени геномной гомологии, четыре вида: собственно, вид *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis* и два новых вида – *Y. similis* и *Y. wautersii* (корейская группа) [Laukkanen–Ninios et al., 2011; Savin et al., 2014]. Самая высокая степень сходства и свидетельства близкого родства обнаружены у возбудителей псевдотуберкулёза и чумы. Геном *Y. pestis* отличают целый ряд перестроек, различные дополнения гетерогенным генетическим материалом, в том числе двумя плазмидами. Это, в сумме, привело к резкому усилению её вирулентности, контагиозности, смене носителей возбудителя и путей его передачи [Achtman et al., 1999, 2004; Parkhill et al., 2001; Сунцов, 2016]. Возбудитель чумы передаётся от носителей к человеку при укусе насекомых-переносчиков, при контакте с повреждёнными кожными покровами, слизистыми и аэрозольно. Протекает в виде сепсиса, пневмоний и местных абсцессов с возможностью осложнений. Сохраняется в природных очагах, периодически вызывая разлитые эпизоотии или эпидемии. Псевдотуберкулёзный микроб передаётся фекально-оральным путём. Вызывает местную или генерализованную инфекцию в хронической или острой форме, преимущественно с поражением желудочно-кишечного тракта, опорно-двигательного аппарата и кожи [Шурыгина И.А. и др., 2003]. В природе сохраняется в организме грызунов, инфицирующих почву, воду и растения в овощехранилищах. Работы с *Y. pestis*, относящейся к I группе патогенности, выполняются в BSL3 (P3) лабораториях; с бактериями псевдотуберкулёза (III группа патогенности) – в обычных BSL2 (P2) лабораториях.

Оба вида иерсиний не однородны. У возбудителя псевдотуберкулёза эта неоднородность выражена в большей степени. Вид *Y. pseudotuberculosis* продуцирует полноценный O-антиген (S-форма ЛПС, соответствующая S-форме колоний). Из-за вариаций структуры O-цепей существует более чем 20 сероваров, которые по фенотипу могут отличаться между собой больше, чем от *Y. pestis* [Сомов и др., 2001]. *Y. pestis* продуцирует ЛПС, лишённый O-боковых цепей (ОПС, R-форма ЛПС, соответствующая R-форме колоний). серологически однородный. У обеих иерсиний возможны переходные формы ЛПС и колоний, а также изменение фенотипических свойств, при которых видовую принадлежность иерсиний трудно различить [Сомова, 1957; Акиев, 1960; Дятлов, 1983]. Требуется совершенствование приёмов, надёжных в их дифференциации и проверенных на больших выборках штаммов. Без этого сложно решать проблемы диагностики, эпидемиологии чумы, а также регламентировать таксономические позиции всех групп, составляющих вид *Y. pestis*, и классифицировать их природную вариабельность (Грачёва и др., 2009).

Клеточная поверхность у большинства штаммов *Y. pestis* экранирована капсулой, основой которой является иммунодоминантный антиген F1 (Caf1).

Видоспецифическая плаزمида pFra с *caf*-генами может иногда утрачиваться или происходить мутации в *caf*-генах. Это препятствует синтезу антигена F1. Возможны серологические варианты F1, затрудняющие диагностику [Анисимов и др., 1992]. В связи с этим актуален выбор другого видоспецифического антигена, стабильно сохраняющегося при всех видах изменчивости. Таким в диагностике может быть описанный ранее специфичный для *Y. pestis* комплекс антигенных белков «фракция V» (FV, F5) [Божко и др., 1998]. Однако требуется его проверка на атипичных штаммах двух иерсиний, а также идентификация состава антигена, с последующим отбором наиболее иммуноактивных компонентов.

Клоновые варианты микроба чумы с «маскирующей» формой изменчивости возникают на разных стадиях эпизоотий, зарегистрированы в лабораторных условиях (Пунский, 1970; Баканурская и др., 1992; Ларина и др., 1992 и другие). Необходимость тщательного контроля над ними, особенно над «бесфракционными» штаммами, подчеркивается в мировой литературе (Sebbane et al, 2009). Успехи по определению роли отдельных экспериментально изменённых генов F1-антигена *Y. pestis*, не снимают необходимости выяснения механизмов естественной изменчивости этих генов. Разработку подходов к решению этих проблем также считаем актуальной.

Актуальны разработки уникальных надёжных приёмов, способных дифференцировать оба вида с наименьшими временными, трудовыми и материальными затратами. Они требуются в зонах, где циркулируют бактерии обоих видов. Начаты работы по конструированию вакцин на основе гибридов двух видов иерсиний (Ivanov et al., 2008; Debrise et al., 2013), где эти приёмы также актуальны.

С учётом возможности утраты плазмид наиболее экономичным и точным тестом, на наш взгляд, может быть ПЦР с праймерами на уникальный консервативный видоспецифический фрагмент хромосомы, который имеется у всех типичных и атипичных штаммов *Y. pestis*, и способен быть мишенью праймеров при нахождении бактерий *in vitro* и *in vivo* и в смеси с родственными бактериями. Его обнаружение и подбор к нему эффективных праймеров – задача очень перспективная. Она обеспечит разработку приёма, доступного, краткого по времени и объёму выполнения при первичном скрининге возбудителя и многочисленности исследуемых проб. Выявление диагностического антигена будет способствовать совершенствованию не только идентификации иерсиний, но и серологической диагностики чумы, вызванной антигенно-изменёнными вариантами возбудителя.

Степень разработанности темы исследования.

С использованием приёмов молекулярной биологии в настоящее время вид *Y. pestis* условно дифференцируют на эпидемичный основной подвид (*sudsp. pestis* возбудитель чумы людей) и более близкий к *Y. pseudotuberculosis*, неосновной подвид (*subsp. microtus*), не эпидемичный

или даже авирулентный для людей. Каждый из них имеет типичные общие для вида и для подвида определённые признаки (Тюлембаев и др., 1982; Кокушкин, 1983; Апарин, Голубинский, 1989; Fan et al., 1998; Zhou et al., 2004; Платонов и др., 2012). При изменении одного или нескольких признаков формируются атипичные штаммы, механизм образования которых не всегда ясен. Для идентификации таких образцов требуются тесты на признаки, не подверженные вариабельности. Внутри вида *Y. pestis*, разделённого на два подвида (*pestis* и *microtus*), выделяют биовары: *antique*, *mediaevalis* и *orientalis* (Devignat, 1951); *altaica*, *hissarica*, *caucasica*, *ulegeica* и др. [Анисимов и др. 2009; Zhou et al., 2004], ранее обозначенные как группа *pestoides* (Radnedge et al., 2002; Zhou et al., 2004; Garsia et al., 2007).

Официальными инструкциями определены критерии идентификации вида *Y. pestis* и дифференциации его от *Y. pseudotuberculosis*. Они включают помимо ряда признаков фенотипа, не всегда стабильных, и биологического теста на модели лабораторных животных, постановку ПЦР с праймерами на гены плазмид, способных сегрегировать (*cafI*, *lcrV* и *pla*) и праймерами («3а», *irp2*, *hms*), комплементарными видоспецифическим фрагментам хромосомы *Y. pestis*. Такой подход может решать вопросы диагностики классических форм заболевания чумой и позволит выявить типичные штаммы её возбудителя, но не охватывает всего разнообразия форм, составляющих вид.

Разработаны трудоёмкие приёмы полной детализации структуры геномов бактерий для их сравнения и таксономической дифференциации (Deng et al., 2002). Они включают контроль с использованием мультилокусного набора праймеров, часть из которых подвержена вариабельности, и последующее секвенирование ампликонов, анализ SNP-последовательностей, секвенирование геномов - приёмы, эффективные и нужные для детального изучения механизмов вариабельности микроба чумы. Однако при первичной идентификации и детекции при использовании этих методов увеличиваются время анализа проб и материальные затраты. Хотя для идентификации типичных штаммов предложены известные «плазмидные» и «хромосомные» праймеры (набор «Ген *Yersinia pestis* идентификация – РФФ», Инструкция, Утв. 13.10.2011 Приказом Росздравнадзора), сведений об их эффективности в отношении множественно изменённых штаммов, смешанных культур и рекомбинантов двух видов иерсиний мы не встретили.

Описана активность в идентификации *Y. pestis* специфического комплекса антигенных белков «FV» [Божко и др., 1998]. Авторский антителный КоА-диагностикум реагировал со всеми 28⁰-бактериями опытной выборки типичных и «бесфракционных» штаммов *Y. pestis* и только с единичными R-мутантами *Y. pseudotuberculosis*. Однако нет данных по более широкой апробации диагностикума на природных изменённых по диагностическому фенотипу штаммах двух близкородственных видов иерсиний. Не проведена идентификация составляющих антигена, с последующим отбором компонентов, перспективных для изучения

иммуногенеза при чуме и совершенствования приёмов иммунопрофилактики и диагностики

В нашей лаборатории получили развитие исследования атипичных штаммов иерсиний, касающиеся механизмов их естественного возникновения, приёмов идентификации и особенностей патогенеза. Продолжение их мы оцениваем как актуальное и перспективное.

В связи с изложенным **целью настоящего исследования** было получение новых данных о полиморфизме возбудителя чумы и псевдотуберкулёза, научное обоснование выбора и практическая оценка эффективности использования альтернативных молекулярных мишеней для их индикации и идентификации.

Основные задачи исследования:

1. Сформировать рабочую коллекцию штаммов иерсиний (*Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*), представляющих внутривидовое и внутривидовое разнообразие, прежде всего по F1 антигену.
2. Выявить причины, определяющие природную дефектность штаммов *Y. pestis* по F1 антигену.
3. Определить иммунодоминантную молекулярную мишень антигенного комплекса «FV–антиген».
4. Предложить алгоритм индикации и идентификации атипичных штаммов чумного и псевдотуберкулёзного микробов.

Научная новизна.

Впервые в составе антигенного комплекса FV *Y. pestis* идентифицирован иммунодоминантный белок фермент - адгезин трансальдолаза. По аминокислотной последовательности определена структура у *Y. pestis tal*-гена.

Доказана в ПЦР-анализе стабильность встройки IS100 элемента у видоспецифического консервативного локуса гена, определяющего синтез белка систем секреции семейства Dot U (праймеры группы «vIm») и сохранение её у всех представителей вида *Y. pestis* при известных формах их природной изменчивости, в процессе многократных пассажей через организм чувствительных к чуме животных и на питательных средах, а также при длительном хранении штаммов в лабораторных условиях и при клоновом анализе.

Впервые установлено, что у природных атипичных Fra^- и Fra^\pm штаммов *Y. pestis*, сохраняющих плазмиду pFra, природный спонтанно возникающий дефект может быть локализован в любом из четырёх генов *caf*-оперона. Доказано, что при снижении вирулентности таких штаммов для многих носителей, монгольские песчанки проявляют к ним высокую чувствительность.

Доказано, что приобретение pFra плазмиды чумного микроба бактериями *Y. pseudotuberculosis* (предполагаемый эволюционный механизм) повышает для белых мышей патогенетическую активность и значительно усиливает иммуногенность в отношении мышей и морских свинок при этом

снижаются антифагоцитарные свойства рекомбинантов. Это происходит, возможно, из-за конкурентного отношения ЛПС с антигеном F1, который у рекомбинантов *Y. pseudotuberculosis* продуцируется в недостаточно высоком титре. Приобретение двух плазмид, pFga и pCad, усиливает эффекты. Механизмы этого феномена пока не ясны и нуждаются в исследовании.

Теоретическая и практическая значимость.

Предложена гипотеза, объясняющая диагностически значимые различия в экспрессии трансальдолазы в клетках чумного и псевдотуберкулёзного микробов.

При углублённом изучении видовых признаков у 270 природных и экспериментальных штаммов и 112 клоновых культур *Y. pestis*, 82 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, включающих 60 природных и 22 референтных штамма, а также 43 клоновых и рекомбинантных культур возбудителя псевдотуберкулёза, отобрана репрезентативная коллекция атипичных вариантов двух видов иерсиний с единичными и множественными изменениями дифференцирующих свойств, определена частота их изменчивости и дана сравнительная оценка надёжности рекомендуемых инструкциями фенотипических диагностических тестов. Коллекция может быть полезной при разработке новых тестов идентификации.

Доказана высокая эффективность, специфичность и преимущества монолокусной ПЦР с совместимыми праймерами «vIm12/IS216») и «JS» (*Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, соответственно) при использовании их в одной пробе или врозь в ходе анализа чистых культур, смесей типичных и изменённых штаммов двух иерсиний, находящихся в растущей культуре, во взвесах и биоматериале.

Предложены эффективные подходы к идентификации и дифференциации всех атипичных штаммов двух видов иерсиний с использованием монолокусной ПЦР с видоспецифическими праймерами («vIm») и «JS») и реакции коаггутинации (pCoA) на комплексный антиген FV.

Доказано существование атипичных штаммов *Y. pestis* позитивных в ПЦР с праймерами «vIm», но негативных в присутствии праймеров «3a» и «caf1».

Доказано, что праймеры на любой ген *caf*-оперона равноценны по диагностической ценности паре праймеров *caf1*.

Показано, что рекомбинантные бактерии возбудителя псевдотуберкулёза с плазмидой чумного микроба в случае их выделения в смешанных природных очагах или в условиях эксперимента могут быть идентифицированы в ПЦР суммарно по *caf*-праймерам и «JS». Выявление в той же пробе параллельно ампликонов, специфичных для пары праймеров «vIm» свидетельствует о присутствии смешанной культуры двух иерсиний.

Разработаны и утверждены на учрежденческом уровне «Методические рекомендации по применению полимеразной цепной реакции при видовой идентификации и внутривидовой дифференциации бактерий вида *Y. pestis*»

(Протокол Ученого Совета ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт № 10 от 28.08.2008); «Методические рекомендации по анализу и диагностике микстов возбудителей чумы и псевдотуберкулёза» (Протокол Ученого Совета ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт №14 от 18.12.2009); «Методические рекомендации по индикации возбудителей *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* в органах биопробных животных» (Протокол Ученого Совета ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт № 16 от 22.12.2010); «Методические рекомендации по получению антигенного комплекса «фракция V» чумного микроба» (Протокол Ученого Совета ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт №2 от 17.12.2015).

Разработан «Способ идентификации штаммов вида *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis*» (Патент №2422535. Приоритет 11.01.2010).

«Методические рекомендации по получению антигенного комплекса «фракция V» чумного микроба» (Протокол Ученого Совета ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт №2 от 17.12.2015) используются в совершенствовании методов иммунодиагностики чумы в лаборатории микробиологии чумы и др. иерсиниозов РостНИПЧИ. «Методические рекомендации по анализу и диагностике микстов возбудителей чумы и псевдотуберкулёза» и «Методические рекомендации по индикации возбудителей *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* в органах биопробных животных» включены в курс лекций по ООИ для врачей-бактериологов при Ростовском-на-Дону противочумном институте (Акт внедрения от 07.11.15. Утв. Директором РостНИПЧИ С.В.Титовой) и используются в экспериментальных наблюдениях во ФКУЗ Северо-Кавказской противочумной станции Роспотребнадзора в обследуемых очагах с целью поиска двух видов иерсиний и их атипичных штаммов (Акт внедрения от 07.11.15. Утв. Директором ФКУЗ Северо-Кавказской противочумной станции Роспотребнадзора Ю.Г. Киреевым).

Методология и методы исследования.

Методология диссертационной работы выстроена, исходя из цели и задач исследования.

В частности, проводилось изучение диагностических фенотипов коллекционных штаммов иерсиний видов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* и отбор атипичных вариантов. Проведен сравнительный анализ эффективности различных методов дифференциальной диагностики этих вариантов и исследование их патогенетической активности. Произведён отбор наиболее общедоступных приёмов идентификации указанных штаммов иерсиний в чистых, рекомбинантных и смешанных агаровых культурах, а также в инфицированном биоматериале. Оптимальным для этого было признано сочетание иммунологического теста на стабильный антиген FV с монолокусной ПЦР с парой праймеров на уникальный стабильный хромосомный сайт каждой из иерсиний.

Информативность указанного приёма оценивали в условиях лабораторного сравнительного эксперимента на модели репрезентативных коллекций штаммов, с различными отклонениями диагностического фенотипа и при лабораторном исследовании органов заражённых животных.

Научная литература, посвящённая исследованиям в области анализа природной изменчивости и патогенетической активности возбудителей чумы и псевдотуберкулёза, а также молекулярно-генетической диагностики иерсиниозов, проанализирована формально-логическими методами. В работе использованы микробиологические, биохимические, генетические, биологические, молекулярно-биологические, биоинформационные и статистические методы исследования.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Штаммы *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, независимо от характера спонтанного изменения видоспецифического фенотипа, стабильно сохраняют видоспецифический фрагмент хромосомы, комплементарный, соответственно, паре праймеров «vIm» (*Y. pestis*) и «JS» (*Y. pseudotuberculosis*). Каждый из указанных фрагментов может служить специфическим надёжным таксономическим критерием видовой принадлежности штамма и, при использовании его в качестве мишени праймеров в широкодоступной монолокусной ПЦР, обеспечивает точную идентификацию, дифференциацию указанных иерсиний в ходе анализа большого количества чистых и смешанных культур и проб биоматериала.

2. Спонтанные нарушения *caf*-оперона, выявляемые у природных штаммов, могут происходить дискретно в каждом из его генов. Предложенные нами праймеры на каждый ген *caf*-оперона (*caf1*, *cafA*, *cafM*, *cafR*) и возможность применения в качестве биопроб высокочувствительных к чуме монгольских песчанок повышают результативность выявления Fra^- штаммов *Y. pestis* и способствуют анализу механизма природных нарушений продукции диагностического антигена F1.

3. За серологическую активность «фракции 5» отвечает трансальдолаза.

Степень достоверности и апробация результатов исследования.

О достоверности полученных результатов работы свидетельствует достаточный объём проведенных лабораторных исследований по разработке тест систем для идентификации и дифференциации изменённых штаммов двух видов иерсиний. Исследования выполнены с помощью современных методов на сертифицированном оборудовании. Обоснованность выводов подтверждается результатами, полученными с помощью комплекса адекватных методов, данными их анализа и статистической обработкой.

Работа выполнена на базе Федерального казённого учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора в ходе разработки пяти плановых федеральных тем по проблемам представленным в диссертации, в трёх из которых она была ответственным исполнителем.

Диссертация апробирована на общеинститутской конференции «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора (Протокол № 18 от 16. 08. 2016).

Материалы и результаты исследований были представлены на: (1) научных конференциях Ростовского-на-Дону противочумного института (*Ростов-на-Дону*, 2003-2013); (2) научно-практической конференции «Современные аспекты эпидемиологического надзора за особо опасными инфекционными заболеваниями на юге России» (*Ставрополь*, 2007); (3) Всероссийской научной конференции 48 ЦНИИ Минобороны России» (*Киров*, 2008); (4) научно-практической конференции «Современные аспекты эпидемиологического надзора и профилактики особо опасных и природно-очаговых болезней» (*Иркутск*, 2009); (5) юбилейной научной конференции с международным участием Западно-Сибирского института природно-очаговых инфекций (*Омск*, 2009); (6) Всероссийской научно-практической конференции по проблемам молекулярной диагностики (*Москва*, 2010); (7) Межгосударственной научно-практической конференции стран СНГ (*Ставрополь*, 2010); (8) научно-практической конференции института им. Пастера с международным участием (*Санкт-Петербург*, 2011); (9) заседании Международного симпозиума по проблеме «*Yersinia*» (*США, Кентукки*, 2006); (10) научной конференции «Медицинская безопасность» (*Германия, Мюнхен*, 2011).

Публикации.

Основные результаты исследований представлены в Патенте № 2422535(RU) с приоритетом от 11.01.2010, четырёх методических рекомендациях (см. выше) и обобщены в 21 публикации, из которых 5 статей опубликованы в научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ Министерства образования и науки, 2 статьи в электронном журнале «Universum: химия и биология», 13 публикаций в сборниках, трудах и материалах Всероссийских и международных научных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 223 страницах, состоит из введения, 7 глав, заключения, выводов; иллюстрирована 13 таблицами, 28 рисунками. Библиография на 42 страницах, содержит ссылки на 350 публикаций (в том числе на 207 отечественных работ и 143 – зарубежных авторов). Имеется «Приложения» на 20 стр., содержащее основные паспортные и полученные характеристики всех исследованных штаммов (Таблицы 1, 2, 3).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы дана краткая характеристика двум эволюционно связанным видам иерсиний. Описаны общие представления о чуме и псевдотуберкулезе и их возбудителях, представлена характеристика основных микробиологических признаков идентификации возбудителя эпидемической чумы (*Y. pestis* subsp. *pestis*) и дифференциации его от *Y. pseudotuberculosis*. Освещаются дополнительные тесты дифференциации

иерсиний по фенотипическим признакам, а также молекулярно-биологические методы идентификации и дифференциации *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*. Приведены и указаны факторы, осложняющие детекцию и дифференциацию типичных, атипичных, смешанных и рекомбинантных штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. Охарактеризованы основные тесты для выявления близкородственных иерсиний в практике и научных исследованиях и указаны основные моменты, требующие совершенствования приемов изучения.

Даны краткие данные о структуре и функциональных особенностях специфического для *Y. pestis* антигенного комплекса FV. Освещены актуальные проблемы, связанные с атипичными штаммами обеих иерсиний. Показаны слабые стороны некоторых принятых в практике методов диагностики и показана необходимость их совершенствования.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Глава 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования явились 270 музейных штаммов и 112 клоновых культур *Y. pestis* и 82 штамма и 43 клоновые культуры *Y. pseudotuberculosis* и рекомбинанты. Среди них природные штаммы, клонированные варианты некоторых из них и экспериментальные штаммы, сконструированные *in vitro*. На различных этапах исследований объектами были штаммы, разные в соответствии с типом их изменчивости. Их характеристика дана в начале каждого раздела.

Основные и дифференциальные питательные среды, методики культивирования, изучения культурально-биохимических и диагностических свойств, выявления генетических маркеров использовали, как рекомендовано (Туманский, 1958; Лабораторная диагностика ООИ, 2009). Продукцию видоспецифических антигенов F1 и FV чумного микроба определяли, соответственно, в НИМФ с МКА (лаборатории гибридом РостНИПЧИ) (Бичуль, 1993) и РКoА с экспериментальным иммуноглобулиновым диагностикумом (РостНИПЧИ) (Божко и др., 2006), согласно авторским рекомендациям.

Летальный и иммуногенный эффект штаммов проверяли на морских свинках (*Cavia porcellus*), белых мышах (*Mus albus officinarum*) и монгольских песчанках (*Meriones unguiculatus*) при разных способах заражения разными дозами бактерий. Длительность наблюдения до 30 сут. Павших или забитых хлороформом животных в конце срока наблюдения вскрывали, высевая «отпечатки» органов на питательную среду.

Антимакрофагальную активность бактерий оценивали по ИЗФ₆ на модели перитонеальных МФ (Пустовалов и др., 1984).

В ПЦР использовали пару «хромосомных» праймеров «3а» (Radnedge et al., 2002), входящие в коммерческий набор «Ген *Yersinia pestis* идентификация», экспериментальные праймеры vlm12for/IS216rev и vlm33rev/ISfor1754 (Motin et al., 2002) и JSfor/JSrev (Radnedge et al., 2001), комплементарные видоспецифическим консервативным фрагментам

хромосом *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* по одному или сразу два праймера в одной пробе; а также рассчитанные в нашей лаборатории четыре пары экспериментальных праймеров на *caf1*, *cafR*, и *cafA* и *cafM* гены *caf*-оперона. ДНК извлекали из бактерий чистых, смешанных культур, а также из органов инфицированных животных.

Антигенный комплекс FV выделяли из бактерий дефицитного по плазмидам штамма *Y. pestis* Otten с помощью поэтапного осаждения градиентом концентраций ДОХ (Baker, 1952), финального осаждения белков V-го супернатанта ацетоном при -20°C и диализа.

При исследовании белков FV- антигена использовали агглютинацию, диффузионную преципитацию по Ouchterlony, гель-электрофорез, двухмерный гель-электрофорез и иммуноблоттинг с применением поликлональных мышинных антител, а также МКА к одному из компонентов антигена (Остерман, 1981; Laemmlly, 1970; Bradford, 1978; Towbin et al., 1979; Garfins, Bers, 1989). Масс-спектрометрический анализ белка выбранного пятна после протеолитического расщепления трипсином и последующей элюцией проводили при помощи 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems). Результаты обрабатывали с использованием баз данных NCBI и программного обеспечения Mascotsearchingengine v.2.1 (Matrix Science, London, UK). Для характеристики идентифицированного белка и выявления его сигнального пептида пользовались программой SignalP 4.0. Определение полноценных α - и β -спиральных участков полипептида проводили с помощью BOMP, а место клеточной локализации определяли с помощью PSORTb 3.0.2.

При исследовании соблюдали режим работы с возбудителями I группы патогенности (СП 1.3.3118-13). Биопробных животных содержали и использовали с учётом ФЗ от 01.01.1997 и предписаниями Женевской конвенции (Geneva, 1990).

Глава 3. СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕГЛАМЕНТИРОВАННЫХ ТЕСТОВ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ШТАММОВ *Y. pestis* И *Y. pseudotuberculosis*

Для выявления характера возможных отклонений фенотипа от видоспецифического и отбора атипичных штаммов исследовано 270 случайно выбранных изолятов *Y. pestis*, выделенных в разное время из разных источников и в различных очагах Кавказа, Закавказья, Средней и Центральной Азии, Алтая, Забайкалья, Поволжья, Ближнего и Дальнего Зарубежья, а также их экспериментальные варианты и 112 клоновых культур. Протестированы 60 штаммов *Y. pseudotuberculosis* из Северо-Западных районов и Дальнего Востока России и 43 их клонов, а также 22 референтных штамма 16 сероваров этого микроба из международной коллекции (Tsubokura, Alexiĉ, 1995). Их характеристика дана в начале каждого раздела и в «Приложении» к диссертации.

Практически по всем регламентированным фенотипическим признакам у обоих видов иерсиний были обнаружены различные по численности группы

штаммов с одинаковыми показателями (отсутствие антигена F1, плазмид, подвижности или рамнозопозитивность и т.д.). Одиночные и множественные отклонения от видоспецифического фенотипа у обоих видов иерсиний обнаружены в пределах 2-20 % штаммов (форма колоний, чувствительность к диагностическим фагам, ферментация рамнозы, мочевины, ауксотрофность, плазмидный состав). Отмечены 4 свойства, каждое из которых обнаруживалось абсолютно у всех штаммов одного из видов. У *Y. pseudotuberculosis* все штаммы не продуцировали F1 антиген и были устойчивы к фагу Л-413 «С». У *Y. pestis* не обнаружено ни одного «подвижного» штамма, и лишённого антигена FV. Однако у противоположного вида обнаружены штаммы с подобными признаками. Это нивелировало чёткость различий и лишало исследованные маркеры полной надёжности. В отдельности, они в разной степени могли служить ориентирами, но требовали комплексного исследования по другим признакам. Точная идентификация получена со всеми штаммами только в монолокусной ПЦР с «хромосомными» праймерами «vIm12/IS216» (или «vIm33/IS1754»), (специфическими для *Y. pestis* и «JS» - для *Y. pseudotuberculosis* (Рисунок 1).

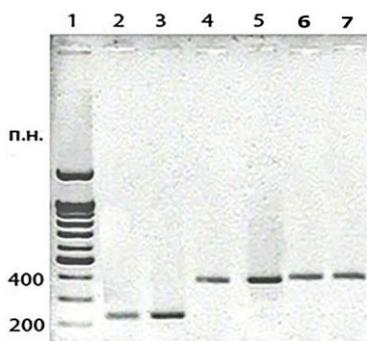


Рисунок 1 – ПЦР анализ ДНК *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*. Электрофорез в 2% агарозном геле.

Праймеры «JS» (2, 3); «vIm12/IS216» (4, 5); «vIm33/IS1754» (6,7). 1 – М.м.: п.н.; 2 - *Y. pseudotuberculosis* 493 O:5 (типовой штамм); 3 – *Y. pseudotuberculosis* 322 (Mob⁻, Ure⁻, ауксотроф); 4,6 - *Y. pestis* EV76 (вакцина); 5,7 – *Y. pestis* Yawa (без плазмид)

Те же тесты успешно апробированы на клонах «спорных» диссоциирующих штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Нестабильность их фенотипа считалась следствием диссоциации (Сомова, Сергеева, 1957) или контаминации бактериями вида *Y. pestis* (Гурлева, 1967; Водопьянов и др., 1994). Нами исследовано 105 клонов R- и 43 клонa S-«диссоциантов», включая три клонa штамма *Y. pseudotuberculosis* 3465(R) без плазмид с атипичными свойствами (Таблица 1). Видовая принадлежность всех культур чётко определялась только с помощью rKoA и ПЦР с видоспецифическими праймерами «vIm12/IS216» и «JS». Среди бесплазмидных клонов один был *Y. pestis*, два других - *Y. pseudotuberculosis*. Сделано заключение о смешанной культуре двух иерсиний. Надёжность идентификации клонов одного спорного штамма как представителей двух видов побудила нас тестировать штамм *Y. pestis* ЖВР-19, много лет назад представленный как «новообразованный» после действия чумного диагностического фага из бактерий «Х». По фенотипу мало отличался от изменённых вариантов *Y. pestis*, но по результатам ПЦР идентифицировался как *Y. pseudotuberculosis*. Атипичный Glp⁺ китайский вариант вакцинного океанического штамма

Y. pestis EV487 при клоновом анализе идентифицирован как смесь двух иерсиний.

Таблица 1 – Свойства клонов «спорного» штамма 3465 с разным числом плазмид

Признак	Признаки у 100% OR и OS клонов «спорных» штаммов при количестве плазмид			
	3	1-2	0	0
FV-антиген (<i>Y. pestis</i>)	+	+	+	-
Подвижность	-	-	-	+/-
Прототрофность	-	-	-	+
Антиген F1	+	(+/-)*	-	-
Пестицин 1	+	(+/-)*	-	-
ПЦР - «За» (<i>Y. pestis</i>)	+	+	+	-
ПЦР - «vIm12/IS216» (<i>Y. pestis</i>)	+	+	+	-
ПЦР - «JS» (<i>Y. pseudotuberculosis</i>)	-	-	-	+
ВСЕГО клонов	15	87	1	2
Вид иерсиний	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>

Примечание - *) в зависимости от наличия/отсутствия pFra и pPst плазмид

Глава 4. ПОДХОДЫ К ДЕТЕКЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ СМЕШАННЫХ КУЛЬТУР ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЧУМЫ И ПСЕВДОТУБЕРКУЛЁЗА

Известно наличие природных очагов с циркуляцией двух возбудителей видов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. Выделение бактерий двух видов из одного штамма свидетельствует о существовании смешанных культур в природе или при случайной контаминации в лаборатории, что требует простых приёмов их детекции. Экспериментальные смеси, содержащие бактерии обеих иерсиний в разных соотношениях и концентрациях, доступных принятым методам детекции (10^3 , 10^4 , 10^5 м.к.), исследованы *in vitro* и *in vivo*. Детекция и видовая идентификация бактерий, составляющих смесь, безошибочно выполнены в ПЦР при добавлении в одну пробу одновременно двух совместимых пар праймеров «vIm12/IS216» и «JS». Так исследовали (1) первичные смеси культур, (2) эмульсии ткани селезёнок мышей, инфицированных этими смесями и (3) культуры после «отпечатков» селезёнок. Два типа ампликонов, каждый из которых специфичен для *Y. pestis* или *Y. pseudotuberculosis*, появлялись в пробах с ДНК, по количеству адекватной 50 м.к. В контрольных пробах размер ампликонов соответствовал контрольному виду бактерий (Рисунок 2).

После положительного «ПЦР-сигнала» смесь разделяли, используя приёмы, основанные на дифференцирующих признаках. Наиболее наглядным был посев при пониженной температуре в слой мягкого питательного агара изолированных клеток смеси для проявления при формировании колоний видоспецифической подвижности и психрофильности (Рисунок 3).

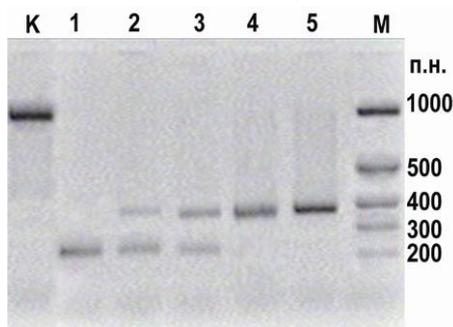


Рисунок 2 – ПЦР ДНК смешанных культур *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. К – фаг Т7; 1 - *Y. pseudotuberculosis* 1923; 2 – смесь: *Y. pseudotuberculosis* 1929+*Y. pestis* EV76; 3 - смесь: *Y. pseudotuberculosis* 1923+ *Y. pestis* Yawa; 4 — *Y. pestis* Yawa; 5 - *Y. pestis* EV76; М.м – п.н. Пробы 1, 2 из селезёнки; 3, 4, 5 – агаровые культуры. Праймеры «vlm12/IS216» (400 п.н.) и «JS» (223 п.н)

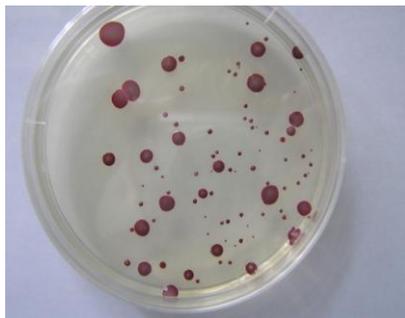


Рисунок 3 – Рост изолированных колоний смеси *Y. pseudotuberculosis* 1923 (крупные колонии) и *Y. pestis* Yawa (мелкие колонии) в слое полужидкого 0,4% агара Хоттингера с 1% ТТХ при 18°C

Глава 5. ОСОБЕННОСТИ СВОЙСТВ И ДЕТЕКЦИИ ШТАММОВ *Y. pestis*, НЕ ПРОДУЦИРУЮЩИХ КАПСУЛЬНЫЙ АНТИГЕН F1

Наиболее часто в исследуемой коллекции встречались штаммы *Y. pestis*, дефицитные по F1. Этот дефект был обнаружен у штаммов фагоустойчивых, с измененной ферментативной активностью и с сегрегацией плазмид. Исследовано 28 штаммов *Y. pestis* и их клонов, не реагирующих в РАО на F1 антиген или дающих сомнительные (\pm) результаты.

При подкожном заражении штаммы, вирулентные для мышей в дозах 10^3 и 10^6 м.к., были в разной степени вирулентны или авирулентны для морских свинок. Во всех случаях была пролонгирована длительность болезни. У отдельных свинок до 30 сут (контроль – 5-6 сут). При вскрытии животных, павших или забитых в поздние сроки, обнаруживали в селезёнках крупные некротические абсцессы. Испытанные монгольские песчанки оказались высоко чувствительны к «бесфракционным» штаммам *Y. pestis*: заболевали остро и погибали через 2-4 сут без резко выраженных патологических изменений, кроме подкожной гиперемии.

От животных, павших в пределах 14-16 сут, обычно выделяли культуры. Совпадало число культур из первичных посевов и положительных результатов в ПЦР с праймеров «vlm12/IS216» и ДНК из материала селезёнок. В поздние сроки иногда культур не обнаруживали, или были посевы, заросшие аутогенной флорой из-за иммуносупрессивного действия Fra^- бактерий. Положительные результаты ПЦР на *Y. pestis*, служили сигналом для проведения успешных дополнительных бактериологических исследований.

Дефицит антигена F1 у штаммов был связан с утратой плазмиды pFra или с дефектом в *caf*-опероне. ДНК отдельных Fra^- штаммов с pFra, взаимодействовала в ПЦР с известной парой праймеров «caf1». Вероятно,

дефект генов был за пределами амплифицированного участка. Результаты ПЦР с рассчитанными нами праймерами на фрагменты, структурного, регуляторного и вспомогательных *caf*-генов доказали, что дефект *caf*-оперона может быть в разных его генах. Синтез специфических ампликонов, комплементарных интактным фрагментам *caf*-оперона, свидетельствовал о возможности использования наших *cafI*(alt) и *cafR*(alt) *cafA*(alt) и *cafM*(alt) праймеров при идентификации Fra^- штаммов *Y. pestis*. Предлагаемые праймеры оцениваем как начальные при создании коллекции со структурными вариациями *caf*-оперона и для первичного выявления культур с дефектами в отдельных *caf*-генах.

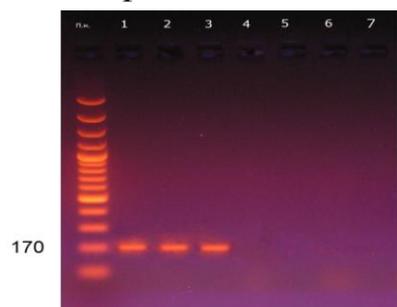


Рисунок 4 – Результаты ПЦР ДНК «бесфракционных» штаммов *Y. pestis* и праймеров – *cafR* (tal) (размер ампликона 170 п.н.). Электрофорез проводили в 2% агарозном геле. М.м., п.н.; 1 – 1330 (555) ($pFra^-$); 2 – 252 (624) ($pFra^+$); 3 – И 2442 (630) ($pFra^+$); 4 – 139 ($pFra^+$); 5 – 126 ($pFra^-$); 6 – 144 ($pFra^+$); 7 – С-393 ($pFra^-$)

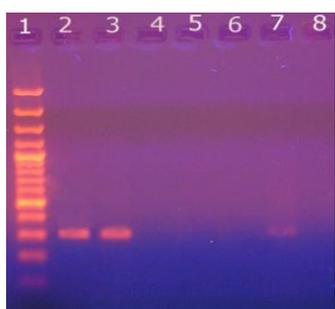


Рисунок 5 – Результаты ПЦР-анализа ДНК Fra^- штаммов *Y. pestis* с праймерами – *cafI*(tal) (размер ампликона 307 п.н.). 1 – М.м., п.н.; 2 – 1330 (555) ($pFra^-$ *) интеграция в хромосому; 3 – И-2442 (626) ($pFra^+$); 4 – 144 ($pFra^+$); 5 – 16K(554) ($pFra^+$); 6 – 126 ($pFra^-$); 7 – 16K (622) ($pFra^+$); 8 – 1450 ($pFra^-$); Электрофорез в 2% агарозе.

ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТОВ

Y. pseudotuberculosis С ПЛАЗМИДАМИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

Сосуществование двух видов иерсиний в одном очаге и в виде смешанных культур в одном хозяине и переносчике, создаёт условия для обмена плазмидами, который не требует высокой гомологии ДНК донора и реципиента. Исследовали рекомбинанты бесплазмидных штаммов *Y. pseudotuberculosis* с плазмидами *Y. pestis*, полученные нами ранее. Антиген F1 определялся у них в титре близком к *Y. pestis* (10^{6-5} м.к.). Однако тест на антиген FV был отрицательным. Рекомбинанты чётко идентифицированы в ПЦР с «хромосомными» праймерами «JS» при отсутствии ампликонов с «чумными» праймерами «vIm12/IS216». В ПЦР с праймерами на *caf*-оперон обнаружены специфические ампликоны (Рисунок 6) В наших опытах присутствие $pFra$ плазмиды по-разному отражалось на патогенетической активности рекомбинантов *Y. pseudotuberculosis* (Таблицы 2, 3): слабо повышала вирулентность, повышала иммуногенность до уровня живой противочумной вакцины EV76 и подавляла антифагоцитарную активность рекомбинантов.

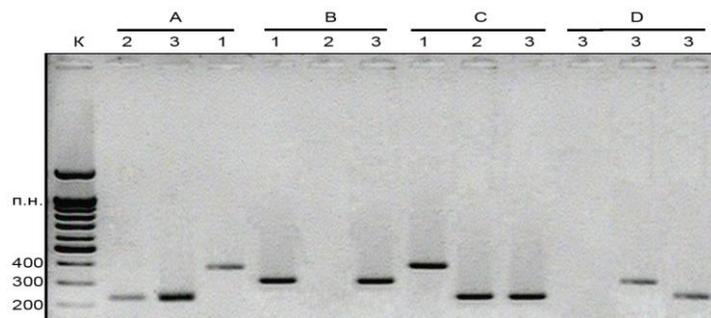


Рисунок 6 – ПЦР анализ ДНК донора плазмид *Y. pestis* EV76, реципиента *Y. pseudotuberculosis* 1923 и рекомбинанта *Y. pseudotuberculosis* 1923 (pFra)⁺.
 1 – *Y. pestis* EV76 (донор); 2 – *Y. pseudotuberculosis* 1923 (реципиент);
 3 – *Y. pseudotuberculosis* (pFra)⁺ (рекомбинант). А – первичные культуры (одновременно vlm12/IS - 390 п.н. + JS - 223 п.н.); В – первичные культуры, пара праймеров F1 – 290 п.н.; С – материал из селезёнок с бактериями указанных штаммов (1, 2, 3) (одновременно праймеры «vlm12»+ «JS»); D – материал из селезёнки, с бактериями рекомбинанта *Y. pseudotuberculosis* 1923 (pFra)⁺: (3₁) - vlm12/IS216; (3₂) - «vlm12/IS216» + «JS» (одновременно); (3₃) — праймеры F1.

Эффект pFra усиливала плаزمида pCad, самостоятельно не проявляющая активности. Это свидетельствовало о сложности их взаимоотношений с новым хозяином.

Таким образом, затруднений в идентификации, возникающих при появлении межвидовых рекомбинантов с признаками плазмид чумного микроба, можно было избежать, используя ПЦР с двумя парами «хромосомных» праймеров «vlm12/IS216» и «JS», специфичных для видов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, соответственно.

Таблица 2 – Летальный эффект рекомбинантов штамма *Y. pseudotuberculosis* 1923 с плазмидами *Y. pestis* (белые мыши, внутрибрюшинно)

Штамм	Плазмиды <i>Y. pestis</i>	Отношение числа павших к числу зараженных разными дозами				
		10 ⁹ м.к.		10 ⁸ м.к.		10 ⁶ м.к.
		абс. числа	% павших	абс. числа	% павших	абс. числа
<i>Y. pestis</i> EV76 (донор)	pFra::Tn5, pCad::Tn7, pPst	3/12	25	0/12	0	0/12
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 1923 (реципиент)	-	0/12	0	0/12	0	0/12
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 1923 (рекомбинанты)	pCad::Tn7	0/12	0	0/12	0	0/12
	pFra::Tn5	8/12	67	0/12	0	0/12
	pFra::Tn5+ pCad::Tn7	12/12	100	11/12	92	0/12

Таблица 3 – Защита мышей от чумы рекомбинантами *Y. pseudotuberculosis* 1923 и их антимакрофагальная активность

Штамм	Плазмиды <i>Y.pestis</i>	Число выживших после перезаражения/к числу иммунизированных х, (%)*	ИЗФ _{6**/} бактерий выращенных при	
			37°C	28°C
<i>Y. pestis</i> EV76 (донор)	pPst, pFra::Tn5 pCad::Tn7,	6/6 (100)	-0,6	-1,3
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 1923 (реципиент)	-	1/ 6 (17)	-0,77	-1,09
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 1923 (рекомбинанты)	pCad::Tn7	1 /6 (17)	н.и.	н.и.
	pFra::Tn5	5/ 6 (83)	+0,34	-0,18
	pFra::Tn5 + pCad::Tn7	6/6 (100)	+0,25	-0,21

Примечание – */ - исследуемые штаммы первично подкожно, 10^4 м.к. / *Y. pestis* 231, 200 DCL через 14 сут; **/ – индекс завершённости фагоцитоза бактерий, выращенных при разных температурах через 6 часов контакта с перитонеальными МФ морских свинок (среднее по трём измерениям); н.и. – не исследовано.

ГЛАВА 7. ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИГЕННОГО КОМПЛЕКСА FV ЧУМНОГО МИКРОБА

Приступая к изучению антигенного комплекса FV, мы располагали данными автора, впервые выделившего его (Божко, 1993), кроличьей анти-FV-сывороткой, образцом иммуноглобулинового КоА-диагностикума на тотальный препарат FV и МКА (Е6/Н8), к одному из неидентифицированных белков FV (Бичуль, 1993). Нами модифицирован метод выделения антигена, выбраны в качестве продуцентов два штамма *Y. pestis* (Ottен и TRU), лишённые, в отличие от первичного, мажорных плазмид и детерминант наиболее активных антигенов F1 и Vag чумного микроба, и получены препараты антигена FV, которые реагировали с со специфическими кроличьей сывороткой и МКА (Е6/Н8). Полученный препарат FV исследовали методами, указанными выше. Цельный FV в РДП с имевшейся и полученной нами специфической поливалентной кроличьей анти-FV-сывороткой, содержащей IgG антитела, образовывал 2 чёткие линии преципитации. Одну размытую обнаруживали в РДП с живыми 28°C-бактериями разных штаммов *Y. pestis* в качестве антигена и той же кроличьей сывороткой, но при отсутствии реакции с контрольным штаммом *Y. pseudotuberculosis* (Рисунок 7 и 8).

Иммуноблотт препарата с поликлональной мышинной сывороткой (IgM) против лизата бактерий штамма-продуцента и самого антигена обнаруживал

две белковые линии в зонах расположения белков с М.м. около 25 и 35-37 кДа (Рисунок 9).

В исследовании FV с помощью 2D электрофореза и иммуноблоттинга с применением МКА(Е6/Н8) и антимышиной сыворотки, меченной пероксидазой хрена, максимальный окрашенный сигнал был обнаружен в зоне, приближенной к уровню движения белков с М.м. 45 кДа и рI 5,0. Методом масс-спектрометрии показано, что белок, имеющий наибольшую иммунную активность по отношению к анти-FV МКА (Е6/Н8)

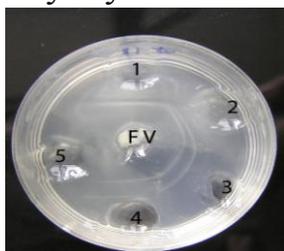


Рисунок 7 - Диффузионная преципитация в 1% агарозном геле. 1 – нативная цельная анти-FV-сыворотка кролика; 2 – анти-FV- сыворотка кролика 1:20; 3 – анти-FV-сыворотка кролика 1:40; 4 – анти-FV-сыворотка кролика 1:80; 5 – фоновая сыворотка кролика до иммунизации.



Рисунок 8 – Диффузионная преципитация анти-FV-кроличьей сыворотки против взвеси бактерий штаммов: 1 – FV-антиген; 2 – *Y. pestis* 556/106; 3 – *Y. pestis* EV76; 4 – *Y. pestis* Yawa; 5 – *Y. pseudotuberculosis* 1986; 6 – кроличья сыворотка против FV антигена.

идентифицируется по своей аминокислотной последовательности как фермент трансальдолаза (Tal) 35-36 кДа из одноименного семейства. С помощью программы BLAST установленный ген *tal* *Y. pestis* 556//106 сравнили с *tal* *Y. pseudotuberculosis*. Отличия затрагивали 6-8 единичных нуклеотидов (1%) в различных фрагментах гена. Подобные вариации были у разных штаммов возбудителя псевдотуберкулёза, тогда как в *tal*-гене у анализированных штаммов *Y. pestis* отличия не найдены.

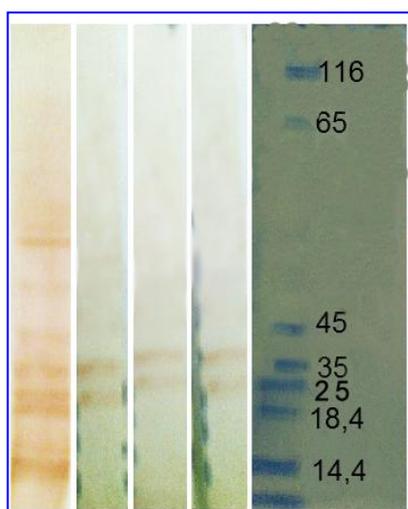


Рисунок 9. Иммуноблотт лизата штамма продуцента *Y. pestis* 556/106 и антигена FV с различными специфичными сыворотками.

1 – лизат бактерий *Y. pestis* 556/106 с поликлональной мышинной сывороткой к этому лизату; 2 – лизат бактерий *Y. pestis* 556/106 с поликлональной мышинной к FV антигену; 3 – FV антиген с поликлональной мышинной сывороткой к лизату бактерий *Y. pestis* 556/106; 4 – FV антиген с поликлональной мышинной сывороткой к FV антигену; 5 – маркеры Мм, кД.

При анализе трансальдолаз чумы и псевдотуберкулеза, имеющих наибольшее число единичных нуклеотидных замен в генах фермента, были отобраны 3 штамма *Y. pseudotuberculosis* I, *Y. pseudotuberculosis* YPIII и *Y. pseudotuberculosis* IP 31758 гены которых отличались соответственно на 6,

6 и 9 нуклеотидов в различных локусах от последовательностей генов возбудителя чумы. Перевод нуклеотидной последовательности в аминокислотную и сравнение последовательности аминокислот показало, что у двух штаммов *Y. pseudotuberculosis* I и *Yersinia pseudotuberculosis* IP 31758 полностью идентичная структура трансальдолазы с трансальдолазой штаммов возбудителя чумы, а у штамма *Y. pseudotuberculosis* YPIII существует одно отличие в аминокислотной последовательности в 57 положении. У различных штаммов *Y. pestis* в этом положении находится аланин, тогда как у конкретного штамма *Y. pseudotuberculosis* – треонин.

Сравнение нуклеотидных последовательностей генов трансальдолазы у различных штаммов *Y. pestis* позволяет говорить о высокой стабильности структуры трансальдолазы возбудителя чумы. Все последовательности, кодирующие трансальдолазу *Y. pestis* оказались однородны и не имели каких либо нуклеотидных замен, либо делеций за исключением одного штамма. При сравнении генов трансальдолазы 39 штаммов *Y. pestis*, сведения о которых имелись в GenBank, был обнаружен один штамм *Pestoides* B, в котором произошла делеция (мутация), которая привела к утрате одного нуклеотида со сдвигом рамки считывания и образовании стоп-кодона, не позволяющего осуществлять транскрипцию всего гена.

Tal участвует в катализе реакций пентозофосфатного цикла и локализация её в соответствии с этой функцией определена как внутриклеточная. Сигнального пептида не выявлено. Однако нами этот фермент обнаружен на поверхности бактерий всех вариантов *Y. pestis* при 28° и 37°С {НИМФ с МКА (Е6/Н8)}. Это дает повод предположить существование не охарактеризованного пути, который позволяет ферменту транспортироваться экстрацеллюлярно и закрепляться на поверхности, Благодаря чему он может выполнять дополнительные функции, такие как адгезия, аутоагрегация и инвазия бактерий продуцента (Gonzales-Rodrigues et al., 2012).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты рекомендуемых практическими руководствами диагностических фенотипических тестов могут быть сомнительными или отрицательными при дифференциации природных множественных мутантов *Y. pestis* и клонов генетически нестабильных штаммов с изменённым фенотипом. В полной степени достоверными при анализе и детекции штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* даже с изменениями диагностических свойств как *in vitro*, так и *in vivo* оказались результаты монолокусной и монопраймерной ПЦР с экспериментальными праймерами к консервативным фрагментам хромосомы –«JS» (*Y. pseudotuberculosis*) и «vIm» (*Y. pestis*) и тест коагуляции на антиген FV. Данные легли в основу предлагаемого метода для идентификации и дифференциации иерсиний в чистых культурах и в биоматериале.

Недостаточная видовая маркерная надёжность фенотипических признаков значительно осложняет анализ mix-штаммов *Y. pestis* и

Y. pseudotuberculosis. Отработаны дополнительные упрощённые приёмы анализа в подобной ситуации с одновременным использованием двух, указанных выше видоспецифических «хромосомных» праймеров «vIm12/IS216» и «JS». Этот подход так же как КоА эффективны и при разделении их чистых культур.

В ходе анализа коллекции Fra⁻ штаммов *Y. pestis* предложены подходы, повышающие эффективность выявления Fra⁻ вариантов. Показан различный механизм их формирования. Кроме известной утраты pFra плазмид впервые доказано, что нарушения могут быть отдельно в каждом из четырех генов *caf*-оперона без визуального изменения размера pFra плазмиды

Обнаружена высокая чувствительность к Fra⁻ штаммам *Y. pestis* монгольских песчанок при подкожном заражении. Это позволит повысить эффективность поиска Fra⁻ штаммов в природе. Также как использование ПЦР с предложенными нами праймерами на разные гены *caf*-оперона.

Наши результаты и данные литературы (Sha et al., 2011; Ling Chao et al., 2012) подтверждают необходимость исследований по детализации образования спонтанных Fra⁻ вариантов, регуляции этого процесса и биологической роли естественной флюктуации Fra-фенотипа.

Результаты исследования рекомбинантов свидетельствуют об актуальности проблемы, намечают дальнейшие перспективы и предоставляют инструмент для контроля над подобными рекомбинантами.

Эффективность диагностики чумы может быть значительно повышена. Доказанная способность любых штаммов *Y. pestis* продуцировать антигенный комплекс FV, который вызывает синтез специфических антител, может быть использована в иммунологическом тесте у больных хронической или острой формой чумы [Божко и др., 2005].

По нашим данным иммуноактивность антигена FV обеспечивают несколько компонентов. Идентификация среди них фермента трансальдолазы (Tal) открывает ряд аспектов, связанных с её дополнительными функциями, которые кажутся важными. Известно, что у разных бактерий Tal может обеспечивать адгезию, агрегацию, инвазию в клетки млекопитающих, проявляет иммунологическую и аллергенную активности, а в сумме причастна к реализации вирулентности (Gupta et al., 2011; Gonzales-Rodriues et al., 2012; Chou et al., 2014; He et al., 2015).

Не ясен пока механизм доставки фермента на поверхность бактерии, где он может проявлять перечисленные дополнительные активности. При наличии значительной гомологии Tal (*pestis*) и Tal (*pseudotuberculosis*), но при различиях обоих ферментов по М.м., структуре гена и термозависимой его экспрессии можно предполагать определённые функциональные особенности Tal *Y. pestis*. У этого микроба она конститутивно представлена на поверхности бактерий при разных температурах культивирования, независимо от форм изменчивости, особенностей генотипа, а ген её не проявляет склонности к нуклеотидным вариациям, которые имеют место у бактерий псевдотуберкулёза.

Итак, полученные в рамках диссертационных исследований сведения, на наш взгляд, могут быть полезны в научных исследованиях иерсиний, связанных с их патогенезом, идентификацией, природной вариабельностью, а также будут способствовать решению практических задач при контроле над *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. В частности, представляются перспективными исследования механизмов естественной изменчивости *caf*-оперона и особенностей влияния плазмид *Y. pestis* на патогенетическую активность различных вариантов возбудителя псевдотуберкулёза. Перспективно использование монолокусной ПЦР с «хромосомными» праймерами vlm и JS в поисках атипичных штаммов, уклоняющихся от идентификации принятыми в практике приёмами, а также при поколониальном анализе диссоциирующих штаммов чумного микроба и возможных смесей культур двух видов иерсиний. Перечисленные данные и сведения литературы позволяют считать полезными и дальнейшие исследования Tal, и антигена FV в целом, для решения проблем диагностики, иммунопрофилактики чумы.

ВЫВОДЫ

1. Изучение праймеров группы «vlm» («vlm12for/IS216rev» и «vlm33rev/IS1754for») и «JS», предложенных ранее для дифференциации типичных штаммов *Y. pestis* от *Y. pseudotuberculosis*, выявило их высокую специфичность в отношении штаммов обеих иерсиний с любыми отклонениями в диагностическом и патогенетическом фенотипе, высокую эффективность при идентификации чистых культур *in vitro* и детекции бактерий в инфицированном биоматериале, а также при анализе клонов-диссоциантов и смешанных культур возбудителей чумы и псевдотуберкулёза.

2. Обнаруженная высокая чувствительность монгольских песчанок к Fra⁻ штаммам *Y. pestis* позволяет рекомендовать их в качестве эффективной биопробной модели для выявления этих вариантов возбудителя чумы.

3. Дефекты *caf*-оперона у Fra⁻ штаммов могут быть локализованы в любом из четырёх *caf*-генов. Предложенные нами праймеры, комплементарные фрагментам генов *cafI*, *cafA*, *cafM* и *cafR* и специфически реагирующие с ДНК плазмиды pFra чумного микроба, повышают эффективность ПЦР-детекции Fra⁻ и Fra[±] вариантов *Y. pestis* за счёт образования специфических ампликонов на гены *caf*-оперона, не затронутые изменениями.

4. Рекомбинантные штаммы *Y. pseudotuberculosis*, приобретая плазмиды чумного микроба, меняют свои патогенетические и связанные с плазмидами свойства в сторону сходства с микробом чумы. При дифференциации их от бактерий чумы и целевом их поиске эффективны реакция коаггутинации (pKoA) на антиген FV и ПЦР одновременно с двумя хромосомными праймерами «vlm12/IS216» и «JS», и параллельно с праймерами на диагностические гены плазмид *Y. pestis*.

5. Идентифицирован ген *tal*, отличающийся стабильностью структуры и его иммуноактивный белок – фермент трансальдолаза (Tal), входящий в

состав диагностического антигенного комплекса FV чумного микроба и вне зависимости от температуры роста, представленный на поверхности бактерий всех типичных и атипичных штаммов *Y. pestis*. Tal бактерий чумы в значительной степени гомологична Tal возбудителя псевдотуберкулёза (фактор инвазии и вирулентности), но имеет минорные различия с ней в структуре и особенности экспрессии, зависящие от температуры и формы ЛПС продуцента.

6. Эпитопы белка трансальдолазы и других компонентов антигена FV чумного микроба консервативны и представлены на поверхности бактерий у всех типичных и изменённых штаммов *Y. pestis*, что позволяет в определённых условиях использовать их в РКоА со специфическими анти-FV-антителами при первичной видовой идентификации и детекции, а также межвидовой дифференциации иерсиний. Моноклональные антитела к F1 антигену способны выявлять среди «бесфракционных» штаммов *Y. pestis* только те, которые содержат в популяции единичные клетки с Fra⁺ фенотипом.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. Божко, Н.В. Изучение возможности конструирования чумного диагностикума для реакции агглютинации на основе иммуноглобулинов к антигену «фракция V» и выяснение его диагностической ценности / Н.В. Божко, С. А. Лебедева, В.С. Иванова, А.Л. Трухачёв, Л.К. Лысова, Г.Л. Барабаш, **Т.Е. Арсеньева** // Клин. лаб. диагностика. - 2006.- №7. - С.49-51.
2. **Арсеньева, Т.Е.** Подходы к видовому типированию двойных микст-культур, включающих бактерии возбудителя псевдотуберкулеза и атипичных штаммов чумного микроба / **Т.Е. Арсеньева**, А.Л. Трухачёв, С. А. Лебедева, Н.В. Божко, Л.К. Лысова // Клин. лаб. диагностика. - 2007. - №8. - С.52-56
3. Трухачёв, А.Л. Поиск праймеров на основе хромосомной ДНК *Yersinia pestis* для наиболее эффективной ПЦР – идентификации типичных и атипичных штаммов возбудителя чумы / А.Л. Трухачёв, В.С. Иванова, **Т.Е. Арсеньева**, С. А. Лебедева, Е.В. Гончаренко // Клин. лаб. диагностика. – 2008. - №12. - С.49-52.
4. **Арсеньева, Т.Е.** Сравнение эффективности тестов для дифференциации типичных и атипичных штаммов *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis* / **Т.Е. Арсеньева**, С. А. Лебедева, А.Л. Трухачёв, Е.А. Васильева, В.С. Иванова, Н.В. Божко // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол.- 2010. - №4. - С.75-81.
5. Трухачёв, А.Л. Прием экспресс-анализа мик-культур возбудителей чумы и псевдотуберкулеза / А.Л.Трухачёв, **Т.Е. Арсеньева**, С. А. Лебедева, Е.А. Васильева // Клин. лаб. диагностика. – 2011. - №7. - С.47-49.
6. **Арсеньева, Т.Е.** Особенности штаммов возбудителя чумы, не продуцирующих основного капсульного антигена F1, и апробация отдельных методов их детекции / **Т.Е. Арсеньева**, А.Л. Трухачёв, Е.А. Васильева, И.В. Морозова, С. А. Лебедева // Universum: Химия и биология: электрон. науч. журн.- 2014. - №8(8). URL: <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/1513>.
7. Трухачёв, А.Л. Некоторые свойства рекомбинантов иерсиний с плазмидами rFra и rCad бактерий чумы / А.Л. Трухачёв, Е.А. Васильева, **Т.Е. Арсеньева**, И.В. Морозова, А.П. Кочеткова, С. А. Лебедева // Universum: Химия и биология: электрон. науч. журн.-2015. - №1-2(11). URL: <http://7universum.com/ru/nature>

/archive/item /1513.

Патент

8. Трухачёв, А.Л. Патент № 2422535 RU. МПК С1. С12Q 1/68 (2006/01).
Способ идентификации штаммов вида *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* / А.Л. Трухачёв, **Т.Е. Арсеньева**, С. А. Лебедева, Л.П. Алексеева, Е.А. Васильева, (RU) № 2422535; заявлено 11.01.2010. - Бюл. №18.-15с.

Публикации в материалах конференций

9. Лебедева, С.А. Атипичные иерсинии, выделенные в Санкт-Петербурге / С.А. Лебедева, А.В. Ракин, В.С. Иванова, **Т.Е. Глазко (Т.Е. Арсеньева)** // Природно-очаговые инф. в России: соврем. эпидемиол., диагностика, тактика защиты населения: Матер. Всерос. научно-практ. конф. - Омск, 1998. - С.157-158.

10. Лебедева, С.А. Выявление атипичных штаммов в коллекции *Y.pseudotuberculosis* / С.А. Лебедева, В.С. Иванова, А.В. Ракин, И.А. Семёнова, **Т.Е. Глазко (Арсеньева Т.Е)** / Идеи Пастера в борьбе с инфекциями: Матер.2-й Междунар. конф., посвящ. 75-лет. ин-та Пастера, - Санкт-Петербург, - 1998.-С.160.

11. Лебедева, С.А. О некоторых проблемах в подходах дифференциальной диагностики возбудителей чумы и псевдотуберкулёза / С.А. Лебедева, В.С. Иванова, А.В. Ракин, А. Л. Трухачёв, **Т. Е. Глазко (Т.Е. Арсеньева)** // Акт. вопр. особо опасн. инф.: Матер. Регион. науч.-практ. конф.- Нальчик, 2000.- С.36-38.

12. Trukhachev, A. Detection of typical and atypical strains of *Yersinia pestis* with the help of PCR / A.Trukhachev, S. Lebedeva, V. Ivanova, **T. Arsenjeva** // Abstracts of 9-th International Symposium of *Yersinia*.- Lexington, USA, -2006. - P.74. - A 113.

13. **Арсеньева, Т.Е.** Эффективность различных диагностических тестов при идентификации диссоциирующих атипичных и «спорных» штаммов *Yersinia pestis* / **Т.Е. Арсеньева**, С.А. Лебедева, А. Л. Трухачёв // Матер. науч.-практ. конф. – Ставрополь, -2007. - Ч.1. - С.142.

14. **Арсеньева, Т.Е.** Проблемы дифференциальной диагностики *Yersinia pestis* от *Yersinia pseudotuberculosis* / **Т.Е. Арсеньева**, А. Л. Трухачёв, Е.А. Васильева, С.А. Лебедева // Диагностика, лечение и профилактика опасных и особо опасных инф. заболеваний. Биотехнология: Матер. Всерос. науч. конф., посвящ. 70-лет. со дня основания ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России». - Киров, 2008. - Вып.1. - С.42-46.

15. Трухачёв, А.Л. Взаимоотношения возбудителей чумы (*Yersinia pestis*) и псевдотуберкулёза (*Yersinia pseudotuberculosis*) и проблемы, связанные с ними / А.Л.Трухачёв, С.А. Лебедева, **Т.Е. Арсеньева**, Е.А. Васильева // Национальные приоритеты России: Матер. Всерос. конф. с международ. участ., посвящ. 70 – лет. теории академика Е.Н. Павловского о природной очаговости болезней «Актуальные проблемы природной очаговости болезней» – Омск, 2009. -№ 2. - С.136-137.

16. Трухачёв, А.Л. Дифференциация возбудителя чумы от возбудителя псевдотуберкулёза с помощью мультилокусной ПЦР в пробах, содержащих одновременно оба вида микроорганизмов / А.Л. Трухачёв, **Т.Е. Арсеньева**, С.А. Лебедева, Е.А. Васильева // Современные аспекты эпидемиологического надзора и профилактики особо опасных и природно очаговых болезней: Матер. науч. – практ.конф. посвящ. 75-лет. ФГУЗ Иркутский НИПЧИ Сибири и Д. Востока. - Иркутск, 2009. – Ч.3. - С.207-208.

17. **Arsenjeva, Т.Е.** Detection of *Yersinia pestis* strains with different phenotypes in infected animals / A.L. Trukhachev, I.V. Morozova, **T.Е. Arsenjeva** // Medical

Biodefence Conference-Munich, 2009. - V.4, - P.29-30.

18. Трухачёв, А.Л. Экспресс – диагностика возбудителей чумы и псевдотуберкулеза при возможном формировании бивалентных *mix*-культур / А.Л. Трухачёв, Т.Е. Арсеньева, С.А. Лебедева, Е.А. Васильева// Актуал. пробл. предупред. и ликвид. последствий чрезвыч. ситуаций в области сан.-эпид. благополучия населения госуд.-участ. СНГ. Матер. X межгос. научн.- практ. конф. госуд.- участ. СНГ: – Ставрополь, 2010. - С.232-233.

19. Лебедева, С.А. Особенности скрининга и идентификации «бесфракционных» штаммов *Yersinia pestis* / С.А. Лебедева, Т.Е. Арсеньева, Е.А. Васильева, А.Л. Трухачёв // «Молекулярная диагностика»: – Сборник трудов VII Всерос. науч.- практ. конф. с междунар. участием.- М., 2010. -Т.1. - С.403-405.

20. Арсеньева, Т.Е. О взаимоотношении возбудителей псевдотуберкулёза (*Yersinia pseudotuberculosis*) и чумы (*Y. pestis*) в природных очагах / Т.Е. Арсеньева, С.А. Лебедева, А.Л. Трухачёв // Матер. 3-й Всерос. науч.- практ. конф. с междунар. участием «Инфекции, обусловленные иерсиниями», - Санкт-Петербург, - 2011.-С.21-23.

21. Трухачёв, А.Л. Трансальдолаза – один из наиболее иммунологически активных компонентов препарата «фракцияV» *Yersinia pestis* / А.Л.Трухачёв, П.Х. Копылов, Т.Е. Арсеньева, С.А. Лебедева, А.П. Анисимов // «Молекулярная диагностика»: – Сборник трудов IX Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – М, 2017. -Т.1. – С. 342-343.

Благодарности

Приношу искреннюю благодарность научному руководителю кандидатской диссертации д.м.н., проф. Светлане Александровне Лебедевой, оказавшей помощь на всех этапах работы, а также зав. лаб. микробиологии чумы и др. иерсиниозов Трухачёву Алексею Леонидовичу и всем моим соавторам, принимавшим участие и оказавшим помощь в проведении экспериментов в РостНИПЧИ и ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск).