

**Федеральное казённое учреждение здравоохранения
«Ростовский-на-Дону Ордена Трудового Красного Знамени
научно- исследовательский противочумный институт» Федеральной
службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия
человека**

На правах рукописи

АРСЕНЬЕВА ТАТЬЯНА ЕВГЕНЬЕВНА

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

03.02.03 - микробиология

**Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор Лебедева С. А.**

Ростов-на-Дону – 2017

Глава 3. СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕГЛАМЕНТИРОВАННЫХ ТЕСТОВ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ШТАММОВ <i>Y. PESTIS</i> И <i>Y. PSEUDOTUBERCULOSIS</i>.....	67
3.1. Вариабельность диагностических признаков, затрудняющая идентификацию штаммов иерсиний, и выбор наиболее надёжных тестов, определяющих видовую принадлежность.....	67
3.2. Подходы к идентификации атипичных диссоциирующих штаммов чумного микроба и дифференциации их от бактерий псевдотуберкулёза	78
Глава 4. ПОДХОДЫ К ДЕТЕКЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ СМЕШАННЫХ КУЛЬТУР ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЧУМЫ И ПСЕВДОТУБЕРКУЛЁЗА.....	90
4.1. Приём обнаружения смешанных культур возбудителей чумы и псевдотуберкулёза.....	90
4.2. Подход к разделению и идентификации смешанных культур <i>Y. pestis</i> и <i>Y. pseudotuberculosis</i>	93
Глава 5. ОСОБЕННОСТИ СВОЙСТВ И ДЕТЕКЦИИ ШТАММОВ <i>Y. PESTIS</i>, НЕ ПРОДУЦИРУЮЩИХ КАПСУЛЬНЫЙ АНТИГЕН «ФРАКЦИЯ 1» (F1).....	96
5.1. Некоторые свойства «бесфракционных» штаммов <i>Y. pestis</i> и подходы к их идентификации.....	96
5.2. Эксперименты на биопробных животных, различающихся по чувствительности к F _{ra} ⁻ штаммам <i>Y. pestis</i> , и идентификация выделенных от них культур.....	99
5.3. Возможные подходы для выяснения причин нарушения продукции антигена F1.....	104

Глава 6. ИССЛЕДОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТОВ <i>Y. PSEUDOTUBERCULOSIS</i> С ПЛАЗМИДАМИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ	111
6.1. Некоторые свойства рекомбинантных вариантов возбудителя псевдотуберкулёза с pFra и pCad плазмидами бактерий чумы и подходы к их детекции.....	111
Глава 7. ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИГЕННОГО КОМПЛЕКСА FV <i>Y. PESTIS</i>.....	122
7.1. Первичная характеристика препаратов антигена FV.....	122
7.2. Выявление иммунологически активных компонентов антигена FV.....	127
7.3. Анализ <i>tal</i> -гена.....	130
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	137
ВЫВОДЫ.....	153
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	155
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В РАБОТЕ..	197
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	199
ПРИЛОЖЕНИЯ. (Перечень исследованных штаммов и выявленные их особенности)	203

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы.

Входящий в состав рода *Yersinia* [133] обособленный недавно 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) [281, 319]. 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 [110, 309]. В сумме это привело к превращению отщепившегося клона в отдельный, с точки зрения медицины, вид, сохранивший значительную гомологию генома с предшественником [174, 208, 279, 302, 307].

Предложение объединить оба микроба в один вид *Y. pseudotuberculosis* [217] не принято из-за различий в экологии, путях распространения, контагиозности, клинической картине; тяжести заболевания и высокой смертности при чуме. Однако из-за высокой гомологии генома оба возбудителя сохранили одну таксономическую позицию в составе комплекса «*Y. pseudotuberculosis*» в качестве группы *Y. pestis/Y. pseudotuberculosis*.

Y. pestis передаётся от человека человеку через повреждённые кожные покровы, слизистые или аэрозольно. Сохраняется в природных очагах в организме грызунов и их эктопаразитов, периодически вызывая губительные эпизоотии. Вторичными носителями могут быть сайгаки, олени, верблюды, хищники и в отдельных случаях птицы [13, 170]. Для псевдотуберкулёзного микроба характерен фекально-оральный путь передачи. Он вызывает местную или генерализованную инфекцию, протекающую в хронической или острой форме, для которой характерен полиморфизм клинических проявлений преимущественно с признаками поражения желудочно-кишечного тракта,

опорно-двигательного аппарата и кожи [205]. В природе существует в организме грызунов, в инфицированной почве, на растениях в овощехранилищах. Условия работы с обоими возбудителями резко отличаются: с *Y. pestis*, относящейся к I группе патогенности, манипуляции выполняются в BSL3 (P3) лабораториях; работа с бактериями псевдотуберкулёза (III группа патогенности) – в обычных BSL2 лабораториях.

Оба вида не однородны. Однако у возбудителя псевдотуберкулёза эта неоднородность выражена в большей степени. *Y. pestis* продуцирует ЛПС, лишённый O-боковых цепей, R-форма ЛПС, соответствующая R-форме колоний. И в основном, серологически однородна, хотя у обеих иерсиний возможны в той или иной степени штаммовые или температурозависимые вариации структуры полисахаридных цепей [51]. Бактерии вида *Y. pseudotuberculosis* при температурах ниже 36 °C продуцируют полноценный O-антиген (S-форма ЛПС, соответствующая S-форме колоний), но из-за вариаций структуры O-ветвей ЛПС вид *Y. pseudotuberculosis* представлен более чем 20 сероварами, которые по фенотипу могут отличаться между собой больше, чем от *Y. pestis* [167]. Некоторые из этих серовариантов вызывают заболевания у людей, иногда тяжёлые. При определённом сходстве *Y. pseudotuberculosis* с возбудителем чумы актуальны поиски фенотипических маркеров и специфических диагностических антигенов для совершенствования дифференциации таких иерсиний и диагностики.

Клеточная поверхность бактерий *Y. pestis* при температуре ≥ 37 °C экранирована капсулой, основной составляющей которой является иммунодоминантный капсульный антиген «фракция 1» (F1) [214], идентифицированный как CafI белок. Его синтез контролируется видоспецифичной плазмидой rFra, которая может утрачиваться или обладать мутациями в *caf*-опероне. В таких случаях капсула не образуется, что затрудняет диагностику [3]. В связи с этим представляются актуальными поиски альтернативного видоспецифического антигена.

Вид *Y. pestis* условно дифференцируют на эпидемичный основной Rha⁻ подвид и его биовары [237], представленный возбудителем чумы у людей, и более близкий к *Y. pseudotuberculosis*, неосновной Rha⁺ подвид, включающий разные географически приуроченные варианты [254, 313, 350], неэпидемичные или даже авирулентные для людей [241]. Каждый из них имеет типичные штаммы с характерными для подвида, строго определёнными признаками [7, 91, 142, 187, 240, 350]. При изменении любого из признаков или нескольких формируются атипичные штаммы. Они описаны в литературе, хотя механизм их образования не всегда ясен. В последнее время предложено значительно большее число внутривидовых групп *Y. pestis*, зачастую в той или иной степени схожих с возбудителем псевдотуберкулёза. Современные методы генотипирования делят штаммы на клональные кластеры/филогенетические группы, соответствующие очаговой и подвидовой принадлежности [72, 208]. Но они не всегда общедоступны. Однако для обеспечения задач перед внутривидовой градацией необходимо располагать простыми уникальными маркерами, которые не меняют своей идентифицирующей эффективности и сохраняют видоспецифичность при всех известных формах изменчивости бактерий. Без этого сложно решать проблемы диагностики, эпидемиологии чумы, а также регламентировать таксономические позиции групп, составляющих вид *Y. pestis*, классифицировать и изучать их природную вариабельность [43].

Степень разработанности темы исследования.

Фенотипические маркеры могут подвергаться изменчивости и не могут гарантировать точность идентификации [58].

Методы иммунологической диагностики чумы направлены на поиск в сыворотках крови больных антител к специфическому для *Y. pestis* антигену, и видоспецифического антигена с помощью чумных диагностических моно- и поликлональных антител. Эти тесты имеют ряд существенных преимуществ перед методами бактериологического анализа: простота постановки, высокая чувствительность, ускоренный ответ (2-4 ч), упрощенность исследования

материала, непригодного для бактериологического анализа или требующего более трудоемких приемов (загнившие и мумифицированные трупы животных, погадки хищных птиц, субстраты гнездовой камеры грызунов, скрытые в инкапсуляциях формы возбудителя).

За истекшие десятилетия для диагностики чумы были предложены и апробированы разные типы диагностикумов. Многие из них в силу недостаточной чувствительности или антигенной специфичности не получили широкого распространения, хотя в научных исследованиях применяются. Продолжение исследования антигенного состава возбудителя чумы, начатое более полувека назад [77, 282, 331] актуально и сейчас не только в плане диагностики чумы и идентификации возбудителя, но и в связи с особой видоспецифической биологической ролью каждого из антигенов. Вполне понятно, что для этих целей целесообразно использовать антигены, проявляющие наибольшую степень специфичности для чумного микроба [117]. Основные препараты для иммунодиагностики чумы первоначально и до настоящего времени сконструированы при использовании в качестве сенситина специфического капсульного антигена F1 (Ca1) *Y. pestis* и антител к нему. Использовался этот антиген и антитела к нему при изготовлении как коммерческих форм диагностикумов, так и экспериментальных авторских [18, 180].

Однако многолетняя практика исследований возбудителя показала существование в природе и у больных людей вариантов чумного микроба, лишенных антигена F1 [225, 289, 339, 340]. Во многих случаях это штаммы с пониженной вирулентностью, но встречаются и с достаточно высокой вирулентностью. Все они способны вызывать заболевания, иногда тяжелые, но часто затяжные по форме проявления. В связи с этим проблема быстрого, точного и широкодоступного метода выявления и идентификации чумного микроба, дефектного по F1-антигену, более сложна, а потому более актуальна, чем в отношении его значительно изученных полноценных вариантов.

Острота проблемы усиливается ещё и возможными затруднениями в лечении этих форм инфекции [159].

В связи с этим при разработке методов идентификации помимо F1 антигена исследователи проявляют интерес к другим антигенам и соответствующим антителам. Выявление заражённых эктопаразитов при чумных эпизоотиях в эксперименте удавалось с помощью диагностикумов на основной соматический антиген (ОСА) и «мышинный» токсин. При этом обнаруживались не только бесфракционные штаммы, но и бактерии чумы, находящиеся в L-форме [164, 165]. Диагностическая ценность известного для возбудителя чумы V-антигена, участвующего в реализации вирулентности, ограничена его специфичностью ещё для двух других иерсиний (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*) [212, 293]. Описаны авторские образцы препаратов для обнаружения антигена рН 6 с помощью ИФА [34], но этот антиген есть и у возбудителя псевдотуберкулеза [301]. Использование порина OmpF в силу его вариабельности требует особого подхода [323].

К числу поверхностных антигенов относится липополисахарид (ЛПС). Изучены их структура и свойства [15, 30, 46, 67, 107, 178, 276]. Характеристика ЛПС, особенности его генетической детерминированности, структуры и биологической активности, а также данные о структуре и свойствах липида А у чумного микроба описаны довольно подробно [195, 211]. Дана положительная оценка диагностических свойств ЛПС, а также ценность препарата, приготовленного на основе ЛПС чумного микроба, при выявлении бактерий чумы, не продуцирующих F1 [47, 231]. Оказалось, что в организме животных, заражённых чумой, иногда легче выявить антитела к ЛПС, чем к антигену F1. В связи с этим диагностикум на ЛПС апробировали для определения эффективности лечения антибиотиками [185]. Показана возможность конструирования на основе суммарного препарата белков внешней мембраны антигенных и антительных диагностикумов, которые способны в целевом эксперименте выявлять «бесфракционные» штаммы

возбудителя чумы [203, 204]. Имеются сведения о конструировании диагностикума на основе активатора плазминогена Pla возбудителя чумы [31].

Однако, указанные препараты представлены в форме авторских экспериментальных и не получили широкого распространения, а активатор плазминогена оказался не видоспецифическим [213, 256]. Поэтому, невзирая на проводимые работы, проблема диагностики чумы с помощью иммунопрепаратов, иных, чем на F1-антиген, сохраняет свою актуальность, и исследования в этом направлении продолжаются. Работы по созданию диагностикумов осложняются по разным причинам. Среди них трудности получения чистых антигенных монопрепаратов, их молекулярная идентификация, нестабильность их и специфических антител некоторых классов. Значительная фенотипическая и генотипическая вариабельность чумного микроба с мутациями генов-мишеней, таких как *cafI*, *mur*, *pla*, *lcrV* или недостаточная специфичность [3, 213] также позволяет чумному микробу «ускользнуть» от выявления соответствующими диагностикумами.

В поисках антигенов, перспективных для решения перечисленных выше проблем наше внимание привлёк атоксичный антигенный комплекс FV, извлечённый поэтапно после воздействия на бактерии продуцента возрастающими концентрациями ДОХ (третон-X100) из бактерий *Y. pestis* EV1290 - потомка вакцинного штамма, не способного продуцировать антиген F1 [21, 22, 23]. По данным авторов комплекс FV оказался специфическим для возбудителя чумы, синтезировался при 28 °С и 37 °С, независимо от плазмид и не требовал особой питательности сред культивирования бактерий-продуцента. Иммунокомпетентной его основой была белковая составляющая препарата (по Lowry до 50 %). Судя по результатам гель-электрофореза, препарат содержал несколько минорных белков с разной Мм. и два мажорных с М.м. 38 и 42-43 kDa. Антитела к тотальному препарату с помощью реакции диффузионной преципитации обнаружены в противочумной коммерческой лошадиной и экспериментальной кроличьей сыворотках, а также после иммунизации линейных мышей бактериями полностью бесплазмидного

штамма чумного микроба TRU в одном из образцов МКА [18]. Эти данные подтвердили иммуноактивность FV, и позволили провести ряд дальнейших исследований, в том числе сконструировать экспериментальный антигенный эритроцитарный диагностикум на основе FV и авторский антителный поликлональный коагглютинирующий (КоА). Эритроцитарный диагностикум с тотальным антигеном FV позволял определять иммунологические сдвиги в сыворотке крови иммунизированной вакцинным штаммом *Y. pestis* EV и экспериментальным атипичным его Fra⁻ Tox⁻ вариантом. С помощью эритроцитарного FV-диагностикума сдвиг выявлялся в большем числе проб крови и дольше после момента инфицирования, чем в случае анализа по F1 антигену [23]. Специфичность FV-эритроцитарного диагностикума подтвердилась негативными результатами в пробах с гетерогенными сыворотками (типовыми псевдотуберкулезными, бруцеллезными, туляремийной, сапной, колийной, брюшнотифозной и дизентерийной). Авторский образец КоА-диагностикума видоспецифически реагировал только с типичными штаммами чумного микроба, выборкой контрольных атипичных Fra⁻ штаммов *Y. pestis* и единичными штаммами *Y. pseudotuberculosis* в R-форме. Диагностикум был апробирован в условиях природного очага чумы. Гибридная линия МКА Е6/Н8, содержала мышинные иммуноглобулины класса IgM, ведущие участники первичного гуморального ответа на чумную инфекцию [18]. МКА Е6/Н8 специфически реагировали с тотальным препаратом FV и ограниченной выборкой штаммов чумного микроба, типичных и лишённых основного диагностического антигена F1. При конкурентном ИФА-анализе МКА линии Е8/Н6 почти полностью ингибировались тотальным препаратом FV, не реагировали с известными антигенами чумного микроба – ЛПС, F1 и рН 6, а также с бактериями разных видов сем. *Enterobacteriaceae*, но проявляли некоторую «заинтересованность» в контрольном штамме возбудителя псевдотуберкулёза. При пассивной иммунизации белых мышей и морских свинок с помощью МКА линии Е6/Н8 после заражения 20 DCL вирулентного штамма чумного микроба выживало

10–20 % животных [18]. Все эти данные заслуживают внимания и подтверждают перспективность и актуальность анализа антигена FV, а также определения возможности использования его составляющих в практических и научных целях при исследовании возбудителей чумы и псевдотуберкулеза.

С развитием молекулярной биологии и ПЦР-анализа появились тесты для обнаружения и характеристики штаммов, более точные, чем фенотипический и иммунологический анализ. Принятый в практике набор маркеров для идентификации штаммов основного подвида чумного микроба и их дифференциации от *Y. pseudotuberculosis* [84, 111] включает ряд признаков фенотипа, биологический тест на модели лабораторных животных и ПЦР с праймерами на плазмидные гены чумного микроба *cafI* и *pla* и праймерами «За», комплементарными видоспецифическому фрагменту хромосомы *Y. pestis*. Такой подход решает вопросы диагностики классических форм заболевания чумой и позволяет выявить типичные штаммы её возбудителя, сохраняющие плазмиды. Однако в природе встречаются варианты *Y. pestis* с выраженной естественной изменчивостью основных диагностических признаков фенотипа, которые сложно дифференцировать от близкородственной *Y. pseudotuberculosis*. Известны штаммы с дефектами *cafI* гена и фрагмента хромосомы, комплементарного паре праймеров «За». В свете последних данных сомнение вызывает и специфичность *pla*-гена [213]. Клоновые варианты микроба чумы с «маскирующей» формой изменчивости возникают на разных стадиях эпизоотий, зарегистрированы в лабораторных условиях, на отдельных этапах формирования или реверсий L-форм [11, 113, 149]. Спонтанное изменение признаков фенотипа бактерий обеспечивает выживание чумного микроба как вида, но затрудняет его идентификацию и может обуславливать бесконтрольное распространение возбудителя чумы. Особенно важно, что у многих атипичных вариантов (бесплазмидных, «бесфракционных», фагоустойчивых) изменена вирулентность, отмечаются особенности патогенеза. Необходимость тщательного контроля, особенно над «бесфракционными» штаммами, подчеркивается в мировой литературе [321].

Успехи молекулярно-генетических конструкторских исследований по определению роли отдельных *caf*-генов, участвующих в синтезе видоспецифического F1-антигена *Y. pestis*, не снимают необходимости выяснения молекулярных механизмов естественной (возможно регулируемой) изменчивости этих генов, определения её значимости для сохранения возбудителя чумы в природе и решения вопроса о реверсibility этих изменений, последствия которой могут быть самыми тяжёлыми. Разработка подходов к решению этих проблем представляется нам актуальной.

Существующие бактериологические методы детекции в отношении изменённых форм *Y. pestis* не всегда надёжны или весьма трудоёмки. Иногда их фенотип настолько приближается к *Y. pseudotuberculosis*, что их трудно дифференцировать [2, 65, 168]. Для идентификации вида требуются уникальные надёжные критерии, способные дифференцировать оба вида желательно с наименьшими временными, трудовыми и материальными затратами. Ситуация более напряженная в природных зонах, где циркулируют бактерии обоих видов и, возможно, их рекомбинанты. Кроме того, в последнее время получили развитие работы по конструированию гибридов этих иерсиний и комбинированных вакцин [236, 270]. Для контроля над ними также требуются доступные широкому кругу специалистов надёжные приёмы полезные при поиске природных гибридных форм, который до сих пор не проводился.

При идентификации разных штаммов, имеющих нехарактерный фенотип важна точная первичная видовая ориентировка. Без стабильного надёжного широкодоступного критерия, который чётко очерчивает границы вида *Y. pestis* во всём разнообразии его фенотипа, трудно правильно определить варианты биологически целесообразной изменчивости, позволяющей чумному микробу в различных природных условиях выживать как виду и сохранять свой патогенный потенциал.

Разработаны молекулярно-биологические приёмы полной детализации структуры геномов [235, 274]. Они включают полногеномный секвенс,

программное сравнение последовательностей, мультилокусный контроль с использованием наборов разнообразных маркеров и последующего секвенирования ампликонов, используют анализ SNP последовательностей и другие методы. С увеличением числа праймеров и анализируемых сайтов увеличивается время анализа проб и различные затраты. С учётом возможности утраты плазмид наиболее экономичным и точным тестом для определения вида, на наш взгляд, может быть ПЦР с праймерами на консервативный видоспецифический фрагмент хромосомы [232], который сохраняется у всех типичных и атипичных штаммов *Y. pestis*, и способен быть мишенью праймеров при нахождении бактерий *in vitro* и *in vivo*. Поиски и широкую апробацию таких праймеров можно оценить как актуальную. Для идентификации типичных штаммов предложены «хромосомные» праймеры «За» [313], включённые в набор «Ген *Yersinia pestis* идентификация» [83]. Однако их тотальная эффективность в отношении разных множественно изменённых штаммов, смешанных культур и рекомбинантов двух видов иерсиний до начала нашей работы не исследовалась. Предложение любых праймеров с большей эффективностью по одному из этих пунктов будет иметь преимущества. Кроме того, поскольку при первичном поиске возбудителя чумы предметом анализа может быть значительное число проб, для безошибочной первичной детекции вида иерсиний необходим общедоступный приём, краткий по времени и объёму выполнения, превосходящий фенотипический анализ по эффективности и точности. Такой метод будет очень полезным и повысит эффективность генетических, микробиологических и таксономических исследований возбудителя чумы и родственных бактерий псевдотуберкулёза. В нашей лаборатории исследования атипичных штаммов иерсиний в этом направлении получили развитие [183]. Основой такого метода может быть простая в исполнении широкодоступная монолокусная ПЦР с парой праймеров на консервативный фрагмент хромосомы и простой в выполнении тест на специфический антиген, сохраняющийся у *Y. pestis* при всех типах фенотипической изменчивости.

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[±] штаммов *Y. pestis*, сохраняющих плазмиду rFra, 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 pFga 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 («vlm12/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 (pKoA) 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 17.12.2015) используют 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 «vlm» (*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 ПЦР-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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика двух эволюционно связанных видов иерсиний

Из трёх наиболее патогенных для человека иерсиний (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*) самым агрессивным является возбудитель бактериальной чумы, способный вызывать эпидемии и пандемии с высоким уровнем летальности [225]. Поэтому он привлекает главное внимание специалистов. Наиболее родственным, проявляющим значительное сходство с возбудителем чумы по диагностическим признакам, но не по клинике и степени опасности для людей, признан микроб псевдотуберкулёза [208], который, по мнению исследователей, имеет более раннее происхождение и является «предком» чумного микроба. Существуют определённые проблемы с идентификацией и дифференциацией вариантов обоих видов с природной изменчивостью признаков, которые в разные исторические периоды использовались для видового разграничения.

1.1.1. Общие представления о чуме, псевдотуберкулёзе и их возбудителях

Псевдотуберкулез – острый инфекционный зооноз [206]. Носителями инфекции являются грызуны, чаще домовые, некоторые виды диких и домашних птиц, кошки, собаки, овцы, верблюды. Псевдотуберкулёзный микроб влаголюбив и чаще обнаруживается в более холодных влажных районах ряда стран. В России более интенсивно циркулирует в Северо-Западном регионе, на Дальнем Востоке, в Западной Сибири, Забайкалье, на Алтае. Спорадически регистрируется в странах Европы, Северной и Южной Америке и отдельных районах Азии [158, 225, 268, 335]. Заражение людей

псевдотуберкулезом происходит фекально-оральным путём, в том числе при употреблении инфицированных продуктов, длительно хранящихся в холодильных камерах [206]. Вспышки и спорадические случаи заболевания обычно регистрируются осенью и зимой. Для человека характерен полиморфизм клинических проявлений и нередко хроническое течение с аллергическими проявлениями. Поражается желудочно-кишечный тракт, кожа, опорно-двигательный аппарат и другие органы [225].

Бактериальная чума – острое инфекционное природноочаговое заболевание. Вызывает её микроб чумы (*Y. pestis*), который сохраняется в популяциях некоторых видов грызунов – постоянных носителей инфекции (сурков, сусликов, песчанок, крыс), обитающих в определённых природных очагах чумы во всех частях света, кроме Австралии и Антарктиды. Возбудитель чумы патогенен для человека, грызунов, зайцеобразных, хищников, парнокопытных, приматов и лабораторных животных. Природные очаги, где он персистирует, расположены в основном в зонах с жаркими и засушливыми летом, в пустынной, гористой местности и на побережьях морей, изобилующих поселениями людей. В России природные очаги чумы расположены на Северном и Центральном Кавказе, в Калмыкских степях, Среднем и Нижнем Поволжье, на территории Волго-Уральского междуречья, Горного Алтая, Тувы, Предбайкалья и Забайкалья [173]. В популяциях различных по чувствительности диких грызунов её возбудитель циркулирует годами. Заражение происходит, в основном, через укус инфицированных блох, иногда клещей, при непосредственном контакте больных животных, некрофагии, поедании заражённых блох и др. Человек инфицируется при укусе переносчиками, при непосредственном контакте с заразным материалом и аэрозольно. В зависимости от пути распространения инфекции, формируется бубон, чумной сепсис, первичная или вторичная пневмония. У диких грызунов чума регистрируется в виде спорадических случаев, мелкоочаговых вспышек или разлитых эпизоотий, периодически затухающих и вспыхивающих вновь. Среди людей бывают спорадические заболевания,

вспышки, эпидемии и пандемии. Передача воздушно-капельным путем способствует быстрому эпидемическому распространению инфекции с высоким уровнем летальности. До сих пор чума остается серьезной проблемой для человечества [278] из-за активных перемещений населения и распространения штаммов с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя [58, 70, 228, 253, 266, 300].

Y. pseudotuberculosis – грамотрицательная палочковидная бактерия, не образующая спор [167]. Сосуществует с бактериями почвы или кишечника теплокровных, приспосабливаясь к разным условиям [29]. Хорошо размножается при низкой температуре (4–10 °C), но может и при 36–40 °C. Оптимум – при 26–30 °C. Метаболизм микроба и фенотип термозависим. Ниже 30 °C бактерий образуют жгутики и становятся подвижными [29]. Микроб способен размножаться в почве, при этом сохраняет вирулентность [167, 226, 330]. Инвазин, участвующий в проникновении инфекции *in vivo*, продуцируется при +4 °C, а при +37 °C ингибируется [60].

Возбудитель чумы – короткие грамотрицательные палочки, не образующие спор. В мазках из органов и бульонных культур окрашиваются биполярно. Могут проявлять полиморфизм. В мазках из бубонов и органов, трупов обнаруживаются шары, нити, тени и др. Микроб не подвижен. В организме теплокровных и *in vitro* при 37 °C образует видоспецифическую капсулу. Может расти при 40 °C, оптимум роста –28–30 °C, но размножается и при более низкой температуре [59]. Однако имеются наблюдения, что при низких температурах *Y. pestis* может переходить в некультивируемое состояние [303].

Y. pseudotuberculosis при низких температурах – прототроф. Отмечен рост на голодных синтетических средах и даже в дистиллированной воде [163]. При повышении температуры – некоторые штаммы проявляют ауксотрофность [29]. *Y. pestis* – хемогетеротроф независимо от температуры. Хорошо размножается только на полноценных питательных средах при pH 5,8–8,0. Природный ауксотроф – возбудитель чумы – не растёт на голодных

средах: ему необходимы определённые аминокислоты и витамины. Штаммы, выделенные из разных очагов, иногда отличаются по питательным потребностям [55, 125, 177, 181]. При температуре выше 30°C у всех штаммов расширяется потребность в факторах роста [9].

Типичные бактерии *Y. pseudotuberculosis* ферментируют L-рамнозу и арабинозу, мочевины, глицерин, активны в денитрификации. Бактерии *Y. pestis* не ферментируют, как правило, сахарозу, лактозу, мелибиозу и рамнозу и в большинстве случаев мочевины. Есть неактивная β -галактозидаза. Среди штаммов *Y. pestis* зарегистрированы ферментирующие глицерин (Glp+) и обладающие денитрифицирующей (Nap+) активностью, и не способные к этому [57].

Y. pseudotuberculosis при пониженной температуре растёт в гладкой S-форме. Выше 28°C активно переходит в шероховатую R-форму или промежуточные OR, OS. Колонии полиморфны по размеру, форме, цвету. Микроб устойчив во внешней среде. До года отмечено его сохранение в почве. *Y. pestis* на агаровых средах образует видоспецифический рост в виде «битого стекла» и «кружевных платочков», а затем - колоний с мелкозернистым центром и «кружевной» каймой (в R-форме независимо от температуры). На выраженность каймы влияет состав питательной среды. Для роста малых посевных доз требуется добавление стимуляторов роста [57, 111].

Y. pseudotuberculosis температурозависимо синтезирует O-антиген [32, 328]. Вариабельность структуры боковых цепей O- и жгутиковых H-антигенов обусловила появление более 21 сероварианта [52, 288, 336]. По признакам и клиническим проявлениям инфекции представители вида *Y. pseudotuberculosis* в разных зонах отличаются друг от друга иногда даже больше, чем от чумного микроба [199]. Вид *Y. pestis* не обладает O-антигеном [328]. Основным диагностическим маркером для него является капсульный антиген F1. Он оценивается как серологически однотипный для всех штаммов *Y. pestis* [214], хотя возможны мутационные изменения структуры F1 и иммунологической специфичности [3, 191, 275].

Исторически сложилось, что стабильные вариации фенотипов позволили разделить вид *Y. pestis* на: а) подвиды Rha^- subsp. *pestis* и Rha^+ subsp. *microtus* [118, 142], а также б) биоварианты, отличающиеся по способности к денитрификации и ферментации глицерина: *antique* (Glp⁺, Nap⁺), *mediaevalis* (Glp⁺, Nap⁻), *orientalis* (Glp⁻, Nap⁺) [237]. Существующие возможности секвенса геномов, определения их сходства и различий создало основу разделения вида *Y. pestis* на отдельные клоновые и кластерные группы, отражающие подвидовую и очаговую принадлежность штаммов, а также их эволюционную связь и индивидуальные особенности [208].

Биовары чумного микроба оцениваются по особенностям фенотипа [237]. К биовару *antiqua* относят штаммы *Y. pestis* subsp. *pestis* с фенотипом (Nap⁺) и (Glp⁺), характерным и для *Y. pseudotuberculosis*. Фенотип (Nap⁻, Glp⁺) – маркер биовара *medievalis* *Y. pestis* subsp. *pestis*, а фенотип (Nap⁺, Glp⁻) – для биовара *orientalis* *Y. pestis* subsp. *pestis*. Они же ещё называются, соответственно, биовар - античный, средневековый и океанический, или разновидность (по основным носителям) – сурчинный, сусликовый-песчаночий и крысиный. Индивидуальная вариабельность возбудителя чумы, связанная с мутационными изменениями отдельных признаков фенотипа и структуры генома, приводит в каждой таксономической группе к образованию атипичных штаммов и трудностям их идентификации. Особенно при фенотипе, близком к *Y. pseudotuberculosis*.

У разных штаммов *Y. pseudotuberculosis* обнаружено более десятка различных плазмид размером от 2 до 135 МД [154, 156, 198, 200, 201, 202]. Основные плазмиды - pYV 42-48 МД и pVM 82 МД [201, 249, 251, 252]. Для типичных штаммов *Y. pestis* характерны две видоспецифичные плазмиды 60-80 МД (pFra) и 6-8 МД (pPst), а также общая для патогенных иерсиний плазида 46-47 МД (pCad) [262]. Редко выявляются дополнительные криптические плазмиды от 4 до 120 МД [13, 73, 81, 239, 283].

Близкое родство этих микробов доказывается морфологическими, микробиологическими, биохимическими и молекулярно-генетическими ме-

тодами [6, 186, 217, 224, 328]. Общность многих антигенов [145, 282], сходство нуклеинового состава ДНК [19] и геномов у возбудителей псевдотуберкулеза и чумы [217, 226], 16S-структуры рибосомальной ДНК [269] и значительное сходство нуклеотидных последовательностей большинства генов [284] подтверждают это положение. Методом секвенирования ДНК подтвердили их родство. Анализ секвенсов привёл к выводу о наибольшем сходстве геномов *Y. pestis* subsp. *pestis* и серовара O:1b *Y. pseudotuberculosis*, который преобладает в таких районах с суровыми зимами, как Сибирь, Дальний Восток, Монголия и даже в Канаде [133, 167, 251, 252, 310, 335]. Полагают, что именно от него отщепился клон *Prepestis*, родоначальник бактерий, вызывающих чуму [208, 328, 341]. Клон этот претерпел изменения в результате приобретения от других видов микробов автономных репликонов pFra и pPst, профагов [234, 258] фрагментов их хромосом и за счёт амплификации мобильных инсерционных элементов [172, 173, 192, 223, 226, 341, 347, 349]. Происходили и внутривхромосомные перестройки с делециями, транслокациями, единичными заменами нуклеиновых оснований и возникновением «псевдогенов», или иначе «молчащих» генов [226].

1.1.2. Характеристика основных фенотипических признаков для идентификации возбудителя эпидемической чумы (*Y. pestis* subsp. *pestis*) и дифференциации от *Y. pseudotuberculosis*

Главное внимание противоэпидемических служб при охране здоровья людей и контроле над природными очагами привлекают бактерии эпидемически опасного подвида *Y. pestis* subsp. *pestis*. Именно он вызывает распространение классической чумы людей во всём многообразии её клинических форм, как типичных, так и атипично молниеносных или замедленных.

Выделенные от больных людей типичные штаммы *Y. pestis* subsp. *pestis* обладают одинаковыми свойствами, многие из которых есть у большинства представителей всего вида *Y. pestis*, но отсутствуют у типичных вариантов *Y. pseudotuberculosis*. Критериями идентификации и отличия от *Y. pseudotuberculosis* определены типичная R-форма колоний грамотрицательных бактерий, лизис их фагами (чумными диагностическими, Покровской и Лариной (Л-413«С») и псевдотуберкулёзным), образование при 37 °С капсулы, отсутствие жгутиков, подвижности и роста на голодных средах. Показателями типичных бактерий *Y. pestis* subsp. *pestis* признана неспособность ферментировать рамнозу, мелибиозу, мочевины [7, 111], высокая вирулентность при всех методах заражения для белых мышей и морских свинок, а также для указанных выше естественных носителей инфекции в природных очагах чумы. Обязательно наличие двух видоспецифических плазмид (pFra и pPst) и одной общей плазмиды кальцийзависимости (pCad) [307]. Активная антифагоцитарная функция у *Y. pestis* позволяет при идентификации использовать ИЗФ (индекс завершенности фагоцитоза) [28, 151]. Очень важной является также продукция основного видоспецифического антигена F1 [213] под контролем pFra. Разработаны и широко используются серологические реакции с видоспецифическими антигенными и антительными диагностикумами на капсульный F1 антиген *Y. pestis*. Для тестирования F1 используются поликлональные и моноклональные антительные диагностические препараты [18, 49, 162, 180]. Плазмида pFra отвечает также за продукцию «мышинного» токсина с функцией фосфолипазы D [257, 317]. Этот токсин способствует быстрой гибели организмов некоторых природных носителей возбудителя чумы [221] и помогает выживанию его в блохах-переносчиках [265]. Его детерминанта тоже диагностическая.

Гены на плазмиде *pCad* в значительной степени определяют высокую вирулентность [242, 296, 297, 326]. В их числе гены, ответственные за Ca²⁺-зависимость размножения бактерий, за синтез V-антигена (*lcrV*) и

эффektorных белков внешней мембраны (Yop), которые разрушают иммуноактивные клетки макроорганизма и подавляют фагоцитоз [233, 311, 318]. Важно наличие видоспецифического по структуре V-антигена. Плазида pPst, также используется при диагностике, обеспечивает чумному микробу синтез пестицина 1 (Pst), белка иммунитета к пестицину и активатора плазминогена (Pla) [92, 93, 103, 146, 147, 216, 315]. Суммарно эти критерии перечислены в практических руководствах [111].

1.1.3. Дополнительные тесты дифференциации иерсиний по фенотипическим признакам

В качестве дополнительных тестов при исследованиях и дифференциации типичных штаммов двух обсуждаемых иерсиний могут использоваться иммунологические тесты на основе авторских флюоресцирующих антител к различным антигенам [18, 48, 116], наборов авторских моноклональных антител к специфическому для *Y. pestis* антигену F1, ЛПС [189, 190] и к мажорному белку антигена FV [18, 22, 87]. Показана возможность дифференциации по соматическому антигену [64]. Отмечена перспективность испытания диагностикумов на основе мембранных белков [203] антигенного комплекса FV и антител к нему [23] при идентификации штаммов Fra⁻ штаммов *Y. pestis*.

Основываясь на зависимости патогенных свойств у бактерий псевдотуберкулёза и чумы, которые зависят от различий в структуре липида А, вполне возможно, что исследование этого липида может оказаться полезным при решении проблемы дифференциации этих иерсиний [333]. Предложен также дифференциальный метод, основанный на различном отношении этих микробов к макрофагам, который поможет различать вирулентные штаммы [28]. Сообщается, что при 37 °С у типичных штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* нарушается синтез изолейцина и валина, а у *Y. pseudotuberculosis* этого не происходит [9].

Установлено, что чумной микроб в процессе эволюции приобрел для белкового обмена реакции переаминирования [137] и в отличие от псевдотуберкулезного – лишен γ -глутаматтрансаминазы [57, 217]. Показано, что изоцитратлиазная активность, как правило, отсутствует у псевдотуберкулезного микроба, но характерна для штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* [42]. Есть исключения у обеих иерсиний, а потому данный тест оценивается как дополнительный. Желательна широкая апробация на атипичных штаммах теста, определяющего функциональность детерминант оксидаз β -фенилаланина и L-триптофана [38]. Обнаружено отсутствие N-ацетил- β -D-глюкозамидазной активности у возбудителя чумы и наличие её у контрольных штаммов возбудителя псевдотуберкулеза [131].

Установлена активность галактокиназы для псевдотуберкулезного микроба и её отсутствие у исследованных штаммов *Y. pestis* [16]. Опубликована работа о росте бактерий псевдотуберкулёза на дрожжевой среде с гуанозином в виде колоний с чёрными вкраплениями, а бактерии чумы к этому не способны [197]. Исследованы различия ферментативной активности у классических вариантов возбудителей чумы и псевдотуберкулёза по отношению к нетрадиционным для дифференциации субстратам. Так, микроб чумы не превращает экзогенный аденин в гуанин НК, а псевдотуберкулезный - осуществляет это в реакции дезаминирования аденина [121]. Предложен изотопный метод – дифференцировать *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* по усвоению альдегидов [95]. Решить вопрос о возможности и целесообразности использования всех различий в качестве тестов межвидовой дифференциации – дело будущего. Потребность в этом может возникнуть, если принятые в практике тесты будут признаны как не обеспечивающие надёжной идентификации появляющихся атипичных, изменённых форм иерсиний.

1.1.4. Молекулярно-биологические методы дифференциации иерсиний чумы и псевдотуберкулёза. Полимеразная цепная реакция

В настоящее время эффективными признаны приёмы, основанные на анализе генной и геномной структуры бактерий. Первичное выявление микроба чумы этими методами доступно микробиологам. Более детальная характеристика геномов возбудителей чумы и псевдотуберкулёза требует специальной квалификации [210].

Молекулярно-биологические тесты позволяют избежать ошибок при оценке видовой принадлежности по фенотипу микробов. Среди особенностей генной структуры есть специфические для вида, подвида, групп и отдельных штаммов. Знание их обеспечивает возможность быстро опознавать видовую принадлежность возбудителей и повысить качество эпиднадзора за чумой с учётом всех вариаций фенотипа возбудителя. Вопрос о связи фенотипических особенностей со структурой генома описан подробно [222, 287].

В геноме бактерий, кроме генов с конкретной функцией, могут быть проанализированы последовательности нуклеотидов иного типа. Анализ осуществляется с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР, PCR) с одним или многими праймерами, которые комплементарны исследуемым фрагментам ДНК. Эти праймеры можно разделить на типы: (1) видоспецифические, (2) специфически реагирующие только с ДНК определённых групп внутри вида или (3) с ДНК отдельных оригинальных штаммов. Определение варибельного числа повторов (VNTR) требует программной и статистической обработки. Для установления наличия и интактности определённого гена нужен набор праймеров на разные участки гена, а результат может быть оценен визуально по наличию или отсутствию ампликонов определённого размера. Однако при маркерных точковых мутациях (замена, делеции, вставки н.о.) требуется секвенирование ампликонов [71, 106].

ПЦР позволяет осуществлять поиски и предварительную идентификацию возбудителей непосредственно в первичном материале до

выделения культуры бактерий. Объектами исследования могут быть органы животных, насекомые-переносчики, кровь, моча, почва, вода, испражнения и др. Метод сокращает время предварительного анализа и позволяет получить положительный ответ в день обработки материала во всех образцах, за исключением содержащих 10^1 - 10^2 м.к. и менее. ПЦР является сигнальным тестом, определяющим целенаправленный бактериологический поиск возбудителя.

На первом этапе обследования инфекционных и природных очагов исследуется большое количество проб. При этом существует дефицит времени и необходимость экономного расходования препаратов. В связи с чем молекулярно-биологические исследования можно разделить на два этапа: (1) предварительный скрининг штаммов, максимально охватывающий все существующие фено- и генотипы вида возбудителя, а затем (2) детальное выявление общих и индивидуальных особенностей геномной структуры штаммов с целью их внутривидовой и индивидуальной маркировки. Однако детальному изучению генома должна предшествовать точная, лаконичная, не вызывающая сомнений, идентификация видовой принадлежности штамма с помощью ПЦР и праймеров, полностью гарантирующих правильность ответа.

На наш взгляд, эти два этапа целесообразнее распределить между специалистами практических и научных учреждений. В этом случае, задачей практических учреждений будет широкомасштабный скрининг всех штаммов вида *Y. pestis*, в том числе и атипичных. Это позволит на первом этапе выполнить бóльший объём работы с минимальными затратами. И только позитивные выборки штаммов передавать для детального исследования их геномов сложными современными методами. На первом этапе тесты должны быть не сложными в исполнении, малочисленны, а ответы на них гарантированно точны, чтобы не пропустить ни одного штамма *Y. pestis*. Эти подходы необходимы в случае экстренной детекции и быстрой идентификации вида *Y. pestis* по принципу «да» - «нет», при

обследовании природных очагов, в научных исследованиях имеющихся коллекций и в рамках чрезвычайных ситуаций [342].

Для постановки ПЦР описаны разные праймеры, в различной степени апробированные на практике, в том числе и при поиске бактерий с изменённым фенотипом, и даже находящихся в «некультивируемой» форме [68]. Большинство из них проверено только на малых выборках штаммов и требует более широкой апробации. Есть много вариантов ПЦР с праймерами на плазмидные и хромосомные гены *Y. pestis*. Помехой для плазмидных праймеров является спонтанная сегрегация тестируемых плазмид. Поэтому большего внимания для видовой идентификации заслуживают консервативные и высокоспецифичные фрагменты ДНК, стабильно сохраняющиеся в составе геномов всех штаммов вида [288].

В задачи ПЦР-анализа входит не только видовая идентификация или межвидовая дифференциация. Эта методология с использованием данных секвенса геномной ДНК позволяет исследовать наличие и структуру генов, проверять степень их интактности и штаммовую или групповую вариабельность, контролировать перемещение генов между различными бактериями, использовать данные полно секвенса, как типовые, стандартные [71, 160, 235].

В этой связи в качестве мишеней привлекают внимание известные дефекты видоспецифических фрагментов ДНК *Y. pestis*, которые возникли за счёт внедрения IS-элементов [20, 132] при формировании «молчащих» генов [102, 227]. Так, специфическими для *Y. pestis* дефектными «псевдогенами» стали хромосомные гены *Y. pseudotuberculosis* (*rfa* и *rfb*), контролирующие синтез S-липополисахарида (ЛПС). Их дефектность определяет характерный R-фенотип, иногда встречающийся и у псевдотуберкулёзного микроба [198]. Дефект O-ag-кластера, позволил предложить разные дифференцирующие праймеры на *wzz* и *wbyJ* гены *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* [219].

Обнаруженная в *ure*-опероне *Y. pestis* [348] вставка дополнительного нуклеотида (G) в ген *ureD* прекратила синтез уреазы. Эта вставка – маркер

штамма и один из возможных ориентиров при межвидовой дифференциации [320], помимо ферментативного теста [12]. Ген *napA* есть у *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. Однако у каждого вида могут обнаруживаться в нём замены н.о., которые формируют *stop*-кодон или снижают активность соответствующего белка [350]. Этот факт использован при составлении набора праймеров на гены *glpD*, *araC*, *napA* для внутривидовой градации *Y. pestis* [105]. Типичная для *Y. pestis* subsp. *pestis* неспособность ферментировать рамнозу, по мнению некоторых авторов, обусловлена заменой н.о. в одной позиции у гена *rhaS* [104]. Амплификация в ПЦР соответствующих фрагментов этих генов поможет дифференцировать типичные штаммы *Y. pestis* subsp. *pestis* от возбудителя псевдотуберкулёза после секвенирования ампликонов и программного анализа данных.

Значительная часть вариантов ПЦР-диагностики иерсиний основана на выявлении генов вирулентности, имеющих плазмидную (*virF*, *yadA*, *yopN/lcrE*, *yopT*) и/или хромосомную локализацию (*ail*, *inv*, *yst*) [1, 37, 248]. Но они идентифицируют патогенные штаммы и не охватывают разнообразия всех составляющих вида.

Присутствие у большинства штаммов *Y. pestis* плазмид pFra и pPst позволяет использовать для идентификации видов иерсиний ПЦР с праймерами на *cafI*-оперон, гены *ymt* (синтез фосфолипазы D, «мышинного» токсина), *pst* и *pla*. Имеющаяся в третьей плазмиде, pCad, у *Y. pestis* «маркирующая» точковая мутация в гене адгезина YopA с последующим сдвигом рамки считывания, отсутствует у *Y. pseudotuberculosis*. С учётом этого предложены варианты ПЦР с родоспецифическими праймерами (Yers1 и Yers2, 518 п.о.) [327]. Также используется факт отсутствия у *Y. pestis* особой вариабельной нуклеотидной последовательности в гене *lcrV*, обнаруженной у некоторых штаммов *Y. pseudotuberculosis* [293]. Однако в случае бесплазмидных или дефектных по отдельным плазмидам штаммов перечисленные выше тесты не эффективны. Кроме того, выявление некоторых дефектов требует секвенса ампликонов.

Полноценный ген *inv* имеется у вирулентных штаммов возбудителя псевдотуберкулёза [305], а у *Y. pestis* он дефектный. Ген *inv* «выключен» вставкой элемента *IS1541* [136, 324]. Праймеры на основе разных фрагментов хромосомного гена *inv* (*Inv1* и *Inv2*, 295 п.н.; YP-3 и YP-4, 440 н.п.) рекомендованы для уточнения видов иерсиний [111, 205, 295, 337].

Рекомендована к широкой апробации мультилокусная ПЦР с набором праймеров на (1) *wzz* ген синтеза ЛПС, общий для двух видов иерсиний, (2) специфический для *Y. pestis* ген YPO2088 (предполагаемая метилтрансфераза) и (3) плазмидный *pla* ген [288].

Описаны родоспецифические праймеры на *recA* ген, выявляющие ДНК *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*, но не *Y. enterocolitica* [35]. На основе генов 16S и 23S рибосомальных РНК [62, 260] и генов неспецифических поринов (*OmpF*-подобных белков) разработана мультиплексная ПЦР для поэтапной идентификации трёх основных патогенных видов *Yersinia*. Однако нуклеотидная последовательность гена *OmpF* белка у иерсиний имеет как консервативные, так и переменные участки, которые отражают внутривидовую неоднородность и могут снижать точность видовой идентификации по числу и размерам ампликонов [85, 171].

Для дифференциации штаммов *Y. pestis*, принадлежащих к биовару «*antiqua*», и их генотипирования по IS элементам и структуре гена, кодирующего глицерол-3-фосфат-дегидрогеназу (*glpD*), эффективно использовали праймеры группы «*vIm*». Они оказались специфичными для взятых в опыт штаммов *Y. pestis*, но не реагировали с ДНК контрольного штамма *Y. pseudotuberculosis* [294]. Недавно предложена ещё одна пара праймеров для внутривидовой градации *Yersinia* на основе генов ферментативной активности [50].

Идентификация типичных штаммов *Y. pestis* в ПЦР может быть иногда осуществлена не только на основе плазмидных *caf1*, *lcr* и *pla* генов, но также и хромосомного *hms* локуса [26, 83, 175]. Однако данный приём требует получения нескольких ампликонов, гомологичных разным фрагментам *hms*

локуса и последующего их секвенирования. Помехой могут быть также индивидуальные штаммовые мутационные изменения в нём. Предложена видовая детекция, ориентированная на вирулентность бактерий *Y. pestis*, и дифференциация от *Y. pseudotuberculosis* с помощью набора праймеров на гены с разной локализацией: хромосомные – «3а» (фрагмент профага), гены *irp2* (остров высокой патогенности) и плазмидный *lcrV* ген pCad [101]. В дополнение к этому набору рекомендованы праймеры TAN1-TAN2 (ген *hutG* – YPO1967). Ген N-формилглутамат-амидогидролазы имеет структурные отличия у *Y. pestis* CO92, *Microtus* и других иерсиний, поэтому дифференциацию типичных штаммов иерсиний можно проводить по размерам ампликонов [25]. При таком тестировании невыявленными остаются штаммы с дефектами по вирулентности. Было предложено проводить межвидовую и внутривидовую дифференциацию типичных штаммов всех подвидов бактерий *Y. pestis* и псевдотуберкулёзного микроба с помощью мультилокусной ПЦР с учётом делеций в генах: *terC* - синтез белка резистентности к теллурию- Δ89 п.н. (*subsp. pestis* - ампликон-300 п.н., у остальных интактный ампликон - 389 п.н.); *ilvN* – ген ацетолактатсинтетазы Δ45 п.н. (*subsp. pestis* - ампликон-515 п.н., у остальных интактный ампликон - 560 п.н.) [140]. Дополнением к этим праймерам может быть ПЦР-анализ генов *glpD* (глицерол-3-фосфат-дегидрогеназа) *inv* (адгезин-инвазин) и *fglJ* (флагеллин), а также некоторых межгенных пространств. Метод очень трудоёмкий, времязатратный. Нет сведений о проверке его на модели атипичных вариантов иерсиний, а выполнение метода трудно реализуемо в условиях проведения первичного скрининга штаммов иерсиний при обследовании очагов. Хотя он может быть эффективен при индивидуальной характеристике штаммов после ориентировочной идентификации.

Совмещение задач межвидовой и внутривидовой дифференциации, а также необходимость маркировки выделенных штаммов обуславливают проведение многопраймерного VNTR-анализа [71, 308]. Он позволяет (1)

отнести исследуемые штаммы к разным видам, (2) предположить исходный природный очаг, (3) с учётом общности и различий в генотипе построить филогенетическое дерево и (4) определить возможное географическое происхождение. Межвидовые фенотипические отличия являются ориентировочными, их желательно подтвердить другими тестами [127, 176, 245].

Способ мультиспейсерного секвенирования штаммов на модели VNTR областей межгенных пространств и вычитающий рестрикционный фингерпринт имеют свои преимущества. Однако они дороги, трудоёмки, требуют больших затрат времени, более высокой квалификации исполнителей и значительного технического оснащения.

Для выявления и типирования вариаций в структуре геномов используют также универсальные праймеры, например, тандемные повторы фага M13. Тест оценен как дополнительный [160]. Апробирован метод мультилокусного энзимотипирования. Дифференциацию видов он не гарантирует, но может быть полезным для маркировки штаммов при эпиданализе [33, 71], в том числе на предмет антибиотикоустойчивости [70].

В нашей лаборатории при идентификации коллекции природных штаммов *Y. pestis* разных подвидов и типовых *Y. pseudotuberculosis* разных сероваров (МЖК РостНИПЧИ) оказалась высокоэффективной монолокусная ПЦР [184] с «хромосомными» праймерами «vIm12/IS216» [294] и «JS» [314], соответственно. Причём праймеры «vIm12/IS216», в отличие от регламентированных «3а» [111] реагировали с ДНК всех природных штаммов *Y. pestis* из коллекции. Недавно в китайском природном очаге от монгольских песчанок так же были выделены атипичные штаммы *Y. pestis*, которые, подобно обнаруженным нами, не идентифицировались в ПЦР с помощью «хромосомных» праймеров «3а» [346], что подтверждает актуальность начатых нами поисков более надежных «хромосомных» праймеров для идентификации вида *Y. pestis*. Продолжение этих исследований представлено в данной диссертации.

Подводя итог разделу, можно заключить, что при детекции и межвидовой дифференциации двух близкородственных иерсиний используют праймеры, комплементарные фрагментам хромосомных и плазмидных генов. Исследование ориентировано на типичные штаммы иерсиний с учётом их этиологической роли в инфекции, поэтому не всегда учитывается возможность появления природных дефектов в исследуемых генах. Аттенуированные и изменённые по некоторым диагностическим признакам варианты бактерий, по-прежнему составляющие вид *Y. pestis* в биологическом и таксономическом отношении и отражающие механизмы выживания чумного микроба в очагах, могут остаться за пределами исследований. В равной степени это относится к штаммам бесплазмидным, с Pgm⁻ и Fga⁻ фенотипом. Это намного снижает эффективность поиска чумного микроба в природных очагах, влияет на оценку ареалов его распространения, длительности сохранения в природе и характера биологической активности вида *Y. pestis*. Широкое активное внедрение ПЦР-анализа может мешать ориентировка на использование мультилокусной, многопраймерной ПЦР, требующей заключительного секвенирования ампликонов, программной обработки результатов, значительного инструментального и материального оснащения и высокой специализации исполнителей.

Изложенное выше определяет необходимость разработки типа ПЦР-анализа, обладающего наименьшей сложностью и с доступными, но в высокой степени надёжными праймерами. Это позволит серийно исследовать объёмные выборки проб и с высокой гарантией обнаруживать при первичном скрининге представителей вида *Y. pestis*, независимо от степени отклонения их фенотипа от типичного и отрицательных результатов бактериологического и биологического исследования. Тем более что при детекции и межвидовой дифференциации двух склонных к изменчивости близкородственных иерсиний более надёжными оказываются результаты ПЦР-анализа хромосомной ДНК.

1.2. Факторы, осложняющие детекцию и идентификацию *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*

1.2.1. Смешанные культуры бактерий *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*

В природных очагах чумы её возбудитель может циркулировать одновременно с псевдотуберкулезным и другими микробами [14, 193]. Если две культуры находятся в одном организме грызуна, возможно заражение через блох [122] и выделение смешанной культуры. При пересевах на питательных средах (при низкой температуре культивирования) превалируют бактерии псевдотуберкулеза, вытесняя в значительной степени микроб чумы. А в организме биопроб чумной микроб доминирует над псевдотуберкулезным. Но, как правило, полной элиминации одного или другого вида не происходит. Сохранение возбудителей чумы и псевдотуберкулёза в блохах обеспечивало смешанную инфекцию грызунов обеими иерсиниями [17]. Известно, что сурки и другие грызуны из числа основных носителей *Y. pestis* болеют псевдотуберкулезом. Его возбудителя выделяли из их организма при обследовании природных очагов чумы в Монголии [196] и в горах Средней Азии [188, 119]. Бактерии чумы и псевдотуберкулёза при нахождении в почве могут захватываться свободноживущими амёбами и в них размножаться. Тогда амёбы и их цисты способны быть переносчиками этих инфекций. Внутри их можно обнаружить до 5 микробных клеток. Зарегистрирована гибель амёб с выходом активных бактерий во внешнюю среду. Этот феномен поддерживает оба вида в очаге и циркуляцию смешанных культур в природе или в организме теплокровных [134]. Поскольку бактерии чумы и псевдотуберкулёза способны обитать в виде смешанных культур в организме одного носителя [17], а псевдотуберкулёз, протекая в хронической форме [75], вызывать иммунитет к чуме за счёт ряда общих антигенов [282], в сумме это снижает остроту чумной

инфекции и переводит её также в более затяжную форму и возникновению иммунной прослойки носителей.

На различных стадиях эпизоотии и в межэпизоотический период появляются атипичные штаммы *Y. pestis*, по фенотипу не отличимые от *Y. pseudotuberculosis* [207]. Их очень важно, но трудно точно идентифицировать, если они циркулируют в одном очаге. Такая необходимость возникает также при поиске бактерий псевдотуберкулёза у грызунов, в объектах окружающей среды и пищевых продуктах [166]. Ареалы этих близкородственных иерсиний могут перекрываться, как например, на Кавказе, во Вьетнаме, Сибири и Средней Азии [133, 153, 188]. Известно, что от одних и тех же грызунов могут выделяться оба микроорганизма [59, 88, 153, 194, 196]. Из большого числа разных штаммов, выделенных от грызунов в прикаспийских и кавказских очагах, были отобраны 8 штаммов, имеющих сходство с чумным микробом, 3 из них отнесены к O:3, а 5 к O:5 сероварам возбудителя псевдотуберкулёза [66]. Мешает диагностике также неоднородность популяций иерсиний, особенно характерная для штаммов, склонных к диссоциации. Требуется предварительное клонирование исходной культуры и последующее изучение большого числа клонов [130].

Приёмы идентификации смешанных культур двух иерсиний недостаточно разработаны. Хотя проблема является чрезвычайно важной. Именно в этих исследованиях возможны ошибочные суждения, особенно когда в состав смешанных культур входят атипичные бактерии. Для выдачи заключения об их видовой принадлежности требуется повышенная ответственность. Необходима отработка методов, дающих полностью гарантированный результат, который подтверждает (1) наличие смешанной культуры и видовую принадлежность составляющих его иерсиний, а затем (2) позволяет разделить их и точно идентифицировать.

1.2.2. Основные формы изменчивости *Y. pestis*. Атипичные штаммы

С отклонениями от классических форм у бактерий возбудителя чумы специалисты начали сталкиваться при поиске его в природных очагах среди носителей, переносчиков, на объектах внешней среды, при исследовании свойств бактерий в музейных коллекциях и в экспериментальных исследованиях. Особое внимание привлекают вариации фено- и генотипа, которые затрудняют идентификацию возбудителя и диагностику чумы, а также дифференциацию с возбудителем псевдотуберкулёза [41, 54, 76]. Обнаружение этих двух иерсиний в формах, неотличимых по фенотипическим тестам, возможно и в настоящее время. Это вызвало даже в определенный период исследований (при отсутствии надёжных тестов дифференциации) предположение об очень быстротечном «в ходе одного лабораторного исследования» превращении *Y. pestis* в *Y. pseudotuberculosis* и наоборот. Достижения последних десятилетий позволяют исключить такую возможность, но удивительное фенотипическое сходство атипичных форм иерсиний обуславливает у некоторых исследователей старой школы сохранение сомнений в отношении категоричности такого отрицания [65]. Поэтому проблема совершенствования диагностики с использованием новых методологических подходов остаётся актуальной.

Параллельно с поисками дифференцирующих признаков специалисты находили и формы с отклонениями по этим признакам. Так, кроме типичных R-колоний уже известны штаммы *Y. pestis*, формирующие OR, OS и S формы, а у *Y. pseudotuberculosis* – R и OR колонии. Это затрудняет первичный отбор культур, так как колонии в R-форме, похожие на возбудителя чумы обычно выделяются от крыс, больных псевдотуберкулёзом. А эти грызуны являются основным носителем океанического биовара *Y. pestis*. Поэтому точная идентификация в этом случае приобретает особую актуальность. Фаговую диагностику широко используют в поисках микроба чумы [316]. Так, колонии с нетипичной формой не редко состоят из бактерий, устойчивых к диагностическим бактериофагам. Однако давно известны не только случаи устойчивости к

диагностическим фагам, но и факт недостаточной специфичности чумного и псевдотуберкулёзного бактериофагов Покровской, Д'Эрелля и Таля [8, 40], поэтому чувствительность или устойчивость к ним не всегда могут быть использованы в качестве гарантированного критерия для дифференциации. Более надёжный в этом плане фаг Л-413С не активен по отношению к бактериям псевдотуберкулёза. Но он, также как фаг «Н» [135] не лизирует и некоторые атипичные бактерии *Y. pestis* с «неустойчивой» формой колоний, приближающейся к типу «S», вызывая ошибки диагностики [44, 112, 116]. В связи с фагоустойчивостью вариантов *Y. pestis* необходимо учитывать нарушение фаговых рецепторов, связанных с изменением ЛПС бактерий [273, 244] и тенденцию к их плеiotропной изменчивости по ряду признаков, важных для дифференциации с возбудителем псевдотуберкулёза. Среди них (1) изменение формы бактерий и колоний, (2) появление рамнозопозитивности, (3) склонность к утрате видоспецифических плазмид, (4) слабый рост на питательных средах и высокая чувствительность к генцианвиолету, который тормозит рост вторичной флоры, (5) утрата или существенное ослабление способности синтезировать антиген F1, (6) снижение антифагоцитарной активности, (7) уменьшение на несколько порядков степени вирулентности для лабораторных животных и (8) регистрация гибели биопроб при отсутствии роста возбудителя в посевах. Однако доказана способность некоторых фагоустойчивых штаммов реверсировать к фагочувствительному полноценному фенотипу, как *in vitro*, *in vivo*, так и после пребывания в макрофагах [44]. Без учёта всего этого может быть неправильной видовая идентификация двух иерсиний, что может грозить неприятными последствиями.

Способность ферментировать рамнозу (Rha⁺) и мелибиозу (Mel⁺), ранее причислялась к типичным признакам *Y. pseudotuberculosis*, но не *Y. pestis*. Позже выяснилось, что среди штаммов основного подвида *Y. pestis* обнаружены отдельные атипичные Rha⁺ и Mel⁺ штаммы и клоны. Они обычно обладают пониженной вирулентностью [57, 82, 161, 238].

Способность Rha⁺ штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* реверсировать к исходному вирулентному классическому Rha⁻ фенотипу исследована явно недостаточно, чтобы делать выводы об их безопасности. Рамнозопозитивность так же характерна для «полёвочьих» штаммов [118], как для бактерий псевдотуберкулёза. Эти «полёвочьи» штаммы эпидемически не опасны, а некоторые даже не вирулентны для людей, в отличие от основного подвида *Y. pestis* subsp. *pestis* [7, 37, 91, 102, 125, 141, 182, 240, 243, 349].

Ure⁻ фенотип чумного микроба в настоящее время точно также не абсолютный показатель. Иногда штаммы основного подвида могут формировать клоны, продуцирующие уреазу. В природных очагах чумы обнаруживаются Ure⁺ варианты *Y. pestis* subsp. *pestis*, особенно в отсутствии острых эпизоотий [58, 116, 144, 187, 291].

При специфической для *Y. pestis* ауксотрофности показана селекция её прототрофных клонов в лабораторных условиях и выделение прототрофных вариантов в природных очагах [89, 124]. Это снижает практическую значимость дифференциальных голодных сред [125].

Плазмидный состав также не может быть использован с гарантией правильной дифференциации основного подвида *Y. pestis* и псевдотуберкулёзного микроба. Среди штаммов обоих видов микроорганизмов встречаются с одной плазмидой или полностью бесплазмидные [81]. А в природе могут быть обнаружены штаммы других микробов, имеющие плазмиды по числу, размеру и функции соответствующие чумным [99].

Давно известны штаммы *Y. pestis* (фенотип Fra⁻, Fra[±]), у которых отсутствует или снижена в значительной мере продукция основного диагностического антигена F1, основа которого - белок Caf1. Это существенно затрудняет их идентификацию, особенно при наличии других вариаций видоспецифического Caf-фенотипа [61, 191]. Штаммы могут быть (1) авирулентные, (2) со сниженной избирательной вирулентностью и

хроническим течением инфекции, а также (3) высоковирулентные. Существование последних предположительно объясняется интактностью локализованных на этой плазмиде других детерминант вирулентности, соседних с *caf*-опероном [338].

С нашей точки зрения, Fga⁻ штаммы представляют собой опасную форму чумного микроба:

- потому что могут вызывать заболевание у людей и, к тому же, с атипичной клинической картиной;
- во многих случаях могут реверсировать в полноценную форму возбудителя, особенно, если ранее были в L-форме или некультивируемой;
- способны преодолевать специфический противочумный иммунитет;
- в различной степени вирулентны для разных природных носителей и влияют на ход эпизоотий;
- могут долго и скрыто сохраняться в природе, являясь источниками ДНК в пробах.

Методика выделения типичных форм чумного микроба из биопроб, получение культур и их идентификация стандартны и известны.

Чтобы выявить Fga⁻ бактерии, нужно очень хорошо знать особенности патогенеза, представлять, как они проявляют себя в организме разных носителей. А так как они обычно вызывают атипичную форму чумы у морских свинок и изменённую у белых мышей, то нужно знать, как и откуда «извлечь» возбудителя, а не сказать, что *Y. pestis* нет. Мыши и свинки недостаточно эффективная модель для скрининга «бесфракционных» вариантов возбудителя чумы через биопробы в силу увеличения у них длительности заболевания, различной индивидуальной чувствительности животных и отсутствия гарантий выделения культуры возбудителя даже от павших, в поздние сроки после заражения. Поэтому эти биомодели могут быть информативными при анализе особенностей механизма патогенности Fga⁻ форм чумного микроба. Нужна более эффективная модель, которая помогла бы выявить эти формы во всех случаях с выделением культуры возбудителя и в более краткие сроки.

Нарушение продукции F1 антигена может иметь место при утрате плазмиды pFra, при интеграции её с хромосомой и в случае повреждений генов *caf*-оперона: регуляторного (*cafR*), вспомогательных (*cafIM*, *cafIA*) или структурного (*cafI*) (Рисунок 1).



Рисунок 1 - Схема расположения генов *caf*-оперона на плазмиде pFra *Y. pestis* [302]. *caf1R* – регуляторный ген; *caf1M* – ген –шаперона; *caf1A* – ген – ашера; *caf1* – структурный ген субъединицы Caf-белка

Методами молекулярной биологии с использованием клонирования и кассетных вставок исследовались функции каждого гена и их роль в экспрессии патогенности [86, 285]. Штаммы с дефектами *caf1* обладают высокой степенью аутоаггрегации, менее эффективно вызывают бубонную чуму, а при обсеменении организма преимущественно «оседают» в печени и селезёнке [321]. Сообщается об участии ашера (*cafA* ген) в адгезии к макроклеткам и макрофагам [263]. Доказан высокий аффинитет ашера к человеческим интерлейкинам (IL) 1 α и 1 β . Белок Caf1 является маркером. Он соединён липидной связью с ашером, который его переносит [272]. Сам Caf1 не влияет на вирулентность [4, 5]. Ашер может замещать Caf1 (ложная субъединица) или самостоятельно связываться с IL, препятствуя иммунному ответу и активации МФ [343, 345]. Функции вспомогательного *cafM* гена описаны [230]. Нарушение гена и утрата шаперона CafM может сопровождаться снижением вирулентности [338].

Однако естественные механизмы повреждения *caf*-оперона у природных Fra^{-±} штаммов и условия их реверсии к Fra⁺ фенотипу не исследованы.

Описанные «бесфракционные» штаммы возбудителя чумы возникают в организме иммунных животных, в заражённых блохах и клещах. Так известно, что в природном Средне-Азиатском очаге при исследовании клещей (где возбудитель чумы может сохраняться от 3 до 5 лет) при отрицательных результатах бактериологического, иммунологического анализа и ПЦР-теста на *cafI* ген положительного результата поиска достигли с помощью ПЦР на другие интактные гены плазмид и хромосомы [172]. В этих же условиях могут формироваться фильтрующиеся формы и L-формы *Y. pestis* [108] и даже штаммы с изменённым отношением к фагам. У всех этих форм микроба, кстати, во многих случаях реверсидельных, могут встречаться сходные вариации Fga-фенотипа. Сложность их диагностики также в том, что они нуждаются в особых подходах при культивировании, точно так же, как известные «некультивируемые» формы [11, 53, 116, 123, 157, 246, 329, 342]. При исследовании L-форм на различных стадиях их формирования в разных экологических условиях обнаружены следующие признаки: (1) потребность L-форм в особых средах выращивания; (2) отсутствие «кружевной» каймы у колоний; (3) искажённая форма бактерий (шары, агломераты, нити); (4) снижение продукции Pla-протеазы и F1 антигена;

Таблица 1 – Основные дифференциальные признаки *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, указанные в различных инструктивных документах (суммированные данные всего обзора литературы диссертации)

№ пп	Дифференциальный признак	Варианты иерсиний с признаками			
		Типичный основной подвид <i>Y. pestis</i>	Атипичные штаммы основного подвида <i>Y. pestis</i>	Атипичные штаммы вида <i>Y. pseudotuberculosis</i>	Типичный вид <i>Y. pseudotuberculosis</i>
1.	R- колонии	есть	есть/нет	есть/нет	нет
2	S, RS, OS-колонии	нет	есть/нет	есть/нет	есть
3	«прозрачный» рост в бульоне	есть	есть/нет	есть/нет	нет
4	«мутный» рост в бульоне	нет	есть/нет	есть/нет	есть
5.	Лизис фагом Покровской	есть	есть/нет	нет/есть	нет
6.	Лизис фагом Лариной «Л-413»	есть	есть/нет	нет/есть	нет
7.	Лизис псевдотуберкулёзным фагом	есть	есть/нет	есть/нет	есть
8.	Ферментация рамнозы и мелибиозы	нет	есть/нет	есть/нет	есть
9.	Гидролиз мочевины	нет	есть/нет	есть/нет	есть
10.	Подвижность (18°C)	нет	нет	есть/нет	есть
11.	Антиген F1	есть	нет/есть	Нет	нет
12	Антиген FV	есть	есть	нет/есть	нет
13	Ауксотрофность	есть	есть/нет	нет/есть	нет
14	3 видоспецифические плазмиды <i>Y. pestis</i>	есть	есть/нет	Нет	нет
15.	Продукция пестицина 1	есть	есть/нет	Нет	нет
16	Продукция Pla-протеазы	есть	есть/нет	Нет	нет
17	Продукция «мышинного» токсина	есть	есть/нет	Нет	нет
18.	Высокая вирулентность, характерная для возбудителя чумы	есть (характерная)	есть (характерная)/нет	Нет	нет
19.	Хронические проявления инфекции	нет	есть	Есть	есть

(5) изменение чувствительности к фагам; (6) отсутствие характерной ферментативной активности, иногда экспрессия нетипичной для *Y. pestis* лактозо- и сахарозопозитивности; (7) гибель заражённых животных с проявлением только токсинемии при невыявлении культуры; (8) склонность к утрате плазмиды pCad [11, 63, 80, 109, 113, 116]. До достижения конечных стадий развития L-формы могут реверсировать и дать рост как полноценным клонам *Y. pestis*, так и атипичным вариантам, которые трудно отличить от *Y. pseudotuberculosis*.

Описано много случаев, когда видовая принадлежность штаммов иерсиний определялась с большим трудом или даже ошибочно. Так, штаммы *Y. pseudotuberculosis* на Аляске от грызунов были зарегистрированы ВОЗ как *Y. pestis*. Долгие споры вызывали «иолотанские» штаммы из Туркмении, по фенотипу относимые то к псевдотуберкулёзному микробу, то к *Y. pseudopestis turkmenica*, то к атипичной *Y. pestis* [2, 39, 125, 149, 150]. Причиной таких разногласий была неоднородность популяций и неполноценность используемых в то время тестов. Затруднения в идентификации нестабильных атипичных штаммов иерсиний были на Кавказе [74]. В такой ситуации вполне допустимо предположение о встрече со смешанными культурами двух иерсиний. По этой причине изучение атипичных штаммов *Y. pestis* и их чёткая дифференциация от *Y. pseudotuberculosis* важны (1) при обнаружении патогенетически высоко активного возбудителя, (2) при получении доказательств наличия чумного микроба с изменённым фенотипом в неактивном природном очаге и (3) при выявлении очагов, где циркулируют оба вида иерсиний.

Широкое распространение атипичных штаммов иерсиний в природных очагах в разные периоды эпизоотий требует решения вопросов, связанных со способностью вызывать инфекционный процесс, как в типичных, так и в изменённых формах. Последние крайне осложняют клиническую диагностику, особенно при затяжных и не резко выраженных формах чумы.

При изменении фенотипа бактерий чумы со снижением патогенности до критического уровня, важно своевременно обнаружить такие формы возбудителя и выяснить способность возврата их в исходный дикий фенотип. Решение этой проблемы требует объёмных скрининговых исследований. Крайне затруднительно выполнять их без легко доступных для любых лабораторий и минимально трудоёмких надёжных приёмов идентификации возбудителя чумы, который находится в любой известной и даже малодоступной для идентификации форме изменчивости. Это требует много материальных и высокопрофессиональных трудозатрат.

1.2.3. «Плазмидные» рекомбинанты *Y. pseudotuberculosis*

При длительном сосуществовании двух иерсиний в одном макроорганизме, в эктопаразитах-переносчиках или на объектах внешней среды возможен обмен плазмидами и формирование клонов *Y. pseudotuberculosis* с *rFra Y. pestis*, важной для детекции и дифференциации иерсиний [97]. В эксперименте такая передача маркированной *rFra* была показана не только между иерсиниями [78, 79, 148], но и другим видам сем. *Enterobacteriaceae* [97, 98, 100, 114, 115]. Клонированные *caf* гены [27, 325] в векторной плазмиде у рекомбинантных клонов гетерологичных штаммов, обеспечивали продукцию полноценного антигена F1. Причём рекомбинантный F1 индуцировал образование антител. При появлении рекомбинантных клонов в природе, их сохранение во многом зависит от уровня патогенетической активности, стабильности плазмид и степени выживаемости бактерий в среде обитания исходных штаммов. Известно, что гетерогенные плазмиды могут влиять на свойства псевдотуберкулёзного реципиента. Так, присутствие векторной плазмиды с *caf*-опероном снижает воспроизводимость псевдотуберкулёзных трансформантов при 37 °С и их устойчивость к стрессовым факторам *in vitro*, хотя параллельно усиливает колонизирующую способность при инфицировании биопроб [27, 36]. Предлагается получить

живую противочумную вакцину из плазмидного Fra^+ рекомбинанта *Y. pseudotuberculosis*, способного длительное время находиться в макроорганизме биопроб без патологии [236]. Как поведут себя у людей рекомбинанты, и как распространятся в мире - не известно. Нужен безошибочный идентификационный тест для слежения за ними. Проблема «плазмидных» рекомбинантов *Y. pseudotuberculosis* интересна не только в плане ошибок диагностики и контроля над ними. Она важна в связи с проблемами экологии возбудителей, при выяснении путей эволюционной изменчивости микробов и при решении проблем эпизоотологии. Этапы эволюционной перестройки возбудителя псевдотуберкулёза серовара O:1b в вид *Y. pestis* в основном подтверждены. Хотя отдельные исследователи придерживаются иного мнения, не представляя убедительных доводов [172]. А потому разработка методов, (1) облегчающих широкомасштабный скрининг атипичных штаммов двух видов иерсиний, (2) упрощающий дифференциацию двух видов и их рекомбинантов и (3) демонстрирующих их близость, представляется нам актуальной.

В итоге обзора литературы, можно заключить, что основное внимание исследователей возбудителя чумы в обсуждаемом аспекте направлено на типичные высоковирулентные эпидемически опасные штаммы, их диагностическую характеристику и обусловленную эволюцией внутривидовую таксономическую позицию. Однако сохранение возбудителя чумы в природе связано с его приспособительной изменчивостью, которая может быть многоплановой и определять различные фенотипы, уклоняющиеся от диагностики или затрудняющие её, да к тому же недостаточно изученные. Потенциал изменчивости фенотипических признаков варьирует в довольно значительной степени, но ни один из признаков не может считаться абсолютно обязательным для вида *Y. pestis* полностью надежным и видоспецифичным и в достаточной степени изученным. Известная информативность молекулярно-биологических методов диагностики обеспечивает высокую эффективность анализов. Однако отдельные фрагменты генома также могут подвергаться

перестройкам. Поэтому его анализ, эффективный у типичных штаммов, может давать ошибочный ответ при вариациях структуры ДНК хромосомы и нарушениях или утрате ДНК плазмид у атипичных вариантов. Молекулярно-биологические методы дают надежные ответы в тех случаях, когда при тестировании исследователи ориентируются на консервативные видоспецифические нуклеиновые последовательности ДНК, сохраняющие интактную структуру вне зависимости от изменения других свойств. Исследования в этом направлении актуальны и могут быть очень продуктивными и полезными при наблюдении за возбудителем чумы и его изучении.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Глава 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Бактериальные штаммы

Объектами исследования явились 352 музейных штаммов из разных очагов, принадлежащие к видам *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, отобранные по принципу случайности и 155 клоновых культур некоторых штаммов. 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. Полный перечень штаммов и обнаруженные отклонения фенотипа даны в на 25 страницах «Приложении» к диссертации (Таблицы 1, 2, 3).

2.2. Среды культивирования

Основными питательными средами были плотный и мягкий агар и бульон Хоттингера, агар и бульон LB (Luria-Bertrani, USA). Ферментативную активность определяли, используя известные жидкие среды: Гисса с сахарами и Маслена с мочевиной. Плотные дифференциальные среды содержали сахара в стандартной концентрации и комплексный индикатор {смесь: 100мл индикатора Андреде (Россия) и 0,4г. бромтимолового синего (Fluka)}. Экспрессию пигментсорбции и кальцийзависимости проверяли на среде Хоттингера, содержащей 0,01 % красителя «Congo-red» [332] и дефицитной по ионам Ca^{2+} среде Хигучи-Смита, соответственно. Другие стандартные особые среды упомянуты в соответствующих разделах.

2.3. Методы изучения фенотипических культуральных свойств

Культуральные, морфологические и биохимические свойства определяли, как принято [186]. Все манипуляции с посевами выполняли так, как описано в инструктивных документах [128].

Чувствительность к диагностическим бактериофагам чумным (Покровской, Л-413 «С», Н4), псевдотуберкулёзному Д'Эрелля, коли-фагу Mu cts62 [155] проверяли методом «пятна». Ограничение бактериями фагов выявляли по двуслойному методу Грациа.

Продукцию специфического для *Y. pestis* пестицина 1 определяли методом отсроченного антагонизма [247], используя в качестве индикатора штамм №377 *Y. pestis* subsp. *microtus*, var. *caucasica*. Активность *Pla*-протеазы проверяли с помощью плазмы (Difco) согласно [111].

Питательные потребности определяли на глюкозо-минеральной среде М9 Ледерберга модифицированной для выращивания чумного микроба и обогащённой аминокислотами в различном наборе [177].

2.4. Выявление плазмид

Скрининг плазмид проводили, как описано [271].

2.5. Иммунологические тесты

Продукцию специфического чумного F1-антигена выявляли в РПГА и РАО, используя, соответственно, коммерческий антительный диагностикум и F1-специфический диагностикум чумной иммуноглобулиновый полимерный сухой для РАО (сконструирован в РостНИПЧИ).

Манипуляции со всеми диагностикумами выполняли согласно прилагаемым инструкциям. Поиски антигена F1 проводили у культур, выращенных при 37°C в течение 2 сут.

С целью идентификации штаммов, отрицательно реагирующих с антительными диагностикумами к F1-антигену, бактерии штаммов, выращенные при 28 °С, тестировали на продукцию видоспецифического антигенного комплекса «фракция V» чумного микроба (FV) [21]. Его синтез не связан с плазмидами. Для этого в РКoA использовали экспериментальный диагностикум, позитивно реагирующий с бактериями *Y. pestis*, лишёнными плазмидных детерминант. Диагностикум получен Н.В. Божко с соавторами (РостНИПЧИ) по разработанной ими методике [22, 96]. Антительный диагностикум на мембранные белки возбудителя псевдотуберкулёза серовара O:1b для реакции агглютинации был сконструирован Лысовой Л.К. (РостНИПЧИ) на основе специфических IgG-глобулинов.

НИМФ с МКА, полученными в лаборатории гибридом РостНИПЧИ и специфичными для антигенов F1, выполняли согласно авторским инструкциям [18]. Мазки готовили из взвесей бактерий 2-х суточных культур, выращенных при 28 ° и 37 °С. Концентрация взвесей достигала (по стандарту мутности) - 10^5 м.к./мл или 10^9 м.к./мл для анализа популяции «бесфракционных» штаммов *Y. pestis*. На тщательно обезжиренное предметное стекло наносили две капли взвесей, распределяя их по центру мазка диаметром 1-1,5 см. После высыхания при комнатной температуре мазок фиксировали 30-60 мин в 96° этиловом спирте, высушивая после этого без обжигания. Разведенные в PBS 1:10 препараты МКА наносили на фиксированный мазок в объёме 1-2 капель и помещали его, во избежание высыхания, во влажную камеру при 37 °С на 30 мин для связывания МКА и бактерий. После чего мазок опускали два раза в PBS (3-4 сек) и на 2 сек в дистиллированную воду. Высушивали 20-30 мин при комнатной температуре и наносили 1-2 капли ФИТЦ против мышинных глобулинов (разведение 1:8 – 1:10 в PBS). Через 30 мин нахождения во влажной камере при 37 °С мазок снова промывали дважды в PBS по 3-5 сек и 2 сек в дистиллированной воде. На высушенный в течение 20-30 мин при комнатной температуре мазок наносили нелюминесцирующее иммерсионное

масло или диметилфталат и просматривали в люминесцентном микроскопе при увеличении в 1000 раз (иммерсионный объектив 100x; окуляр 10x).

Результаты яркости свечения оценивали, как принято, по 4-х крестовой системе. Сверкающая или яркая флюоресценция оболочки микробной клетки с тёмным телом оценивалась, соответственно, на 4+ и 3+. Согласно инструкциям она считается положительной диагностической. Иногда наблюдаемое слабое и очень слабое свечение на 2+ и 1+ не оценивали как «положительный результат», а считали сомнительным. Полное отсутствие свечения регистрировали как «отрицательный».

2.6. Определение биологической активности штаммов на модели животных и макрофагов

Вирулентность и иммуногенность определяли на модели беспородных белых мышей (*Mus albus officinarum*) 25-30 г (самки) и морских свинок (*Cavia porcellus*) 180±20 г (самки) или монгольских песчанок (*Meriones unguiculatus*) 150±20 г. (самки). Их содержали на стандартном рационе вивария и в соответствии с требованиями Федерального закона от 01.01.1997 г. «О защите животных от жестокого обращения» и предписаниями Женевской конвенции «International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals» (Geneva, 1990). Учёт результатов вели по числу выживших и павших. Выживших забивали, усыпляя хлороформом. Всех вскрывали, исследуя органы на наличие бактерий исследуемых штаммов.

Вирулентность штаммов *Y. pestis* с пониженной продукцией F1 или при полном её отсутствии проверяли на морских свинках, белых мышах и монгольских песчанках. Белых мышей заражали подкожно выращенными при 28 °С бактериями «бесфракционных» штаммов *Y. pestis* в дозах 10^3 и 10^6 м.к., а морских свинок – 10^3 и 10^8 м.к. (по стандарту мутности). Длительность наблюдения была 30 сут. Выживших животных забивали и вскрывали так же,

как павших, регистрируя животных, от которых удалось получить культуру чумного микроба, и визуально фиксируя изменения во внутренних органах.

Летальный эффект рекомбинантных штаммов *Y. pseudotuberculosis* с плазмидами чумного микроба проверяли на белых мышах при внутрибрюшинном введении бактерий исследуемых штаммов в дозах, указанных в таблице, а у морских свинок – при подкожном введении. Культуры бактерий выращивали при 28 °С. Наблюдали за животными 14 сут. Павших животных вскрывали. Материал из ткани селезёнок исследовали посевами на агар Хоттингера, в иммунологическом тесте и ПЦР. Посевы выращивали 5 сут при 28 °С под наблюдением.

Протективность рекомбинантов *Y. pseudotuberculosis* с плазмидами чумного микроба выявляли на модели выживших после введения рекомбинантов животных, перезаражая их подкожно 200 DCL вирулентного штамма *Y. pestis* 231 (2000 м.к. по стандарту мутности). Штаммы для первичного инфицирования выращивали 18 ч при 28 °С на агаре Хоттингера.

Антимакрофагальную активность оценивали по индексу завершённости фагоцитоза (ИЗФ) через 6 ч контакта бактерий с перитонеальными макрофагами (МФ) белых мышей и морских свинок по известной методике при нагрузке 50 м.к. на МФ [151].

У забитых инфицированных мышей забирали фрагмент селезёнки. Половину фрагмента суспендировали в 0,5 мл физиологического раствора, и взвесь клеток отбирали для иммунологического и ПЦР-анализа. Другой фрагмент использовали для посева. Ещё один фрагмент селезёнки сохраняли в чашке Петри при +4°С до получения результатов ПЦР и первичного посева. Посевы отпечатков селезёнок или их эмульсий выращивали при 28 °С 1-5 сут.

Детекцию антигена F1 во взвеси ткани селезёнок животных, инфицированных «бесфракционными» штаммами *Y. pestis* и рекомбинантными штаммами *Y. pseudotuberculosis* проводили с помощью РАО и антительного диагностикума (РостНИПЧИ) по инструкции, а также анализировали ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2.7. Варианты ПЦР с бактериальными культурами и материалом от животных

ДНК исследовали с помощью классической ПЦР. Перечень использованных праймеров приведен в Таблице 2. Среди использованных была одна пара специфических праймеров (IS1–IS2), ранее предложенная для выявления как *Y. pestis*, так и *Y. pseudotuberculosis* O1b серовара. Эти праймеры направляют синтез последовательности в составе IS100 элемента протяжённостью 1200 п.н., который содержится в геноме обеих иерсиний [143]. Из «хромосомных» праймеров на первом этапе мы использовали пару праймеров «За», предложенных зарубежными авторами [313] (позже введённую в набор «ГенПест»), а также пару праймеров «vIm12/IS216» из группы «vIm/IS», превосходящую по эффективности, согласно нашим данным, праймеры «За» и сравнительно недавно описанную в составе набора, позволившего типировать по биоварам группу штаммов *Y. pestis* [294]. Выбранную нами пару праймеров (сокр. «vIm12/IS216»), позволивших их автору в ПЦР отличить штаммы чумного микроба биовара *antiqua* от возбудителя псевдотуберкулёза, принадлежащего к тому же биовару, дополнили парой праймеров «JSfor/JSrev» (сокр. «JS») [314]. По заключению автора праймеры группы «JS» взаимодействовали с ДНК исследованной группы штаммов *Y. pseudotuberculosis*, но не реагировали с ДНК контрольного штамма *Y. pestis*. Обе пары обеспечивают синтез ампликонов, специфичных, соответственно, для *Y. pestis* –390 п.н. и для *Y. pseudotuberculosis* – 223 п.н.

При работе со смешанными культурами иерсиний ПЦР классического типа выполняли, используя в пробе смесь двух экспериментальных пар праймеров: одна пара видоспецифическая для *Y. pestis* - «vIm12/IS216», другая - реагирующая только с ДНК *Y. pseudotuberculosis* – «JS» [313]. При постановке классической ПЦР в работе использован термостат, программируемый для проведения ПЦР-анализа, четырёхканальный ТП4-ПЦР-01- «Терцик» (ЗАО

НПФ ДНК-технология, Россия). К реакционной смеси {Tris HCl, pH 8,6 0,05M; KCl 0,05M; MgCl₂ 2,5 mM; 0,1 % Tween 20; праймеры 1, 2 (Литех, Москва) по 0,1 μM; dNTP's 200μM (Fermentas, Литва); Taq-полимераза (Fermentas, Литва) 0,5 U} в объеме 20 μl добавляли исследуемую ДНК -5 мкл и проводили исследование. В контрольную пробирку вносили все основные ингредиенты, специфические праймеры на ДНК фага T7 по 0,1 μM, ДНК фага T7 1 μg и исследуемую пробу – 5 мкл. Температурный режим проведения ПЦР со всеми использованными праймерами был следующим: 94 °C – 2 мин, затем 30 циклов (94 °C -30 сек, 65 °C – 30 сек, 72 °C – 60 сек) и в конце – 72 °C, 3 мин. Реакцию учитывали в 2 % агарозном геле (Bio Rad, USA) после электрофоретического разделения амплифицированной ДНК, окрашенной EtBr. Результаты ПЦР относительно каждой пары праймеров оценивали как положительные при наличии соответствующих ампликонов указанного выше размера. ПЦР считали отрицательной при отсутствии ампликонов или при наличии ампликонов с нехарактерными размерами. В контрольной пробе с праймерами T7 реакцию считали успешной, если происходила амплификация фрагмента ДНК длиной 1000 пар нуклеотидов.

ПЦР для детекции плазмиды rFra на первом этапе выполняли с парой праймеров «F1» Neubauer, направляющих синтез ампликонов размером около 290 п.н., по методике, рекомендованной авторами [298].

Условия постановки полимеразной цепной реакции во всех случаях соответствовали предложенными авторами.

Наличие «бесфракционных» бактерий возбудителя чумы и рекомбинантов возбудителя псевдотуберкулёза в органах биопроб и видовую принадлежность инфицирующих бактерий в большинстве случаев контролировали также с помощью ПЦР, используя апробированные нами в начале этой работы пары праймеров «vIm12/IS216» и «контрольных», утвержденных в инструкции «За», направляющих синтез ампликонов, соответственно, 390 и 276 п.н., а также специфичную для *Y. pseudotuberculosis* пару праймеров «JS», индуцирующую синтез ампликонов размером 223 п.н. Видоспецифичность экспериментальных

праймеров «vIm12/IS216» и «JS» для каждой из иерсиний, высокая эффективность и надёжность были нами доказаны здесь и в других разработках.

С целью поиска поврежденных генных локусов *caf*-оперона у Fra-штаммов использовали экспериментальные праймеры для ПЦР-детекции генов *cafI*, *cafR*, *cafM* и *cafA*, которые были сконструированы в ходе наших исследований на основе известных данных секвенса *caf*-оперона (Таблица 2). ПЦР выполняли в классическом варианте. Протяженность направляемых праймерами ампликонов была, соответственно, 267, 192, 311 и 250 п.н. Реакция проходила в V=25 мкл реакционной смеси, содержащей 60 мМ трис HCl, pH 8,5, 25 мМ MgCl₂, по 200мкМ каждого dNTP, 0,1 % Тритон X-100; 100мМ 2-меркаптоэтанола, 1 ед Taq-полимеразы и по 5 рмолей каждого праймера. Температура отжига указана в Таблице 2. Реакцию проводили в программируемом термостате «Терцик». Условия амплификации включали стадии денатурации, отжига и элонгации. Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле. В качестве отрицательного контроля использовали 5 мкл дистиллированной воды; положительного – ДНК штамма *Y. pestis* EV76 с плазмидой pFra.

Из взвеси клеток селезёнки, предположительно содержащих бактерии исследуемых штаммов, или из не идентифицированной бактериальной культуры, снятой с поверхности питательного агара, выделяли ДНК и обеззараживали её, как принято [129] и исследовали в ПЦР. Условия постановки ПЦР соответствовали описанным выше. При необходимости статистической обработки результатов пользовались соответствующими руководствами [10, 24].

2.8. Методы выделения и изучения антигенного комплекса FV

Метод выделения антигена FV

По аналогии с методом выделения F1 антигена [214, 215] к 100 мл взвеси нативных бактерий *Y. pestis* 556/106 Otten, в физиологическом растворе (pH 7,2) (10^{10} м.к./мл по оптическому стандарту) добавляли ДОХ в конечной концентрации 0,005 %. Шуттелировали при комнатной температуре 3 ч и центрифугировали 10.000 об/мин при 4-8°C в течение 30 мин. Супернатант сливали, оставляя для дальнейшей проработки осадок. Обработку повторяли 4 раза при наращивании концентрации ДОХ: 0,02 %, 0,08 %, 0,32 %, 1,28 %. Надосадочная жидкость после 5-го фракционирования – это раствор, содержащий «V фракцию».

Для осаждения V фракции к 100 мл супернатанта добавляли 5 объёмов (500мл) охлажденного до -20°C ацетона и оставляли смесь в холодильнике на 18-20 ч для формирования осадка. Затем смесь центрифугировали 30 мин при 4°C и 10.000 об/мин и удаляли надосадочную жидкость. Осадок – (фракция V) – растворяли в 50 мл физиологического раствора и диализовали против дистиллированной воды 7 сут. Раствор «фракции V» разливали по 1 мл в пробирки Eppendorf и замораживали при -20°C для последующего изучения свойств. При длительном хранении антигена целесообразна лиофильная сушка.

Исследование иммунологической активности.

Антигенную активность FV определяли в реакции диффузионной преципитации (РДП) по методу [299] с различными разведениями кроличьей анти-FV-сыворотки с титром 1:160, а в качестве антигена использовали препарат FV-антигена и взвеси бактерий, как штамма продуцента, так и использованных ранее при получении МКА Fra^- бесплазмидного атипичного штамма *Y. pestis* Yawa и вакцинного Fra^+ EV76 Контрольными были

«антигенные» лунки с препаратом FV и бактериями псевдотуберкулёзного штамма *Y. pseudotuberculosis* 1986.

Иммуноблоттинг выполняли, как описано [255], с полученными ранее поликлональными мышинными антителами, специфичными к лизату бактерий-продуцента *Y. pestis* 556/106 и к препарату FV-антигена. В отдельных опытах антителами служили специфичные к компоненту антигена FV мышинные МК-IgM (Е6/Н8). Для переноса белков с форезного геля использовали мембраны (Amersham Hybond-P), которые обрабатывали по инструкции производителя. Перенос вели в режиме постоянного тока 150 мА в течение 1 часа с использованием блоттера для полусухого переноса на платформе Multiphor-II (GE Healthcare Life Sciences, ЕС) в буферном растворе (рН 8,3), содержащем 25мМ Трис, 192 мМ глицина, 20 % этанола и 0,1 % ДСН. Блокировку мембран проводили в растворе 1 % БСА в 10мМ фосфатно-солевом буфере с Твином-20 (ФСБТ) в течение 18 ч при 6 °С. После этого мембрану помещали в раствор (1:2000) МКА Е6/Н8 и инкубировали в течение 2 ч при 37 °С на термокачалке со скоростью вращения 60 об/мин и промывали ФСБТ. Для визуализации полос инкубировали при тех же условиях с раствором (1:4000) антимышиных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Промытые ФСБТ мембраны погружали на 3-4 мин в раствор субстрата, 3,3-диаминобензидина-Н₂О₂-NiCl₂. Развитие цветной реакции останавливали, промывая деионизированной водой. В случаях использования кроличьих антител для визуализации применяли антикроличьи иммуноглобулины, меченные аналогично.

Изучение структуры FV антиген.

В последующих опытах по изучению антигена FV применяли двухмерный гельэлектрофорез, иммуноблоттинг с МКА и изоэлектрическое фокусирование в соответствии с известными рекомендациями [139, 209, 220, 286, 325]. Приготовление растворов и гелей описано ниже. В завершение проводили масс-спектрометрический анализ.

Приготовление 12.5 % разделяющего геля.

В химический стакан ёмкостью 100 мл, наливали 20 мл 30 % раствора акриламида/бисакриламида, 12,5 мл 1,5М буферного раствора трис-НС1, рН 8,8; 16,75 мл деионизированной воды и 0.5 мл 10 % раствора ДСН, перемешивали и дегазировали под вакуумом. Затем добавляли 250 мкл 10 % раствора персульфата аммония, 25 мкл TEMED, перемешивали и заливали в полость между стёклами электрофоретической ячейки, наслаивали 0,15 мл насыщенного водой н-бутанола. Полимеризация геля продолжалась в течение 30-40 мин при температуре 18-20 °С и сопровождалась нагревом и появлением границы между гелем и водой. В течение указанного времени гель не перемещали.

Приготовление 3,5 % концентрирующего геля.

По окончании полимеризации готовили поверхность разделяющего геля для заливки концентрирующего геля. Для этого водно-бутаноловый слой удаляли, промывали водой и подсушивали фильтровальной бумагой. В химический стакан, объёмом 50 мл наливали 1,3 мл 30 % растворов акриламида/бисакриламида; 2,5 мл 0,5 М буферного раствора трис-НС1, рН 6,8; 6,1 мл деионизированной воды и 0,1 мл раствора ДСН. Смесь перемешивали, дегазировали и затем добавляли 50 мкл 10 % раствора персульфата аммония и 10 мкл TEMED, перемешивали и сразу же заливали полученный раствор концентрирующего геля непосредственно на поверхность разделяющего геля. В раствор концентрирующего геля вводили гребёнку, не допуская при этом захвата воздушных пузырьков. Полимеризация геля происходила в течение 30-40 мин при температуре 18–20 °С. После завершения полимеризации гребёнку удаляли и промывали образовавшиеся луни электродным буферным раствором.

Приготовление градиентного разделяющего геля.

«Лёгкий» компонент геля, объёмом 35 мл готовили, смешивая 15,4 мл воды, 10,5 мл 30 % раствора акриламида/бисакриламида; 8,75 мл 1,5М буферно раствора трис-НС1, рН 8,8, и 0,35 мл 10 % раствора ДСН. Перед дегазацией добавляли 80 мкл 10 % раствора персульфата аммония. В

«тяжёлом» компоненте, объёмом 35 мл, содержалось 18,7 мл 30 % раствора акриламида/бисакриламида, деионизированной воды 3,75 мл; 50 мкл 10 % раствора персульфата аммония и дополнительно – 3,5 мл глицерина. Раствор дегазировали под вакуумом, добавляли по 15 мкл TEMED и заливали в формирователь градиента «Bio-Rad, модель 485», выход которого, соединённый с перистальтическим насосом, направлял формирующийся градиентный гель в заливочный модуль. Модуль содержал 2 пары стёкол (0,15×16×18 см). Скорость потока составляла 15 мл/мин. Заливку останавливали по истечению раствора. Затем на гели наслаивали по 300 мкл насыщенного водой н-бутанола и оставляли на 2,5 часа для завершения полимеризации линейного градиента (8-16 %) акриламида.

Условия электрофореза.

Антигенные образцы смешивали в соотношении 1:1 с буферным раствором, чтобы приготовить образцы для проведения электрофореза в редуцирующих условиях, кипятили в течение 5 мин, охлаждали и наносили в лунки (N=18) концентрирующего геля под слой однократного электродного буфера. Разделение проводили в мини-гелях (0,1^x 10^x 10,5) см в электрофорезной камере «MiniVE» (GE Healthcare) при комнатной температуре в режиме постоянного тока с силой 10 мА на один столбик геля при прохождении фронта красителя через концентрирующий гель и 20 мА через разделяющий гель. Напряжение ограничивали пределом, составлявшим 250 V. Цепь отключали при достижении нижней границы стёкол фронтом красителя.

Окраска полиакриламидного геля. В кювету для окрашивания помещали 25 мл раствора Кумаси ярко-голубого G-250. После чего чистым пластиковым шпателем «ровняли» гель со стеклянной пластины в раствор Кумасси. Продолжительность окрашивания составляла 1 час. После этого раствор сливали и заменяли на обесцвечивающий раствор, его меняли 3 раза и в нём хранили отмытый гель. Окрашивание и отмывку проводили на качалке, со

скоростью вращения 60 об/мин. Раствор Кумасси для окраски использовали только один раз. Работу проводили в перчатках.

Цифровые изображения электрофореграммы. Использовали устройство для гель–документации (Vilber–Lourmat) после удаления воздушных пузырьков между гелем и стеклянной подложкой, суммировали размеры изображения и регулировали освещённость геля диафрагмой. Цифровое изображение геля записывали на съёмный носитель, после чего файлы цифровых изображений переносили на персональный компьютер.

Разделение белков FV-антигена и идентификация белка, специфически реагирующего с МКА (Е6/Н8).

а) Изоэлектрическое фокусирование в капиллярах в неравновесном градиенте рН (NEPHGE).

В микропробирке, содержащей 600 мкл деионизированной воды, растворяли 1 г мочевины, 260 мл 30 % раствора акриламида/бисакриламида, 75 мкл амфолинов (5-8), 40 мкл амфолинов (3-0) и 120 мкл смеси 30 % CHAPS с 10 % NP-40. Раствор тщательно перемешивали, дегазировали под вакуумом, вносили 4 мкл 10 % раствора персульфата аммония и 2 мкл TEMED. После чего вносили его в капилляры с внутренним диаметром 0,15 см до высоты 12 см. На гели наслаивали по 20 мкл деионизированной воды и полимеризовали в течение 2 часов. Затем воду удаляли, вносили исследуемые образцы в объёме 10–30 мкл. Трубки крепили в камере Protean II xi (Bio-Rad), заливали электродные буферные растворы (50 мМ NaOH и 20 мМ H₃PO₄) и включали ток. Изоэлектрическое фокусирование начинали в режиме нарастания напряжения от 100v до 500v течение 1 часа, 600v – 1 час, 700v – 18 часов и 900v – 0,5 часов. Гели извлекали из трубок и помещали на 2,5 часа в уравнивающий буфер, содержащий 6М мочевины, 30 % глицерин (объём/объём), 0,125М трис-HCl (pH 6,8), 2 % додецилсульфат натрия (вес/объём), 15мМ дитиотрейтола, 0,02 % бромфенолового синего. Уравновешенные гели наслаивали на градиентный разделяющий гель (линейный градиент 8-16 % акриламида). Фиксировали их положение

расплавленной 1 % агарозой, приготовленной на буфере, содержащем 125 мМ трис-НС1 рН 6,8 и 0,1 % ДСН и проводили электрофоретическое разделение в режиме постоянного тока 50 мА на один столбик геля.

Получение проб для двухмерного гелеэлектрофореза. Взвеси культур с чашек Петри с концентрацией не менее 10^9 КОЕ/мл разливали по 1 мл, добавляли 250 мкл *) % (вес/объём) раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивали и инкубировали 10 мин при 4 °С. Пробирки центрифугировали при 14000xg в течение 5 мин и удаляли надосадочную часть. Осадки промывали трёхкратно 1 мл холодного ацетона, содержащего 10 % воды с промежуточным центрифугированием суспензий при тех же условиях. Пробы хранили в ацетоновом растворе при -20 °С. Перед проведением этапа изоэлектрического фокусирования ацетон удаляли, осадки растворяли в буферном растворе, содержащем 8М мочевины, 2М тиомочевину 20М дитиотрейтол, 5 % (объём/объём) амфолитов 3-10 (Bio-Rad), 18 % (объём/объём) смеси, содержащей 30 % CHAPS и 10 % NP-40.

Масс-спектрометрия выбранных белков. Выбранный по результатам иммуноблотта белок с наибольшей интенсивностью окраски после взаимодействия с МКА Е6/Н8 и визуализации антимышиными антителами с пероксидазой хрена отделяли, подвергли протеолитическому расщеплению трипсином с последующей элюцией и массспектрометрическому анализу 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).

Все эксперименты выполняли, соблюдая требования режима работы с возбудителями I-IV группы патогенности (*Y. pestis* – *Y. pseudotuberculosis* I – III) в зависимости от видовой принадлежности и характеристике патогенных свойств [169]. Атипичные «спорные» штаммы, подозрительные на принадлежность к *Y. pestis* относили к I группе патогенности до окончательной идентификации и получения полной диагностической характеристики вариантов.

Таблица 2 – Используемые в работе праймеры

№ п.п.	Наименование пары праймеров	Нуклеотидная последовательность	Т°С отжига праймеров	Размер фрагментов, п.о.	Ссылка на автора
1.	3a	for -5'TGTAGCCGCTAAGCACTACCATCC-3' rev -5'GGCAACAGCTCAACACCTTTGG-3'	65	276	[349]
2.	v1m12for/IS216rev	for -5'TATCGTCCGCTATTGCCTGT-3' rev -5'GCTCAGATTTTGCCTGCAAA-3'	65	390	[293]
3.	v1m33rev/IS1754for	for -5'GGTGATGCAGCACTGACCTC-3' rev -5'GAGCTTTTCAGCTTCTTCATCAG-3'	65	399	[293]
3.	JSfor/JSrev	for -5'GCAGCTTAGGCTGTCATCG-3' rev -5'CTATCGCCTGATTGGAGAG-3'	65	223	[253]
4.	F1	for -5'CCCTTTAAGCTTTTGGTTAGATACGGT-3' rev -5'CCCTTTCCCATGTAGTTAACATTT-3'	62,5	290	[251]
5.	IS1/IS2	for -5'CAAATCTGAGCCGCCAAAATAT-3' rev -5'GTCATACTCTTCGAACGTTTT-3'	50	1200	[143]
6.	<i>cafI</i> (alt)	for -5'ACAATTATGGACAATGGAAACATCG-3' rev -5'AATTGAGCGAACAAAGAAATCCTG-3'	57	267	Данная работа
7.	<i>cafR</i> (alt)	for -5'CCTCAACGCTGTGAAATCCAA-3' rev -5'GTTACGATGTGGAGGTCATAAAA-3'	55	192	Данная работа
8.	<i>cafM</i> (alt)	for -5'GTCGATATGAAATGATGGGGA-3' rev -5'CGGCTTTCATTATGATCCTACTC-3'	53	311	Данная работа
9.	<i>cafA</i> (alt)	for -5'TCCAGAGTCTACCTTTCGACCATT-3' rev -5'GGGAGGGTTGGATCGTTTGTA-3'	57	250	Данная работа

Глава 3. СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕГЛАМЕНТИРОВАННЫХ ТЕСТОВ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ШТАММОВ *Y. PESTIS* И *Y. PSEUDOTUBERCULOSIS*

В этой главе на модели типичных и атипичных штаммов продемонстрирована степень надёжности официально рекомендуемых тестов идентификации и дифференциации *Y. pestis* от *Y. pseudotuberculosis* [91, 110] и апробирован дополнительно для повышения точности и надёжности дифференциации иммунологический тест коаггутинации бактерий штаммов с диагностикумом на антиген FV и ПЦР с парами хромосомных праймеров, из группы «vlm» («vlm12/IS216», «vlm33/IS1754»), видоспецифических для *Y. pestis*, и JS – для *Y. pseudotuberculosis*.

3.1. Вариабельность диагностических признаков, затрудняющая идентификацию штаммов иерсиний, и выбор наиболее надёжных тестов, определяющих видовую принадлежность

Отбор атипичных по разным признакам штаммов проводили, используя коллекцию из 270 штаммов *Y. pestis* (subsp. *pestis*), выделенных в разных природных не «полёвочьих» очагах (Кавказа и Закавказья, Средней Азии Центральной Азии, Алтая, Забайкалья, Поволжья, а также в странах Ближнего и Дальнего Зарубежья) указаны в Приложении (Таблицы 1, 2, 3). Штаммы, полученные из разных источников и выделенные от разных носителей, хранились в музее живых культур РостНИПЧИ в лиофилизированном состоянии различное время. Кроме того, исследовали также субкультуры этих штаммов, сохранявшиеся в лаборатории микробиологии чумы и других

иерсиниозов РостНИПЧИ на агаровых косяках в рефрижераторах, лиофилизированные экспериментальные штаммы *Y. pestis*; 60 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, включая природные штаммы из Северо-Западных районов и Дальнего Востока России; а также коллекцию из 20 типовых штаммов *Y. pseudotuberculosis* 16 сероваров [336], полученную из института им. Макса фон Петтенкофера (Мюнхен, Германия).

При изучении штаммов учитывали признаки, отличающие бактерии чумы от возбудителя псевдотуберкулёза [170]. Перечень и результаты указаны в Таблица 3.

R-колонии у большинства штаммов, представляющих вид *Y. pestis*, были типичны и безошибочно распознавались в посевах. Типичные для *Y. pseudotuberculosis* S-колонии значительно отличались от R-форм *Y. pestis*, способствуя дифференциации этих видов. Однако некоторые штаммы чумного микроба росли в виде относительно гладких колоний, а бактерии обоих видов при диссоциации образовывали формы, промежуточные между R и S, (от 2 до 10 %), которые не могут быть надёжным ориентиром. К тому же, колонии *Y. pestis* при росте на питательных средах с гемолизированной кровью и на агаре LB (Difco), в отличие от агара Хоттингера, иногда были гладкими, без характерных особенностей.

При определении ферментации рамнозы у штаммов *Y. pestis* основного подвида обнаружено 5 % нетипичных Rha⁺ штаммов, но подавляющее большинство были типичными Rha⁻. Однако среди штаммов *Y. pseudotuberculosis* также обнаружены единичные Rha⁻ варианты. Аналогичные данные получены и в отношении ферментации мелибиозы. Нехарактерная для чумного микроба способность ферментировать мочевины (Ure⁺) обнаружена у 7 исследованных штаммов *Y. pestis* (2,5 %). Напротив, 6 штаммов *Y. pseudotuberculosis* (7,5 %), оказались не способны ферментировать мочевины (Ure⁻), так же, как чумной микроб.

Таблица 3 – Доля штаммов с нетипичными для вида признаками

Признаки	Доля штаммов коллекции атипичных по признаку, % ±*)	
	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
Форма колоний	(O, OS) 2±1,4	(OR, R)→10 ± 6
Фаг Покровской, чувствительность	(-) 3,2 ± 1,7	(+) 12 ± 6
Фаг псевдотуберкулёзный, чувствительность	(-) 3 ± 1,7	(-) 8 ± 5,5
Ауксотрофность	(-) 0,4 **)	(+) 9 ± 5,8
Ферментация рамнозы	(+) 5 ± 2,5	(-) 6 ± 4,8
Ферментация мочевины	(+) 2,5 ± 1,4	(-) 7,5 ± 5,1
Наличие плазмид	(-) 3 ± 1,7	(-) 15 ± 7,2
Плазмиды 65-100 МД	(-) 6,3 ± 2,7	(+) 20 ± 8
Плазмиды 6-8 МД	(-) 4 ± 2,0	(+) 3**)
Плазмиды 30, 16, 4 МД	(+) 7 ± 2,6	(+) 10 ± 6
Фаг Л-413 «С», чувствительность	(-) 5 ± 2,5	(+) 0
Подвижность	(+) 0	(-) 6 ± 4,8
F1-антиген	(-) 14,3 ± 3,6	(+) 0
FV-антиген	(-) 0	(+) 2**)
ПЦР (vIm12/IS216)	(-) 0	(+) 0
ПЦР (vIm33/IS1754)	(-) 0	(+) 0
ПЦР (JS)	(+) 0	(-) 0

*) – Предел, которого ошибка не превышает в 19 случаях из 20;

***) – предел ошибки превышает сам показатель [24].

При идентификации *Y. pestis* и дифференциации от *Y. pseudotuberculosis*, для практического использования рекомендуют фаги – чумной диагностический (Покровской), псевдотуберкулёзный диагностический, чумной диагностический Л-413С (Лариной), известные фаги Н и Му. В наших опытах 9 (3,2 %) штаммов чумного микроба проявляли устойчивость к фагу Покровской, а 14 (5 %) - к фагам Л413 «С», Му cts 62 и Н4, или существенно их ограничивали. Пять

штаммов *Y. pseudotuberculosis* из числа типовых и 4 штамма чумного микроба были резистентны к псевдотуберкулёзному фагу. Наличие фагоустойчивости снижало степень гарантии правильности оценки вида.

Ни один из исследованных в этом разделе работы штаммов *Y. pestis*, ни типичный, ни диссоциирующий или изменённый по разным признакам, в отличие от *Y. pseudotuberculosis*, не проявлял подвижности. Однако в коллекции *Y. pseudotuberculosis* обнаружено 9 штаммов (10 %), бактерии которых подобно *Y. pestis* были не способны активно передвигаться в висячей капле и распространяться в толще агара (Рисунок 2).

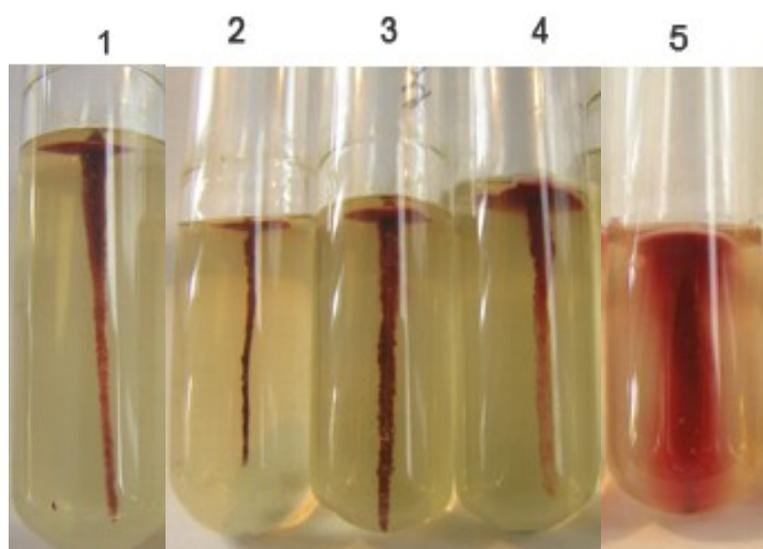


Рисунок 2 - Результаты теста на подвижность в мягком агаре при 18°C

1 – *Y. pestis* EV76. 2 – 4 – *Y. pseudotuberculosis* 463, H141/84, 322 (атипичные). 5 – *Y. pseudotuberculosis* 882.

Все штаммы *Y. pestis* subsp. *pestis* требовали для роста определённых аминокислот, типичных для этого микроба в каждом конкретном очаге. Но среди исследованных штаммов *Y. pseudotuberculosis*, как природных, так и типовых, обнаружено 7 (9 %) ауксотрофных, подобно *Y. pestis*. Эти ауксотрофные штаммы *Y. pseudotuberculosis* не росли на голодно-кислой и беспептонной среде Бессоновой, и этот тест был для них неэффективным.

Проверка способности продуцировать пестицин 1 (Pst1) и Pla-протеазу показала её отсутствие не только у всех штаммов псевдотуберкулёзного микроба, но также у 8 штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* (3 %). Последние были в единичном числе среди штаммов из природных очагов Средней Азии, Вьетнама, Поволжья, Монголии. Подтвердить их принадлежность к виду *Y. pestis* и отличить их от *Y. pseudotuberculosis*, которая исходно Pst1⁻ и Pla⁻, на основании данного признака было нельзя.

Выше указано, что продукция F1-антигена, Pst1 и Pla определяется двумя специфическими для возбудителя чумы плазмидами (pFra, 65-100 МД и pPst, 6-8 МД) в дополнение к третьей общей для иерсиний плазмиде кальцийзависимости (pCad, 47 МД). Указанная триада плазмид определённого размера была характерна для большинства исследованных штаммов чумного микроба. Это подтверждало их видовую принадлежность. Но, как известно, существуют штаммы, утратившие одну, две и даже все три плазмиды (бесплазмидные). В нашей коллекции их оказалось 10 %. Для штаммов обоих видов иерсиний, дефектных по плазмидному составу (Рисунок 3), скрининг плазмид был малоинформативным и при отрицательных результатах не позволял сделать точные выводы о видовой принадлежности.

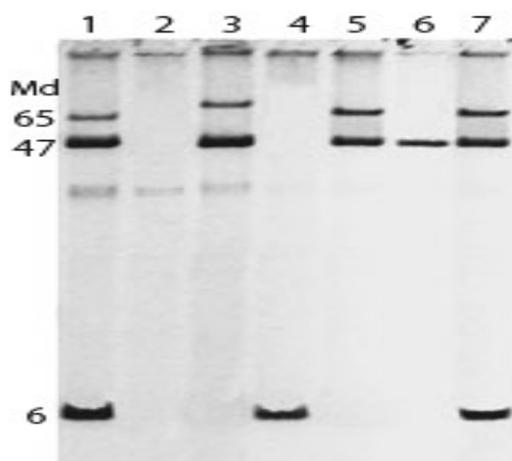


Рисунок 3 - Гельэлектрофореграмма образцов плазмидного профиля различных штаммов *Y. pestis* (1-4, 7), *Y. pseudotuberculosis* (5, 6).

Окраска EtBr. Электрофорез проводили в 0,75 % агарозном геле

Помехой были также криптические плазмиды (30 МД, 15 МД, 4 МД и др.), обнаруженные у отдельных штаммов (Рисунок 4).

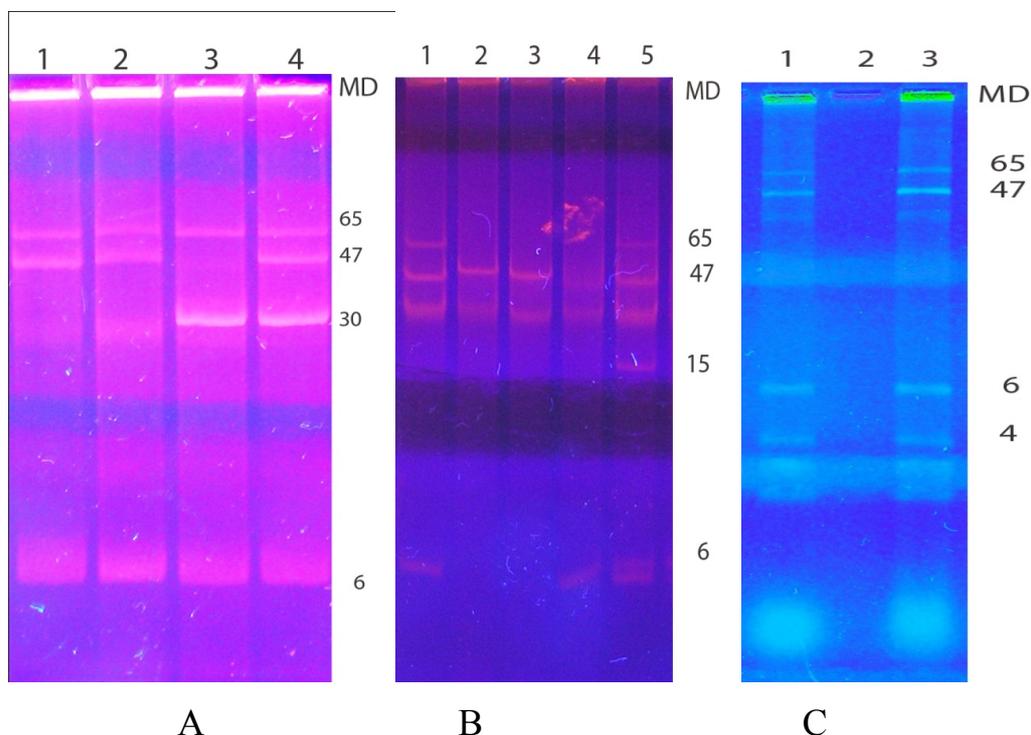


Рисунок 4 - Образцы дополнительных криптических плазмид у различных штаммов *Y. pestis*

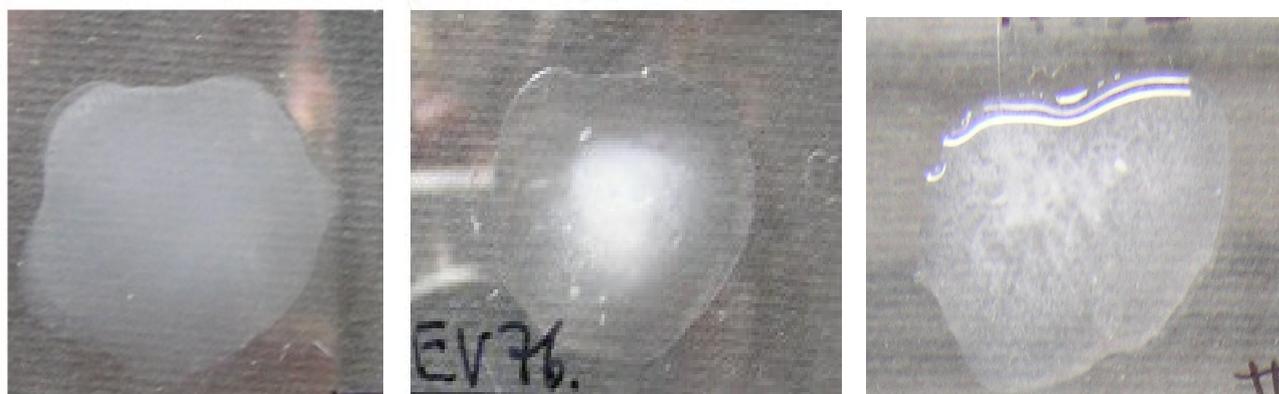
Типичные плазмиды – 65 МД, 47 МД, 6 МД; А – 30 МД; В – 15 МД; С - 4 МД.

Электрофорез в 0,7 % геле. Окраска EtBr

Среди природных встречались штаммы *Y. pseudotuberculosis* с мажорной плазмидой размером около 80 МД, которую на гелеэлектрофореграмме можно было спутать с рFra. Особенно при наличии у этих штаммов общей для иерсиний рCad и выявлении штаммов *Y. pestis* без минорной плазмиды рPst. На следующем этапе исследований использовали иммунодиагностикумы: антительный диагностикум для РАО, специфичный к капсульному антигену F1, и авторский КоА-диагностикум, специфичный к антигену чумного микроба FV, продукция которого не зависит от плазмид. У большинства штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* содержащих плазмиду рFra, F1-антиген обнаруживали в титре 10^4 - 10^5 м.к. Все изученные штаммы *Y. pseudotuberculosis*, как природные, так и типовые, не продуцировали специфичный для *Y. pestis* антиген F1. Однако и

среди штаммов возбудителя чумы (лабораторных и природных от грызунов, их блох и людей) было выявлено 22, а с учётом дополнительных клоновых субкультур 40 (14 %) F1-негативных вариантов. Антиген F1 у них или не выявлялся, или результаты были сомнительные (так называемые Fra[±]).

При тестировании изолятов *Y. pseudotuberculosis* слабо положительная реакция была отмечена только у 5 штаммов, включая 2 из числа типовых (Рисунок 5), а три – в последующем были идентифицированы как диссоциирующие штаммы *Y. pestis*. На фоне 100 % позитивности тестов с *Y. pestis* отрицательная реакция чётко свидетельствовала о принадлежности штаммов к виду *Y. pseudotuberculosis*. Это подтверждало возможность и перспективность использования КоА-диагностикума на FV для идентификации *Y. pestis* и свидетельствовало о его дифференцирующей активности в отношении атипичных вариантов *Y. pestis*, особенно выращенных при 28 °С.



А

В

С

Рисунок 5 - Коагглютинация на стекле с диагностикумом к V фракции

А – штамм *Y. pseudotuberculosis* 847. В – штамм *Y. pestis* EV76

С - штамм *Y. pseudotuberculosis* 322

В итоге в коллекции нами были обнаружены штаммы с атипичными проявлениями одновременно по 3-6 диагностическим признакам. Среди них штаммы *Y. pestis* (одновременно: Fra⁻, без pFra и pPst плазмид, Rha⁺, Ure⁺, фагоустойчивые) и *Y. pseudotuberculosis* (одновременно: Mob⁻, Ure⁻, ауксотрофные, чувствительные к чумному фагу Покровской).

На заключительном этапе, используя четыре видоспецифических праймера («JS», «vlm12/IS216», «vlm33/IS1754», и «3а»), провели ПЦР-тестирование всех штаммов двух видов иерсиний с типичным и атипичным фенотипом, видовая принадлежность которых, определённая с помощью других тестов, требовала проверки. С помощью ПЦР видовая принадлежность этих штаммов во всех случаях была точно установлена. Праймеры JS реагировали только с ДНК всех штаммов псевдотуберкулёзного микроба. Однако при тестировании *Y. pestis* обнаружены отличия. Если праймеры из группы «vlm» специфически реагировали с ДНК всех штаммов чумного микроба, то праймеры «3а» не выявляли ДНК двух штаммов (A559, A556), которые были без антигена F1, тогда как ампликоны с праймерами из группы «vlm» синтезировались регулярно (Рисунок 6А и 6В).

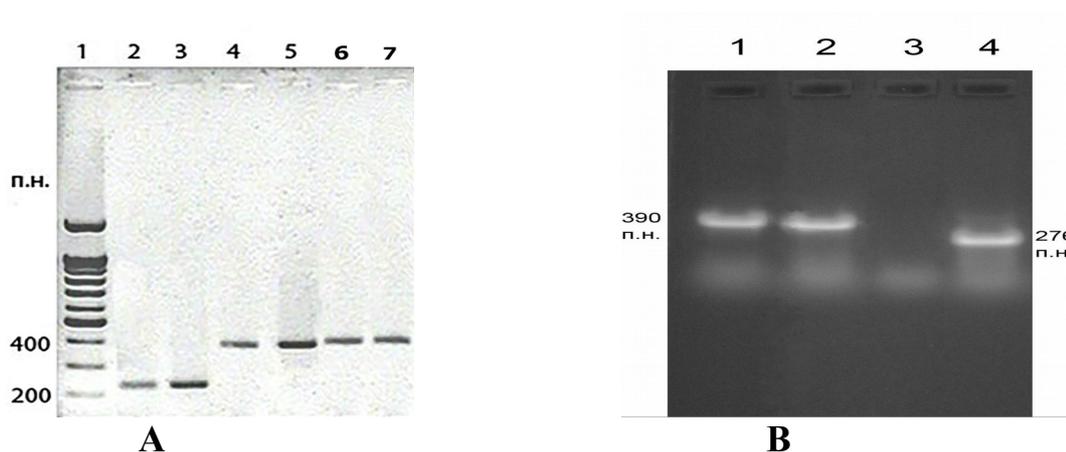


Рисунок 6А - ПЦР анализ ДНК *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*.

Окраска EtBr. Электрофорез проводили в 2 % агарозном геле.

Праймеры «JS» (2, 3) и «vlm12/IS216» (4, 5), «vlm33/IS1754» (6, 7). 1 - Маркеры М.м.; 2 - *Y. pseudotuberculosis* 1923 O:5 (типовой штамм); 3 - *Y. pseudotuberculosis* 322 (атипичный Mob⁻, Ure⁻, ауксотроф); 4, 6 - *Y. pestis* EV76 (типичный штамм); 5, 7 - *Y. pestis* Yawa (атипичный, бесплазмидный)

Рисунок 6В - ПЦР анализ ДНК:

Праймеры: «vlm12/IS216» - 1, 2; «3а» - 3, 4. *Y. pestis* EV (НИИЭГ) - 2, 4;

Y. pestis A-559 - 1, 3.

Это свидетельствовало о преимуществе испытанных праймеров группы «vlm» перед «3а». Поскольку мы не обнаружили различий в результативности

двух использованных праймеров из группы «vIm» в дальнейшем мы использовали только одну пару – «vIm12/IS216».

Таким образом, с полной гарантией во всех случаях правильно идентифицировать штаммы *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* удалось только с учётом результатов ПЦР с каждым из использованных праймеров группы «vIm» и благодаря положительной реакции коаггутинации с диагностикумом на антиген FV у *Y. pestis*. Общие итоги проверки штаммов с помощью тестов обобщены в Таблице 4 и в Приложении.

Штаммы чумного микроба, выделенные в острый период инфекции от больных людей и чувствительных животных (в основном грызунов), как правило, характеризуются видоспецифичным фенотипом, и большинство признаков может быть без отклонений охарактеризовано принятыми тестами.

Сложности возникают при выделении «бесфракционных» штаммов *Y. pestis*, при исследовании длительно хранящихся музейных штаммов этого вида или скрининге штаммов в межэпизоотический период среди эктопаразитов и нехарактерных носителей возбудителя чумы. А у бактерий возбудителя псевдотуберкулёза вариабельность обнаруживается при обследовании крыс и объектов внешней среды, а также в ходе исследований изменчивости под воздействием различных факторов.

Учитывая полученные нами доказательства эффективности межвидовой дифференциации двух иерсиний необычного фенотипа с помощью пары «хромосомных» праймеров из группы «vIm», мы исследовали некоторые музейные, так называемые «новообразованные» штаммы. Среди них широко известный штамм (*Y. pestis* ЖBR-25), селективный много лет назад в г. Одессе из лабораторного штамма «X» длительным выращиванием в препарате чумного фага, и группа штаммов (№№1860-1863), отнесенных к виду *Y. pseudotuberculosis* после селекции из штаммов *Y. pestis* (50/74, 173, 52/80, 46/68 ин-т «Микроб», Саратов) в период существования предположений о возможности перехода *Y. pestis* \longleftrightarrow *Y. pseudotuberculosis* при селекции по дифференциальным признакам в

лабораторных условиях. В качестве контрольного использовали вакцинный штамм *Y. pestis* EV76, и два бесплазмидных штамма TRU и Yawa. Бесплазмидный штамм *Y. pestis* ЖБР-25 по результатам современных тестов и, судя по появлению в ПЦР с праймерами «JS» (но не «vIm12/IS216») специфических ампликонов из 223 п.о., определён нами как представитель вида *Y. pseudotuberculosis*.

Относительно штаммов №№ 1860-1863 (*Y. pseudotuberculosis*?) следует заметить, что их ДНК реагирует с праймерами «JS», а не «vIm12/IS216». По многим тестам их фенотип соответствует *Y. pseudotuberculosis*. Однако решение вопроса об их происхождении требует дополнительных исследований генома.

Итак, была отобрана коллекция атипичных штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. На их модели классифицирован по степени надёжности набор признаков, принятых в практике для идентификации и дифференциации этих иерсиний, и показана способность теста на FV антиген чумного микроба и ПЦР с «хромосомными» праймерами из группы «vIm» и «JS», специфически реагирующими с ДНК любых по фенотипу штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, соответственно, повышать эффективность диагностики.

Таблица 4 - Результаты тестирования штаммов по дифференциальным признакам:

№ п/п	Признаки	<i>Y. pestis</i>		<i>Y. pseudotuberculosis</i>	
		Типичные штаммы	Атипичные штаммы	Атипичные штаммы	Типичные штаммы
1	Ферментация рамнозы		+	–	+
2	– «– мелибиозы	–	+	–	+
3	Гидролиз мочевины		+	–	+
4	Чувствительность к фагу Покровской	+	–	+	–
5	псевдотуберкулёзному	+	–	–	+
6	Л-413С	+	–	–	–
7	Подвижность	–	–	+/-	+
8	Ауксотрофность	+	–	+	–
9	Реакция КоА на фракцию V	+	+	-/+ед.	–
10	Продукция F1-антигена	+	-/+*	–	–
11	Пестицина 1	+/-	-/+*	–	–
12	Pla-протеазы	+/-	-/+*	–	–
13	ПЦР с праймерами: F1 и на <i>cafI</i> и <i>cafR</i> гены	+	-/+*	–	–
14	«За», специфический для <i>Y. pestis</i>	+	+/-**	–	–
15	«vIm12/IS216», специфический для <i>Y. pestis</i>	+	+	–	–
16	«vIm33/IS1754», специфический для <i>Y. pestis</i>	+	+	–	–
17	«JS», специфические для <i>Y. pseudotuberculosis</i>	–		+	+

Примечания:

2 * «+» у некоторых штаммов при условии атипичности по другим признакам

2 ** «↔» у штаммов из отдельных очагов Африки

3.2. Подходы к идентификации атипичных диссоциирующих штаммов чумного микроба и дифференциации их от бактерий псевдотуберкулёза

Специалистам известны несколько атипичных штаммов иерсиний, выделенных от крыс в очаге, где возбудитель чумы ранее не обнаруживался (зона порта г. Санкт-Петербурга). Штаммы первоначально были идентифицированы как *Y. pseudotuberculosis*. Вирулентность их для лабораторных животных была очень слабой. Штаммы диссоциировали по форме колоний и имели признаки поражения бактериофагом [168]. Позже при изучении их популяций из них были выделены R- и S- диссоцианты [126, 152]. У субкультур в R-форме по мере совершенствования диагностических приёмов обнаруживались свойства, характерные для близкородственного вида *Y. pestis*. За прошедшие годы отношение к штаммам было разным. Одни считали их представителями возбудителя псевдотуберкулёза [76] другие относили их к неизвестному промежуточному виду [207]. Допускалась возможность превращения одного вида в другой в процессе лабораторных пересевов [94]. И, наконец, при совершенствовании диагностики по результатам ряда тестов эти штаммы считали близкими к виду *Y. pestis* с неясным происхождением [12, 45, 181]. Совершенствование приёмов идентификации возбудителя чумы и открытие антигена F1 позволило получить дополнительные данные [45, 126, 184] и характеризовать штаммы как относительно стабильные, идентичные *Y. pestis*. Однако при культивировании в разных условиях в популяциях этих бактерий постоянно обнаруживали клоны, по результатам практикуемых в каждый конкретный промежуток времени микробиологических тестов, неотличимые от возбудителя псевдотуберкулёза [126]. Было не ясно, связано ли это «расщепление» штаммов с диссоциацией или это смешанные культуры чумного и псевдотуберкулёзного микробов. Допущение существования смеси требовало изоляции двух видов клонов и

последующей их убедительной идентификацией. В случае диссоциативной изменчивости была необходима проверка правильности проведенной ранее идентификации, а также оценка достоверности использованных приёмов дифференциации, которые, в основном, рассчитаны на фенотипы типичных представителей видов иерсиний.

В данном разделе диссертации была выполнена работа: (1) по уточнению видовой принадлежности «спорных» штаммов иерсиний и их «диссоциантов», (2) по определению границ variability дифференциальных признаков у различных клонов в популяциях этих диссоциирующих культур возбудителя чумы и (3) по оценке диагностической значимости этих признаков для анализа генетически нестабильных бесплазмидных и дефектных по капсульному антигену штаммов чумного микроба в чистых и смешанных культурах.

Объектом исследования были упомянутые выше исходные «спорные» штаммы *Y. pseudotuberculosis* 2393, 5761, 5764, 5765 выделенные от крыс, их R- и S- «диссоцианты» и отдельные клоны, штамм 489 в S- и R-форме от морской свинки. В качестве контрольных штаммов использовали вакцинные – *Y. pestis* EV76 (линия НИИЭГ), 1/1092, 17/1093 и типовой штамм *Y. pseudotuberculosis* 847 серовара O:1b. Свойства перечисленных штаммов, указанные в паспортах и первых публикациях, приведены в Таблице 5.

Предварительная проверка подтвердила соответствие свойств исследуемых штаммов тем, которые указаны в паспортах и в первой публикации [168]. Все исследованные варианты штаммов, похожие на возбудителя чумы или бактерии псевдотуберкулёза, соответственно, были однотипны в своих группах, поэтому в таблицах мы их объединили. Затем проверили большой набор признаков, описанных в современной литературе как диагностические. Все исходные «спорные» штаммы *Y. pseudotuberculosis*, похожие на возбудителя чумы, тоже не разлагали рамнозу, мочевины, мелибиозу и проявляли такую же, как у чумного

Таблица 5 - Характеристика штаммов, использованных в разделе 3.2

Перечень признаков	<i>Y. pseudotuberculosis</i>			<i>Y. pestis</i> Fra ⁺ (контроль)		
	Fra ⁺ (исход- ные) 5761, 5764, 5765, 489R, 2393	Fra ⁻ (дис- соци- анты) 5764S, 5765S, 5765R, 489S	847 O:1b Fra ⁻ (кон- троль)	EV76	1/ 1092	17/ 1093
Ферментация: рамнозы	-	+	+	-	-	-
глицерина	+	+	+	-	+	+
мочевины	-	+	+	-	-	-
Восстановление метиленовой синьки	-	+	+	-	-	-
Чувствительность к фагу чумному Покровской	+	-	-	+	+	+
Чувствительность к фагу псевдотуберкулезному	+	+	+	+	+	+
Рост на беспептонном агаре (степень двукратного разведения из 10 ⁹ м.к.)	1	8	8	1	1	1
Агглютинация с противочумной сывороткой (в титре 1/640)	+	-	-	+	+	+

Примечание: перечень признаков – согласно паспортам; результаты – по итогам нашей проверки.

микроба чувствительность к бактериофагам Mu cts 62 и Л-413 «С». Они были также неподвижны при 18°C в 0,4 % агаре, проявляли ауксотрофность по двум аминокислотам (фенилаланину и метионину). Они содержали три характерные для *Y. pestis* плазмиды (М.м. 65 МД, 47 МД, 6 МД), экспрессировали специфичные для чумного микроба плазмидные детерминанты. Продуцировали F1-антиген (в РАО титр 10⁴-10⁵ м.к.),

пестицин 1 и были Cad^+ . Кроме того по результатам РКоА продуцировали специфический для возбудителя чумы независимый от плазмид антигенный комплекс FV. S-диссоцианты и штамм *Y. pseudotuberculosis* 847 O:1b обладали альтернативными свойствами.

Следовательно, суммарные результаты используемых в настоящее время дополнительных тестов свидетельствовали в пользу принадлежности исследованных атипичных штаммов Fra^+ и Fra^- фенотипов к разным видам иерсиний, соответственно *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. Исследование мы продолжили с помощью ПЦР. В реакции с парой праймеров на основе фрагмента из IS100 положительные результаты были получены со всеми Fra^- «диссоциантами», Fra^+ «спорными» и контрольными штаммами двух видов иерсиний (Рисунок 7).

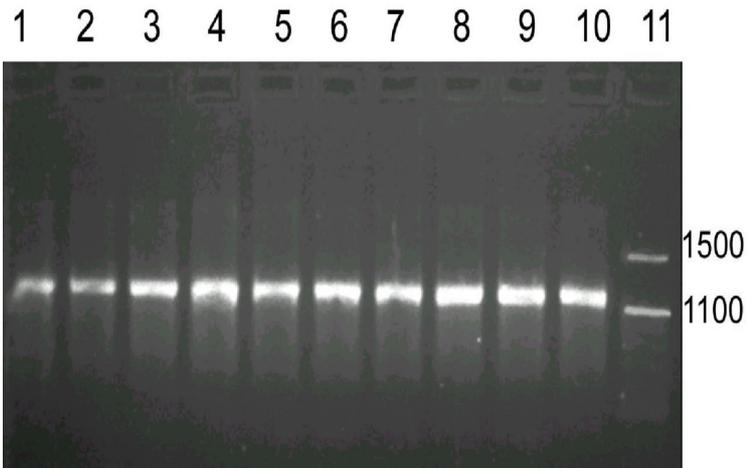


Рисунок 7 - ПЦР-анализ ДНК исследованных штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* с праймерами «IS1» и «IS2».

Штаммы: 1, 2, 3 – *Y. pestis* EV76, 1, 17, соответственно, (контроль); 4 – *Y. pseudotuberculosis* 847 O:1 (контроль); 5-7 - *Y. pseudotuberculosis* (Fra^+) 5764, 5765, 489R; 8- 10 – бесплазмидные диссоцианты *Y. pseudotuberculosis* 5764S, 5765S, 489S; 11 – Маркеры (п.н.); Окраска EtBr. Электрофорез проводили в 2 % агарозном геле

Это свидетельствовало в пользу принадлежности всех исследованных штаммов к роду *Yersinia* и, конкретно, к видам *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* O:1b, для которых характерно наличие IS100-элемента. В ПЦР с видоспецифичными для *Y. pestis* праймерами «3а», «vIm12/IS216» и «JS» - для *Y. pseudotuberculosis* получены также чёткие результаты. Праймеры «3а» и «vIm12/IS216» взаимодействовали только с ДНК Fra⁺ исследуемых «спорных» и контрольных штаммов чумного микроба, а праймеры «JS» - только с ДНК S-«диссоциантов» и контрольного штамма 1989 O1b возбудителя псевдотуберкулёза (Рисунок 8).

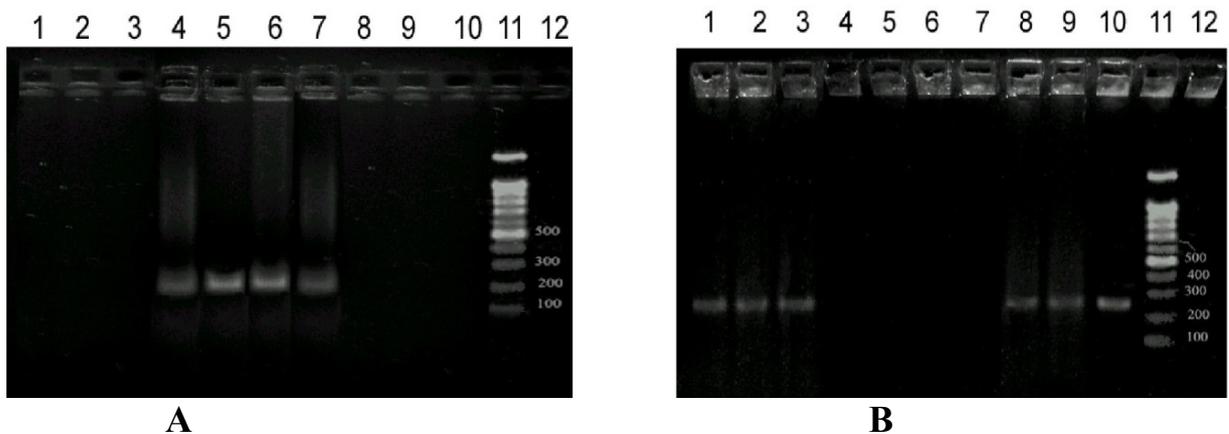


Рисунок 8 - ПЦР-анализ ДНК исследованных штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* с праймерами

А - Видоспецифические праймеры «JS» для *Y. pseudotuberculosis*

В - Видоспецифические праймеры «3а» для *Y. pestis*;

Штаммы: 1, 2, 3 – соответственно, *Y. pestis* EV76, 1, 17, (контроль);
 4 – *Y. pseudotuberculosis* 847 O1 (контроль); 5, 6, 7 – бесплазмидные Fra⁻
 диссоцианты *Y. pseudotuberculosis* 5765S, 5765S, 5765R;
 8, 9, 10 – *Y. pseudotuberculosis* (*Y. pestis*?) (Fra⁺) исх.5765, 5765, 489R;
 11 – Маркеры (п.н.).

Окраска EtBr. Электрофорез проводили в 2 % агарозном геле

Таким образом, результаты исследования высокоспецифичных структурных компонентов геномов штаммов с помощью ПЦР и дополнительное использование КоА-диагностикума на антигенный комплекс FV окончательно подвели итоги многолетней идентификации

«спорных» штаммов, определив их как *Y. pestis*. Бесплазмидные, Fra⁻ S- и R-«диссоцианты» по сумме результатов чётко могут быть отнесены к виду *Y. pseudotuberculosis*, а все варианты, содержащие плазмиды и являющиеся Fra⁺ - к виду *Y. pestis*.

На данном этапе мы не могли объяснить происхождение «спорных» R- и S-«диссоциантов», похожих на возбудителей псевдотуберкулёза и чумы. Обнаруженная ситуация возможна в случае, если исходные штаммы представляли собой культуры, содержащие бактерии обоих видов. Для доказательства мы провели клонирование трёх «спорных» штаммов, идентифицированных нами окончательно как *Y. pestis* (5761, 5764, 5765). Выращивая культуры в разных условиях, разное время отобрали колонии OS- и OR-формы, не характерные для возбудителя чумы. Среди них по результатам гельэлектрофореза плазмидной ДНК выбрали клоны, бесплазмидные, содержащие все три плазмиды и дефицитные по одной-двум плазмидам чумного микроба. Частота сегрегации плазмид у клонов, формирующих атипичные колонии, была на уровне 5-10 %. Такая неоднородность популяции «спорных» Fra⁺ исходных штаммов по дефицитности плазмид наблюдалась на разных средах, в культурах, выросших при 12 °С, 28 °С и 37 °С, а также хранившихся от 1,5 до 2 лет на питательных средах без пересевов. Отобрали 15 клонов с полным набором плазмид, 87 клонов, дефицитных по 1-2 плазмидам, и 3 - бесплазмидных. Последние по признаку отсутствия плазмид были аналогичны S-«диссоциантам». Отобрали также 43 клон S-«диссоциантов» (*Y. pseudotuberculosis*).

У всех клонов были проверены те же дифференциальные признаки, которые изучали у культур до клонирования. Поскольку исследуемые штаммы по своим свойствам были однотипны, результаты дальнейшего анализа клонов приведены нами в сумме по всем штаммам. Значимость использованных признаков для дифференциации клонов двух исследуемых видов оказалась разной.

При тестировании первой группы признаков, которая включала неподвижность при 18 °С, ауксотрофность, наличие плазмид и специфического антигенного комплекса FV, все клоны с одной, двумя или тремя плазмидами, также как их исходные «спорные» Fra⁺ штаммы, были одинаковы (Таблица 6).

Таблица 6 – Характеристика некоторых признаков у атипичных клоновых культур «спорных» штаммов (5761, 5764, 5765) иерсиний и клонов их S и R-диссоциантов (5764S, 5765S, 5765R)

Признак	Наличие (+) или отсутствие (–) признаков у 100 % клонов в зависимости от их плазмидного состава				
	OR и OS клоны «спорных» штаммов			Клоны S-«диссоциантов»	
	3 плазмиды	2 или 1 плазида	Без плазмид	Без плазмид	Без плазмид
Производство FV-антигена (<i>Y. pestis</i>)	+	+	+	–	–
Подвижность	–	–	–	+	+
Прототрофность	–**	–**	–**	+	+
Производство антигена F1	+	(+/-)*	–	–	–
Производство пестицина 1	+	(+/-)*	–	–	–
Реакция с анти-О:1 b антителами (псевдотуберкулез)	н/о	н/о	–	+	+
ПЦР с праймерами «IS1», «IS2» (<i>Yersinia</i>)	+	+	+	+	+
ПЦР с праймерами «3a» (<i>Y. pestis</i>)	+	+	+	–	–
ПЦР с праймерами «vIm12/IS216» (<i>Y. pestis</i>)	+	+	+	–	–
с праймерами «JS» (<i>Y. pseudotuberculosis</i>)	–	–	–	+	+
ВСЕГО исследовано клонов	15	87	1	2	43

Примечание * - наличие пестицина 1 или антигена F1 коррелировало с сохранностью соответствующих плазмид в клонах. ** - ауксотрофность по фенилаланину и метионину. Показатели признаков в каждой графе были однотипными у всех исследованных клонов в соответствующей группе; н/о – не определяли

Они продуцировали пестицин 1 и F1, строго в зависимости от наличия соответствующих плазмид, и по этим признакам были полностью аналогичны контрольным штаммам чумного микроба. Все клоны выделенных ранее «диссоциантов» и два из трёх бесплазмидных клонов «спорного» Fra⁺ штамма 5765, также, как контрольный штамм *Y. pseudotuberculosis* 1989 O:1 характеризовались противоположными свойствами. Более того, они положительно реагировали с антительным диагностикумом на O:1b серовар возбудителя псевдотуберкулёза. Исключений среди результатов видовой идентификации не наблюдали: все клоны, лишённые подвижности, обладающие ауксотрофностью, имеющие одну или все три «чумные» плазмиды и позитивно реагирующие с диагностикумом на FV антиген по результатам ПЦР с праймерами vlm12/IS и За можно было отнести к виду *Y. pestis*.

Диагностические бактериофаги – чумной Покровской, Л 413«С», колифаг и Mu cts 62 (вторая группа тестов) выполняли свою дифференцирующую роль точно без отклонений в отношении OS- и OR-клонов «спорных» штаммов, содержащих три «чумные» плазмиды (Таблица 7). Псевдотуберкулёзный фаг лизировал бактерии S-диссоциантов. Клоны исходных «спорных» штаммов, с дефицитом одной или двух из трёх типичных плазмид, в большинстве своём были чувствительны к фагам, как это характерно для *Y. pestis*. Но в единичных случаях – оказались резистентными так же, как *Y. pseudotuberculosis*.

По признаку ферментативной активности (третья группа тестов) вариабельность в равной степени отмечена у клонов с дефицитом плазмид и S-«диссоциантов» (Таблица 7). Но клоны с нехарактерным фенотипом были в меньшинстве. В то же время исходные штаммы до клонирования чётко отличались по этим признакам. Вероятно, атипичных клонов в популяции было недостаточно, чтобы выявить использованными методами.

Таблица 7 - Характеристика переменных свойств у отличающихся по плазмидному составу клонов «спорного» штамма 5765 *Y. pseudotuberculosis*

Признак	% клонов, обладающих признаками, в зависимости от их плазмидного состава				
	OR и OS клоны «спорных» штаммов				«S-диссоцианты»
	3 плазмиды (Fra ⁺)	2 или 1 плазмиды (Fra ⁺ , Fra ⁻)	Без плазмид *	Без плазмид **	Без плазмид
Ферментация: рамнозы (+/-)	$\frac{0}{100 \pm 4,0}$	$\frac{16 \pm 7,5}{84 \pm 7,5}$	+	+	$\frac{98 \pm 4,5}{2^{***}}$
мелибиозы (+/-)	$\frac{0}{100 \pm 4,0}$	$\frac{19 \pm 8,4}{81 \pm 8,4}$	+	+	$\frac{86 \pm 11}{14 \pm 11}$
мочевины (+/-)	$\frac{0}{100 \pm 4,0}$	$\frac{13 \pm 7,5}{87 \pm 7,5}$	-	+/-	$\frac{85 \pm 11}{15 \pm 11}$
Чувствительность: к фагу: Л-413 «С» (+/-)	$\frac{0}{100 \pm 4,0}$	$\frac{97 \pm 3,6}{3^{***}}$	-	-	$\frac{0}{100 \pm 3,2}$
Mu cts 62 (+/-)	$\frac{100 \pm 4,0}{0}$	$\frac{99 \pm 2,1}{1^{***}}$	-	-	$\frac{0}{100 \pm 3,2}$
Покровской (+/-)	$\frac{100 \pm 4,0}{0}$	$\frac{98 \pm 3}{2^{***}}$	-	-	$\frac{0}{100 \pm 3,2}$
к псевдотуберкулезному (+/-)	$\frac{100 \pm 4,0}{0}$	$\frac{100 \pm 2}{0}$	-	+	$\frac{100 \pm 3,2}{0}$
Всего получено и исследовано клонов	15	87	1	2	43

Пояснение: * ПЦР – *Y. pestis*; ** ПЦР – *Y. pseudotuberculosis* (см. рисунок 9)

*** – см. Таблицу 3 [24].

Данные тестов первой группы могут свидетельствовать лишь в пользу принадлежности всех бесплазмидных клонов S-«диссоциантов» к виду *Y. pseudotuberculosis*, а содержащих плазмиды в полном или сокращённом наборе и одного бесплазмидного – к виду *Y. pestis*. Отклонения в тестах с бактериофагами и проявленная в этом исследовании в разной степени недостаточная надёжность тестов по ферментативной активности потребовали применения дополнительных критериев для определения видовой принадлежности клонов. В качестве такового мы снова использовали ПЦР с «хромосомными» видоспецифическими праймерами «JS» и «vIm12/IS216» (Рисунок 9).

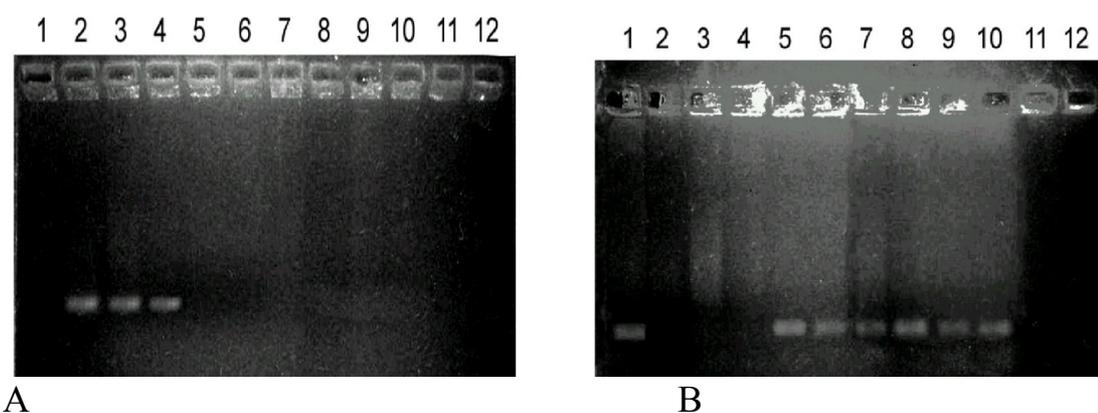


Рисунок 9 – ПЦР-анализ ДНК исследованных штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* с праймерами:

А – праймеры, видоспецифические «JS» для *Y. pseudotuberculosis*(223п.н.)

Б – праймеры «vIm12/IS216», видоспецифические для *Y. pestis*(390 п.н.)

Штаммы: 1 – *Y. pestis* EV76 (контроль); 2 – *Y. pseudotuberculosis* 847 O:1 (контроль); 3, 4 – бесплазмидные клоны из исходного «спорного» Fra⁺ штамма *Y. pseudotuberculosis* 5765; 5-10 – клоны исходных «спорных» Fra⁺ *Y. pseudotuberculosis* штаммов с дефицитом одной-двух плазмид, соответственно: 5 – 5764 (65, 6 МД); 6 – 5764 (65 МД); 7 – 5764 (47 МД); 8 – 5765 (65, 6 МД); 9 – 5765 (бесплазмидный); 10 – 5765 (6 МД).

В скобках приведена М.м. сохранившихся плазмид. Окраска EtBr.

Электрофорез проводили в 2 % агарозном геле.

Чёткие результаты ПЦР-анализа подтверждались итогами определения подвижности бактерий, питательных потребностей и результатами реакции КоА на FV-антиген чумного микроба. За редким исключением, им соответствовали также данные о плазмидном составе и результаты тестов с бактериофагами Покровской, Л-413«С» и Mu cts 62. Таким образом, нами было убедительно установлено, что исследованные S-«диссоцианты» относятся к виду *Y. pseudotuberculosis*. Это доказано, кроме результатов микробиологических и иммунологических исследований, надёжными молекулярно-биологическими дифференциальными тестами. Клоны с тремя плазмидами и дефицитные по отдельным плазмидам, в том числе и по плазмиде, ответственной за продукцию F1-антигена, напротив, были чётко идентифицированы как вид *Y. pestis*.

Особо следует отметить 3 OS-клона, выделенных из популяции штамма 5765 (*Y. pestis*) Все три были без плазмид, устойчивы к чумным фагам, ферментировали рамнозу, мелибиозу, один – мочевины. Два из них были подвижны (свойство *Y. pseudotuberculosis*); третий – продуцировал FV-антиген (свойство *Y. pestis*). Убедительно идентифицировать их удалось в ПЦР с помощью «хромосомных» видоспецифических праймеров «JS» и «vIm12/IS216». Появление специфических ампликонов подтвердило принадлежность первых двух клонов к виду *Y. pseudotuberculosis*, а третьего – к *Y. pestis*.

Вариабельность по диагностической ферментативной активности в отношении рамнозы, мелибиозы и мочевины, изменённая фагочувствительность и дефектность плазмидного состава, отмеченные у клоновых культур, лишенных 1 или 2, и даже всех плазмид, ни в одном случае по результатам ПЦР не «выводили» их за пределы собственного вида. Фрагменты хромосомы, отличающие их, сохранялись, обеспечивая эффективность ПЦР. Давно известны природные штаммы чумного микроба, способные ферментировать рамнозу, мелибиозу и мочевины [7, 118, 125]. Кроме того, в первом разделе диссертации, исследованные

«бесфракционные» и фагоустойчивые штаммы по результатам ПЦР с праймерами «JS» и «vIm12/IS216» были идентифицированы как *Y. pestis*.

В связи с выделением двух клонов *Y. pseudotuberculosis* из «спорного» штамма 5765, идентифицированного как *Y. pestis*, было сделано заключение о смешанной культуре с минорной примесью бактерий псевдотуберкулёза в популяции, хотя большинство были бактериями вида *Y. pestis*. Изолированные нами клоны могут оцениваться как чистые культуры, соответственно, *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, а выделенные атипичные клоны чумного микроба являются результатом диссоциации, сопровождающейся изменением фенотипа и сегрегацией плазмид.

Не удивительно, что нам удалось, хоть и с большим трудом, изолировать из одного «спорного» Fga⁺ штамма, идентифицированного как *Y. pestis*, два бесплазмидных клона, идентичных S-«диссоциантам» *Y. pseudotuberculosis*. По-видимому, частота встречаемости последних в смешанной популяции очень мала. Существование таких смешанных культур фенотипически схожих иерсиний требует особого подхода к их детекции, разделению и идентификации. В обзоре литературы указывалось, что выделение чистых культур из смеси двух иерсиний задача не простая [122], поэтому для решения ряда практически важных вопросов необходимо в перспективе выяснить механизмы, поддерживающие такое «содружество». Более чёткие доказательства смешанных культур двух иерсиний были получены нами при изучении атипичного Glp⁺ варианта вакцинного штамма *Y. pestis* EV, привезенного из Китая в 1928 г. Различная скорость и степень ферментации у отдельных его субкультур побудила нас провести поколониальный анализ. Данные ПЦР с видоспецифическими праймерами показали принадлежность одной части клонов к виду *Y. pestis* (Glp⁻), а другой – к виду *Y. pseudotuberculosis* (Glp⁺). Дальнейший анализ этого и подобных штаммов будет проводиться в рамках специальных исследований.

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

4.1. Приём обнаружения смешанных культур возбудителей чумы и псевдотуберкулёза

Основные иммунологические тесты для детекции и идентификации *Y. pestis* основаны на использовании видоспецифичного F1-антигена (Fra) и антител к нему. Но они зачастую не эффективны при детекции и дифференциации изменённых штаммов чумного микроба от возбудителя псевдотуберкулёза, особенно в смешанных культурах. Выше нами была показана высокая эффективность приёма дифференциации типичных, «бесфракционных», фагоустойчивых и бесплазмидных штаммов *Y. pestis* от *Y. pseudotuberculosis* с помощью иммунологического теста на антиген FV, специфический для всех штаммов чумного микроба, и ПЦР с видоспецифическими «хромосомными» праймерами «vIm12/IS216», «vIm33/IS1754» и «JS». Обнаруженный нами штамм, представляющий смесь чумного и псевдотуберкулёзного микробов, а также возможность персистенции обеих иерсиний в одном очаге и даже в одном организме носителя и переносчика (обзор литературы) определяют актуальность совершенствования методов ускоренного обнаружения этих бактерий и их идентификации.

Целью данного исследования было определить эффективность указанного приёма, совмещающего ПЦР с использованием в пробе одновременно двух пар праймеров («vIm12/IS» и «JS»), каждый из которых специфичен для одного из этих видов иерсиний, и дополнительно иммунологическую идентификацию по антигенам F1 и FV, при выполнении

экспресс-детекции, выделении и анализе смешанных культур возбудителей псевдотуберкулёза и чумы с разным Fra-фенотипом.

В экспериментах использовали штаммы *Y. pestis* subsp. *pestis* EV76 (вакцина, Fra⁺), Yawa (Fra⁻) и *Y. pseudotuberculosis* 1923 (O:3)(Fra⁻).

При определении эффективности предлагаемого комплексного приёма и его чувствительности из выросших культур каждого из штаммов *Y. pestis* Yawa (Fra⁻) и *Y. pseudotuberculosis* 1923 (Fra⁻) готовили взвесь в концентрации 2×10^8 м.к., титровали её десятикратно в физиологическом растворе, смешивая два вида иерсиний по 0,5 мл каждой концентрации. Тотальную ДНК из каждого образца исследовали в ПЦР со смесью пар праймеров «JS» и «vIm12/IS216».

Объектом исследования были пять проб (Таблица 8). Согласно результатам ПЦР с праймерами «JS» и «vIm» проба № 1 содержала ДНК бактерий только вида *Y. pseudotuberculosis*. В пробах № 2, 3, 4 выявлена ДНК бактерий видов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. В пробе №5 обнаружена ДНК бактерий только вида *Y. pestis*. Причём вариации испытанных концентраций не влияли на позитивные результаты ПЦР, а пробы с наименьшей из испытанных доз ДНК обеих иерсиний, адекватных 10^3 м.к. в смешанных культурах были чётко позитивны во всех опытах и их повторях. В контрольной пробе специфические праймеры направляли синтез фрагмента ДНК фага T7 длиной 1000 п.н., что свидетельствовало об отсутствии ингибирования реакции компонентами пробы. Если в пробы одновременно с праймерами «JS» (*Y. pseudotuberculosis*) добавляли праймеры «За» (*Y. pestis*) вместо «vIm12/IS216», специфических ампликонов для «За» для не обнаруживали. Это свидетельствовало о преимуществе праймеров «vIm 12/IS216».

ПЦР с двумя парами праймеров «JS» и «vIm12/IS216» одновременно в одной пробе была испытана также при анализе (1) взесей из ткани 5 селезёнок забитых белых мышей, за 3 сут до этого инфицированных внутрибрюшинно бактериями обеих иерсиний (10^8 м.к. *Y. pestis* EV76 (Fra⁺) и 10^8 м.к.

Таблица 8 – Результаты ПЦР-тестирования смесей бактерий *Y. pestis* Yawa (Fra⁻) и *Y. pseudotuberculosis* 1923

№ пробы	Наличие <i>Y. pestis</i> в пробе в концентрации, м.к.	Наличие <i>Y. pseudotuberculosis</i> в пробе в концентрации, м.к.	Наличие в ПЦР ампликонов, характерных для праймеров*			
			Две пары праймеров в пробе (1)		Две пары праймеров в пробе (2)	
			vlm12/IS216	JS	3a**)	JS
1	–	1·10 ⁶	–	+	–	+
2	1·10 ³	1·10 ⁵	+	+	–	+
3	1·10 ⁴	1·10 ⁴	+	+	–	+
4	1·10 ⁵	1·10 ³	+	+	–	+
5	1·10 ⁶	–	+	–	–	–

Примечание – * «JS» = 223 п.н.; «vlm12/IS216» = 390 п.н.; «3a» = 276 п.н.,

**) – отдельный контроль: в пробе с 10³ м.к. *Y. pestis* и одной парой праймеров «3a» выявлены специфические ампликоны.

Y. pseudotuberculosis 1923(Fra⁻), и (2) первичных культур из селезёнок, полученных после выращивания «отпечатков» 2 сут при 28⁰С на агаре LB. Во всех случаях результаты ПЦР были положительные. Обнаружено по два типа специфических ампликонов, характерных для обоих праймеров и, значит доказано присутствие в исследуемом материале бактерий двух видов иерсиний в концентрации, достаточной для детекции. Это свидетельствует о перспективности дальнейшего использования подобного типа дипраймерной ПЦР для детекции и идентификации *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* при смешанных иерсиниозах (Рисунок 10).

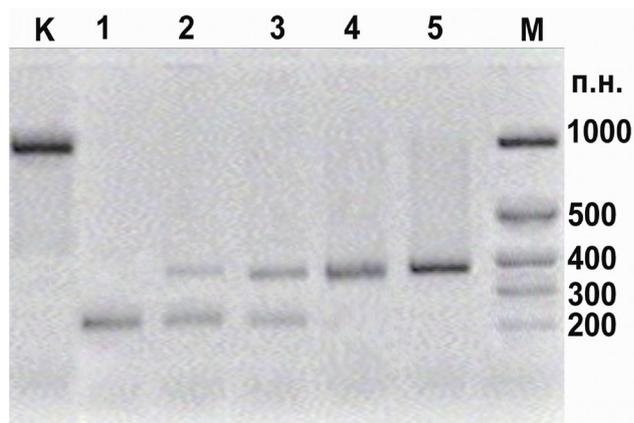


Рисунок 10 – ПЦР - анализ ДНК смешанных культур *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* с праймерами «vIm12/IS216» (390 п.н.) и «JS» (223 п.н).
 К – контроль с ДНК и праймерами фага T7; М – маркеры мол. веса (Fermentas, Литва); 1 – *Y. pseudotuberculosis* 1923; 2 – *Y. pestis* EV76 + *Y. pseudotuberculosis* 1923 (взвесь клеток инфицированной селезёнки); 3 – *Y. pestis* Yawa + *Y. pseudotuberculosis* 1923 (посев смеси культур); 4 – *Y. pestis* Yawa ; 5 – *Y. pestis* EV76. Окраска EtBr. Электрофорез проводили в 2 % агарозном геле.

4.2. Подход к разделению и идентификации смешанных культур *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*

На следующем этапе были исследованы 2 культуры, реагирующие с обеими парами праймеров: а) культура из первичного посева смеси (*Y. pestis* Yawa Fra⁻ и *Y. pseudotuberculosis* 1923, 10⁴ м.к.) и б) культура после посева суспензий клеток селезёнки от мыши, инфицированной смесью бактерий иерсиний (*Y. pestis* EV76 Fra⁺ и *Y. pseudotuberculosis* 1923, 10⁸ м.к.). После ПЦР-типирования их взвеси высевали на пластинки двух дифференциальных сред для получения изолированных колоний. На плотной среде LB с 0,6 % рамнозы и комплексного бромтимолового индикатора после выращивания при 28°C получали изолированные оранжевые (*Y. pseudotuberculosis*, Rha⁺) и зелёные (*Y. pestis* subsp. *pestis*, Rha⁻) колонии. Ориентируясь на более

типичную для каждой из двух иерсиний форму, окраску колоний и скорость роста, отбирали по 3 однотипных клона. Второй средой была та же LB, но двуслойная. Верхний тонкий слой содержал 0,4 % агар Хоттингера с 1 % 2,3,5-трифенилтетразолхлорида. Бактерии засеивали в его толщу для получения изолированных колоний и выращивали при 18°C. Бактерии псевдотуберкулёза, обладающие подвижностью, формировали колонии в виде расплывчатых бляшек; неподвижные *Y. pestis* – в виде мелких точечных колоний (Рисунок 11).

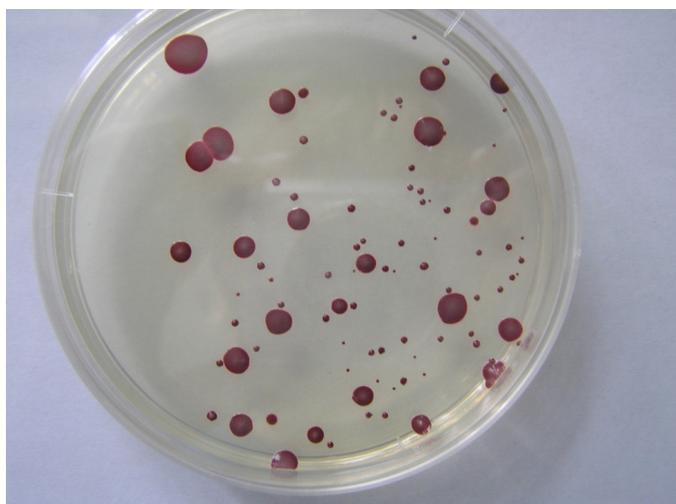


Рисунок 11 - Рост изолированных колоний смеси *Y. pseudotuberculosis* 1923 (крупные колонии) и *Y. pestis* Yawa (мелкие колонии) в слое полужидкого 0,4 % агара Хоттингера с 1 % ТТХ при 18°C

Колонии засеивали иглой, инкубировали при 28°C. Отбирали по 3 однотипных клона. Полученные культуры после выращивания при 28 ° и 37 °С тестировали на специфические для возбудителя чумы капсульный антиген F1 и продуцируемый независимо от наличия капсулы и других форм изменчивости антиген FV, соответственно, в реакции объёмной агломерации (РОА) и коаггутинации (КоА). Позитивно реагирующие с обоими диагностикумами и только с парой праймеров «vIm12/IS216» оценивали как субкультуры *Y. pestis*. Негативные в обоих иммунологических тестах клоны,

но позитивные в ПЦР только с парой праймеров «JS», считали изолятами *Y. pseudotuberculosis*.

Клоны, позитивные в ПЦР только с парой праймеров «vIm12/IS216» и в КоА-тесте на FV, но негативные в РОА на F1-антиген, оценивали как потомство Fra^- штамма *Y. pestis* Yawa. Чистоту культур дополнительно контролировали с помощью тех же пар видоспецифических «vIm12/IS216» и «JS» праймеров, но отдельно. ПЦР проводили по стандартному методу.

В заключение видовая принадлежность полученных в итоге клонов была подтверждена путём полной идентификации по официально утверждённой схеме [128, 170]. Использование единичных видоспецифических пар праймеров и единичных локусов для детекции бактерий двух близкородственных видов иерсиний, находящихся в смеси в одной пробе, значительно упрощает задачу и снижает затраты времени и средств на выполнение анализа. При этом точность ответа не страдает.

Известно, что возбудитель псевдотуберкулёза, циркулируя в природных очагах чумы среди грызунов, может вызывать инфекцию хронического типа. Обе иерсинии, в силу очень близкого родства, имеют целый ряд общих антигенов [282]. Это создает условия для появления среди грызунов-носителей *Y. pseudotuberculosis* определённой иммунной прослойки, у которых заболевание чумой не происходит или протекает менее остро [74, 179]. Именно в организме таких умеренно иммунных носителей могут возникать изменённые, но реверсидельные формы *Y. pestis*, уклоняющиеся от детекции. Именно их необходимо отличать от «соседствующих» бактерий псевдотуберкулёза. Использование пар праймеров «vIm12/IS216» и «JS», а в дополнение к ним иммунодиагностикомов на антигены F1 и FV значительно повысит эффективность поиска и доступность анализа смешанных культур, даже в случае изменённых штаммов.

Глава 5. ОСОБЕННОСТИ СВОЙСТВ И ДЕТЕКЦИИ ШТАММОВ *Y. PESTIS*, НЕ ПРОДУЦИРУЮЩИХ КАПСУЛЬНЫЙ АНТИГЕН «ФРАКЦИЯ 1»

Из атипичных штаммов «бесфракционные» являются наиболее потенциально опасными. Во-первых, в отсутствие F1 антигена становятся практически не эффективными основные диагностические приёмы. Во-вторых, вызывая атипичные трудноузнаваемые формы инфекции и преодолевая специфический противочумный иммунитет Fga⁻ штаммы способны сохранять вирулентность для людей. К тому же патогенез Fga⁻ штаммов имеет свои особенности, а возбудитель может локализоваться в труднодоступных местах организма носителей, в том числе в инкапсулированных абсцессах, недоступных исследователям при жизни объекта. Поэтому попытки выделить культуру возбудителя инфекции по традиционной схеме даже при летальном исходе не всегда удачны.

Трудности диагностики заболевания создают условия для ошибок в лечении и оценке прогноза пациентов или определении активности природных очагов. К тому же часть вариантов Fga⁻ штаммов может иногда вызывать сепсисные токсические проявления и внезапно реверсировать к Fga⁺ фенотипу, вызывая закономерные эпидемические или эпизоотические последствия. Всё это побудило нас более подробно исследовать «бесфракционные» штаммы и проверить предлагаемые нами приёмы обнаружения возбудителя в ходе тестирования материала на биопробах с учётом особенностей клиники и трудностей выявления возбудителя на отдельных этапах заболевания у разных видов животных.

5.1. Некоторые свойства «бесфракционных» штаммов *Y. pestis* и подходы к их идентификации

В этом разделе представлена краткая характеристика биологических свойств исследованных «бесфракционных» штаммов *Y. pestis* различного

происхождения. При их идентификации проведена апробация основных принятых в практике тестов, а также осуществлена попытка найти биологическую модель более чувствительную к таким штаммам, чем белые мыши и морские свинки, способную повысить эффективность биологического метода выявления этой атипичной формы возбудителя чумы.

В работе использована группа клонированных культур, а также природные и ранее полученные лабораторные штаммы основного подвида *Y. pestis* из МЖК и рабочей коллекции лаборатории микробиологии чумы РостНИПЧИ. Исходные штаммы были выделены из разных природных очагов, от разных источников, в том числе и от больных людей из зарубежных очагов. Штаммы не продуцировали антиген F1 из-за: а) спонтанной утраты рFra плазмиды; б) спонтанно возникшей дефектности генов *caf*-оперона и в) направленной на плазмиду рFra IS-опосредованной встройки транспозона Tn10/Tc^R [78]. В общей сложности коллекцию составляли клоны и субкультуры 22 штаммов подвида «*subsp. pestis*»: 4 (Маньчжурия), 16К, 31а, С-64, P121В, 126, 139, 84, 942, 252, 363-1, 375, С-393, С-534, 923, 1166, 1209, 1330, 1450, 1592, 2442, 2232. Контрольным был штамм *Y. pestis* 231 Fra⁺, (pFra)⁺.

Культуры исследуемых штаммов росли в виде типичных колоний. Все они содержали плазмиды кальцийзависимости, пестициногенности и экспрессировали связанные с ними свойства, а также сорбировали пигмент (конго-рот), хотя в популяциях многих штаммов содержались в значительном меньшинстве или в единичном числе Pgm⁻ клоны. Проявляли различную степень чувствительности к чумному диагностическому фагу Покровской. При скрининге плазмид отсутствие определяющей F1-антиген плазмиды рFra обнаружено у шести штаммов (№№ штаммов приведены ниже в таблице 10). Визуально определяемых отличий размеров рFra плазмид от типичных для основного подвида у «бесфракционных» штаммов, не обнаружено.

ДНК всех исследованных штаммов позитивно реагировала в ПЦР со специфическими для возбудителя чумы праймерами «v1m12/IS216» и «3а».

У всех исследованных штаммов и их клонов антиген F1 иммунологически достоверно не определялся в титре 10^8 м.к. Но все они позитивно реагировали в КоА на антиген FV, детерминируемый хромосомой.

В ПЦР с ДНК этих штаммов и парой праймеров «F1» на наличие pFra плазмиды [298] у большинства штаммов появлялись ампликоны соответствующего размера. Их не было в отдельных случаях (Рисунок 12), а именно, в пробах с ДНК штаммов, которые не содержали pFra и двух штаммов, не продуцирующих F1-антиген, но сохраняющих эту плазмиду (2442-11, 252-624).

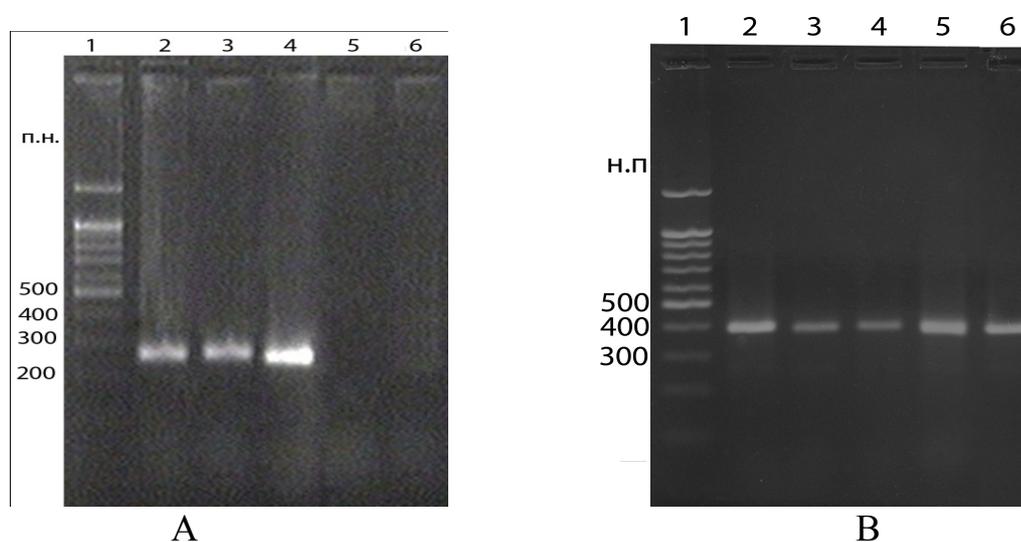


Рисунок 12 - Результаты ПЦР-анализа ДНК штаммов *Y. pestis* с праймерами F1(Neubauer)(A) и vlm12/IS216-(B):

1 - Маркеры М.м; 2 – 231 Fra⁺ (pFra)⁺; 3 – С-534 Fra⁺ (pFra)⁺; 4 – 31a-3 Fra⁻ (pFra)⁺; 5 – 2442(11) Fra⁻ (pFra)⁺; 6 – 252(624) Fra⁻ (pFra)⁺. Электрофорез проводили в 2 % агарозном геле. Окраска EtBr

Часто в пробах появлялись также полосы неспецифических ампликонов. Это вынудило нас сконструировать собственные праймеры на *caf*-гены и провести дополнительные исследования, которые описаны ниже в разделе 5.3.

5.2. Эксперименты на биопробных животных, различающихся по чувствительности к Fra^- штаммам *Y. pestis*, и идентификация выделенных от них культур

Биологический метод при идентификации бактерий *Y. pestis* является обязательным. Данные литературы об избирательной вирулентности «бесфракционных» бактерий *Y. pestis* и возможных отклонениях в клинике инфекции (см. обзор литературы), которые могут повлиять на ход диагностики и исследования биопроб, побудили нас провести тестирование 16 атипичных коллекционных Fra^- штаммов и их клонов на модели биопроб. Для этого использовали белых мышей, морских свинок и ранее не испытанных монгольских песчанок.

После заражения (10^3 - 10^6 м.к.) часть белых мышей гибла через 8-11 сут, в единичных случаях – через 15 сут. Срок жизни мышей, заражённых контрольным Fra^+ штаммом *Y. pestis* 231, был в пределах 3-5 сут. Шесть вариантов оказались авирулентными для мышей (2442-630, 31а-3, 2442-626, С-64, P121В, 1592).

Восемь из исследованных штаммов вызывали гибель всех белых мышей, при обеих заражающих дозах. Остальные индуцировали гибель только части мышей без чёткой корреляции с заражающей дозой. От павших мышей были выделены культуры. Их исследовали на наличие F1-антигена. У большинства из них результаты РАО на F1 в титре 10^8 м.к. оценивали как недостоверные сомнительные (\pm) при позитивной реакции у контрольного штамма в титре 10^{4-5} м.к.

Шестнадцать Fra^- вариантов, пассированных через организм белых мышей, были использованы для последующего заражения морских свинок. Морские свинки пали при заражении только бóльшей дозой бактерий (10^8 м.к.) 8 из 16 штаммов (2442-10, 252-624, 923-6 и 923-10, 16К-1-622 и 16К-4-554, 31а-7, 4-908), а после заражения дозой 10^3 м.к. только в случае двух Fra^- штаммов (4-908 и 16К-1-622). Свинки гибли через 8-15 сут. А в опытах со

штаммом 16К-1-622 от меньшей дозы одна свинка пала на 30 сут. Воспалительный процесс был наиболее выражен в селезёнке, которая была увеличена в 3 раза и содержала абсцедирующие некротические ядра, диаметр которых достигал 3-5 мм (Рисунок 13А). Похожие изменения в селезёнке описаны ранее [69]. Лимфоузел в месте введения был также увеличен. У остальных павших свинок картина была менее выражена, но некротические изменения в селезёнке были значительно большими, чем после заражения высоковирулентным Fra⁺ штаммом *Y. pestis* 231.

От всех павших морских свинок при посеве селезёнок была выделена Fra⁻ культура *Y. pestis*. В одном случае (морская свинка, павшая через 30 сут, штамм 16К-1) на газоне посева выросла сплошь посторонняя флора. Проверка ДНК этого бактериального роста в ПЦР показала наличие в ней примеси хромосомной ДНК чумного микроба. С учётом данных ПЦР были проведены дополнительные пересевы смешанной культуры с агара и из бульона методом изолированных колоний, а также повторного посева ткани селезёнки. В результате после 2-3 пересевов была получена чистая культура Fra⁻ штаммов *Y. pestis*, которую мы могли бы упустить без контроля с помощью ПЦР (Таблица 9). Все выделенные Fra⁻ культуры *Y. pestis* реагировали позитивно с КоА-диагностикумом на FV.

Выживших морских свинок без внешних признаков заболевания забивали, усыпляя хлороформом, и вскрывали. Из органов делали высев на агаровую среду, а фрагменты селезёнки использовали для приготовления суспензий её клеток в физиологическом растворе, которую высевали в бульон. Посевы на агар и в бульон контролировали на наличие роста чумного микроба. Суспензию ткани селезёнки тестировали серологически на F1 антиген и с помощью ПЦР (праймеры «vIm12/IS216» и «3a») на присутствие хромосомной ДНК *Y. pestis*.

На носительство чумной инфекции были исследованы 20 морских свинок. У пяти были обнаружены выраженные в разной степени изменения в селезёнке в виде увеличения её размера, усиления зернистости структуры и

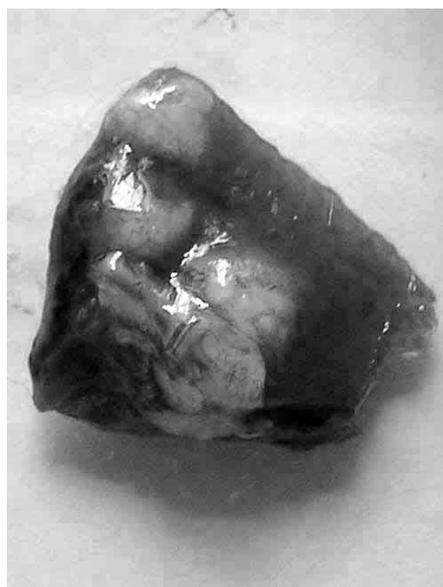
мелкие некротические абсцедирующие очажки (Рисунок 13В). Лёгкие и печень, как правило, были без изменений. Чумную инфекцию удалось подтвердить у трёх из этих животных.

У одной из забитых свинок в первичном посеве на агаре и при высеве из бульона был «подавляющий» рост вторичной флоры. ПЦР (праймеры «vIm12/IS216» и «3a») с ДНК из бактериального роста в бульоне дала положительный результат. Рассев до изолированных колоний бульонного роста смеси бактерий позволил выделить культуру чумного микроба. Такой же «загрязнённый» посев был после вскрытия второй свинки. В этом случае специфические ампликоны были обнаружены в ПЦР с праймерами «vIm12/IS216» в материале из селезёнки. После вторичного посева бóльшего количества материала из селезёнки и последующего двукратного посева выделена Fra^- культура чумного микроба. В третьем случае при первичном посеве культура возбудителя чумы не выделена, однако после проведения ПЦР специфические для *Y. pestis* ампликоны обнаружены в пробах с материалом селезёнки и в бульонной пробе. Чистая культура выделена после двукратного посева первичного агарового роста. В посевах селезёнки свинок, павших в более короткие сроки, выделялась чистая культура *Y. pestis*, позитивно реагирующая с КоА-диагностиком на антиген FV и в ПЦР с парой праймеров «vIm12/IS216». Таким образом, из 20 забитых морских свинок, исследованных через 30 суток после инъекции вирулентных для мышей Fra^- штаммов *Y. pestis*, благодаря сигнальным результатам ПЦР с праймерами «vIm12/IS216» и дополнительным микробиологическим манипуляциям, у трёх свинок удалось обнаружить в организме и выделить

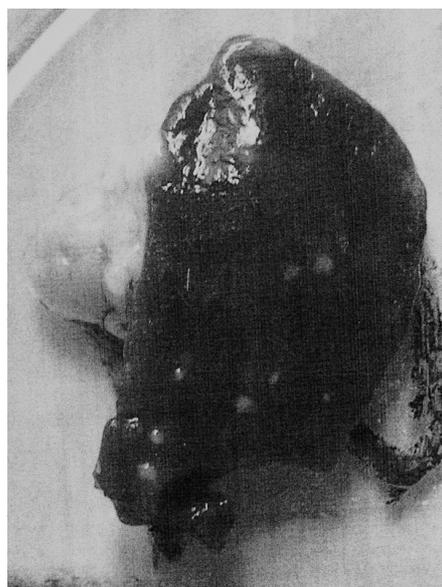
Таблица 9 - Характеристика летальности Fga⁻ штаммов *Y. pestis* и эффективность их детекции в посевах и в ПЦР

Вид животных	Исход инфекции	Срок жизни, сут.	Всего исследовано животных	Культура <i>Y. pestis</i> в первичном посеве «отпечатков» селезёнки	ПЦР с праймерами «vlm»*, «3»а и с материалом:			Выделено культур <i>Y. pestis</i> из: 20 морских свинок			Всего культур <i>Y. pestis</i>	
					культура из посевов «отпечатков»	культура в бульоне	ткань селезёнки	Вторичный рассев роста из «отпечатков»	Вторичный рассев роста из бульона	Повторный посев селезёнки с рассевом по агару***		
Морские свинки	павшие	8	3	+3	+	-	+	н/и	н/и	н/и	3	
		14-15	5	+5	+	-	+	н/и	н/и	н/и	5	
		30	1	±? и ВФ**	-	-	+	-	-	+	1	
	выжившие (забитые)	30	17	-	-	-	-	-	-	-	-	0
			1	ВФ	-	+	-	-	+	н/и	1	
			1	ВФ	-	-	+	+	-	н/и	1	
			1	интенсивный рост ВФ	-	+	+	-	-	+	1	
Монгольские песчанки	павшие	3-4	24	+24	+	н/и	+	н/и	н/и	н/и	24	

Пояснения – «vlm*» = vlm12/IS216; н/и – не исследовали. ** – ВФ – вторичная флора; *** – хранение при +4°C; ±?-начальный рост подозрительных на *Y. pestis* отдельных колоний



А



В

Рисунок 13 - Некротические узлы в селезёнке (фрагмент органа) морских свинок, заражённых Fra^- штаммами *Y. pestis*.

(А) – павшая на 30 сут (№16К-1); (В) - забитая в тот же срок (№252 - 624).

Культуры *Y. pestis* выделены после повторного «отпечатка» селезёнки с рассевом материала фрагментом селезёнки по поверхности агара.

сохранившиеся бактерии чумы при отсутствии визуально заметных проявлений заболевания.

Учитывая, что монгольские песчанки оцениваются как высокочувствительные к чумному микробу основного подвида, и не располагая данными об их чувствительности к «бесфракционным» штаммам чумного микроба, мы инфицировали группу из 24 монгольских песчанок теми же Fra^- вариантами штаммов, которые были использованы для заражения морских свинок. Все песчанки пали в короткие сроки (3 – 5 сут) без резких изменений внутренних органов, кроме гиперемии селезёнки, и от всех заражающих доз. Культуры выделены из селезёнок всех песчанок. Во всех пробах в ПЦР были обнаружены также ампликоны, свидетельствующие о наличии в селезёнках чумного микроба. Таким образом, результаты опытов показали более высокую чувствительность монгольских песчанок к исследованным нами Fra^- штаммам по сравнению с белыми мышами и

морскими свинками. Это позволит совершенствовать биологический метод детекции *Y. pestis* и облегчит её иммуно- и ПЦР-диагностику.

5.3. Возможные подходы для выяснения причин нарушения продукции антигена F1

Выше уже сообщалось, что природные механизмы нарушения продукции F1-антигена могут быть разными: утрата *pFra* или нарушение функций *caf*-оперона за счёт повреждений составляющих его отдельных генов.

ПЦР с ДНК всех штаммов и праймерами «*vIm12/IS216*», а также КоА-реакция с диагностикумом на дополнительный диагностический антиген FV давали положительные результаты, что доказывало принадлежность исследуемых *Fra⁻* культур к виду *Y. pestis*, несмотря на отсутствие у них основного диагностического антигена F1. Контрольные штаммы (2442 исх, 923 исх, 231 исх) с плазмидой *pFra* продуцировали F1-антиген, а в ПЦР формировались специфические ампликоны со всеми праймерами к четырем генам *caf*-оперона. У опытных штаммов, не содержащих ДНК плазмиды *pFra* (126, 942, 1450, 2232, 1450), результаты ПЦР с праймерами на все четыре гена *caf*-оперона были отрицательны из-за отсутствия матричной плазмидной ДНК.

При нарушенной синтезе F1 антигена в присутствии детерминирующей его плазмиды у части штаммов не формировались некоторые специфические ампликоны, что свидетельствовало о дефектах в разных фрагментах *caf*-оперона, комплементарных праймерам. Так, у штаммов 2442(630)-11, 16К-4(554), 252(624), 84, 144 ампликоны не формировались в присутствии пары праймеров на структурный *cafI* ген. У штамма 139 и того же 84 обнаружен дефект в регуляторном гене *cafR*. А у штаммов 1166, 1209 и 1330(555) нарушения были во вспомогательном гене *cafM*, отвечающем за внеклеточное состояние антигена. Дефект гена ашера (*cafA*), контролирующего первичную модификацию субъединиц, выявлен только у последнего штамма, у которого плазида *pFra* в автономном состоянии не выявлялась, а в ПЦР с праймерами

на *cafI* и *cafR* гены обнаруживались специфические ампликоны. Это позволяло предположить известную интеграцию этой плазмиды в хромосому бактерии с нарушением некоторых функций во вспомогательных генах *cafA* и *cafM*, или, что более вероятно, неоднородность популяции с наличием малой доли Fra^+ клеток, недостаточной для скрининга плазмид.

Отрицательные результаты ПЦР в данном случае свидетельствовали о наличии дефекта, тогда как позитивные, основанные на наличии специфических ампликонов, указывали только на присутствие соответствующих генов, интактных или, возможно, имеющих точечные нарушения, заметно не снижающие комплементарность с праймерами. Тонкий механизм этих нарушений можно определить только при завершающем секвенировании ампликонов. Изложенное относится к остальным 9 «бесфракционным» штаммам с позитивными результатами ПЦР (Таблица 10).

На данном этапе работы можно сделать два вывода: один – о существовании различий в механизме повреждений *caf*-оперона при формировании Fra^- фенотипа у разных штаммов; другой – о том, что позитивная ПЦР с *caf*-праймерами свидетельствует о наличии у бактерий специфической для *Y. pestis* ДНК $pFra$ плазмиды, отвечающей за синтез F1-антигена, несмотря на его отсутствие по данным иммунотестов. Более того, отсутствие F1-антигена при дефекте структурного *cafI*-гена (праймер *cafI* входит в диагностические наборы) в совокупности с другими нарушениями может вызвать сомнения в принадлежности бактерий к виду *Y. pestis*. Однако наличие ампликонов, специфических для других генов *caf*-оперона, помогает решить эту проблему и послужит доказательством его наличия и принадлежности бактерий к виду *Y. pestis*. Поэтому при отрицательной ПЦР с *cafI*-праймером эффективнее будет использовать набор праймеров, каждый из которых на отдельный *caf*- ген.

Из 6 исследованных Fra^- штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* лишённых плазмиды *pFra*, ДНК пяти штаммов не реагировала в ПЦР с парой праймеров на структурный *cafI* ген. Исключение составил штамм *Y. pestis* 1330(555). У

него можно предположить интеграцию плазмиды в хромосому [147] с прекращением синтеза антигена F1 или выраженную неоднородность популяции с исключительно малой долей клеток (pFra)⁺. На данном этапе изучения «бесфракционных» штаммов мы пока ограничились изучением клеточного состава популяции в НИМФ с помощью МКА к эпитопам F1 антигена. В итоге в мазках были обнаружены только единичные клетки со специфическим свечением на фоне обильного расположения несвечящихся клеток культуры в поле зрения (Рисунок 16). Положительные результаты НИМФ с МКА к F1 с полноценным свечением у других штаммов не обнаружены. В то время как с диагностикумом на FV все пробы с исследованными Fra⁻ штаммами *Y. pestis* были положительны.

Полученные нами результаты ПЦР свидетельствуют о различных нарушениях генной структуры *caf*-оперона у исследованных штаммов и об эффективности предложенных праймеров «*cafI*(tal)», «*cafR*(tal)», «*cafA*(tal)» и «*cafM*(tal)» для их выявления. Пока нет возможности полностью выяснить тонкие механизмы природной изменчивости *caf*-оперона. Но результаты показывают перспективность начатых нами исследований относительно особенностей экспрессии генов, расположенных на pFra [338]. Выяснение их будет способствовать решению проблем, связанных с «бесфракционными» атипичными штаммами *Y. pestis*. Полезным в этом плане будет также сопоставление результатов ПЦР с *caf*-праймерами и изменений *caf*-оперона у Fra⁻ штаммов с опубликованными итогами эпитопного МКА-анализа изменённых генных продуктов [303].

Таблица 10 - Результаты ПЦР-анализа некоторых Fga⁻ штаммов *Y. pestis*

Штаммы	РАО на F1	pFga*	Праймеры					Серологический тест, КоА FV	Летальность для морских свинок
			«vlm 12/IS»	«caf R (tal)»	«cafI (tal)»	«caf A (tal)»	«caf M (tal)»		
2442-10	±	+	+	+	+	+	+	+	±
2442(626)	±	+	+	+	+	+	+	+	не опр
2442(630)-4(908)	±	+	+	+	-	+	+	+	не опр
16K4(554)	±	+	+	+	-	+	+	+	±
16K1(622)	-	+	+	±	+сл	+	+	+	+
252(557)	±	+	+	+	+	+	+	+	не опр.
252(624)	-	+	+	+	-	+	+	+	±
252-2(628)	±	+	+	+	+	+	+	+	не опр.
31a 2/3	±	+	+	+	+	+	+	+	не.опр.
923-10 (621)	±	+	+	+	+	+	+	+	±
923-6(552)	-	+	+	±	+	+	+	+	±
P121B	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C64	-	+	+	+	+	+	+	+	не опр.
84	-	+	+	-	-	+	+	+	не опр.
139	±	+	+	-	+	+	+	+	не опр.
144	-	+	+	+	-	+	+	+	не опр.
1166	±	+	+	+	+	+	-	+	не опр.
1209	±	+	+	+	+	+	-	+	не опр.
2442 исх	4+	+	+	+	+	+	+	+	не опр.
923 исх	4+	+	+	+	+	+	+	+	+
231	4+	+	+	+	+	+	+	+	-
1330(555)**	±	-	+	+	+	-	-	+	хроника ***
126	-	-	+	-	-	-	-	+	-
144	-	-	+	-	-	-	-	+	
942	-	-	+	-	-	-	-	±	не опр.
C-393	-	-	+	-	-	-	-	+	-
1450	-	-	+	-	-	-	-	+	-
И2232	-	-	+	-	-	-	-	+	-

Пояснение - pFga* - наличие плазмиды в автономном состоянии;** - возможная интеграция pFga с хромосомой; РАО: ± сомнительный результат в 10⁸ м.к.; ПЦР ± очень малое кол-во ампликонов; Летальность: ± пала только часть животных; + пали все; «-» все выжили. ***- забита на 30 сут, выделена культура

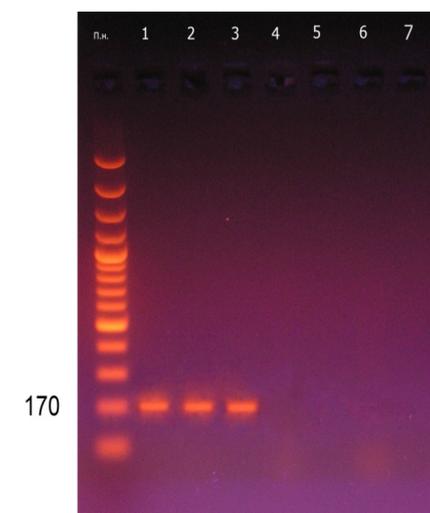


Рисунок 14 - Результаты ПЦР-анализа ДНК «бесфракционных» штаммов *Y. pestis* с праймерами – «*cafR(alt)*» (размер ампликона 170 п.н.). Электрофорез проводили в 2 % агарозном геле. Окраска EtBr. Маркеры М.м.; 1 – 1330(555) (pFra)⁻; 2 – 252(624) (pFra)⁺; 3 – 2442 (630) (pFra)⁺; 4 – 139 (pFra)⁺; 5 – 126 (pFra)⁻; 6 – 84 (pFra)⁺; 7 – С-393 (pFra)⁻

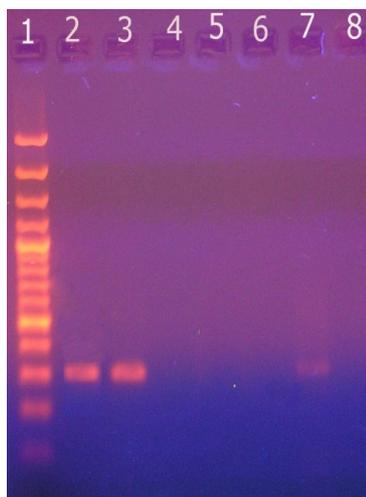


Рисунок 15 - Результаты ПЦР-анализа ДНК «бесфракционных» штаммов *Y. pestis* с праймерами – «*cafI(alt)*» (размер ампликона 307 п.н.): Электрофорез проводили в 2 % агарозном геле. Окраска EtBr. 1 – М.м., п.н.; 2 – 1330(555)(pFra)^{-*} интеграция в хромосому; 3 – 2442(626) (pFra)⁺; 4 – 144 (pFra)⁺; 5 – 16К(554) (pFra)⁺; 6 – 126 (pFra)⁻; 7 – 16К(622) (pFra)⁺; 8 – 1450 (pFra)⁻;

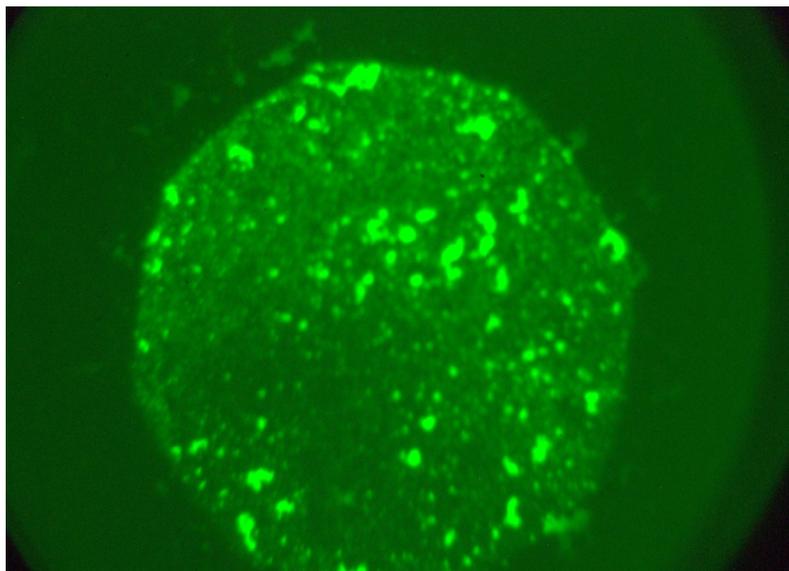


Рисунок 16 - Единичные светящиеся клетки «бескапсульного»(\pm) штамма *Y. pestis* 1330(555)(pFra)⁻ в НИМФ с МКА к F1 на фоне несветящейся массы клеток основной части популяции (концентрация взвеси 10^{10} м.к./мл)

Результаты наших экспериментов позволили сформулировать несколько положений об исследованных Fra⁻ штаммах. Штаммы, которые сохраняют основные детерминанты вирулентности по Wigdows, кроме «Fra», при подкожном заражении белых мышей и морских свинок могут быть авирулентными или в различной степени вирулентными, способными вызывать значительно пролонгированное заболевание чумой с гибелью единичных животных, зависимой не от заражающей дозы, а от индивидуальной чувствительности животных. Это в определённой степени согласуется с ранее известными фактами. Однако, как показано нами, в отличие от белых мышей и морских свинок, монгольские песчанки высокочувствительны к возбудителю «бесфракционной» чумы при подкожном заражении и в 100 % погибают от острой чумы в сроки, характерные для заражения полноценными штаммами возбудителя. Поэтому эти грызуны, на наш взгляд, будут полезны как объекты биопроб при диагностике и поиске «бесфракционных» штаммов в природных очагах.

Судя по данным исследования нашей коллекции, появление в природе Fga⁻ штаммов чаще связано с дефектами разных генов *caf*-оперона плазмиды pFga. Поэтому в части случаев праймеры, комплементарные интактным фрагментам этих *caf*-генов, в совокупности могут помочь выявить плазмиду pFga с дефектами и способствовать идентификации «бесфракционных» штаммов.

Fga⁻ штаммы чумного микроба, даже при наличии отдельных отклонений по другим признакам, могут быть достоверно идентифицированы с помощью КоА диагностикума на FV антиген и ПЦР с праймерами «vIm12/IS216».

Редкие случаи выявления Fga⁻ возбудителя у морских свинок, павших или забитых в конце срока наблюдения (30 сут), обусловлены низкой концентрацией возбудителя в органах (с возможной его инкапсуляцией), что требует более детального бактериологического исследования при наличии положительного «сигнала» ПЦР, которая имеет значительные преимущества перед микробиологическими методами. Полученные нами данные позволяют предположить, что при хроническом течении чумы имеет место значительное ослабление иммунного статуса носителя и активация аутогенных микроорганизмов. Это приводит к циркуляции в организме смешанных культур и трудностям выделения чистой культуры чумного микроба, которые нам удалось преодолеть.

Патогенетические изменения при затяжных формах чумы во многом могут походить на возникающие при псевдотуберкулезе, поэтому при анализе культур и биологического материала потребуются исключить возбудителя псевдотуберкулёза и, прежде всего, целесообразно проверить материал в ПЦР с хромосомными праймерами «JS».

Глава 6. ИССЛЕДОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТОВ

***Y. PSEUDOTUBERCULOSIS* С ПЛАЗМИДАМИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ**

6.1. Некоторые свойства рекомбинантных вариантов возбудителя псевдотуберкулёза с плазмидой pFra бактерий чумы и подход к их детекции

Считают, что одним из этапов эволюционного становления *Y. pestis* было приобретение её предполагаемой предшественницей *Y. pseudotuberculosis* O:1b [208], помимо собственной плазмиды Ca²⁺-зависимости двух дополнительных гибридных плазмид pPst и pFra ставших видоспецифическими [208, 257, 302]. Возбудители чумы и псевдотуберкулёза одновременно циркулируя в одном природном очаге и вызывая смешанные инфекции [17, 40, 153], могут попадать в условия, способствующие их обмену плазмидами и формированию в очаге клонов *Y. pseudotuberculosis* с видоспецифическими плазмидами *Y. pestis*. Возникновение таких рекомбинантов может осложнять идентификацию двух иерсиний. Сохранение рекомбинантных клонов в природе во многом зависит от особенностей их патогенетической активности и стабильности сохранения плазмид. Однако поиск природных рекомбинантов целенаправленно не ведется из-за отсутствия эффективных приемов, малой изученности свойств и способности выживать в естественном биоценозе.

Необходимы методы контроля не только над рекомбинантами возбудителя псевдотуберкулёза в природных очагах чумы. Настораживают сведения об экспериментах по получению противочумной вакцины путём передачи *caf*-генов pFra плазмиды возбудителю псевдотуберкулёза [236, 270] при недостаточном изучении их биологической активности. Представляет опасность намеренное распространение таких рекомбинантов с неясной патогенетической активностью и способных создать трудности для бактериологов-диагностов. В общей сложности, для решения возникающих в этих ситуациях проблем важно хорошо разбираться в последствиях введения

caf-генов в бактерии псевдотуберкулёза и иметь надёжные диагностические тесты, позволяющие быструю идентификацию таких рекомбинантов.

В связи с этим нам представилось целесообразным определить биологическую активность «плазмидных» рекомбинантных штаммов *Y. pseudotuberculosis* и разработать подходы к их детекции. В большей степени нас интересовала маркерная плазида pFra, которая, как предполагается, после получения её бактериями *Y. pseudotuberculosis* от неизвестного донора, возможно *Salmonella* – [172, 262, 309], участвовала в повышении патогенности и превращении бактерий псевдотуберкулёза в *Y. pestis* [208].

В экспериментах использовали штаммы, хранившиеся в коллекции нашей лаборатории микробиологии чумы и других иерсиниозов: (1) послуживший ранее донором плазмид чумной вакцинный штамм EV76 (pFra::Tn5, pCad::Tn7, pPst), две из трёх плазмид которого были предварительно маркированы транспозонами; (2) вирулентный штамм *Y. pestis* 231(pFra::Tn5, pCad::Tn7, pPst); (3) штаммы-реципиенты *Y. pseudotuberculosis* 52, 100, 210, 296, 463 и 1923(493)(бесплазмидный); а также (4) их рекомбинантные варианты, которым эти меченные транспозонами плазмиды были ранее переданы при трансдукции фагом P1cm1 clr 100ts pl, с помощью конъюгации, опосредованной нестабильной R-плазмидой или в составе коинтеграта с конъюгативной плазмидой [78, 79].

Из фенотипических свойств в популяции имеющихся рекомбинантов *Y. pseudotuberculosis* нами обнаружено почти половина клонов с нарушением подвижности и с дефектами по признаку денитрификации. Поскольку рекомбинантам *Y. pseudotuberculosis* pFra плазида была передана с помощью разных методов (трансдукция, коперенос с конъюгативной плазмидой, перенос в составе коинтеграта с конъюгативной векторной плазмидой) для объяснения изменений фенотипа требуются дополнительные исследования их механизма и причастности к этому векторных репликонов. В настоящий момент можно лишь констатировать эти результаты и принимать их во внимание при видовой идентификации и при конструировании

экспериментальных вакцинных штаммов *Y. pseudotuberculosis* с pFra плазмидой.

Антиген F1 в культурах донора плазмид и штамма *Y. pestis* 231 с замещённой плазмидой pFra::Tn5 в РАО определялся в титре $0,25-0,5 \cdot 10^5$ м.к. Для рекомбинантных штаммов *Y. pseudotuberculosis* этот показатель был на порядок ниже ($0,2-0,4 \cdot 10^6$ м.к.). Реципиентные штаммы *Y. pseudotuberculosis* его не продуцировали вообще. В ПЦР с праймерами «cafI» и «F1»(Neubauer) специфические ампликоны регистрировали в пробах с ДНК всех штаммов, использованных в опытах иерсиний, кроме реципиентных, не содержащих pFra. Для исследования патогенетической активности и иммуногенности отобрали рекомбинанты одного бесплазмидного штамма (1923), полученные при трансдукции и не содержащие дополнительных векторных плазмид. Летальный эффект определяли у плазмидных рекомбинантов *Y. pseudotuberculosis* 1923 с одной и двумя плазмидами чумного микроба (Рисунок 17) на модели белых мышей при внутрибрюшинном введении 10^8 и 10^9 м.к. (Таблица 11). В присутствии одной плазмиды pFra::Tn5 он был заметен лишь при заражающей дозе 10^9 м.к., а после дополнения pCad::Tn7 плазмидой, аналогом которой обладают многие природные штаммы возбудителя псевдотуберкулёза, эффект стал очевидным. То есть он был чётко выражен, только при совмещении двух плазмид. Бактерии, ранее авирулентные, можно было оценить при совмещении двух плазмид как слабовирулентные, но и с большей патогенетической активностью, чем штамм противочумной вакцины *Y. pestis* EV76.

Одна плазида pCad::Tn7 вирулентность рекомбинантов для мышей не обеспечивала. При инфицировании обеими дозами бактерий летальный эффект для мышей у рекомбинантов был выше, чем у донора плазмид, контрольного штамма *Y. pestis* EV76 (pFra::Tn5, pCad::Tn7, pPst).

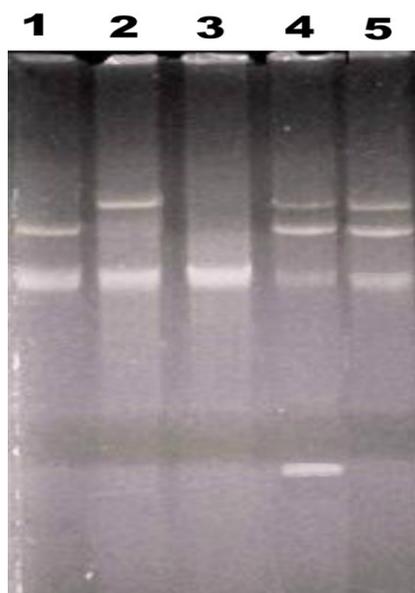


Рисунок 17 - Плазмидный состав рекомбинантов *Y. pseudotuberculosis* 1923 с плазмидами *Y. pestis* EV76:

1 – 1923(pCad::Tn7); 2 - 1923(pFra::Tn5); 3 – 1923(реципиент)

4 - *Y. pestis* EV76 (донор); 5 – 1923(pFra::Tn5+ pCad::Tn7)

Таблица 11 – Летальный эффект рекомбинантов штамма *Y. pseudotuberculosis* 1923 с плазмидами *Y. pestis* (белые мыши, внутрибрюшинное заражение):

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

В культурах из посевов селезенок от павших белых мышей, инфицированных бактериями *Y. pestis* EV76 и рекомбинантами *Y. pseudotuberculosis*, в РАО обнаруживали F1 антиген в диагностическом титре. Однако в контрольных культурах из посевов штамма EV76 (pFra::Tn5, pCad::Tn7, pPst) (донор плазмид) он был на 1-2 порядка выше.

Для морских свинок бактерии исследованных рекомбинантов при подкожном заражении первоначально использованной дозой (10^9 м.к.) были невирулентны, что дало возможность проверить их иммуногенность. Защита от чумы всех морских свинок, предварительно инфицированных подкожно 10^9 м.к. штамма реципиента *Y. pseudotuberculosis* 1923 и штамма донора *Y. pestis* EV76, в условиях нашего опыта не позволила оценить вклад плазмид в иммуногенность рекомбинантов для этих животных.

Иммуногенность рекомбинантов и контрольного штамма *Y. pestis* EV76(pFra::Tn5, pCad::Tn7, pPst) для белых мышей проверяли, как принято для вакцины: при подкожном введении в дозе 10^4 м.к. (Таблица 12).

В этих условиях, когда штамм–реципиент *Y. pseudotuberculosis* 1923 был практически не протективен в отличие от донорного вакцинного штамма *Y. pestis* EV76, эффект плазмид оказался наглядным. Плазмида pFra значительно повышала протективность бактерий рекомбинантов, а совмещение плазмид делало рекомбинанты высокопротективными, одинаковыми в этом отношении с чумным вакцинным штаммом EV76 (донором плазмид). Однако и в этом опыте одна плазмида pCad::Tn7 не была активной.

При изучении фагоцитоза принято, что отрицательные значения ИЗФ обратно пропорциональны способности бактерий размножаться в МФ. Приближение к нулевому значению – уменьшение этой способности, а положительные значения пропорционально их увеличению отражают степень торможения роста бактерий под влиянием бактерицидных факторов МФ. Результаты опытов с перитонеальными МФ белых мышей, как в пробах с исходным реципиентным штаммом *Y. pseudotuberculosis* 1923, так и с

Таблица 12 - Протективность по отношению к чумной инфекции при подкожном введении рекомбинантов *Y. pseudotuberculosis* 1923 с плазмидами *Y. pestis* и их антимакрофагальная активность

Штамм	Плазмиды <i>Y. pestis</i> */	Морские свинки (10 ⁹ м.к.)*	Белые мыши (10 ⁴ м.к.)*	ИЗФ _{6**/} бактерий выращенных при разных температурах			
		Заражено*/ выжило от в, (%)	Перезаражено выживших от исследуемых штаммов / выжило, (%)	МФ морских свинок		МФ белых мышей	
				37°С	28°С	37°С	28°С
<i>Y. pestis</i> EV76 (донор)	pFra::Tn5, pCad::Tn7, pPst	4/4 (100)	6/6 (100)	-(0,6±0,08)	-(1,33±0,1)	-(1,6±0,28)	-(3,8±0,25)
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 1923 (реципиент)	-	4/4 (100)	6/1 (17)	-(0,77±0,04)	-(1,09±0,05)	-(2,9±0,3)	-(4,2±0,3)
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 1923 (рекомбинанты)	pCad::Tn7	4/4 (100)	6/1 (17)	н/и	н.и.	н.и.	н.и.
	pFra::Tn5	4/4 (100)	6/5 (83)	+(0,34±0,06)	-(0,18±0,04)	-(0,28±0,02)	-(1,0±0,2)
	pFra::Tn5 + pCad::Tn7	4/4 (100)	6/6 (100)	+(0,25±0,02)	-(0,21±0,05)	-(0,39±0,08)	-(0,65±0,08)

Примечание -1. *) иммунизирующая доза исследованных штаммов; 2 **/ - заражение подкожно 200 DCL (*Y. pestis* 231 – DCL=100 м.к.) через 14 суток после первого инфицирования исследованными штаммами;

2 **/ - индекс завершённости фагоцитоза бактерий, выращенных при разных температурах через 6 часов контакта с перитонеальными макрофагами ($\Sigma:3$; $P \leq 0,05$; [10]; 3 – н.и. = не исследовано.

рекомбинантами, ИЗФ₆ во всех случаях имел отрицательные значения (устойчивость к фагоцитозу) вне зависимости от температуры предварительного выращивания бактерий. Это свидетельствовало о том, что МФ белых мышей были не способны противостоять бактериям этих штаммов. Следует лишь отметить, что интенсивность размножения выращенных при 37 °С рекомбинантов псевдотуберкулёзного штамма с плазмидой pFra::Tn5 (с одной или вместе с pCad::Tn7) в МФ белых мышей была несколько ниже, чем у исходного реципиента *Y. pseudotuberculosis* 1923. Выращенные при 28 °С рекомбинанты не отличались от исходных штаммов, все они активно размножались в МФ белых мышей.

Результаты определения ИЗФ₆ на модели перитонеальных МФ морских свинок представлены в Таблице 12. Судя по данным таблицы, приобретение бактериями псевдотуберкулёза «чумных» плазмид, детерминирующих отдельные антифагоцитарные компоненты *Y. pestis*, существенно снижало активность собственных антифагоцитарных факторов рекомбинантов *Y. pseudotuberculosis*. Причём более резко это было выражено у рекомбинантов, выращенных при 37 °С и слабее после 28 °С, тогда как бактерии донора и реципиента после инкубации при 37 °С умеренно размножались в МФ. Выращенные при 28 °С – интенсивно нарастали по численности. В отличие от опытов с белыми мышами, репрессия проявлялась, но популяция фагоцитированных клеток внутри МФ погибала не вся. Часть её сохраняла способность к размножению и противостояла фагоцитозу, хотя и в значительно меньшей степени, чем бактерии исходных штаммов донора *Y. pestis* EV76 и реципиента *Y. pseudotuberculosis* 1923.

Дополнительные данные были получены через 24 ч контакта бактерий и МФ. Более чёткой оказалась разница в уровнях корреляции показателей с температурой культивирования бактерий перед фагоцитозом. Выросшие при 28 °С бактерии исследованных штаммов обоих видов (донор и реципиент), через 24 ч, активно размножаясь, обеспечивали полную гибель МФ. Параллельно зарегистрировано заметное размножение сохранившихся рекомбинантов.

37 °С-бактерий донора *Y. pestis* EV76, умеренно размножавшихся в течение первых 6 ч наблюдения, через 24 ч в МФ не обнаруживали, что свидетельствовало об истощении их антифагоцитарной активности, гибели и завершённости фагоцитоза. Близкие к «0», но отрицательные показатели ИЗФ₆ у 28°С-рекомбинантов штамма *Y. pseudotuberculosis* 1923 позволяют предполагать сохранение бактерий и медленное размножение к 24 ч периоду устойчивой к фагоцитозу части популяции, тогда как реципиентный вариант *Y. pseudotuberculosis* 1923 сохранял явную способность к внутриклеточному росту как через 6, так и 24 часа нахождения в МФ, вызывая их гибель.

Иными словами, стойкую антифагоцитарную активность бактерий противочумной вакцины проявляли только после выращивания при 28 °С. Активность реципиентного штамма *Y. pseudotuberculosis* 1923 проявлялась в равной степени высоко и независимо от температуры предварительного выращивания бактерий, однако после приобретения плазмид чумного микроба, а именно pFra, у бактерий *Y. pseudotuberculosis* 1923, выращенных при 37 °С антифагоцитарная активность не проявлялась, как у чумного микроба, а после инкубации при 28 °С была значительно, но избирательно, ингибирована. Эти данные перекликаются с результатами работы [229], где сообщается о способности *caf*-оперона чумного микроба подавлять вирулентность *Salmonella*. Полученные данные свидетельствуют о сложных взаимоотношениях двух иерсиний на уровне их детерминант вирулентности и о целесообразности изучения особенностей патогенеза и подходов к диагностике рекомбинантных форм близкородственных иерсиний *in vivo*.

Для обнаружения их в пробах из внешней среды и в биоматериале была использована ПЦР с праймерами «*caf1*» и «F1»(Neubauer) на pFra плазмиду и видоспецифическими – «JS» и «vlm12/IS216». При анализе материала из селезёнок и культур-«отпечатков» результаты с парой праймеров «*caf1*» и «F1»(Neubauer) были во всех пробах положительны, независимо от того, были в пробе только pFra⁺ рекомбинанты *Y. pseudotuberculosis* или контрольные штаммы *Y. pestis* EV76 и 231. Специфических ампликонов не было лишь в

пробе с ДНК реципиентного штамма возбудителя псевдотуберкулёза и рекомбинантов с одной плазмидой кальцийзависимости. Синтез ампликонов, направленный парой видоспецифических для *Y. pseudotuberculosis* праймеров «JS», выявлен во всех пробах с материалом из селезёнок павших биопроб и в выросших из них культурах, кроме проб с контрольными штаммами *Y. pestis*, которые реагировали со специфической для *Y. pestis* парой праймеров «vIm12/IS216» (Рисунок 18).

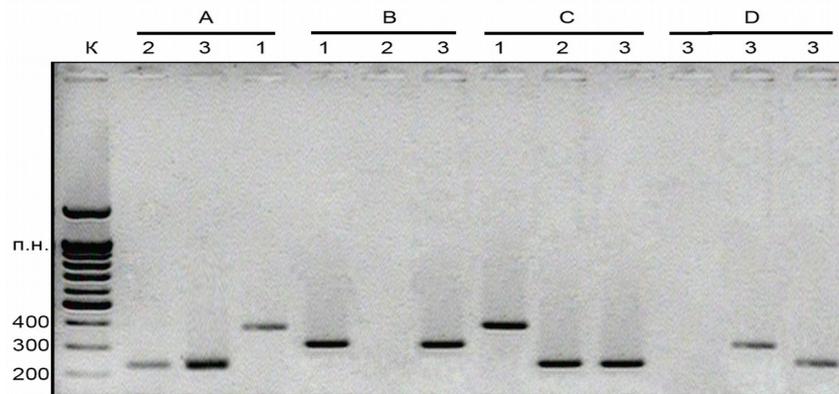


Рисунок 18 – ПЦР-тестирование штаммов и проб из материала селезёнок, содержащих: 1 – *Y. pestis* EV76 (донор); 2 – *Y. pseudotuberculosis* 1923 (реципиент); 3 – *Y. pseudotuberculosis* 1923 (pFra)⁺ (рекомбинант).

А – первичные культуры (одновременно две пары праймеров: («vIm12/IS» – 390 п.н. и «JS» – 223 п.н.); В – первичные культуры, пара праймеров «F1»(Neubauer) – 290 п.н.; С – материал из селезёнок, содержащих бактерии указанных штаммов, одновременно две пары праймеров «vIm12» и «JS»; D – материал из селезёнки, содержащей бактерии трансдуктанта *Y. pseudotuberculosis* 1923 (pFra)⁺: (3₁) – с парой праймеров «vIm12/IS216»; (3₂) – двумя парами праймеров «vIm12/IS216» и «JS» (одновременно); (3₃) – отдельно с одной парой праймеров «F1»(Neubauer)

В посевах ткани селезёнок мышей, заражённых рекомбинантами *Y. pseudotuberculosis*, при положительных результатах ПЦР с праймерами «caf1»

и «F1»(Neubauer) и иммунологического теста на антиген F1, не выявлено ни одной культуры, специфически реагирующей с праймерами «vIm12/IS216» и подозрительной на принадлежность к чумному микробу. Это подтверждает способность рекомбинантов *Y. pseudotuberculosis* длительное время сохраняться в теплокровном хозяине. Полученные результаты доказывают, что ПЦР с двумя праймерами («caf1» и «JS») эффективна не только в детекции и дифференциации бактерий двух видов иерсиний *in vitro*, *in vivo* и при анализе смешанных культур. Совместное использование «caf1» и «JS» под контролем отрицательных результатов с праймерами «vIm12/IS216» открывает возможность поиска рекомбинантов *Y. pseudotuberculosis* с pFra плазмидой чумного микроба в природе. Подобные рекомбинанты могут помешать корректной интерпретации результатов иммунологических тестов на F1-антиген и ПЦР только со специфическими для вида *Y. pestis* «плазмидными» праймерами. Использование в качестве основы «хромосомных» праймеров «JS» и «vIm12/IS216», направляющих синтез ампликонов у возбудителя псевдотуберкулёза и чумы, соответственно, поможет избежать ошибок.

Нужно также учитывать, что возможность передачи «чумных» плазмид и экспрессии диагностических плазмидных генов доказана у разных видов патогенных и условно патогенных бактерий сем. *Enterobacteriaceae* [115], которые, как известно, могут циркулировать в природных очагах чумы в популяциях грызунов и их эктопаразитов, и иметь изменённые свойства, затрудняющие идентификацию [193]. Не исключено, что недостаточная разработка адекватных приёмов скрининга может приводить к неоднозначной интерпретации итогов исследования, когда при позитивных результатах ПЦР-анализа с «caf»-праймерами и иммунологических тестов на F1-антиген, бактериологический анализ не обнаруживает типичных бактерий возбудителя чумы.

Вопрос о контакте и взаимоотношениях возбудителей чумы и псевдотуберкулёза в одном очаге и об их эволюционной связи в настоящее время нуждается в специальных исследованиях с использованием современных

методов. Усиление летального эффекта рекомбинантов и стимуляция ими иммунной системы носителя, не переводит их в ранг вирулентных в той степени, какая характерна для природных штаммов *Y. pestis*. Эффект не стимулируется одиночной «плазмидой вирулентности» pCad. Она только усиливает действие pFra, что свидетельствует о ведущей роли pFra. Но для объяснения такого типа синергидности двух плазмид нужны дополнительные факты. Достоверное повышение иммуногенности рекомбинантов для белых мышей в отношении *Y. pestis* ожидаемо. Эта способность природных штаммов *Y. pseudotuberculosis* уже описана [56, 77]. Особый интерес представляет негативное взаимодействие с МФ. Оно нуждается в специальных исследованиях, потому что свойством бактерий псевдотуберкулёза является способность длительного скрытого их сосуществования с клетками РЭС при хроническом течении псевдотуберкулёза и сложность их выделения из организма-носителя.

Представленные в диссертации данные могут быть полезным заделом при решении проблемы рекомбинантных форм родственных иерсиний, появление и использование которых нам представляется довольно реальным. А детальная разработка алгоритма ПЦР-диагностики таких рекомбинантных форм иерсиний будет способствовать их поиску в природе и контролю над ними. Такой контроль будет также необходим в ходе исследований биологии рекомбинантов, при конструировании противочумных вакцин и при намеренном террористическом распространении.

ГЛАВА 7. ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИГЕННОГО КОМПЛЕКСА FV *Y. PESTIS*

7.1. Первичная характеристика препаратов антигена FV

Результаты широкой апробации нами авторского образца специфического для *Y. pestis* антительного FV-КоА-диагностикума [21, 22] при идентификации в ходе выполнения диссертации всевозможных атипичных штаммов *Y. pestis*, смешанных и рекомбинантных культур, представленные в предыдущих главах, свидетельствуют о иммуноактивной и диагностической ценности составляющих FV-антигена. Стабильность результатов апробации диагностикума доказывает консервативность структуры его иммуноактивных компонентов, поскольку они выявлены у всех исследованных штаммов *Y. pestis* даже при существенном отклонении их фено- и генотипа от типичного. Далее мы приводим дополнительные характеристики этого антигена. Это подтверждается и данными литературы, изложенными выше. В более ранних работах антигенный комплекс «фракция V (FV)» охарактеризован как содержащий несколько мажорных и минорных белков, индивидуальная иммуноактивность которых не была изучена. Для получения пробных авторских диагностикумов использовали кроме тотального FV поликлональную кроличью сыворотку и полученные МКА к одному из эпитопов неидентифицированного компонента FV. Учитывая положительные результаты тестирования полностью бесплазмидных штаммов чумного микроба с помощью РКoA и единственных МКА, мы отказались от дефектного только по pFra плазмиде варианта штамма *Y. pestis* EV (НИИЭГ). И выбрали для экспериментов два других: вакцинный Otten 556/106 и авирулентный бесплазмидный штамм *Y. pestis* TRU и авирулентный бесплазмидный штамм *Y. pestis* TRU. Отсутствие у предлагаемого нами штамма-производителя *Y. pestis* Otten 106/556 мажорной и средней по М.м. плазмид, pFra и pCad исключило в составе препарата основных диагностических антигенов (F1 и Vag), которые контролируются этими плазмидами. Полученный по описанной выше методике препарат содержал белок в концентрации ≈ 900 мкг/мл [286].

Для общей характеристики препарата проведен электрофорез в денатурирующих условиях [280] в полиакриламидном геле с нанесением фракции V в различных концентрациях на полиакриламидный гель, имеющий концентрацию 12,5 %. Результаты электрофоретического разделения белков представлены на Рисунке 19.

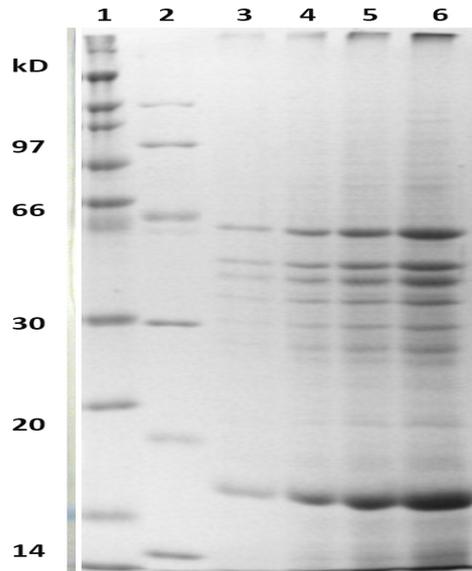


Рисунок 19 – Электрофоретическое разделение белков препарата фракции V, выделенного из штамма *Yersinia pestis* 556 в полиакриламидном геле концентрацией 12,5 % и содержанием ДСН 0,1 %. Окрашивание Кумасси ярко-голубой G-250. Линия 1 – маркеры Novex, сверху вниз в kDa – 200, 100, 110, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 15; линия 2 – маркеры LMW, сверху вниз в kDa – 97, 66, 30, 20, 14; линия 3 - 6 препарат фракции V; линии 3 – 0,5 мкл FV; линии 4 – 1,25 мкл FV; линии 5 – 2,5 мкл FV; линии 6 – 5 мкл FV

Таким образом, было установлено, что препарат фракции V содержит большое количество компонентов белковой природы, которые окрашиваются с помощью Кумасси ярко-голубой G-250 в полиакриламидном геле после электрофоретического разделения. Линии на фореze в геле имеют различную интенсивность окраски. Препарат содержит как мажорные, так и минорные фракции. Мажорные фракции препарата преимущественно находятся в зоне белков молекулярной массой от 30 до 60 и в зоне 15-17 kDa.

Тотальный препарат антигенного комплекса FV при инъекции белым мышам в дозе от 50 мкг/мышь был нетоксичным. После иммунизации им получены две серии кроличьих IgG-анти-FV-антисывороток. Титр антител находился в пределах 1:512 – 1:1024. При взаимодействии антигена FV с лошадиной гипериммунной поливалентной чумной агглютинирующей сывороткой титр антител к FV антигену был выше, чем в кроличьей, и находился на уровне, определяемом для F1 антигена. Полученные кроличьи анти-FV-сыворотки агглютинировали выращенные при 28°C бактерии штамма-продуцента *Y. pestis* 556/106, но не *Y. pseudotuberculosis* 1986 (Рисунок 20)



1

2

Рисунок 20 – Агглютинация на стекле с полученной кроличьей анти-FV-сывороткой и бактериями штаммов: 1 – *Y. pestis* 556/106; 2 – *Y. pseudotuberculosis* 1986.

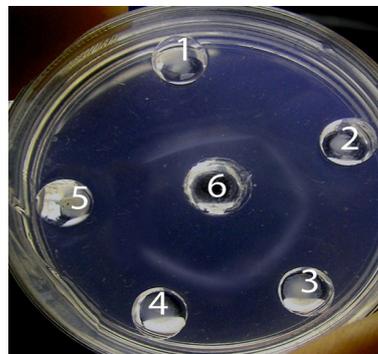
Это доказывает, что они содержат агглютинирующие антитела к компонентам FV. При определении преципитирующего титра в тесте



Ouchterlony испытали тотальный препарат FV и полученную поликлональную кроличью анти-FV-сыворотку (IgG-антитела) в различных разведениях. Выявлена одна мажорная линия, которая чётко разделялась на две по мере разведения сыворотки от 1:10 до 1:80, указывая на двукомпонентность иммуноактивных составляющих антигена. Антитела к одному из компонентов чётко выявлялись в лошадиной чумной диагностической гипериммунной сыворотке. В смеси кроличьих типовых сывороток к бактериальной массе штаммов 6-ти основных биоваров *Y. pseudotuberculosis* анти-FV-антител, реагирующих с FV антигеном не выявлено (Рисунок 21).

Рисунок 21 - 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.

Тест диффузионной преципитации ставили также с использованием в качестве антигена взвеси агаровой культуры (10^{10} м.к.) против анти-FV-кроличьей сыворотки. Во всех случаях формировалась зона преципитата, независимо от штамма-продуцента. Антиген визуально не выявлялся в лунке с



бактериями контрольного штамма *Y. pseudotuberculosis* 1986. В отличие от очищенного антигена секретлируемые цельными бактериями антигенные компоненты образовывали размытые полосы преципитата (Рисунок 22.)

Рисунок 22 - 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.

Поликлональные сыворотки, полученные ранее от мышей BalbC, иммунизированных лизатом бактерий штамма-продуцента *Y. pestis* 556/106 и тотальным препаратом FV, использовали при перекрёстной постановке иммуноблотта. Показано, что поликлональные мышинные IgM-антитела (гибридома E6/H8) связываются с имеющимися в FV двумя мажорными белками с М.м. приблизительно 25 и 35 кД (Рисунок 23)

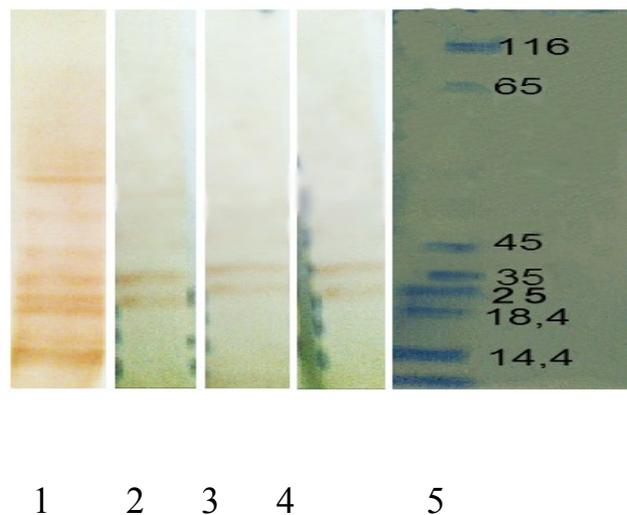


Рисунок 23 - Иммуноблотт лизата штамма–продуцента *Y. pestis* 556/106 и антигена FV с различными специфичными сыворотками.

1 – лизат бактерий *Y. pestis* 556/106 с поликлональной мышинной сывороткой к этому лизату; 2 – лизат бактерий *Y. pestis* 556/106 с поликлональной мышинной сывороткой 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.

Перечисленные результаты тестов, а также обнаруженная ранее возможность выделения анти-FV-МКА доказывает, что полученный нами антигенный комплекс идентичен FV и обладает иммуноактивностью.

Дальнейшую идентификацию белка, индуцирующего синтез МКА IgM(C6/H8), «сигнализирующих» о начале инфекции, проводили с помощью некоторых принятых в практике методов.

7.2. Выявление иммунологически активных компонентов FV.

Изучение компонентов «фракции V», имеющих значение для проявления препаратом своей иммунологической активности проводилась с помощью известных методических подходов, которые включают несколько этапов. А именно:

а) изучение компонентов препарата фракция V с помощью двумерного электрофореза, в котором использовали изоэлектрическое фокусирование в неравновесном градиенте pH и электрофоретическое разделение белков в геле с линейным градиентом плотности акрилаида (8–16 %);

б) выявление наиболее иммунологически активных составляющих препарата FV с помощью иммунной блот-гибридизации;

в) выделение обнаруженных в иммуноблоте компонентов FV;

г) масс-спектрометрический анализ выбранного белка с предварительным протеолитическим расщеплением трипсином, при помощи прибора Proteomics Analyzer4700, (Applied Biosystems);

д) обработка результатов с использованием баз данных NCBI и программного обеспечения Mascot searching engine v.2.1 (Matrix Science, London, UK).

При проведении 2D-электрофореза препарата FV изоэлектрическое фокусирование в капиллярах в неравновесном градиенте pH проводили с использованием амфолинов (3-10) и (5-8), после чего гель переносили в камеру для электрофореза, где в градиентном полиакриламидном геле осуществляли разделение белков в перпендикулярном первому направлению. Результаты 2-D электрофореза с препаратом FV представлены на Рисунке 24. Двумерный электрофорез препарата FV показал наличие более сотни белков в его составе.

Для определения белков, имеющих значение в проявлении возбудителем своей иммунной активности, была проведена блот-гибридизация с

использованием МКА (Е6Н8), полученных ранее и имеющих специфическую активность в отношении эпитопа одного из составляющих препарата FV. Перенос спектра белков проводили с использованием блоттера для полусухого переноса на платформе Multuphor-II (GE Healthcare Life Sciences, ЕС) на PVDF мембрану (Amersham Hybond-P), которую обрабатывали по инструкции производителя.

Итог сравнительного анализа результатов 2D электрофореза препарата FV и результатов иммуноблотта этого же разделения белков с МКА(Е6/Н8) представлен на Рисунке 25. Стрелкой показан белок, имеющий наиболее интенсивную окраску вследствие присоединения антимышинных антител, меченных пероксидазой.

Этот белок был элиминирован из полиакриламидного геля и проведено его масс-спектроскопическое исследование. Предварительно его подвергли протеолитическому расщеплению трипсином, с последующей элюцией и анализом пептидов при помощи прибора масс-спектрометра Proteomics Analyzer 4700, (Applied Biosystems). Обработка результатов показала, что выделенный белок, который имел наибольшую иммунную активность и сродство по отношению к МКА против FV, является белком «семейства трансальдозаз» и по своим свойствам идентичен трансальдозазам возбудителей чумы и псевдотуберкулеза.

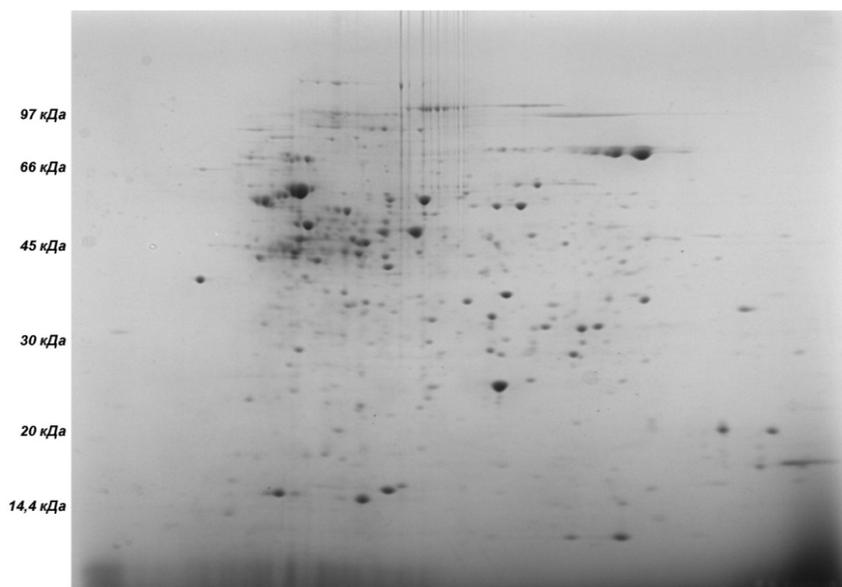
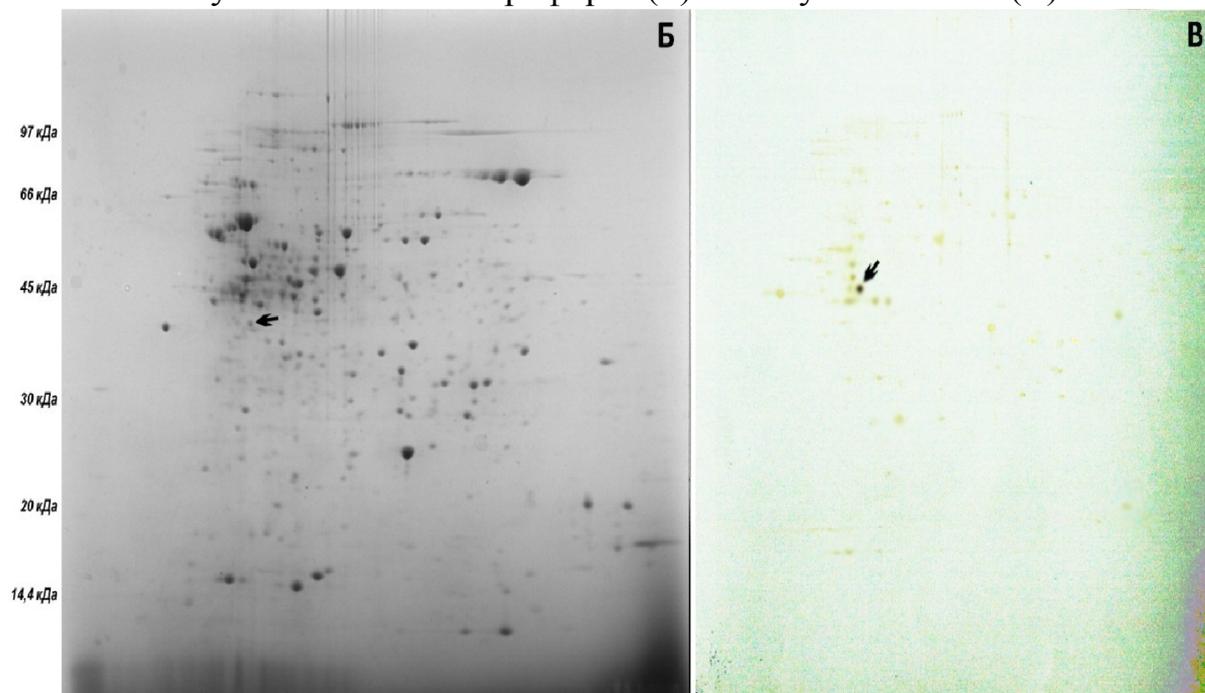


Рисунок 24 - Результаты 2-D электрофореза с препаратом FV в полиакриламидном геле, имеющим линейный градиент плотности от 8 до 16 %.

Рисунок 25 - 2D электрофорез (Б) и иммуноблоттинг (В) белков



препарата FV, разделенных в электрофорезе с МКА (Е6/Н8), против одного из компонентов FV *Y. pestis* 556/106.

Анализ с помощью программы Mascot searching engine v.2.1 (Matrix Science, London, UK) выявил, имеющиеся в базе данных трансальдолазы из штаммов *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*, совпадение по структуре с которыми было значительное. Среди белков штаммов, имеющих при сравнении с изучаемым препаратом наибольшее совпадение (score 133, 134, 137), были трансальдолазы из штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis* Antiqua и *Yersinia pestis* KIM10+ соответственно. Среди белков штаммов, имеющих достоверный уровень совпадения с исследуемым белком из препарата FV (score выше 95), показаны также белки штаммов различных видов рода *Yersinia*, в том числе трансальдолазы штаммов *Yersinia mollaretii*,

Yersinia aleksiciae, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia massiliensis*, *Yersinia similis*, *Yersinia intermedia*, *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia aldovae*.

7.3. Анализ *tal*-гена

Полипептидные последовательности трансальдолазы возбудителей чумы и псевдотуберкулеза отличались на одну аминокислоту внутри белка, причем при сравнении различных штаммов положение этой единственной не совпадающей аминокислоты было различным. Кроме того, у возбудителя чумы от возбудителя псевдотуберкулеза отличие в полипептидной последовательности отмечено и в С - концевом участке.

Нуклеотидные последовательности *tal*-гена у штаммов возбудителя псевдотуберкулеза отличались от последовательностей этого гена у возбудителей чумы на 1 %, что составляло 6-9 нуклеотидов. Эти нуклеотидные замены расположены у различных штаммов в различных локусах. Вместе с тем, сравнительный анализ аминокислотных последовательностей трансальдолаз возбудителей псевдотуберкулеза и чумы, свидетельствуют о том, что нуклеотидные замены не приводят к изменению структуры белковой молекулы. В большинстве случаев нуклеотидные замены являются синонимичными и аминокислоты остаются неизменными. В ряде случаев происходила замена 2 аминокислот, а в большинстве случаев только одной аминокислоты на весь белок трансальдолазы.

Примеры сравнительного анализа трансальдолаз возбудителей чумы и псевдотуберкулеза представлены (Таблица 13). В верхней части таблицы результаты прямого сравнения аминокислотной последовательности трансальдолаз из штаммов *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* с помощью программы BLAST в ncbi. Сравнительный анализ показал, что отличие, имеющихся последовательностей аминокислот в этом белке заключается в наличии в штаммах псевдотуберкулеза в 268 положении цистеина, а у

штаммов *Y. pestis* в этом же локусе находится глицин. Был выявлен еще один штамм возбудителя чумы (*Yersinia pestis* Sequence ID: gi|510938376 | WP_016256116.1), в котором дополнительно в положении 100 обнаружена аминокислота цистеин, тогда как у других штаммов возбудителя чумы и псевдотуберкулеза в этом положении присутствует аргинин.

При анализе трансальдозаз 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 трансальдозазы с трансальдозазой 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 (Таблица 13).

Таблица 13. Сравнительный анализ структуры аминокислот белка трансальдозазы

Штамм	Аминокислотная последовательность трансальдозаз
Сравнение трансальдозаз отдельных штаммов <i>Y. pseudotuberculosis</i> и <i>Yersinia pestis</i> , представленных в GenBank с помощью программы BLAST (ncbi)	
Transaldolase <i>Y. pseudotuberculosis</i>	Query 241 RLTIAPSLKELAESEGPVERKLAYT C EIQAKPAPLTEAEFYWQHNQDPMVAVDKLDGIR 300
Transaldolase <i>Yersinia pestis</i> KIM10+	Sbjct 254 RLTIAPSLKELAESEGPVERKLAYT G EIQAKPAPLTEAEFYWQHNQDPMVAVDKLDGIR 313
Transaldolase <i>Yersinia pestis</i> Antiqua	Sbjct 246 RLTIAPSLKELAESEGPVERKLAYT G EIQAKPAPLTEAEFYWQHNQDPMVAVDKLDGIR 305
Transaldolase <i>Yersinia pestis</i> Sequence ID: gi 510938376 WP_016256116.1	Sbjct 241 RLTIAPSLKELAESEGPVERKLAYT G EIQAKPAPLTEAEFYWQHNQDPMVAVDKLDGIR 300
Transaldolase <i>Y. pseudotuberculosis</i>	Query 61 EQSSDHAQQIVDATDKLAVNIGLEILKLIPGRISTEVDAR R LSYDTVASVAKAKRLIKLYN 120
Transaldolase <i>Yersinia pestis</i> Sequence ID: gi 510938376 WP_016256116.1	Sbjct 61 EQSSDHAQQIVDATDKLAVNIGLEILKLIPGRISTEVDAC L SYDTVASVAKAKRLIKLYN 120
Сравнение аминокислотных последовательностей трансальдозаз ряда штаммов <i>Y. pseudotuberculosis</i> и <i>Yersinia pestis</i> , полученных из нуклеотидных последовательностей этих штаммов, представленных в GenBank	
Transaldolase <i>Y. pseudotuberculosis</i> YPIII	Query 1 MTDKLTSLRQITTVVADTGDIAAMKLYQPQDATTNPSIILNAAQIPEYRKLIDEAI T WAR 60
Transaldolase <i>Yersinia pestis</i> Antiqua, KIM10+, CO92	Sbjct 6 MTDKLTSLRQITTVVADTGDIAAMKLYQPQDATTNPSIILNAAQIPEYRKLIDEAI A WAR 65

Пояснение: С-Цистеин; G-Глицин; R-аргинин, T – треонин, A- аланин

Сравнение нуклеотидных последовательностей генов трансальдозы у различных штаммов *Y. pestis* позволяет говорить о высокой стабильности структуры трансальдозы возбудителя чумы. Все последовательности, кодирующие трансальдозу *Y. pestis* оказались однородны и не имели каких-либо нуклеотидных замен, либо делеций за исключением одного штамма. При сравнении генов трансальдозы 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 образованию стоп-кодона, не позволяющего осуществлять транскрипцию всего гена.

Для характеристики выявленного в ходе исследования белка применили программы, позволяющие обнаружить сигнальный пептид (SignalP 4.0) [306]; трансмембранные альфа-спиральные области белков (TMHMM Server v. 2.0) [292]. Выявление бета-спиральных участков проводили с помощью серверов BOMP [218]. Для установления клеточной локализации отобранных белков использовали серверы PSORTb 3.0.2 [344].

Попытка определения сигнального пептида не принесла положительного результата (Рисунок 26).

Выявление трансмембранных α -спиральных областей исследуемого белка на сервере TMHMM Server v. 2.0 показало их отсутствие (Рисунок 27).

Полноценные β -спиральные области в исследуемом белке также отсутствовали, о чем свидетельствовали результаты тестирования последовательности белка с помощью программы BOMP [218] (**BOMP: Results** - The total number of valid proteins submitted is: 1. The total number of integral β -barrel outer membrane proteins predicted is: 0).

Выявление клеточной локализации выявленных белков проводили с использованием сервера PSORTb 3.0.2 [344] (Рисунок 28).

Результаты и этого исследования показали наличие структуры, характерной для внутриклеточных белков и расположение белка в цитоплазме.

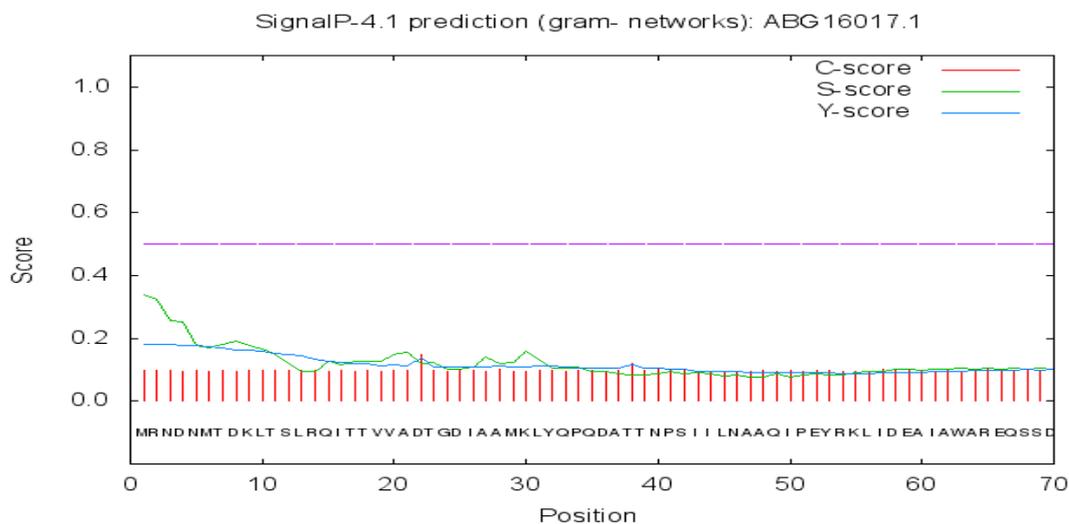
SignalP 4.1 Server - prediction

results

Technical University of Denmark

SignalP-4.1 gram- predictions

>ABG16017.1 transaldolase *Yersinia pestis Antiqua*_



Measure Position Value Cutoff signal peptide?

max. C 22 0.149

max. Y 11 0.153

max. S 1 0.338

mean S 1-10 0.224

D 1-10 0.187 0.570 NO

Name=ABG16017.1 SP='NO' D=0.187 D-cutoff=0.570 Networks=SignalP-noTM

data

Рисунок 26 - Результаты анализа полипептидной последовательности белка трансальдозы из штамма *Yersinia pestis Antiqua* показали их отсутствие на наличие сигнального пептида с помощью сервера SignalP 4.0

TMHMM result

HELP with output formats

ABG16017.1 Length: 322

ABG16017.1 Number of predicted TMHs: 0

ABG16017.1 Exp number of AAs in TMHs: 0.18208

ABG16017.1 Exp number, first 60 AAs: 0.00227

ABG16017.1 Total prob of N-in: 0.09150

ABG16017.1 TMHMM2.0 outside 1 322

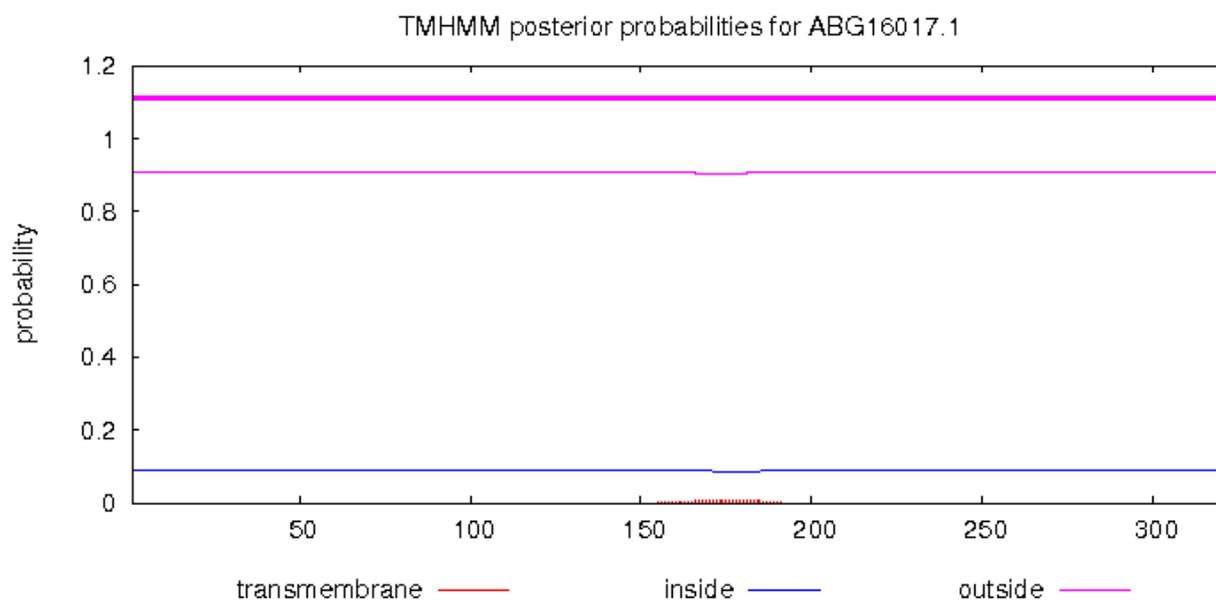


Рисунок 27 - Результаты анализа полипептидной последовательности белка трансальдозазы из штамма *Yersinia pestis Antiqua* с помощью сервера TMHMM Server v. 2.0 на наличие альфа-спиральных областей

PSORTb Results ([Click here for an explanation of the output formats](#))

SeqID: ABG16017.1 transaldolase [Yersinia pestis Antiqua] Analysis Report:

CMSVM-	Unknown	[No details]
CytoSVM-	Cytoplasmic	[No details]
ECSVM-	Unknown	[No details]
ModHMM-	Unknown	[No internal helices found]
Motif-	Unknown	[No motifs found]
OMPMotif-	Unknown	[No motifs found]
OMSVM-	Unknown	[No details]
PPSVM-	Unknown	[No details]
Profile-	Unknown	[No matches to profiles found]
SCL-BLAST	Unknown	[No matches against database]
SCL-BLASTe-	Unknown	[No matches against database]
Signal-	Unknown	[No signal peptide detected]

Localization Scores:

Cytoplasmic	8.96
CytoplasmicMembrane	0.51
Periplasmic	0.26
OuterMembrane	0.01
Extracellular	0.26
Final Prediction:	
Cytoplasmic	8.96

Рисунок 28 - Определение вероятного расположения исследуемого белка - трансальдозы возбудителя чумы

Таким образом, не было обнаружено никаких структурных компонентов в исследуемом белке, позволяющих предполагать возможность его секретироваться вне клетки и располагаться экстрацеллюлярно, либо в связанном состоянии с цитоплазматической или клеточной мембраной. Однако положительная рНИМФ с МКА демонстрирует специфическую связь МКА Е6/Н8 именно с поверхностно расположенной Та1, доступной для МКА как при 28°С, так и при 37°С, когда типичные бактерии окружены F1-специфической капсулой. Тогда как у возбудителя псевдотуберкулёза с этими МКА реагируют только штаммы в R-форме и то не все.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В итоге наших исследований можно заключить, что большинство фенотипических признаков, по которым рекомендуется идентифицировать типичные штаммы возбудителя чумы и отличать его от типичных штаммов возбудителя псевдотуберкулёза, может подвергаться природной изменчивости. Тесты на утилизацию рамнозы, мелибиозы, мочевины, не всегда могут гарантировать правильность идентификации атипичных вариантов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. Варианты «+», и «-» зарегистрированы нами у обеих иерсиний. То же самое можно сказать о пробах с диагностическими бактериофагами и о тесте на ауксотрофность. Хотя в большинстве случаев, особенно при дифференциации штаммов, выделенных в период острой инфекции, были получены достоверные результаты, обеспечивающие корректную дифференциацию и идентификацию. Более надёжные выводы были сделаны: (1) при наличии подвижности (*Y. pseudotuberculosis*), (2) при положительном результате РКоА на антиген FV (*Y. pestis*) и, если исключить встречу с гетерологичными плазмидными рекомбинантами, то (3) при положительном результате ПЦР-поиска плазмид pFra и pPst (*Y. pestis*), а также (4) при способности продуцировать F1-антигена (*Y. pestis*). Хотя по тестам 1 и 2 мы обнаружили редкие штаммы псевдотуберкулёзного микроба, похожие на чумной, а по тестам 3 и 4 значительное число штаммов *Y. pestis*, лишённых этих признаков и похожих на возбудителя псевдотуберкулёза. Совершенно очевидно, что наиболее достоверными при анализе и детекции штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, типичных и с любыми отклонениями диагностических свойств, были результаты ПЦР с видоспецифическими праймерами, которые гомологичны определённым консервативным фрагментам хромосомной ДНК каждой из иерсиний. В наших исследованиях такими проявили себя пары экспериментальных праймеров «vIm12/IS216» и «vIm33/IS1754» (*Y. pestis*) [294] и «JS» (*Y. pseudotuberculosis*) [314]. Во многих случаях эффективной была и пара праймеров «3а» [313] хотя, как удалось

показать, последовательности, комплементарные праймерам «3а», отсутствуют у единичных известных в мире штаммов чумного микроба, лишённых F1 антигена и устойчивых к диагностическому бактериофагу, хотя в их ДНК имеются фрагменты, которые реагируют с праймерами «vIm12/IS216» и «vIm33/IS1754», имеющими равную эффективность и специфичность.

С использованием праймеров «vIm12/IS216» и «JS» мы уточнили видовую принадлежность некоторых атипичных штаммов. Доказано, что так называемый «превращённый» штамм *Y. pestis* ЖБР-19, полученный в своё время под действием бактериофага при направленной селекции из «Х» бактерий (паспортные данные), является атипичным спонтанным мутантом вида *Y. pseudotuberculosis*, имеющим некоторое сходство с чумным микробом. Атипичные «спорные» штаммы, выделенные в 60-х годах от крыс в порту г. Ленинграда [168] и их R- и S-«диссоцианты», переданные в Музей живых культур РостНИПЧИ как вид *Y. pseudotuberculosis*. Нами с помощью ПЦР с праймерами, видоспецифическими для *Y. pestis* («vIm12/IS216» и «3а») и *Y. pseudotuberculosis* («JS») R-«диссоцианты» определены как однотипные аттенуированные культуры *Y. pestis*, одна из которых имеет малую примесь бактерий псевдотуберкулёза при максимальном доминировании чумного микроба. S-«диссоцианты» идентифицированы как *Y. pseudotuberculosis*. Выделены чистые клонированные культуры обоих видов, которые идентифицированы как *Y. pestis*. subsp. *pestis*, bv. *antiqua* (Nap⁺, Glp⁺, сурчиная разновидность) и *Y. pseudotuberculosis* O:1b. Заключение об этом передано в МЖК РостНИПЧИ.

У «спорных» штаммов исследован состав популяций. Установлена их неоднородность, наиболее выраженная по ферментативной активности, а также чувствительности к фагам, которая коррелировала у *Y. pestis* с вариациями плазмидного состава, т.е. по признакам, которые используются при идентификации видов иерсиний. R-«диссоцианты» отщепляли клоны, которые лишены одной, двух, а в единичных случаях трёх плазмид, специфичных для вида *Y. pestis*, обладали наибольшей изменчивостью и

проявляли ряд «диагностических» свойств, характерных для возбудителя псевдотуберкулёза. Однако по данным ПЦР с «хромосомными» праймерами они сохраняли принадлежность к виду *Y.pestis*.

Клоны S-«диссоциантов» и два OS-клона, выделенные из культуры одного исходного «спорного» штамма (смешанная культура), проявляли диагностические признаки возбудителя псевдотуберкулёза и позитивно реагировали в ПЦР только с праймерами «JS», видоспецифическими для *Y. pseudotuberculosis*.

С надёжными результатами исследования ДНК R-клонов в ПЦР с «хромосомными» праймерами «vIm12/IS216» чаще всего совпадала характеристика по таким видоспецифическим фенотипическим признакам, как подвижность, полный плазмидный состав, конкретные питательные потребности и продукция антигенного комплекса FV. Именно эти свойства в дополнение к ведущим по надёжности результатам ПЦР с праймерами «JS» и «vIm12/IS216», могут быть наиболее эффективными маркерами при идентификации атипичных бесплазмидных и бескапсульных штаммов иерсиний. Те штаммы, которые уклоняются от диагностики по ферментативной активности, F1 антигену и его иммунодетерминантам, могли быть негативными и в тестах с диагностическими бактериофагами Покровской, Л 413 «С», и Mu cts 62.

В сумме по результатам тестирования R- и S-«диссоциантов» *Y.pestis*, нами сделано заключение, что при исследовании «бесфракционных» и бесплазмидных штаммов чумного микроба штаммов лишь ограниченное количество микробиологических и иммунологических тестов может способствовать надёжной комплексной идентификации и межвидовой дифференциальной диагностике. Этот факт служит помехой анализу подобных «спорных» штаммов и особенно культур, содержащих примесь бактерий псевдотуберкулёза, и может в значительной степени затруднять исследование «пульсирующих» природных очагов.

В научных исследованиях или при обследовании очагов, следует учитывать возможность «встречи» со смешанными культурами иерсиний, подлежащих идентификации и разделению, а для этого целесообразно совершенствовать современные приёмы анализа. В том числе за счёт проверки малоизученных дополнительных критериев и поиска новых тестов, более доступных по выполнению.

На наш взгляд, вопросы детекции смешанных культур иерсиний на современном уровне, исследованы недостаточно и в инструктивных документах практически не освещены. В ходе исследования искусственных смешанных культур иерсиний мы отработали приём, включающий ПЦР-детекцию в них возбудителей чумы и псевдотуберкулёза с внесением в пробу одновременно двух видоспецифических «хромосомных» праймеров «vIm12/IS216» и «JS», комплементарных консервативным фрагментам хромосомы обоих видов иерсиний, при последующей селекции и заключительной видовой идентификации составляющих. По нашим результатам этот приём является эффективным и перспективным для применения в практике исследования материала, подозрительного на обсеменённость сразу двумя видами иерсиний. Его можно использовать при детекции описанных иерсиний в исследуемом материале, при идентификации выделенных культур и при разделении их, дополняя анализ иммунодиагностикой на антигены F1 и FV.

Исследования имеющейся в нашем распоряжении коллекции Fra⁻ штаммов *Y. pestis* с различным механизмом нарушения синтеза F1-антигена выявили их некоторые особенности.

Показано, что патогенетическая активность Fra⁻ штаммов чумного микроба зависит от потенциала сохранившихся у них детерминант вирулентности, с одной стороны, а также видовых, и даже индивидуальных, особенностей иммунной системы носителей – с другой. У белых мышей и морских свинок, они сильно варьируют. Это создаёт возможность скрытого течения инфекции и снижает эффективность биологического метода

обнаружения чумного микроба, что требует увеличения набора микробиологических манипуляций. Нельзя исключить, что возникающие иногда трудности обнаружения Fra^- бактерий *Y. pestis* бактериологическими, иммунологическими и биологическими методами снижают результативность поиска возбудителя чумы в межэпизоотический период. Возможно, в это время Fra^- и Fra^\pm формы доминируют над типичными и соседствуют с некультивируемыми вариантами и L-формами. В такой ситуации единичные положительные результаты ПЦР-детекции ДНК чумного микроба могут ошибочно оцениваться как «неспецифика» или как показатель присутствия ДНК давно погибших бактерий чумы, что сомнительно в случае исследования органов биопроб. На наш взгляд такие случаи требуют внимательного решения вопроса относительно способности Fra^- штаммов с пониженной вирулентностью вызывать хроническую не фатальную, инфекцию и обеспечивать сохранение вида *Y. pestis* в межэпизоотический период в скрытом состоянии.

Механизмы, приводящие к нарушению продукции F1-антигена у разных по происхождению штаммов, могут быть различными: утрата $rFra$ вообще, интеграция её с хромосомой или повреждение отдельных генов *caf*-оперона. В сумме всё это приводит к тому, что степень вирулентности этих бактерий при подкожном заражении не только белых мышей, но и морских свинок сильно варьирует. Причём штаммы, вирулентные для белых мышей, могут оказаться невирулентными для морских свинок. Это говорит об отличиях в чувствительности разных видов животных и о том, что патогенетической активностью для них обладают разные детерминанты Fra^- штаммов. Сообщение [322] об авирулентности экспериментального Fra^- штамма *Y. pestis* при подкожном заражении белых мышей и о вирулентности его при аэрозольном, вероятно, отражает штаммовую особенность. Поскольку в наших опытах большинство природных Fra^- штаммов при подкожном заражении белых мышей были вирулентны, и биопробы гибли от чумы, хотя болели несколько дольше, чем обычно. Данные литературы вместе с нашими

результатами подтверждают целесообразность детальных исследований всех возможных вариантов «бесфракционных» штаммов, как природных, так и экспериментальных. Это поможет (1) избежать ошибок при их поиске, (2) уточнить конкретную роль продуктов каждого из генов *caf*-оперона для экспрессии вирулентности, (3) определить возможность реверсии к Fra^+ фенотипу у природных Fra^- вариантов возбудителя, а также (4) расширить наше знание о биологической роли этих вариантов микроба в природе, которые долгое время сохраняются без острых проявлений инфекции в организме носителей, менее чувствительных к ним [61, 150, 321]. Наличие Fra^- и Fra^\pm в очаге исключает тотальную гибель носителей, мешает оздоровлению очага и способствует выживанию возбудителя чумы.

Судя по нашим определениям летального эффекта «бесфракционных» штаммов, модель белых мышей и морских свинок можно оценить как информативную и эффективную для характеристики особенностей механизма вирулентности Fra^- штаммов, тогда как для выявления максимального числа изменённых форм возбудителя, на наш взгляд, нужны более чувствительные биопробные животные, такие, как исследованные нами монгольские песчанки. В условиях регулярного обследования природных очагов, когда не доступен метод аэрозольного заражения, нет возможности пролонгировать срок наблюдения за биопробами на модели морских свинок и белых мышей и вводить расширенные схемы микробиологического анализа материала, замена вида биопробных животных будет облегчать выявление природных «бесфракционных» штаммов опосредованно через биопробы. При остром течении инфекции у монгольских песчанок снизится пропорция биопроб с активацией аутогенной условнопатогенной флоры и, соответственно, появление смешанных культур, которые мы регистрировали при длительном течении чумы после заражения морских свинок Fra^- штаммами *Y. pestis*.

Fra^- штаммы не выявляются в иммунологических тестах на F1-антиген, не всегда выделяются при посеве заражённого материала, что требует особого внимания при выращивании их на питательных средах и при наблюдении за

биопробами. Решению проблемы диагностики может способствовать стабильное сохранение у них свойства продуцировать видоспецифический антиген «FV», индуцирующий специфические для него антитела у хронически болеющих носителей, когда нет F1-антител. Это обеспечивает эффективность РКоА с тестируемыми культурами и обнаружение FV-специфических иммуноглобулинов в крови инфицированных бактериями чумы теплокровных носителей. А, следовательно, способствует корректной оценке очага инфекции.

Поиск Fra⁻ бактерий в первичном материале, и особенно в органах носителей и биопроб, можно облегчить применением ПЦР не только с праймерами «vIm12/IS216», но также и с праймерами на отдельные гены *caf*-оперона. Если плазида rFra не была утрачена, а имела дефекты в *caf*-опероне, то «сигнальные» положительные результаты ПЦР мы получали с предложенными нами праймерами на каждый или большинство из четырёх генов *caf*-оперона. Появление специфических ампликонов в ПЦР, лишь с частью «caf»-праймеров, при исследовании материала из органов или застарелых абсцессов биопроб, даже при отсутствии культуры возбудителя чумы в посевах, однозначно свидетельствует о наличии живых бактерий *Y. pestis* в пробе и требует более тщательного бактериологического анализа.

Иногда при исследовании органов морских свинок свидетельства о наличии бактерий чумы мы получали не из посевов, а только в ПЦР с ДНК из ткани селезёнок и «хромосомными» праймерами «vIm12/IS216», специфичными для *Y. pestis*. Судя по всему, при низкой обсеменённости органов возбудитель чумы маскировался вторичной флорой, устойчивой к генцианвиолету и тормозящей рост чумного микроба. То же, вероятно, может возникать при исследовании загнившего трупного материала, из которого трудно или даже невозможно выделить возбудителя чумы. Мы полагаем, что описание анализа наших проб с «вторичной» культурой может облегчить другим исследователям выбор приёмов для выявления Fra⁻ возбудителя,

поскольку демонстрирует эффективность монолокусной ПЦР с праймерами «vIm12/IS216» в экспресс - диагностике.

Таким образом, наши исследования позволяют сформулировать следующие положения:

1) при целевом скрининге Fra^- штаммов чумного микроба сроки наблюдения за биопробами (белые мыши и морские свинки) должны быть не менее 15 сут;

2) эффективно исследование материала из органов диких грызунов и биопроб в ПЦР с праймерами типа «vIm12/IS216», специфичными к консервативной последовательности хромосомной ДНК любых штаммов чумного микроба;

3) обязательны ПЦР-пробы с нетипичной культурой, выросшей в первичных посевах, на предмет наличия примеси чумного микроба к гетерологичной микрофлоре, которая может быть маскирующим антагонистом.

Для получения культуры при наличии положительных результатов ПЦР нам потребовались: (1) дополнительные рассевы материала; (2) использование для постановки биопроб более чувствительных к «бесфракционным» штаммам животных, которыми в наших опытах оказались монгольские песчанки; (3) последующая идентификация выделенной культуры по наиболее стабильным признакам возбудителя чумы, среди которых нам в наибольшей степени способствовала РКoA с иммунодиагностиком на антиген FV. Именно эти подходы и, особенно, «сигнальная» роль ПЦР с экспериментальными праймерами «vIm12/IS216» позволили нам выделить Fra^- культуры от забитых визуально здоровых морских свинок, исследованных на 30 сут наблюдения или павших в этот срок.

Возможность генетического обмена, доказанная у близкородственных иерсиний для плазмидной ДНК, содержащей маркерные фрагменты, определяет необходимость идентификации таких рекомбинантов, существование которых в природе пока не проверялось. Однако исключить их

в настоящее время нельзя. А потому эффективные приёмы выявления гибридных штаммов крайне необходимы, тем более данных о методических приёмах такой направленности мы не встретили. С учётом позитивных результатов проверки разработанного приёма дифференциации было проведено ПЦР тестирование ранее полученных рекомбинантных штаммов *Y. pseudotuberculosis* с маркированными Tn-элементами плазмидами pFra и pCad. В ПЦР с экспериментальными праймерами «vIm12/IS216» и «JS» показана принадлежность рекомбинантных штаммов к виду *Y. pseudotuberculosis* в сочетании с гетерогенной способностью продуцировать F1-антиген (позитивная РАО со специфическим диагностикумом) и с присутствием соответствующих генов pFra (положительная ПЦР с *caf*-праймерами), то есть с признаками вида *Y. pestis*. Нужно ещё учесть: доказана реципиентная способность к «чумным» плазмидам у бактерий других иерсиний, сальмонелл, коли-бактерий, клебсиелл и цитробактерий [98, 115]. Они, как известно, в виде смешанных культур могут циркулировать в природных очагах чумы в популяциях грызунов и их эктопаразитов, и иметь изменённые свойства [193]. Недостаточная разработка адекватных приёмов скрининга различных отклоняющихся от нормы форм возбудителей может приводить к ошибкам идентификации, которые можно устранить применением РКoA с диагностикумом на специфический для *Y. pestis*, независимый от плазмид антигенный комплекс FV и постановкой ПЦР с «хромосомными» высокоспецифичными парами праймеров «vIm12/IS216» (*Y. pestis*).

Для подтверждения целесообразности разработки приёмов тестирования возможных рекомбинантных форм псевдотуберкулёзного микроба в экологии природных очагов чумы и определения их роли мы проверили у них биологическую активность.

Оказалось, что pFra плазида *Y. pestis* может усиливать патогенные свойства больших доз бактерий рекомбинантов *Y. pseudotuberculosis* для белых мышей, даже с проявлением летального эффекта, а также существенно повышать их способность в малых дозах защищать мышей от чумной

инфекции так же, как вакцинный штамм *Y. pestis* EV76. Обнаружено, что плазмиды pFra и pCad чумного микроба могут неблагоприятно действовать на антимакрофагальную активность бактерий псевдотуберкулёза по отношению к МФ белых мышей и, особенно, морских свинок. Плазмиды затрудняли выживание микробов внутри свободных перитонеальных МФ, но бактерии дольше сохранялись в селезёнке биопроб. Полученные нами сведения являются заделом исследований выживаемости рекомбинантов во внешней среде и в организме носителей и определения конкурентоспособности в биоценозе природных очагов, а также способствуют накоплению данных в пользу гипотезы о путях возникновения вида *Y. pestis*.

Наши исследования показали, что FV –антиген *Y. pestis* содержит иммуноактивные молекулярные компоненты, индуцирующие, как показано ранее, синтез как IgG- (кроличьи) [23], так и IgM (мышинные) [18] антител. Мышинные специфические поликлональные IgM антитела обнаруживают компоненты с М.м около 25 и 35 кДа, а конкретно МКА IgM (С6/Н8) – 35-36 кДа. Это свидетельствует о различной иммуноактивности составляющих FV и, возможно, разной роли в развитии инфекции, поскольку класс IgM появляется сразу после первичного контакта с инфекционным началом (или антигеном), а для продукции IgG требуется длительное воздействие антигена. Таким образом, специфические к молекулярным компонентам анти-FV кроличьи ПКА, использованные ранее [138] для получения коагглютинирующего диагностикума и мышинные поликлональные, использованные в иммуноблотте, могут выявлять разные компоненты антигенного комплекса. «Индукторы» занных выше IgG, судя по реакции коагглютинации, представлены на поверхности бактерий всех штаммов *Y. pestis*, независимо от сохранности их типичного фенотипа и выращивания при 28°, или 37°С. При этом даже у формирующих капсулу Fra⁺ штаммов реакция была чётко позитивной, свидетельствуя о доступности V-антигена для комплементарных антител. Не обнаружено ни одного штамма чумного микроба, не реагирующего или слабо реагирующего с КоА-FV-диагностикумом, приготовленным с использованием

кроличьих IgG-антител. Показано отсутствие позитивной реакции с МКА (Е6/Н8) в НИМФ и с КоА-диагностикумом на FV у всех штаммов *Y. pseudotuberculosis* в S-форме [18]. Установлен факт существования единичных атипичных R- и RO-штаммов этого вида или некоторых S-штаммов, переходящих в R-форму при 37°C, в различной степени реагирующих с КоА-диагностикумом или с МКА (Е6/Н8) (чаще). В сумме такая ситуация свидетельствует о наличии у возбудителя псевдотуберкулёза антигена, похожего на компонент(ы) препарата FV чумного микроба. В пользу этого предположения свидетельствует также ранее показанная частичная конкурентность в твёрдофазном ИФА бактерий контрольного штамма *Y. pseudotuberculosis* и антигенного комплекса FV *Y. pestis* при взаимодействии с МКА (Е6/Н8) [18]. Это требует детального исследования структуры, особенностей синтеза и биологических функций компонентов FV у обоих видов. В этой ситуации результат FV-идентификации *Y. pestis* можно оценить лишь как ориентировочный, хотя с вероятностью, направленной на *Y. pestis*. Такой результат нуждается в подтверждении. Именно это сделано нами в ПЦР-анализе ДНК редких атипичных штаммов с помощью высокоэффективных видоспецифичных для *Y. pseudotuberculosis* праймеров «JS» и аналогичных по характеристике специфичных для *Y. pestis* «хромосомных» праймеров «vIm12/IS216» комплементарных видоспецифическому локусу гена, определяющего синтез белка систем секреции Dot U семейства. Следует заметить, что R-штаммы возбудителя псевдотуберкулёза, позитивные в иммунореакциях по FV, встречаются реже, чем «бесфракционные» чумные, и по характеру роста существенно отличаются от *Y. pestis*, что меняет направленность и значимость гипердиагностики.

То, что у единичных штаммов бактерий *Y. pseudotuberculosis* (находящихся при 28°C в S-форме) при 37°C на поверхности появляется некоторое количество антигена, имеющего сходство с компонентом FV, свидетельствует о термозависимости его локализации на поверхности клеток. Это вполне может быть связано с известной термозависимой трансформацией

ЛПС возбудителя псевдотуберкулёза из S-формы в R-, при которой освобождается доступ к сайтам, комплементарным эпитопам специфических анти-FV-антител [52, 90, 195].

На различных этапах выполнения диссертационной работы в диагностических целях в силу простоты, широкой доступности и быстроты выполнения метода мы пользовались РКоА. В то же время МКА (Е6/Н8) использовали при идентификации и иммуноблотт-анализе иммунокомпетентных составляющих комплекса FV. Именно с их помощью был выявлен 35-36 кДа белок, содержащий эпитоп, комплементарный МКА (Е6/Н8) и по аминокислотной последовательности идентифицированный как трансальдолаза.

Основной функцией фермента трансальдолазы (Tal) является участие в альтернативном пути окисления глюкозы – пентозофосфатном неокислительном пути, в котором в анаэробных условиях с помощью фермента происходит перенос остатка диоксиацетона от седогептулозо-7-фосфата на глицеральдегид-3-фосфат. Эти процессы происходят внутри клетки и, казалось бы, нет необходимости ферменту Tal секретироваться через клеточную мембрану и участвовать в проявлении иммунологических свойств микробной клеткой. Однако существуют исследования, которые показывают, что Tal находят в межклеточном пространстве, и она может выполнять другие функции, не связанные с ферментативным обеспечением пентозо-фосфатного пути метаболизма сахаров.

У некоторых бактерий обнаружена его способность проявлять функции адгезина для прикрепления патогенных бактерий к слизи выстилающей кишечник и при проникновении внутрь эпителиальных клеток хозяина. В этом ракурсе Tal оценивается не только как средство пробиотики и участник аутоаггрегации при формировании гломерул бактерий *in vitro* и *in vivo*, но и как фактор, связанный с вирулентностью [259, 264]. Авторы считают, что наличие этой субстанции у *Bifidobacterium bifidum* является важным компонентом фактора колонизации. При исследовании различных штаммов

V. parahemolyticus было выделено из белкового профиля секреции 15 белков, 6 из которых, включая Tal, отнесены к факторам патогенности. Предполагают, что Tal может иметь отношение к факторам, которые дополнительно участвуют в инвазии, колонизации и адаптации во внешней среде [264]. Вместе с тем, есть сведения, которые свидетельствуют о возможной иммунологической активности этого белка. В одной из работ предлагается использовать комплекс трех протеинов, среди которых Tal, как один из диагностических маркеров, позволяющих в ИФА проводить тестирование патогена *Mycobacterium avium* [261]. Исследования китайских авторов показали индукцию IgE в ответ на присутствие Tal грибов *Fusarium fungus*, которая является аллергеном для макроорганизма [267]. Есть сведения, что Tal через пентозофосфатный путь контролирует реакции оксидативного стресса, воспаления и карциногенеза [290, 304].

Возбудитель чумы в редких случаях также может проникать в организм хозяина через кишечник. Подобная ситуация возможна при воздушно-капельной инфекции, оральном поражении глотки. В других случаях участие фермента возможно при формировании биоплёнок с участием углеводов на поверхности кутикулы нематод, в гранулёмах ретикулоэндотелиальной системы при хроническом течении инфекции, вызванной ослабленными по вирулентности штаммами. Участие Tal в инвазии и сохранении инфекции *in vivo* в этих условиях представляется возможным, и эта его роль после экспериментального подтверждения может в перспективе оказаться существенной. А результаты исследования будут способствовать более глубокому пониманию феномена вирулентности *Y. pestis*.

При анализе аминокислотной последовательности Tal-белка нам не удалось обнаружить сигнальную последовательность. Однако сайты связывания этого белка с диагностическими антителами, как показали использованные тесты, расположены на поверхности бактерий чумы при обеих температурах выращивания, независимо от того имеется капсула с F1-антигеном или нет. Мы не получили свидетельства активной секреции

антигена вовне бактерий. Не исключено, что Tal находится в состоянии связи с компонентами ядра ЛПС *Y. pestis*, или наружной клеточной мембраной, играя кроме особо регулируемой ферментативной ещё и роль якоря для гликопротеина и гликолипида при формировании капсульной субстанции и сборке полноценного S-ЛПС. Последний формируется при 37 °С только у полноценных S-штаммов возбудителя псевдотуберкулёза и проявляет активность при наружной локализации боковых O-углеводных цепей, которые, видимо, и закрывают доступ антител к специфическим эпитопам *Tal*.

Сравнение в базе данных NCBI структурных генов *Tal*, а также результаты масс-спектрометрии не позволяют сделать заключение о полной структурной идентичности этого фермента у возбудителя псевдотуберкулёза и чумного микроба. Однако нам не удалось обнаружить существенных отличий в последовательности ДНК *tal* - гена у этих двух видов иерсиний. Отличающиеся единичные нуклеиновые основания в последовательности гена, обнаруженные при секвенсе, носили индивидуальный штаммовый характер. Эти точковые изменения были характерны для штаммов *Y. pseudotuberculosis*, тогда как последовательности у исследованных штаммов *Y. pestis* были идентичными. Однако при сравнении М.м. фермента у возбудителя чумы она была незначительно, но заметно выше (35658 и 36550 кДа), чем у большинства исследованных штаммов псевдотуберкулёзного микроба (М.м. 35027–35073 кДа).

Представляется важным дальнейшее исследование в разных аспектах: (1) возможных структурных вариаций фермента и его генов, (2) регуляции синтеза также роли функциональной Tal в инфицированном организме. Существующие межвидовые генные отличия, даже на уровне единичных замен в нуклеотидных последовательностях *tal*-генов, если они не являются индивидуальными для отдельных штаммов, можно будет рассматривать с точки зрения межвидовой ПЦР-дифференциации иерсиний, сравнивая секвенсы ампликонов, а также проконтролировать возможность (1) изменения

аминокислотной последовательности, а возможно и активности фермента, и (2) формирования stop-кодонов у отдельных штаммов.

В большей степени привлекает внимание другой аспект. Некоторая активность пассивной иммунизации МКА (Е6/Н8) и свидетельства антигенной активности FV, и конкретно Tal, позволяют рассчитывать на возможность использования этих антигенов для повышения эффективности препаратов, протективных в отношении чумы, и, возможно, псевдотуберкулёза. Перспективным представляется создание диагностических иммунопрепаратов для контроля над иерсиниозами. Эти разработки могут иметь не только чисто практическое значение, но способствовать решению фундаментальных вопросов, связанных с патогенетической активностью иерсиний.

Таким образом, в наших исследованиях были показаны возможные формы изменчивости *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, затрудняющие их детекцию и дифференциацию. Обнаружены атипичные по некоторым свойствам штаммы и на их модели дана оценка эффективности регламентированных инструкциями методов идентификации. Разработан и успешно апробирован методологический подход, позволяющий выявлять и дифференцировать различные атипичные штаммы этих иерсиний, в чистых, смешанных культурах и в органах биопробных животных, а также рекомбинантные формы *Y. pseudotuberculosis* с плазмидами *Y. pestis*. Охарактеризованы особенности биологической активности бесфракционных штаммов *Y. pestis* и рекомбинантов *Y. pseudotuberculosis*, определяющие необходимость соответствующих модификаций диагностических приёмов. Во всех случаях при детекции, идентификации и межвидовой дифференциации исследованных атипичных штаммов стержневым элементом была монолокусная ПЦР с двумя парами праймеров, комплементарных консервативным фрагментам хромосомы, одна из которых высокоспецифичная для чумного микроба (праймеры «vlm12/IS216»), другая для псевдотуберкулёзного (праймеры «JS»). Алгоритмы метода позволяют использовать его в упрощённых условиях специализированных мобильных и практических лабораторий различного

уровня, но материально оснащенных для проведения ПЦР диагностики в обычно режиме. Повышение эффективности выявления культур этих двух иерсиний за счёт применения экспериментального КоА-диагностикума на специфический для чумного микроба антиген FV демонстрирует целесообразность более детального исследования этого антигена и разработки специфических для него тест систем, способных выявлять типичные и любые атипичные штаммы возбудителя 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 «vIm12/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 ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдирасилова А.А. Диагностические характеристики ПЦР тест-систем при эпизоотологическом обследовании природных очагов чумы Казахстана / А.А. Абдирасилова // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. – 2013. - №6(94). – С.75-81.
2. Акиев, А.К. Чумоподобные культуры, выделенные от больших песчанок в юго-восточной Туркмении / А.К. Акиев, Н.А. Плетнева, З.М.

Сидоренко // Вопр. природной очагов. и эпизоотол. чумы в Туркмении.- Ашхабад, 1960. - С.227-233.

3. Анисимов, А.П. Сероварияция капсульного антигена возбудителя чумы / А.П. Анисимов, Н.М.Захарова // Мол. генет., микробиол., вирусол. - 1992. - № 9-10. – С.26-29.

4. Анисимов, А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 1 / А.П. Анисимов // Мол. генет., микробиол., вирусол. – 2002. - №3. - С.3-23.

5. Анисимов, А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 2. / А.П. Анисимов // Мол. генет., микробиол., вирусол.. – 2002. №4. – С.3-11.

6. Анисимов, П.И. Генетические элементы патогенности и молекулярные механизмы фенотипического выражения вирулентности иерсиний / П.И. Анисимов, О.Т. Можаров, Г.П. Шведун [и др.] // Пробл. особо опас. инф. - Саратов, 1994. - Вып.1-2(71-72). - С. 57-66.

7. Апарин, Г.П. Микробиология чумы: Руководство / Г.П. Апарин, Е.П. Голубинский. - Иркутск, 1989. – 91 с.

8. Арутюнов, Ю.И. К вопросу установления причин неспецифичности чумных фагов / Ю.И. Арутюнов, Н.Н. Новосельцев // Пробл. особо опас. инф. – Саратов,1971. - Вып.3. – С.107-111.

9. Арыкпаева, У.Т. О дополнительном методе дифференциации возбудителя чумы и псевдотуберкулёза / У.Т. Арыкпаева, Л.Н. Классовский, Г.Ю. Пак [и др.] // Спец. профилакт. чумы и холеры (Тр. противочум. учрежд.). – Саратов, 1980. – С.23-24.

10. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьёв. – Л.,1986. – 184 с.

11. Баканурская, Т.Л. Нетипируемая форма микроба чумы /Т.Л. Баканурская, В.М. Степанов, В.Л. Семиотрочев // Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилакт.: Матер. межгос. науч.-практ. конф. – Алма-Ата, 1992. – Ч.1. – С79-82.

12. Баландин, И.Г. Об уреазной активности чумных и псевдотуберкулёзных бактерий / И.Г. Баландин, А.А. Долманова // Труды Ростовского-наДону н.-и. противочум. ин-та. – Ростов-наДону, 1960. - Т.17. – С.123-130.

13. Балахонов, С.В. Новые плазмидовары штаммов возбудителей чумы, изолированных в Монголии / С.В. Балахонов, С. Цэнджав, А. Эрдэнебат // Мол. генет., микробиол., вирусол. – 1991. – №11. –С.27-29.

14. Бамматов, Д.М. Сочетанные природные очаги инфекционных болезней в равнинно-предгорной части республики Дагестан: Автореф. дис. ... канд. мед. наук /Бамматов Джанболат Мусаевич. – Ставрополь, 2013. – 22с.

15. Бахрах, Е.Э. К характеристике соматических антигенов чумного микроба / Е.Э. Бахрах, Т.П. Боровикова, В.И. Вейнблат [и др.] // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1972. - №9. – С. 101-105.

16. Безрукова, Г.А. Галактокиназная активность возбудителей чумы и псевдотуберкулёза / Г.А. Безрукова, Т.В. Воробьева // Микробиол. и биохим. особо опасных инф. - Саратов, 1982. - С.36-40.

17. Бибикова, В.А. О судьбе чумных и псевдотуберкулёзных микробов. Сообщение 3. О судьбе чумных и псевдотуберкулёзных микробов в смешанных культурах / В.А. Бибикова, В.Н. Классовский, Л.М. Осадчая [и др.] // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1967. - №5, - С.138-139.

18. Бичуль, О.К. Моноклональные антитела к поверхностным антигенам чумного микроба: Автореф. дис. ...канд. мед. наук / Бичуль Ольга Константиновна. - Ростов-на-Дону, 1993.-20с.

19. Блохина, И.Н. Систематика бактерий (с основами геносистематики) /И.Н. Блохина, Г.Ф. Леванова, А.С. Антонов. - Ниж. Новгород, 1992. - 170с.

20. Бобров, А.Г. Распространённость IS285 и IS100 в геномах *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis* / А.Г. Бобров., А.А. Филиппов // Мол. генет. микробиол., вирусол. - 1997. - №2. – С.36-40.

21. Божко, Н.В. Получение диагностических препаратов на основе антигенов чумного микроба, выделенных поверхностно-активными

веществами / Нина Васильевна Божко: Автореф. дис. ... канд.биол. наук. – Ростов-на-Дону, 1972. – 23 с.

22. Божко, Н.В. Диагностические препараты на основе фракции V чумного микроба / Н.В. Божко, В.В. Король, Л.К. Лысова [и др.] // Диагност. лечение и профилакт. опасн. инф. забол. Биотехнология: Ветеринария. Матер. юбил. науч. конф., посвящ. 70-лет НИИ микробиол. МО РФ. – Киров, 1998. – С. 57-58.

23. Божко, Н.В. Первичная характеристика свойств и диагностической ценности антигенного комплекса «фракция V» чумного микроба / Н.В. Божко, С.А. Лебедева, О.К. Бичуль [и др.] // Клин. лаб. диагностика. – 2005. - №6. – С. 45-49.

24. Боярский, А.Я. Статистические методы в экспериментальных медицинских исследованиях. – М., Медгиз, 1955. – 262с.

25. Булгакова, Е.Г. Способ дифференциации чумного и псевдотуберкулёзного микробов с одновременной внутривидовой дифференциацией штаммов чумного микроба // Патент. 2332464 RU. МПК С1 С12 Q1/68. /Е.Г. Булгакова, А.В. Гаева, И.Ю. Сухоносков [и др.] (RU).- №2332464; заявлено 20.08.2008, Бюл. №24. -10 с.

26. Булгакова, Е.Г. Особенности проявления признака пигментации и структурные различия генов HMS-оперона у штаммов *Y.pestis* и *Y.pseudotuberculosis* разного происхождения / Е.Г. Булгакова, Я.М. Краснов, А.В. Гаева [и др.] // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 2011. – Вып.2 (108). – С.30-35.

27. Бывалов, А.А. Биологические и физикохимические свойства культур бактерий *Yersinia pseudotuberculosis*, несущих fra-оперон *Yersinia pestis* / А.А. Бывалов, К.Е. Гаврилов, В.В. Крупин [и др.] // Мол. генет., микробиол., вирусол. – 2008. - №1. – С.14-18.

28. Васильева, Г.И. Дифференциальная диагностика чумного и псевдотуберкулезного микробов / Г.И. Васильева, В.Л. Пустовалов, А.К.

Кисилева [и др.] // Иерсиниозы (микробиол., эпидемиол., клиника, патогенез, иммунол.): Тез. Всесоюз. научн.- практ. конф.- Владивосток, 1986. - С.21-23.

29. Венедиктов, В.С. Влияние температуры культивирования на биологические свойства псевдотуберкулезного микроба: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / Владимир Сергеевич Венедиктов. - Владивосток, 1988.- 23с.

30. Вейнблат, В.И. Видоспецифический поверхностно-соматический антиген возбудителя чумы / В.И. Вейнблат, М.М. Титенко, М.С. Веренков [и др.] // Мол. биол., генет. и иммунол. возб. особо опас. инф.: Тез. докл. Всесоюз. конф. – Ростов-на-Дону, 1984. – С. 94-96.

31. Вейнблат, В.И. Конструирование диагностикумов на основе энтеротоксина холерного вибриона и фибринолизина возбудителя чумы, их и значение в системе эпидемиологического надзора / В.И.Вейнблат // Бактериальные токсины: 2-ая Всесоюз. конф. – Юрмала, 1989. – С.22.

32. Видяева, Н.А. Сравнительный анализ липополисахарида штаммов *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis* различного происхождения / Н.А. Видяева, А.В. Гаева // Пробл. особо опас. инф. - Саратов, 2007. – Вып. 2(94). - С. 43-45.

33. Видяева, Н.А. Сравнительная характеристика антиокислительных ферментов штаммов *Y.pestis* различных подвидов и *Y.pseudotuberculosis* / Н.А. Видяева, А.В. Гаева, Л.М. Куклева [и др.] // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 2008. – Вып.96. – С.29-32.

34. Водопьянов, С.О. Пили (фимбрии) возбудителей чумы и псевдотуберкулёза: обнаружение в реакции гемагглютинации и в системе иммуноферментного анализа / С.О. Водопьянов, В.С. Рыбкин, А.В. Родионова [и др.] // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. - 1988. - №8. – С.7-10.

35. Водопьянов, С.О. Выявление возбудителей чумы и псевдотуберкулёза в полимеразной цепной реакции / С.О. Водопьянов, И.Ю. Сучков, Л.В. Романова [и др.] // Актуал. пробл. разработки мед. средств и методов и восстанов. боеспособности лич. состава вооруж. сил: Тез. юбил. конф. НИИ воен. медицины. – СПб, 1994. – С.127-128.

36. Гаврилова, Л.Б. Влияние температуры культивирования и носительства *fra*-оперона *Y. pestis* на морфологические особенности *Y. pseudotuberculosis* /Л.Б. Гаврилова, А.А. Бывалов, А.В. Чернядьев [и др.] // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 2011. - №2. – С.72-75.

37. Гаева, А.В. Идентификация и внутривидовое типирование штаммов чумного микроба с определением их потенциальной вирулентности методом ПЦР / А.В. Гаева, Е.Г. Булгакова, И.Ю. Сухоносков [и др.] // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 2011. - Вып.3(109). – С.35-42.

38. Гольдфарб, Л.М. Фенилаланиновый тест у возбудителей чумы и псевдотуберкулеза / Л.М. Гольдфарб, Л.И. Кузнецова, К.П. Богатова // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1970. - Вып.3. - С.102-103

39. Гольдфарб, Л.М. Выявление атипичных штаммов чумного микроба среди культур, выделенных на территории Туркмении в 1966-69 г. /Л.М. Гольдфарб, Е.Е. Пунский, А.А. Левина [и др.] // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1971. – Вып.4. - С.18-21.

40. Гольдфарб, Л.М. Характеристика энтерококков, выделенных от песчанок и изучение взаимоотношений возбудителя чумы и энтерококков / Л.М. Гольдфарб, Р.Т. Герасименко, Н.Г. Пономарёв [и др.] // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1972. – Вып 5. – С.114-117.

41. Гольдфарб, Л.М Видовая принадлежность и некоторые особенности культур, выделенных на холмогорье Бадхыз весной 1976 года / Л.М. Гольдфарб, С.Г. Седина, Т.В. Святая [и др.] // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1977. – Вып.3. – С.5-8.

42. Гольдфарб, Л.М. К оценке изоцитратлиазного теста для дифференциации возбудителей чумы и псевдотуберкулеза / Л.М. Гольдфарб, Т.И. Домарадская, М.Н. Джапаридзе // Актуал. вопр. лаб. диагност. чумы и холеры. - Саратов , 1984.- С.23-27.

43. Грачёва, И.В. Современное состояние классификации некоторых патогенных представителей родов *Bacillus*, *Brucella*, *Burkholderia* *Francisella*,

Vibrio, Yersinia /И.В. Грачёва, Т.Б. Караваева, Т.К. Меркулова [и др.] // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 2009. – Вып. 1(99). – С.42-48.

44. Гребцова, Н.Н. Изменчивость бактерий чумы (*Yersinia pestis*), сопутствующая появлению устойчивости к диагностическому бактериофагу / Н.Н. Гребцова, С.А. Лебедева, А.С. Чернявская [и др.] // Изв. Сев.- Кавк. науч. центра Высшей школы. Естеств.науки. – 1998. - №4. – С.79-86.

45. Гурлева, Г.Г. К вопросу о блокирующих или неполных антителах противочумных агглютинирующих сывороток / Г.Г. Гурлева // Труды Ростовского н/Д. н-и. противочум. ин-та. – Ростов н/Д, 1960. – Т.17. – С.110-114.

46. Дальвадянец, С.М. Некоторые свойства компонентов, выделенных из препарата «основного» соматического антигена бактерий чумы / С.М. Дальвадянец, Л.А. Мартенс, Т.М. Тараненко, М.Н. Джапаридзе // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1972. – Вып. 4. – С. 17-20

47. Дальвадянец, С.М. Использование соматического эритроцитарного диагностикума для обнаружения возбудителя чумы в блохах / С.М. Дальвадянец, Л.Н.Величко, Т.В.Князева [и др.] // Актуал. вопр. лаб. диагност. и биохимии возб. чумы. - Саратов, 1984. – С.11-14.

48. Девдариани, З.Л. Результаты изучения активности, чувствительности и специфичности моноклональных диагностических чумных антикапсульных люминесцирующих иммуноглобулинов / З.Л. Девдариани, И.Л. Мартиневский, М.С. Веренков [и др.] // Механизмы формирования иммунитета к особо опасным инфекциям. – Саратов, 1986. – С.3-7.

49. Девдариани, З.Л. Иммуноферментная тест-система для идентификации типичных и атипичных штаммов чумного микроба / З.Л. Девдариани, В.А. Фёдорова, Н.С. Солодовников [и др.] // Мед. паразитология. – 1997. - №1. – С.31-33.

50. Демидова, Г.В. Способ идентификации и дифференциации штаммов *Y.pseudotuberculosis* от *Yersinia pestis* и *Yersinia enterocolitica* // Патент. 2486252¹³ RU. МПК С1 С12 Q1/68 (2006.01) / Г.В Демидова, С.О. Водопьянов,

А.Л. Трухачёв [и др.] (RU). - № 201211964/10; заявлено 12.05.2012. Бюл.№ 18. - 7с.

51. Дентовская, С.В. Структурное разнообразие и эндотоксическая активность липополисахарида *Yersinia pestis* / С.В. Дентовская, И.В. Бахтеева, Г.М. Татарева [и др.] // Биохимия. - 2008. – Т.73, №2. - С. 237-246.

52. Дентовская, С.В. Функциональная характеристика и биологическая роль генов биосинтеза липополисахарида *Yersinia pestis* / С.В. Дентовская, А.П. Анисимов, А.Н. Кондакова [и др.] // Биохимия. - 2011. - Т.76, №7. - С.989-1005.

53. Диденко, Л.В. Ультраструктурная организация клеток *Salmonella typhimurium* при длительном голодании и переходе в некультивируемое состояние / Л.В. Диденко, Н.Д. Константинова, Ю.М. Романова [и др.] // Мол. генет. микробиол., вирусол.– 2000. - №3. – С.21-26.

54. Доломанова, А.А. К вопросу об особенностях бактериологической диагностики псевдотуберкулёза у серых крыс / А.А. Доломанова // Труды Ростовского н/Д. н.-и. противочумного ин-та. – Ростов-н/Д.,1941. – Т.2. – С.19-25.

55. Домарадский, И.В. Некоторые данные по культивированию чумного микроба на синтетических средах / И.В. Домарадский, В.А. Иванов //Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. - 1957. - №2. – С.54-59.

56. Домарадский, И.В. Материалы к вопросу неспецифической иммунизации против чумы псевдотуберкулёзными микробами / И.В. Домарадский, Р.С. Колесник, Э.И. Клец [и др.] // Профилактикт. особо опас. б-ней: Тез. докл. межинститут. науч. конф. – Ростов-на-Дону, 1963. – С.45-48.

57. Домарадский, И.В. Возбудители пастереллёзов и близких к ним заболеваний / И.В. Домарадский.– М., 1971. - 288 с.

58. Домарадский, И.В. Биохимия и генетика возбудителя чумы / И.В. Домарадский, Е.П. Голубинский, С.А. Лебедева [и др.] – М., 1974. – 168 с.

59. Домарадский, И.В. Чума / И.В. Домарадский.– М., 1998. – 175 с.

60. Дробков, В.И. Иммунологические аспекты инвазивности псевдотуберкулезного микроба / В.И. Дробков, И.В. Дармов, С.Н. Янов [и др.]

др.] // Матер. науч.- практ. конф., посвящ. 100 лет. образов. противочум. службы России. - Саратов, 1997. - Т.1. - С.207-208.

61. Дроздов, И.Г. Оценка биологических свойств бескапсульных вариантов возбудителя чумы / И.Г. Дроздов, И.Н. Ежов, С.В. Самойлова [и др.] // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1993. – Вып. 1-2. – С.154-159.

62. Дрыгин, Ю.Ф. Определение *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis* методом амплификации 16S рРНК и её генов / Ю.Ф. Дрыгин, И.Б. Сахурия, И.И. Воробьёв [и др.] // Мол. биология. – 1995. – Т.29, №6. – С.1326-1335.

63. Дунаев, Г.С. Предварительные результаты исследований по Л-формам чумного микроба / Г.С. Дунаев, Л.Ф. Зыкин, В.Н. Метлин [и др.] // Особо опасные и редко встречающиеся троп. инф. – Волгоград, 1980. – С.26-28.

64. Дьяков, С.И. Диагностическая ценность некоторых флуоресцирующих антител при идентификации возбудителя псевдотуберкулеза грызунов / С.И. Дьяков, М.И. Леви, И.А. Куликов [и др.] // Пробл. особо опс. инф. – Саратов, 1972. - Вып.3(25). - С.194-198.

65. Дятлов А.И. О биологическом значении изменчивости чумного микроба в псевдотуберкулезный / А.И. Дятлов // Биохимия, патофизиология и микробиология особо опасных инфекций.- Саратов, 1983.-С.10-15.

66. Дятлов, А.И. Природная очаговость чумы на Кавказе / А.И. Дятлов, А.Д. Антоненко, Г.М. Грижебовский [и др.] - Ставрополь, 2001.-345с.

67. Евсеева, В.В. Активатор плазминогена чумного микроба / В.В. Евсеева, М.Е. Платонов, П.Х. Копылов [и др.] // Инфекция и иммунитет – 2015. – № 5(1). – С. 27-36. – DOI: 10.15789/2220-7619-2015-1-27-36.

68. Емельяненко, Е.Н. Полимеразная цепная реакция как метод изучения некультивируемых форм иерсиний в окружающей среде / Е.Н. Емельяненко, М.Ю. Аксёнов, А.Л. Гинцбург [и др.] // Патогенные бактерии в сообществах. (Механизмы и формы существования): Сб. науч. тр. - М., 1994. – С.135-139.

69. Еремицкий, И.Я. Инфекционная чувствительность к чуме больших песчанок Северного Приаралья / И.Я. Еремицкий // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1969. – Вып.2. – С.66-69.68.

70. Ерошенко, Г.А. Антибиотикоустойчивые штаммы возбудителя чумы и разработка способа их детекции методом полимеразной цепной реакции / Г.А. Ерошенко, Г.Н. Одинокоев, Л.В. Анисимова [и др.] // Пробл. особо опас. инф. - Саратов, 2011. - Вып.1(107). - С. 53-57.

71. Ерошенко, Г.А. Стандартный алгоритм типирования штаммов *Yersinia pestis* / Г.А. Ерошенко, Г.Н. Одинокоев, Л.М. Куклева [и др.] // Журн. Микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 2011. – №3. – С.90-95.

72. Ерошенко, Г.А. Совершенствование подвидовой классификации *Yersinia pestis* на основе данных полногеномного секвенирования штаммов из России и сопредельных государств / Г.А. Ерошенко, Я.М. Краснов, Н.Ю. Носов [и др.] // Пробл. особо опас. инф. - Саратов, 2015. – Вып.4. – С.58-64.

73. Жаринова, Н.В. Свойства штаммов, выделенных в Центрально-Кавказском природном очаге чумы в 1999-2001 гг / Н.В. Жаринова, А.Ф. Брюханов, В.В. Зарубин [и др.] // Эпидемиол. безопасн. на Кавказе. Итоги и перспективы: Актуал. пробл. эпидемиол. безопасности: Матер. юбил. науч. – практ. конф., посвящ. 50-лет. Ставропольск. НИПЧИ. – Ставрополь, 2002. – С.99-100.

74. Занина, В.М. К изучению штаммов возбудителя псевдотуберкулёза грызунов, обладающих некоторыми свойствами чумного микроба / В.М. Занина, И.Ф. Таран // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1975. – Вып.1 – С.73-74.

75. Занина, В.М. К изучению перекрёстного иммунитета при чуме и псевдотуберкулёзе грызунов / В.М. Занина, И.Ф. Таран, В.Ф. Дмитриев [и др.] // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1977. – Вып.3(55). – С.68-69.

76. Заплатина, С.И. К вопросу об оценке некоторых признаков у чумного и псевдотуберкулёзного микробов при установлении их видовой принадлежности / С.И. Заплатина // Труды Ростовского н/Д. н.-и. противочумного ин-та. – Ростов-н/Д, 1957. - Т. XIII. – С.207-210.

77. Заплатина, С.И. Об иммунологическом родстве *P. pestis* и *P.pseudotuberculosis* / С.И. Заплатина, А.М. Хохлова // Труды Ростовского н/Д н.-и. противочум. ин-та. – Ростов-на-Дону, 1959. – Т.ХVI. – С.97-104.

78. Заренков, М.И. Способ трансдукции хромосомных маркеров и плазмид у чумного микроба / М.И. Заренков, С.А. Лебедева, Н.Н. Гребцова [и др.] Авторское свидетельство №1304406 СССР. Заявка Ростовского–на-Дону противочумного института №3858282/28-14. Приоритет от 25.02.1985.

79. Заренков, М.И. Тп-опосредованная мобилизация плазмидных детерминантов чумного микроба с помощью плазмиды рКА7 /М.И. Заренков, С.А. Лебедева // Мол. генет. микробиол., вирусол. - 1986. - №5. – С.16-20.

80. Зыкин, Л.Ф. Итоги 15-летнего изучения персистенции L-форм *Yersinia pestis* / Л.Ф. Зыкин // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1994. – Приложение. – С.68-71.

81. Иванова, В.С. Скрининг плазмид у музейных штаммов чумного микроба, выделенных из разных природных очагов / В.С. Иванова, С.А. Лебедева, Н.А. Гончарова [и др.] // Мол. генет., микробиол., вирусол. – 1990. - №3. – С.16-18.

82. Иванова, В.С. Отбор атипичных рамнозопозитивных штаммов основного подвида *Yersinia pestis* принятыми методами идентификациями / В.С. Иванова, А.Л. Трухачёв, С.А. Лебедева / Клин. лаб. диагностика- 2007. - №11. – С.50-54.

83. Инструкция по применению набора реагентов для ускоренной идентификации штаммов *Yersinia pestis* методом мультилокусной полимеразной цепной реакц с гибридизационно-флуоресцентным учётом результатов в режиме реального времени (Ген *Yersinia pestis* идентификация – РГФ //Утверждена Приказом Роспотребнадзора от 13 октября 2011 г. №6580-Пр/11.

84. Инструкция по применению тест-системы для выявления ДНК *Yersinia pestis* методом полимеразной цепной реакйии (ГенПест). Утверждена Главным

государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г.Онищенко 11 мая 2007 г. №01-11/86-07.

85. Исаева, М.П. Набор родо- и видоспецифических олигонуклеотидных праймеров для детекции и видовой идентификации иерсиний методом мультикомплексной полимеразной цепной реакции // Патент РФ №2354700. / М.П. Исаева, А.М. Стенкова - №2006118406/13; заявлено 26.05.2006; опубл. 10.05.2009, Бюл. № 13.- 10 с.

86. Кадникова, Л.А. Капсульный антиген чумного микроба / Л.А. Кадникова П.Х. Копылов, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Инфекция и иммунитет. – 2015. – Том 5, № 3. – С.201-218.

87. Казаков, А.М. Использование коаггулинирующих диагностикумов в период эпизоотии чумы среди горных сусликов в Центрально-Кавказском природном очаге в 1997 году / А.М. Казаков, Г.А. Мозлоев, З.Л. Мамедов [и др.] // Инф. болезни: Новое в диагностике и терапии: Тез. докл. III съезда Итало-Рос. об-ва по инф. б-ням. – СПб, 1998. – С.37.

88. Карпузиди, К.С. Выделение *B.pseudotuberculosis rodentium Pfeifferi* от суслика и возможное эпизоотологическое значение этой находки / К.С. Карпузиди, М.С. Дрожевкина // Труды Ростовского–н/Д н.-и. противочум. ин-та, - Ростов-на-Дону, 1941. - Т. 2. - С. 78-88.

89. Классовский, Л.Н. К изучению потребностей возбудителя чумы в аминокислотах (при 28°C) / Л.Н. Классовский, В.М. Степанов, Л.И. Терентьева // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1971. - Вып.3. - С.122-124.

90. Книрель, Ю.А. Липополисахарид чумного микроба *Yersinia pestis*: структура генетика, биологические свойства / Ю.А. Книрель, А.П. Анисимов // Acta naturale. – 2012. - Том 4., №3 (14). – С.49-61.

91. Кокушкин, А.М. Социальные и биологические аспекты эпидемиологии чумы: автореф. дис. ... докт. мед. наук / Александр Михайлович Кокушкин.– Саратов, 1983. – 47 с.

92. Кольцова, Е.Г. Некоторые свойства пестицина 1 и передача пестициногенного фактора *in vitro*: Автореф. дис. ...канд. мед. наук /Елена Григорьевна Кольцова. - Ростов-на-Дону, 1970. – 24с.

93. Кольцова, Е.Г. Передача фактора бактериоциногении у чумного микроба / Е.Г. Кольцова, Ю.Г. Сучков, С.А. Лебедева // Генетика. -1971. - Т.7, №4. - С.118-122.

94. Коробкова, Е.Г. К вопросу о терминологии диссоциантов *Pasteurella pestis* / Е.Г. Коробкова // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол. – 1963. - №11. – С.76-80.

95. Коровкин, С.А. Изучение способности чумного и псевдотуберкулезного микробов усваивать альдегиды / С.А. Коровкин, А.К. Адамов // Пробл. природной очаговости чумы: Тез. докл IV Совет.-Монгол. конф. специалист. противочум. учрежд.- Иркутск, 1980. - Ч.2. - С.63.

96. Король, В.В. Диагностика бескапсульных вариантов чумного микроба / В.В. Король, Н.В. Божко, Г.П. Барабаш // Матер. межгосуд. науч. конф. «Профилактик. и меры борьбы с чумой», посвящ. 100-лет. открытия возб. чумы. – Алма-Аты, 1994. – С.97-98.

97. Коссе, Л.В. Штамм *Citrobacter freundii* KM1 – продуцент антигена «фракция 1» чумного микроба // Патент. № 1838403 SU. МПК 7: C12 N 1/20 / Л.В. Коссе, С.А. Лебедева, Л.С.Кузнецова, (SU). - №5024172/13 (22); заявлено 03.07.1991 (46). Положительное решение от 06.05.1992; 30.08.93. Бюл. №32(71).

98. Коссе, Л.В. Рекомбинантные штаммы *Klebsiella pneumoniae* и *Citrobacter freundii*, продуцирующие капсульный антиген *Yersinia pestis* / Л.В. Коссе, С.А. Лебедева, Л.С. Кузнецова // Иммунол. и спец. профилактик. особо опас. инф.: Матер. Рос. науч. конф. – Саратов, 1993. - С.290-291.

99. Кузнецова, Л.С. Активность некоторых пневмоцинов в отношении чумного микроба / Л.С. Кузнецова, С.А. Лебедева // Пробл. переноса генетич. информ.: Тез. докл. X Всесоюз. совещ. по программе «Плазмида». - М., 1985. – С.97-99.

100. Кузнецова, Л.С. Влияние генома бактерии на экспрессию и поведение плазмиды, определяющей Ca^{2+} -зависимость чумного микроба / Л.С. Кузнецова, С.А. Лебедева, Н.Н. Гребцова [и др.] // Мол. генет., микробиол., вирусол. – 1991. - №4. – С.10-13.

101. Куклев, В.Е. Применение мультилокусной ПЦР для ускоренной идентификации *Y.pestis* / В.Е. Куклев, И.Ю. Сухонос, Н.А. Осина [и др.] // Гено-диагностика инф. болезней-2007. (Молекулярная диагностика – 2007): Сб. трудов. - М., 2007. – Т.1., Разд.7. – С.376-377.

102. Куклева, Л.М. Сравнительная характеристика биохимических свойств штаммов разных подвидов *Yersinia pestis* и штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* / Л.М. Куклева, И.А. Кузьмиченко, О.А. Проценко [и др.] // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 2001. - Вып.1(81). - С.105-110.

103. Куклева, Л.М. Современные представления о родстве возбудителей чумы и псевдотуберкулёза / Л.М. Куклева, О.А. Проценко // Мол. генет. микробиол., вирусол. - 2002. - №1. - С.3-7.

104. Куклева, Л.М. Использование варибельности нуклеотидной последовательности генов *gha* локуса для дифференциации штаммов *Yersinia pestis* с различной вирулентностью и эпидемической значимостью / Л.М. Куклева, Г.А. Ерошенко, В.Е. Куклев [и др.] // Мол. диагностика: Сб. трудов VI Всерос. науч. - практ. конф с международ. участием. – М., 2007. – Т.1. – С.378-379.

105. Куклева, Л.М. Характеристика штаммов возбудителя чумы разных подвидов по признаку нитратредукции, ферментации глицерина и арабинозы / Л.М. Куклева, Г.А. Ерошенко, А.И. Павлова [и др.] // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 2007. – Вып. 4 (29). - С.50-53.

106. Куклева, Л. М. Сравнение полной нуклеотидной последовательности гена *rhaS* у штаммов возбудителя чумы основного и неосновного подвидов / Л. М. Куклева, Г.А. Ерошенко, В.Е. Куклев [и др.] // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 2008. – Вып. 3. – С.38-42.

107. Куклева, Л. М. Активатор плазминогена – многофункциональный белок возбудителя чумы. / Л. М. Куклева, А. В. Бойко // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 2016. – Вып. 3. – С.13-20. – DOI:10.21055/0370-1069-2016-3-13-20.

108. Куница, Н.К. Случай заболевания чумой и выделение от больного культур, трансформирующихся в L-формы чумного микроба в организме белых мышей, после длительного хранения / Н.К. Куница // Пробл. сан. - эпид. охраны территории стран СНГ: Тез докл. науч. - практ. конф. – Саратов, 1998. – С.131-132.

109. Куница, Н.Ф. К вопросу о патогенности трансформирующихся в L-формы культур чумного микроба / Н.Ф. Куница // Карантин. и зооноз. инф. в Казахстане. – Алматы, 1999. – Вып.1 (юбилейный). – С.201-202.

110. Кутырев, В.В. Генетический анализ факторов вирулентности возбудителя чумы / Владимир Викторович Кутырев: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Саратов, 1992. – 38 с.

111. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство / Под ред. Г.Г. Онищенко – М., - 2009. – 472 с..

112. Ларина, В.С. Использование мутанта умеренного чумного бактериофага Л-413 «С» для выявления изменённых штаммов возбудителя чумы / В.С. Ларина, Е.В. Чибикова, З.И. Беглецова [и др.] // Пробл. особо опас. инф. - Саратов, 1971. - Вып.6. – С.140-144.

113. Ларина, В.С. О сущности гипотезы сохранения чумного микроба в скрытой форме в сложном симбиозе с новым хозяином – почвенным микроорганизмом / В.С.Ларина, В.М.Степанов, А.М. Айкимбаев // Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилакт.: Матер. межгосуд науч. - практ. конф. – Алма-Ата, 1992. –Ч.1. – С129-132.

114. Лебедева, С.А. Изучение зависимости экспрессии генов плазмиды 65 МД чумного микроба от генома бактерии-хозяина / С.А. Лебедева, Л.С. Кузнецова, О.К. Бичуль [и др.] // Мол. генет.микробиол., вирусол. – 1991. - №4. – С.7-10.

115. Лебедева, С.А. Гетерологичные плазмиды и фаги в анализе генома возбудителя чумы *Yersinia pestis*: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. / Светлана Александровна Лебедева.– Ростов-на-Дону, 1993. – 45 с.

116. Лебедева, С.А. Вариабельность возбудителя чумы и проблемы его диагностики. / С.А. Лебедева, А.Л. Трухачёв, В.С. Иванова [и др.] – Гл. ред. Ю.М.Ломов. - Ростов-на-Дону, 2009. – 534 с.

117. Леви, М.И. Серологические исследования при чуме. Сообщение VIII. К вопросу о чувствительности и специфичности реакций нейтрализации антител при чуме и туляремии / М.И. Леви, Л.А. Сагатовская, Ю.Г. Сучков [и др.] // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1963, - №5. – С.65-68.

118. Леви, М.И. Новая разновидность чумного микроба / М.И. Леви, Ю.В. Канатов, Л.А. Сагатовская [и др.] // Труды Ростовского-н/Д. н.-и. противочум. ин-та. – Ростов-на-Дону, 1961. – Т.XVIII. – С.3-23.

119. Лесняк, В.М. К изучению взаимного влияния возбудителей чумы и псевдотуберкулеза грызунов на развитие инфекционного процесса / В.М. Лесняк, М.Н. Алиев // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1976. - Вып.1. - С.22-25.

120. Литвин, В.Ю. Обратимый переход патогенных бактерий в покоящееся (некультивируемое) состояние: экологические и генетические механизмы /В.Ю. Литвин, А.Л. Гинцбург, В.И. Пушкарёва [и др.] // Вестник РАМН. – 2000. - №1. – С.7-13.

121. Майский, В.Г. Активность аденозиндезаминазы бактерий чумы и псевдотуберкулеза грызунов / В.Г. Майский // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1971. - №3. - С.85-90.

122. Малафеева, Л.С. О возможности заражения животных псевдотуберкулёзом при поедании инфицированных блох / Л.С. Малафеева, Е.А. Плотникова // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1977. – Вып.3. – С.35-40.

123. Марамович, А.С. Популяционная изменчивость *Yersinia pestis* в почве из природного очага чумы / А.С. Марамович, Н.В. Бреднева, В.Т. Климов // Журн. микробиол. эпидемиол., иммунобиол. – 2006. - №2. – С.7-11.

124. Мартиневский, И.Л. О природе штаммов, выделенных от больших песчанок в Танджен-Мургабском междуречье / И.Л. Мартиневский // Журн. микробиол. эпидемиол., иммунобиол. – 1965. - №2. – С.136-140.

125. Мартиневский, И.Л. Биология и генетические особенности чумного и близкородственных ему микробов / И.Л. Мартиневский. – М., 1969. – 296 с.

126. Мартиневский, И.Л. К вопросу о природе штаммов бактерий, выделенных от серых крыс в Ленинграде в 1956 г. / И.Л. Мартиневский, Т.П. Кудинова, Л.М. Осадчая // Матер. 5 науч. конф. противочум. учр. Ср. Азии и Казахстана, посвящ. 50-лет. Велик. Октяб. Соц. револ. – Алма-Ата, 1967. – С.229-231.

127. Мекка-Меченко, Т.В. Микробиологический и молекулярно-генетический мониторинг возбудителя чумы из природных очагов разного типа: Автореф. дис. ... докт. мед. наук / Татьяна Владимировна Мекка-Меченко – Алматы, 2010. – 58 с.

128. Методические указания – «Организация проведения эпидемиологического надзора в природных очагах чумы Российской Федерации: МУ 3.1.1098 – 2002. - М., 2001. – 112 с.

129. Методические указания – Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV группы патогенности: МУ 1.3.2569-09. – М., 2009. – с.

130. Миронова, Л.П. О популяционной гетерогенности штаммов иерсиний / Л.П. Миронова // Иерсиниозы (Микробиол., эпидемиол., клиника, патогенез, лаб. диагност.): Тез. Всесоюз. науч. - прак. конф. - Владивосток, 1989 – С.35-36.

131. Мишанькин, Б.Н. Способ дифференциации возбудителей чумы и псевдотуберкулёза по N-ацетил-β-D-глюкозамидазной активности / Б.Н. Мишанькин, О.В. Дуванова // Обмен веществ при адаптации и повреждении. (Дни медицинской лаб. диагностики): Матер. X межвуз. конф. с международ. участ. – Ростов н/Д, 2011. – С.122-123.

132. Можаров, О.Т. Высокоповторяющиеся элементы генома возбудителя чумы / О.Т. Можаров, Е.П. Савостина, П.И. Анисимов [и др.] // Мол. генет., микробиол., вирусол. - 1997. - №1. – С.36-40.

133. Налётова, Л.Е. К нозогеографии псевдотуберкулеза в Сибири и на Дальнем Востоке / Л.Е. Налётова, Л.П. Миронова, В.Я. Головачева [и др.] // Современ. аспекты профилактики зоонозных инфекций: Тез. докл. Всесоюз. науч. конф. специалистов противочум. учреж. – Иркутск, 1984. - Ч.3. - С.45-46.

134. Никульшин, С.В. Изучение ассоциации почвенных амёб *Hartmannella rhysoides* с бактериями-возбудителями чумы и псевдотуберкулёза в эксперименте / С.В. Никульшин, Т.Г. Онацкая, Л.М. Луканина [и др.] // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1992. - №9-10. – С.2-5.

135. Новосельцев, Н.Н. О выделении умеренных фагов чумного микроба / Н.Н. Новосельцев // Генетика, биохимия и иммунохимия особо опас. инф.. – Ростов-н/Д, 1967. - Вып.1 – С.91-98.

136. Одинокоев, Г.Н. Сравнительный анализ структуры гена *inv* у штаммов чумного и псевдотуберкулёзного микробов / Г.Н. Одинокоев, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 2009. – Вып.2(100). – С. 50-52.

137. Оленичева, Л.С. Реакция переаминирования аминокислот у псевдотуберкулёзного микроба / Л.С. Оленичева, Г.Т. Атарова // Генетика, биохимия и иммунохим. особо опас. инф. – Ростов-на-Дону, 1967. - Вып.1.- С.180-183.

138. Определитель бактерий Берги. Изд.9-е. – М.,1997. – 779 с.

139. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и центрифугирование/ Л.А. Остерман - М, 1981. - 288с.

140. Павлова, А.И. Молекулярное типирование штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов: Автореф. дис. ... канд. мед наук / Алла Ивановна Павлова.– Саратов, 2012. – 24 с.

141. Пейсахис, Л.А. Внутривидовая классификация возбудителя чумы по принципу географического районирования / Л.А. Пейсахис, В.М. Степанов // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1975. – Вып.2. - С.5-9.

142. Платонов, М.Е. Филогеография полёвочьих штаммов *Y.pestis* из природных очагов Кавказа и Закавказья / М.Е. Платонов, В.В.Евсеева, Т.Э. Светоч [и др.] // Мол. генет., микробиол., вирусол. - 2012. - №3.- С.18-21.

143. Подладчикова, О.Н. Детекция возбудителя чумы и I сероварианта возбудителя псевдотуберкулёза с помощью полимеразной цепной реакции / О.Н. Подладчикова, А.Л. Трухачёв, А.В. Ракин [и др.] // Матер. межгосуд. научно-практ. конф, «Актуал. вопр. профилакт. чумы и др. инф. забол.» – Ставрополь, 1994. – С.68-69.

144. Полосмаков, В.Э. Участие уреазы штаммов *Yersinia pestis* из Центрально-Кавказского природного очага чумы в усвоении азота мочевины / В.Э. Полосмаков, Н.Я. Шиманюк, М.Б. Мишанькин [и др.] // Актуал. пробл. эпидемиол., безопасности: Матер. юбил. науч.- практ. конф. «Эпидемиол. безопас. на Кавказе. Итоги и перспективы», посвящ. 50-лет. Ставропольского НИПЧИ. – Ставрополь, 2002 – С.212-213.

145. Попов, А.А. Об антигене родстве бактерий псевдотуберкулёза и чумы по данным иммуноэлектрофореза / А.А. Попов, В.П. Прокофьева, С.М. Дальвадянц // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1972. – Вып.1(23). – С.33-36.

146. Попов Ю.А. Обнаружение плазмид пестициногенности чумного микроба методом электрофореза в агарозном геле / Ю.А. Попов, О.А. Проценко, П.И. Анисимов [и др.] // Профилактика особо опас. инф. – Саратов, 1980. – С.20-25.

147. Проценко, О.А. Выявление и характеристика плазмид чумного микроба, детерминирующих синтез пестицина 1, антигена фракция 1 и экзотоксина «мышинного» токсин / О.А. Проценко, П.И. Анисимов, О.Т. Можаров [и др.] // Генетика. – 1983. – Т.19, №7. – С.1081-1090.

148. Проценко, О.А. Серологические свойства эксконъюгантов псевдотуберкулёзного микроба, получивших свойство синтеза фракции / О.А.

Проценко, М.С. Веренков // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1977. – Вып. 4. – С.10-12.

149. Пунский, Е.Е. Морфологические, культуральные и ферментативные свойства штаммов чумного микроба, выделенных в Западной Туркмении в 1951-1955 г. / Е.Е. Пунский // Вопр. природ. очагов и эпизоотологии чумы в Туркмении. – Ашхабад, 1960. – С.212-216.

150. Пунский, Е.Е. Характеристика атипичных штаммов чумного микроба, выделенных в Тенджен-Мургабском междуречье, Восточных Кара-Кумах и на Бадхызе. Сообщение 1. Морфологические, культуральные ферментативные и антигенные свойства. Сообщение 2. Патогенность. Сообщение 3. Развитие инфекционного процесса у заражённых диких и лабораторных животных /Е.Е. Пунский, В.Ф. Андреева, Т.А. Бурлаченко [и др.] // Труды Ашхабад. ин-та эпид. и гигиены. – Ашхабад, 1970. – Т.8, Вып.2. – С.132-162.

151. Пустовалов, В.Л. Определение антифагоцитарной активности антигенов чумного микроба / В.Л. Пустовалов, Г.И. Васильева, А.К. Киселёва // Пат. физиол., иммунол. и аллергол. особо опас. инф. – Саратов, 1984. - С.8-12.

152. Пыленко, М.С. К вопросу об улучшении дифференциальной диагностики между *Pasteurella pestis* и *B. pseudotuberculosis rodentium Pfeiferi* /М.С. Пыленко // Труды Ростовского н/Д. н.-и. противочум. ин-та. – Ростов-н/Д, 1956. – Т.11. – С.39-48.

153. Радченко, Г.А. Сочетанные инфекции в Среднеазиатском пустынном очаге чумы / Г.А. Радченко, А.С. Безрукова, И.К. Алманиязова // Современ. аспекты профилакт. зоонозных. инф. - Иркутск, 1984. – С.44-45.

154. Ракин, А.В. Изучение плазмидного состава как дополнительный тест для дифференциации видов иерсиний и выявления патогенных штаммов / А.В. Ракин, Л.К. Казаченко // Современ. аспекты профилакт. зоонозных инф. - Иркутск, 1984. – Ч.3. – С.49-50.

155. Ракин, А.В. Чувствительность иерсиний к бактериофагу Mu / А.В. Ракин, Л.К. Казаченко // Журн. микробиол., эпидемиол, иммунобиол. – 1990. - №8. – С.17-20.

156. Ракин, А.В. Изучение плазмидного состава и продукции секретируемых термоиндуцибельных белков у штаммов *Y. pseudotuberculosis* / А.В. Ракин, В.А. Рыкова, Е.П. Соколова [и др.] // Генетика и биохимия вирулентности возбудит. особо опас. инф. - Саратов.-1992, -С.50.

157. Ривкус, Ю.З. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 2. / Ю.З. Ривкус, О.В. Митропольский, В.М. Бочкарёв [и др.] // Матер. регион. совещ. противочум. учрежд. по эпидемиол. и профилакт. особо опас. инф. - Куйбышев, 1990. - С.179-180.

158. Рузе, М. Микроб холодильника / М. Рузе // Наука и жизнь. - 1985. -№ 6. - С.132-135.

159. Рыжко, И.В. Особенности этиотропной терапии чумной инфекции, вызванной атипичными штаммами возбудителя чумы с Fra⁻ фенотипом / И.В.Рыжко, Э.А. Самоходкина, Р.И. Цураева // Антибиот. и химиотер. – 1998. – Т.43, №9. – С.24-28.

160. Савостина, Е.П. Анализ геномного полиморфизма типовых и атипичных штаммов возбудителя чумы с использованием ПЦР с универсальными праймерами / Е.П. Савостина, Ю.А. Попов, Т.Н. Каштанова [и др.] // Мол. генет. микробиол., вирусол. – 2004. - № 1. - С.22-26.

161. Свиридова, Л.С. Рамнозопозитивные варианты вакцинного штамма ЕВ / Л.С. Свиридова // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1970. – Вып.3. – С. 119-123.

162. Северин, С.Е. Моноклональные антитела и диагностика специфических антигенов / С.Е. Северин // Пробл. соврем. биохим. и биотехнол.: Тез. Докл. 8-го объедин. симпоз. биохим. об-ва СССР - ГДР. – Рига, 1985. – С.15.

163. Серов, Г.Д. Как их теперь назвать: скарлатиноподобная лихорадка или псевдотуберкулез, ложный туберкулёз или ложная чума? / Г.Д. Серов // Занимательные очерки о деятельности и деятелях противочумной системы России и Советского Союза. - М., 1999. - Вып.9. - С.43-76.

164. Соколов, П.Н. К вопросу о продолжительности сохранения микроба чумы в клещах и почве в экспериментальных условиях / П.Н. Соколов, В.С. Ларина, В.М. Степанов [и др.] // Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилактики: Матер. межгосуд. науч.-практ. конф. – Алма-Ата, 1992. – Ч. II. – С.269-272.

165. Соколов, П.Н. К вопросу об использовании серодиагностики клещей при эпизоотическом обследовании на чуму / П.Н. Соколов, Г.Г. Свиридов, В.М. Степанов [и др.] // Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилактики: Матер. межгосуд. науч.-практ. конф. – Алма-Ата, 1992. – Ч. II. – С.272-273.

166. Сомов, Г.П. Паразитизм и сапрофитизм патогенных бактерий. Экологические аспекты / Г.П. Сомов, В.Ю. Литвин. - Новосибирск, 1988. - 207с.

167. Сомов, Г.П. Псевдотуберкулёз / Г.П. Сомов, В.И., Покровский, Н.Н. Беседнова [и др.]. – М., 2001. - 256 с.

168. Сомова, Н.М. Выделение *Pasteurella pestis* в R форме из органов серых крыс / Н.М. Сомова, Н.А. Сергеева // Труды Ростовского-н/Д. н.-и. противочум. ин-та. – Ростов-н/Д, 1957. – Т.12. - С.307-317.

169. СП 1.33118-13: Постановление Главного санитарного врача РФ от 28.11.2013 №64 «Об утверждении эпидемиологических правил СП 1.33118-13. «Безопасность работы с микроорганизмами I и II группы патогенности (опасности)» вместе с «СП 1.3.3118-13». Зарегистрировано в Минюсте России 19.05.2014 №32325.

170. Специфическая индикация патогенных биологических агентов: (Практическое руководство) / Под ред. акад. РАМН Г.Г.Онищенко. – М., 2006. – 288с.

171. Стенкова, А.М. Разработка многопраймерной ПЦР для идентификации бактерий рода *Yersinia* и дифференциации патогенных видов (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*) / А.М. Стенкова, М.П. Исаева, В.А. Рассказов //Мол. генет., микробиол., вирусол. - 2008. - №3. - С.18-23.

172. Сулейменов Б.М. Энзоотия и эпизоотия чумы / Б.М.Сулейменов, Эверо. – Алматы, 2015. – 516 с (С.35-63).

173. Сунцов, В.В. Чума. Происхождение и эволюция эпизоотической системы (экологические, географические и социальные аспекты) / В.В. Сунцов, Н.И. Сунцова. - М., 2006. – 247 с.

174. Сунцов, В.В. Рецентное видообразование микроба чумы *Yersinia pestis* в гетеротермной (гетероиммунной) среде сурок-блоха (*Marmota sibirica*–*Oropsylla silantiewi*): Биогеоценотические предпосылки и преадаптации / В.В. Сунцов // Успехи современной биологии, – 2016, – Т. 136, № 6, – С.569–583.

175. Сухоносков, И.Ю. Структурно-функциональные различия *hms*-областей геномов *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis*: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / Игорь Юрьевич Сухоносков. – Саратов, 2009. -25 с.

176. Сучков, И.Ю. Современные возможности дифференциации представителей рода *Yersinia* / И.Ю. Сучков, Б.Н. Мишанькин, С.О. Водопьянов [и др.] // Генодиагностика инфекционных болезней: Сб. тр.V Всерос. науч.-практ. конф. - М, 2004. - Том 2. - С.188-190.

177. Сучков, Ю.Г. Естественная генетическая маркировка штаммов чумного микроба из природных очагов Кавказа / Ю.Г. Сучков, Г.Н. Розанова, Ю.М. Ёлкин [и др.] // Пробл. природ. очаг. чумы. – Иркутск, 1980. – Ч.2. – С.35-36.

178. Тараненко, Т.М. Современные представления о структуре Осоматического антигена чумного микроба / Т.М. Тараненко, В.И. Вейнблат // Иммунохимия и лаб. диагност. особо опас. инф. – Саратов, 1985. – С. 10-17.

179. Тарасова, В.Е. Восприимчивость монгольской пищухи Тувы и Горного Алтая к псевдотуберкулёзу / В.Е. Тарасова, Т.И. Инокентьева // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1974. – Вып.6(40). – С.76-79.

180. Темирралиева, Г.А. Иммуноферментная моноклональная тест-система для обнаружения возбудителя чумы / Г.А. Темирралиева, И.С. Аракелян, Л.Ю. Лухнова [и др.] // Лаб. дело. – 1988. - №8. – С.61-63.

181. Тимофеева, Л.А. О природе штаммов, выделенных от серых крыс в Ленинградском морском порту / Л.А. Тимофеева, Р.С. Колесник, В.Я. Головачёва [и др.] // Докл. Иркутск. н.-и. противочум. ин-та Сибири и Дальнего Востока. – Кызыл, 1962. – Вып.3. – С.14-17.

182. Тимофеева, Л.А. О таксономии чумного микроба / Л.А. Тимофеева // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1972. – Вып.1. – С.15-22.

183. Трухачев, А.Л. Способы диагностики и дифференциации возбудителя чумы: детекция атипичных штаммов *Yersinia pestis* молекулярно-биологическими методами (часть I) / А.Л. Трухачев, С.А. Лебедева // Мол. генет. микробиол., вирусол. - 2006. - № 1. - С. 3-6.

184. Трухачёв, А.Л. Набор праймеров для детекции и внутривидовой дифференциации штаммов возбудителя чумы / А.Л. Трухачёв, Е.А. Васильева, В.С. Иванова [и др.] // Диагностика, лечение и профил. опас. и особо опас. инф. забол. Биотехнология: Матер. Всерос. науч. конф., посвящ 80-лет. основ. ФГУ «48 ЦНИИ МО России». - Киров, 2008. - С.139-144.

185. Тугамбаев, Т.И. Иммуноглобулиновый эритроцитарный диагностикум к лирополисахариду возбудителя чумы / Т.И. Тугамбаев, Б.М. Сулейменов, Б.Б. Атчабаров [и др.] // Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилактики: Матер. Межгосуд.науч.-практ. конф. – Алма0Ата, 1992. – Ч.І. – С.166-168.

186. Туманский, В.М. Микробиология чумы / В.М. Туманский.– М.,1958. – 268 с.

187. Тюлембаев, М.А. О выявлении эпизоотии чумы среди мышевидных грызунов в Таласском автономном очаге / М.А. Тюлембаев, О.С. Соорбеков, Б.М. Якунин [и др.] // Вопр. природ. очагов. зоонозов. – Саратов, 1982. – С.40-41.

188. Усенбаев, А.У. Итоги лабораторного исследования на кишечный иерсиниоз и псевдотуберкулёз в Киргизии за 1984-1985 г. / А.У. Усенбаев, И.И. Асаналиев, Д.С. Суйеркулов [и др.] // Генетика, микробиол. и

совершенствование методов лаб. диагностики особо опас. инф. – Саратов, 1991. – С.95-97.

189. Фёдорова, В.А. Получение и научноприкладное значение моноклональных антител к липополисахариду *Yersinia pestis* (14.00.36 – аллергология, иммунология): Автореф. дисс. ... канд. мед. наук / Валентина Анатольевна Фёдорова. – Саратов, 1994. - 23 с.

190. Фёдорова, В.А. Изучение антигенных детерминантов липополисахарида *Yersinia pestis* с помощью моноклональных антител / В.А.Фёдорова, З.Л. Девдариани // Мол. генет., микробиол., вирусол. – 1998. - №3. – С.22-26.

191. Фёдорова, В.А. Иммунохимическая характеристика фракции 1 штаммов *Yersinia pestis*, дефектных по гену *cafIM* / В.А. Фёдорова, З.Л. Девдариани // Мол. генет. микробиол., вирусол. – 2002. - №1. – С.11-17.

192. Филиппов, А.А. Мобильные генетические элементы патогенных иерсиний / А.А. Филиппов // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 2000. – Вып.80. – С. 71-88.

193. Хрущелевская, Н.М. Взаимоотношение возбудителя чумы с эризопелотриксами, пастереллами, листериями и сальмонеллами в организме блох, мышей и на питательных средах / Н.М. Хрущелевская, В.А. Бибикова, О.С. Сержанов // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1975. – Вып.1(41). – С.72-82.

194. Чуринов, И.А. О серологическом тестировании штаммов возбудителя псевдотуберкулёза, выделенных на территории Калмыцкой АССР / И.А. Чуринов, Л.В. Чуринова, В.В. Подсвинова // Актуал. вопр. иммунодиагностики особо опас. инф.: Тез. докл. Всесоюз. науч.- практ. конф. – Ставрополь, 1986. – С.168-169.

195. Шайхутдинова, Р.З. Структурно-функциональная организация и генно-инженерная модификация липополисахарида *Yersinia pestis* / Римма Завдатовна Шайхутдинова: Автореф. дис. ... д.б.н.. – М., 2008. – 30 с.

196. Шамова, А.М. Случай выделения чумных и псевдотуберкулезных культур из грызунов на территории энзоотического очага чумы / А.М. Шамова // Изв. Иркут. н.-и. противочум. ин-та Сибири и Дальнего Востока. – Иркутск, 1959. – С.63-67.

197. Шерemet, О.В. Питательная среда для дифференциации возбудителей чумы и псевдотуберкулёза / О.В. Шерemet, Е.П. Голубинский, Н.Н. Винидченко // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1978. – Вып.4(62). – С.65-66.

198. Шмелев, В.А. Плазмиды *Yersinia pseudotuberculosis* / В.А. Шмелев, Е.А. Новиков // Мол. генет., микробиол., вирусол. – 1990. - №2. – С.16-19.

199. Шмелёв, В.А. Гетерогенность музейных штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* и их молекулярно-биологические свойства / В.А. Шмелёв, Л.Ю. Носова, В.С. Галлеев [и др.] // Журн. микробиол. эпидемиол., иммунобиол.- 1991. - №1. - С4-8.

200. Шубин, Ф.Н. Плазмиды *Yersinia pseudotuberculosis* и их значение в реализации эпидемиологического процесса при псевдотуберкулёзе / Ф.Н. Шубин, Ю.Т. Сибирцев, В.А. Рассказов // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1985. - №12. – С.53-56.

201. Шубин, Ф.Н. Анализ плазмидного состава штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* и его применение для типирования возбудителя псевдотуберкулёза / Ф.Н. Шубин, А.Л. Гинцбург, В.М. Китаев [и др.] // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1989. - №6. – С.20-25.

202. Шубин, Ф.Н. Молекулярная эпидемиология псевдотуберкулёза: методология и первые результаты исследований / Ф.Н. Шубин // Иерсиниозы (микробиология, эпидемиология, клиника, патогенез, лабораторная диагностика). – Владивосток, 1989. – Ч.1 - С.125-126.

203. Щербаков, А.А. Диагностикум эритроцитарный антигенный на основе мембранных белков чумного микроба / А.А. Щербаков, П.И. Анисимов, Ю.И. Кондрашин [и др.] // Генетика и микробиол. природно-очагов. инф. – Саратов, 1984. – С.22-27.

204. Щербаков, А.В., Применение мембранных белков в диагностике чумы / А.В. Щербаков, В.П. Топорков, П.И. Анисимов // Акт. вопр. иммунодиагностики особо опас. инф. – Ставрополь, 1986. – Ч.II. – С.187-189.
205. Шурыгина, И.А. Псевдотуберкулёз / И.А. Шурыгина, М.В. Чеснокова, В.Т. Климов и др. – Новосибирск, 2003. – 320 с.
206. Эпидемиологический надзор и профилактика псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза: Методические указания МУ 3.1.1.2438-09. - М., Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, - 2010. – 52с.
207. Яфаев, Р.Х. Дифференциация микробов чумы и псевдотуберкулёза грызунов / Р.Х. Яфаев // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол. – 1963. - №5. – С.23-26.
208. Achtman, M. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis* / M. Achtman, G. Morelli, P. Zhu [et al.] // Proc. Natl.Acad.Sci.USA. – 2004. - Vol.101, No.51. – P.17837-17842.251.
209. Akins, D.R. A new animal model for studiing lime disease spirochetes in a mammalian host adapted state / D.R. Akins, R.W. Bourell, M.J. Caimano [et al.] // J. clin. Invest. – 1998. – Vol.101, No.10. - P.2240-2250
210. Amoako, K.K.Genomics characterization of *Yersinia pestis* /К.К. Amoako, K.R. Hahn, M.C. Thomas [et al.] // Abstracts 11th Int.Symposium of *Yersinia*. – Beijing, China. – Cold Spring Harbor Laboratory, 2013. – P.15.
211. Anisimov, A.P. *Yersinia pestis* lipopolisaccharide in host-pathogen interactions / A.P. Anisimov, S.V .Dentovskaya, A.N. Kondakova [et al.] // В сб.: The challenge of higly pathogenic microorganisms of virulence and novel medical countermeasures. – 2010. – P.77-87.
212. Anisimov, A. P. Amino acid and structural variability of *Yersinia pestis* LcrV protein / A. P. Anisimov, S. V. Dentovskaya, E. A. Panfertseva [et al.] // Infection, Genetics and Evolution. – 2010. – Vol. 10. – P.137–145 doi:10.1016/j.meegid. 2009.10.003
213. Armougom, F. Genomic Insights into a New *Citrobacter koseri* Strain Revealed Gene Exchanges with the Virulence-Associated *Yersinia pestis* pPCP1

Plasmid / F. Armougom, I. Bitam, O. Croce [et al.] // Microbiology. – 2016. – Vol.7. – www.frontiersin.org 13 March | Article340.

214. Baker, E.E. Antigen structure of *Pasteurella pestis* and the isolation of crystalline antigen / E.E. Baker, Y. Sommer, L.T. Forster [et al.] // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1947. – Vol.64. – P.139-141.

215. Baker, E.E. Studies on immunization against plague. 1. The isolation and characterization of the soluble antigen of *Pasteurella pestis* / E.E. Baker, H. Sommer, L.E. Forster [et al.] // J. Immunol. - 1952. - Vol.68, No.2. – P.131-145

216. Ben-Gurion, R. Bacteriocin like material produced by *Pasteurella pestis* / R. Ben-Gurion, J. Hertman // J. gen.Microbiol. - 1958. - Vol.19, No.2. - P.289-297.

217. Bercovier, H. Intra and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and its relationship to *Yersinia pseudotuberculosis* / H. Bercovier, H.H. Mollaret, J.M. Alonso [et al.] // Curr. Microbiol. – 1980. – Vol.4, No.4. – P.225-229.

218. Berven, F.S. BOMP a program to predict integral β -barrel outer membrane proteins encoded within genomes of Gram-negative bacteria / F.S. Berven, K. Flikka, H.B Jensen [et al.] // Nucleic acids research. – 2004. – Vol.32 (suppl 2). – W394-399.

219. Bogdanovich, T. Use of O-antigen gene cluster-specific PCRs for the identification and O-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* / T. Bogdanovich, E. Carniel, H. Fukushima [et al.] // J.Clin. Microbiol. – 2003. – Vol.41, No.11. – P.5103-5152.

220. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein-dye binding/ M.M.Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – Vol.72. – P.248-254.

221. Brubaker, R.R. Factors promoting acute and chronic disease caused by *Yersiniae* / R.R. Brubaker // Clin. Microbiol. Rev. – 1991. – Vol.4. - P.309-324.

222. Brubaker, R.R. *Yersinia pestis* and bubonic plague // The procariotes, an evolving electronic resource for the microbiological community / R.R. Brubaker, M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg and E. Stackelbrandt (ed.).-V. On line (www.procariotes .com). - Springer Verlag, New York, 2000.

223. Buchrieser, C. The high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* can be inserted into any of the three chromosomal asn tRNA genes / C. Buchrieser, R. Brosch, S. Bach [et al.] // Mol. Microbiol. - 1998. – Vol.30. – P.965-978.

224. Buchrieser, C. The 102-kilobase pgm locus of *Yersinia pestis*: sequence analysis and comparison of selected regions among different *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains / C. Buchrieser, C. Rusniok, L. Frangeul [et al.] // Infect. Immun. – 1999. – Vol.67. – P.4851-4861.

225. Butler, T. Plague and other *Yersinia* infection / T. Butler. – NY, Plenum Medical Book Co. – 1983. – 220 p.

226. Chain, P.S.G. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis* / P.S.G. Chain, E. Carniel, F.W. Larimer [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. - Vol.101, No.38. – P.13826-13831.

227. Chain, P.S.G. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strains Antiqua and Nepal 516: evidence of gene reduction in an emerging pathogen / P.S.G. Chain, P. Hu, S.A. Malfatti [et al.] // J. Bacteriol. - 2006. – Vol.188, No.12. – P.4453-63.

228. Chanteau, S. Current epidemiology of human plague in Madagascar / S. Chanteau, M. Retsitorahira, L. Rahalison [et al.] / Microbes Infect. - 2000. - Vol.2. - P.25-31.

229. Chao Ling Vulnerabilities in *Yersinia pestis caf* operon are unverlied by a *Salmonella* vector / Chao Ling, Lim Timoty, Sang Mu-Jun // Plos ONE. - 2012. – Vol.7. – Issue 4. – e 36283.

230. Chapman, D.A.C. Structural and functional significans of the FGL sequence of the periplasmatic chaperon CafIM of *Yersinia pesris* / D.A.C. Chapman, A.V. Zavyalov, T.V. Chernovskaya, G.A. Zavyalova [et al.] // J. Bacteriol. – 1999. – Vol.181, No.8. – P.2422-2429.

231. Chart, H. Differentiation of *Yersinia pestis* and *Ypseudotuberculosis* by SDS-PAGE analysis of lypopolysaccharide / H. Chart, T. Creasy, D. Rowe // Lett. Appl. Microbiol. – 1995. – Vol.20. – P.369-370/

232. Chase, C.J. Real-time PCR assays targeting a unique chromosomal sequence of *Yersinia pestis* / C.J. Chase, M.P. Ulrich, L.P. Wesielovski [et al.] // *Clinical Chemistry*. – 2005. – Vol. 51. – P.778-1785.

233. Cornelis, G. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome / G. Cornelis, A. Boland, A. Boyd [et al.] // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1998. – Vol.62, No.4. – P.1315-1352.

234. Debrise, A. An infectious filamentous phage associated with the transformation of *Yersinia pestis* from an enteropathogen into the deadly plague bacillus / A. Debrise, V. Chenal-Francisque, F. Pouillot [et al.] // «*Yersinia – 2006*»: Abstracts Book of 9th Intern.Sympos.on *Yersinia*. – Lexington, Kentucky, 2006. – A.61. – P.54.

235. Deng, W. Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM1 / W. Deng, V. Burland, G. Plunkett [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2002. – Vol.184. – P.4501-611.

236. Derbise, A. Plague vaccine: a new promising approach / A. Derbise, C. Demeure, E. Carniel // *Medical Biodef. Conference: Abstracts*. München (Germany), 2013. – MO 01.

237. Devignat, R. Variétés de l'espèce *Pasteurella pestis*. Nouvelle hypothèse / R. Devignat // *Bull. World. Hlth. Org.* – 1951. – Vol.4, No.2. – P.247-263.

238. Englesberg, E. Mutation to rhamnose utilization in *P.pestis* / E. Englesberg // *J. Bacteriol.* - 1957. – Vol.73, No.5. – P.641-648.

239. Eppinger, M. Genome sequence of the deep-rooted *Yersinia pestis* strain Angola reveals new insights into the evolution and pangenome of the plague bacterium / M. Eppinger, P.L. Worsham, M.P. Nicolich [et al.] // *J. Bacter.* 2010. – V

240. Fan, Z. *Microtus brandti* plague in the xilin Gol Glassland wasinoffensive to humans / Z. Fan, Y. Luo, S. Wang [et al.] // *Chin. J. Control Endmic Dis.* – 1995. – No.10. – P.56-57.

241. Fan Zhou. The plague of vole (*Microtus brandii*) is harmless to human being / Zhou Fan // 7th Int. Congr. on *Yersinia*. – Nijmegen: Abstracts – *Ned.Tijdschr. Med.Microbiol.* – 1998. - Suppl II. – Vol.6. – Abstr. P.127. - S.42.

242. Ferber, D.M. Plasmids in *Yersinia pestis* / D.M. Ferber, R.R. Brubaker // Infect.Immun.-1981.-Vol.31.-P.831-841.

243. Filippov, A.A. Plasmid content in *Yersinia pestis* strains of different origin / A.A. Filippov, N.S. Solodovnikov, L.M. Kookleva [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. – 1990. – Vol.55. – P.45-48.

244. Filippov, A. Bacteriophage-resistant mutants in *Yersinia pestis*: Identification of phage Receptors and attenuation for mice / A. Filippov, K. Sergueev, Y. He, X.Z. Huang, B.T. Gnade, A.J. Mueller, C.M. Fernandez-Prada, M.P. Nikolich. // PLoS One. 2011; 6(9):e25486. doi:10.1371/journal.pone.0025486. Epub 2011 Sep 28.

245. le Fleche Ph., A tandem repeats database for bacterial genomes application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis* / Ph. le Fleche, Y. Hauck, L. Onteniente [et al.] // BMC Microbiology. – 2001. – Vol.1-2. – (электронный вариант).

246. Forsman, M. *Francisella tularensis* does not manifest virulence in viable but non-culturable state / M. Forsman, E.W. Hennigton, E. Larson [et al.] // FEMS Microbiol. Ecol. – 2000. - Vol. 31. – No.3. – P.217-224.

247. Frederiqcs, P. Transfer genetique de la propriété de produire an antibiotique / P. Frederiqcs, M. Betz-Bareau // C.R. Soc. Biol. – 1953. – Vol.147. – P.1653-1657.

248. Fredriksson-Ahomaa, M. Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem / M. Fredriksson-Ahomaa, H. Korkeala // Clinical Microbiology Reviews. - 2003. - P.220-229.

249. Fukushima, H. Intestinal carriage of *Yersinia pseudotuberculosis* by wild birds and mammals in Japan / H. Fukushima, M. Gomyoda // Appl. Environ. Microbiol. -1991. - Vol. 57. - P.1152 – 1155.

250. Fukushima, H. Isolation of *Yersinia pseudotuberculosis* from river waters in Japan and Germany using direct KOH and HeLa cell treatment / H. Fukushima, H. Gomyoda, M. Tsukobura [et al.] // Zbl. Bakteriол. - 1995. - Vol.282. - P.40 – 49.

251. Fukushima, H. H. Putative origin of *Yersinia pseudotuberculosis* in western and eastern countries. A comparison of restriction endonuclease analysis of virulence plasmids / H. Fukushima, M. Gomyoda, N. Hashimoto [et al.] // Intern. J. Med. Microbiol. – 1998. - No.288. - P. 93-102.

252. Fukushima, H. Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen, and the high pathogenicity island among *Yersinia pseudotuberculosis* strains / H. Fukushima, Y. Matsuda, R. Seki [et al.] // J. clin. Microbiol. – 2001. – Vol.39., No. 10. – P.3541-3547.

253. Galimand, M. Resistance of *Yersinia pestis* to antimicrobial agents / M. Galimand, E. Carniel, P. Courvalin // J. Antimicrob. Chemother. - 2006. - Vol.50(10). - P.3233-3236.

254. Garcia, T. Pestoides F, an atypical *Yersinia pestis* strain from the former Soviet Union / E. Garcia, P. Worsham, S. Bearden [et al.] // Adv. Exp.Med.Biol. – 2007. – Vol.372, No.1. – P.P.85-96.

255. Garfin, D.E. Basic aspects of protein blotting / D.E.Garfin, G.Bers // In Protein Blotting: Methodology, Research and Diagnostic Applications B.A.Baldo et al., eds. (Basel Switzerland^Karger). – P.5-41.

256. Giles, T. A. Detection of a *Yersinia pestis* gene homologue in rodent samples /T. A. Giles, A. D. Greenwood, K. Tsangaras [et al.] // Peer J. – 2016. – Aug 17; 4:e2216. doi: 10.7717/peerj.2216.

257. Golubov A. Structural organization of the pFra virulence-associated plasmid of rhamnose-positive *Yersinia pestis* / A. Golubov, H. Neubauer, K. Nolting [et al.] // Infec.Immun. - 2004. – Vol.72, No.10. – P.5613-5621.

258. Gonzales, M.D. Conserved filamentous prophage in *Escherichia coli* O18:K1:H7 and *Yersinia pestis* biovar *orientalis* / M.D Gonzales, C.A. Lichtenstiger, R. Caughlan [et al.] // J. Bacteriol. – 2002. - Vol.184, No.21. – P.6050-6055.

259. Gonzales-Rodrigues, I.. Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation / L. Gonzales-

Rodrigues, B. Sánchez, L. Ruis // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2012. – Vol.78, No. 11. – P.3992-3998.

260. Guiyoule, A. Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains / A Guiyoule, F. Grimont, J. Iteman [et al.] // *J. Clin Microbiol.* – 1994. – Vol.32. – P.634-641.

261. Gupta K. Evaluation of Aro-Tal AST complex protein as marker for differential diagnosis of *Mycobacterium avium* infection / R. Gupta, I. Verma, G.K. Khuller, R. Mahajan // *J. Glob Infect. Dis.* – 2011. – Jul-Sep. - Vol.3(3). – P.259-264.

262. Hu, P. Structural organization of virulence-associated plasmids of *Yersinia pestis* / P. Hu, J. Elliot, P. McCready [et al.] // *J. Bacteriology*. – 1998. – Vol.180, No.19. – P.5192-5202.

263. Hatcoff, M. Roles chaperon/usher pathways of *Yersinia pestis* in murine model of plague and adhesion to host cells / M. Hatcoff, L.M. Runco, C. Pujol [et al.] // *Infect. Immun.* – 2012. Vol.80, No.10. – P.3490-3500.

264. He, Yu. Comparative secretomic reveals novel virulence associated factors of *Vibrio parahemolyticus* / Yu He, Wang Hua, Chen Lamming // *Frontiers in Microbiology*. - 2015. – Vol.6. – Article 707.

265. Hinnebusch, P. Murine toxin of *Yersinia pestis* shows phospholipase D activity but is not required for virulence in mice / J. Hinnebusch, P. Cherepanov, Y. Du [et al.] // *Int. J. Med. Microbiol.*-2000.- Vol.290.-P.483-487.

266. Hinnebusch, B.J. High-frequency conjugative of antibiotic resistance genes to *Yersinia pestis* in the flea midgut / B.J. Hinnebusch, L. Rosso-M, J.L. Schwan [et al.] // *Mol. Microbiol.* - 2002. - Vol.2, - P.349-54.

267. Hong Chou The transaldolase, a novel allergen of *Fusarium proliferatum*, demonstrates IgE cross-reactivity with its human analogue / Hong Chou, Keh-Gong Yeh, Ysiao-Yun Tai [et al.] // *PLOS one*. – Juli 2014. – Vol. 9 | issue 7 | e103488.

268. Hubbert, W.T. *Yersinia pseudotuberculosis* infection in the United States / W.T. Hubbert, C.W. Petenyi, L.A. Glasgow [et al.] // *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* -1971. - Vol.20, No.5, - P.679-683.

269. Ibrahim, A. The phylogeny of the genus *Yersinia* based on 16S rDNA sequences / A. Ibrahim, B. Goebel, W. Liesack [et al.] // FEMS Microbiol. -1993. — Vol.114. - P.173-177.

270. Ivanov, M.I. Vaccination of mice with a Yop translocon complex elicits antibodies that are protective against infection with F1⁻ *Yersinia pestis* / M.I. Ivanov, B.L. Noel, R. Rampersaud [et al.] // Infect. Immun. – 2008. – Vol.76, No.11. – P.5181-5190.

271. Kado, C.I. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids / C.I., Kado, S.-T. Liu // J. Bacteriol., 1981. – Vol.145, No.3. – P.1365 – 1373.

272. Karlishev, A. Structure and regulation of a gene cluster involved in capsule formation of *Y. pestis* / A. Karlishev, E.Galyov, O.Smirnov [et al.] // Biological membranes: structure, biogenesis and dynamics. NATO ASI Series. Series H: Cell Biology/Jos A.F. Op den Kamp (ed.)–Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1994. – Vol.82. – P.321-330.

273. Kiljunen, S Identification of the lipopolysaccharide core of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* as the receptor for bacteriophage ϕ A1122. // S. Kiljunen, N. Datta, S.V. Dentovskaya [et al.] // J Bacteriol. – 2011. – Vol. 193(18). – P. 4963-72. doi: 10.1128/JB.00339-11. Epub 2011 Jul 15.

274. Kislichkina, A. Nineteen Whole-Genome Assemblies of *Yersinia pestis* subsp. *microtus*, Including Representatives of Biovars *caucasica*, *talassica*, *hissarica*, *altaica*, *xilingolensis*, and *ulegeica* / A. Kislichkina, A. Bogun, L. Kadnikova [et al.] // Genome Announcements. – 2015. – Vol. 3. – No. 6 e01342-15.

275. Kopylov, P.K. Caf1 Protein: Effect of Sequence Polymorphism on Intrinsic Disorder Propensity, Serological Cross-Reactivity and Cross-Protectivity of Isoforms / P.K. Kopylov, M. E. Platonov, V. G. Ablamunits [et al.] / Published: September 8, 2016 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162308>
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0162308>

276. Kolodziejek, A. *Yersinia pestis* Ail: multiple roles of a single protein // A. Kolodziejek, F.H. Carolyn J. and M. Scott A. // Cell. Infect. Microbiol., 06 August 2012 |[https:// doi.org/10.3389/fcimb.2012.00103](https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00103)

277. de Köning-Ward, T.F. Analysis of the urease gene complex of members of the genus *Yersinia* / T.F. de Köning-Ward, R.M. Robins-Braun // Gene. – 1996. – Vol.182, No.1-2. – P.225-226.

278. Kumar, K. Entomological and rodent surveillance of suspected plague foci in agro-environmental and feral biotopes of a few districts in Maharashtra and Gujarat states of India / K. Kumar, S.K. Sharma, K.S. Gill [et al.] // Jpn. J. Med. Sci. Biol. - 1997. - Vol.50. - P.219-226.

279. Lan, R. When does a clone deserve a name? A perspective on bacterial species based on population genetics / R. Lan, P.R. Reeves // Trends Microbiol. - 2001. - Vol.9, No. 9. - P. 419-424.

280. Laemmly, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K.Laemmly // Nature. - 1970. - Vol.227. P.680-685.

281. Laukkanen-Ninios, R. Population structure of the *Yersinia pseudotuberculosis* complex according to multilocus sequence typing / R. Laukkanen-Ninios, X. Didelot, K. A. Jolley [et al.] // *Environ Microbiol.* – 2011. – Vol. 13, No.12. – P.3114–3127. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02588.x

282. Lawton, W.D. Studies on the antigens of *Pasteurella pestis* and *Pasteurella pseudotuberculosis* / W.D. Lawton, G.M. Fukui, M.J. Surgalla // J. Immunol. – 1960. – Vol.84, No.5. – P.475-479.

283. Leal, N. C. Plasmid composition and virulence-associated factors of *Yersinia pestis* isolates from a plague outbreak at the Paraiba State, Brazil // N.C. Leal, A.M. Almeda, L.C.Ferreria // Rev. Inst. Med. Trop. Sao.Paulo. – 1989. – Vol.193, No.6. – P.339-342.

284. Leal, N.C. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR / N.C. Leal, A.M. Almeda // Rev. Inst. Med. Trop. Sao.Paulo. – 1999. – Vol.193, No.6. – P.339-342.

285. Lindler, L.E. Complete DNA sequence and detailed analysis of the *Yersinia pestis* KIM5 plasmid encoding murine toxin and capsular antigen / L.E. Lindler, G.V Plano, V. Burland [et al.] // Infect. Immun. - 1998. – Vol.66. - P.5731-5742.

286. Lowry O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, T.N. Rosebroug, A.A. Farr, B.J. Randal // J. Biol. Chem. - Vol.93. – P.265-278.

287. Lucier, T.S. Determination of genome size. Studies on the pathogenesis of plague / T.S. Lucier, R.R. Brubaker // J. Bacteriol. 1992 – Vol.174, No.7. – P.2078-2086.

288. Mateo, P. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* / P Mateo, T. Pasanen, R. Laukkanen [et al.] // J. Compitation APMIS. – 2009. – Vol.117. – P.34-44.

289. Meka-Mechenko, T.V F1 negative *Y. pestis* strains / T.V.Meka-Mechenko // 8th International symposium on *Yersinia*. – Turku, Finland, 2002. – P.84.

290. Michel, S. A haploproficient interaction of transaldolase paralogue NQM1 with the transcription factor VHR1 affects stationary phase survival and oxidative stress resistance / S. Michel, M.A. Keller, M.M.C. Warnelink, M. Raiser // BMC Genetics. – 2015. – Vol.16. - P.13.

291. Mollaret, H.H. Sur l'uréase du bacille Yersin / H.H. Mollaret, Nguyen van ba, M. Vandekerkove [et al.] // Ann. Inst. Pasteur. – 1964. - Vol.107, No.3. – S.424-429.

292. Moller, S. Evolution of methods for prediction of membrane spanning region / S. Moller M.D. Croning, R. Apweiler // Bioinformatics. – 2001. – Vol.17, No.7. – P.646-653.

293. Motin, V.L. The difference in lcrV sequences between *Y. pestis* and *Y.pseudotuberculosis* and its application for characterization of *Y.pseudotuberculosis* strain / V.L Motin, M.S. Pokrovskaya, M.V. Telepnev [et al.] // Microbial. Pathogenesis. – 1992. –Vol.12, No.3. - P.165-175.

294. Motin, V.L. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*glpD*) / V.L. Motin, A.M. Georgescu, J.M. Elliott [et al.] // J. Bacteriol. – 2002. - Vol.184. - P.1019–1027.
295. Nakajima, Y. Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method / Y. Nakajima, M. Inoue, T. Mori [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1992. – Vol.30. – P.2484-2486.
296. Nakajima, R. Association between virulence of *Yersinia pestis* and suppression of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha / R. Nakajima, R. Brubaker // Infect. Immun. – 1993. – Vol.61. – P.23-31.
297. Nakajima, R. Suppression of cytokines in mice by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization / R. Nakajima, R. Brubaker // Infect. Immun. – 1995. – Vol.63. – P.3021-3029.
298. Neubauer, H. F combination of different polimerase chain reaction (PCR) assays for the presumptive identification of *Yersinia pestis* / H. Neubauer, H. Meyer, J. Prior [et al.] // J. Vet. Med. B: Infect. Dis. Vet. Public Health. – 2000. – Vol.47, No. 8. – P.573-580
299. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gels /O. Ouchterlony // Arkiv Kemi Mineral. Geol. Med. Scandinav. – 1949. – Vol.191, No.2. – P.1-9.
300. Pan, J.-C. *Vibrio cholerae* O139 multi-drug resistance mediated by *Yersinia pestis* pIP1202-like conjugative plasmids / J.-C. Pan, R. Ye //Antimicrob. Agents. Chemother. - 2008. - Vol.5(11). - P.3829-36.
301. Pakharukova, N. Structural basis for Myf and Psa fimbriae-mediated tropism of pathogenic strains of *Yersinia* for host tissues / N. Pakharukova, S. Roy, M. Tuittila [et al.] // Mol Microbiol. – 2016. – Nov; 102(4):– P.593-610. doi: 10.1111/mmi.13481].

302. Parkhill, J. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague / J. Parkhill, B.W. Wren, N. Tompson [et al.] // Nature. – 2001. – Vol.413, No.6855. – P.523-526.

303. Pawlovsky, D.R. Entry of *Yersinia pestis* into the viable but nonculturable state in a low temperature tap water microcosm / D.R.Pawlovsky, D.J. Metzger, A. Raslavsky [et al.] // PLoS ONE. – 2011. – Vol.6, Issue 3. – e17585.

304. Perl, A. Oxidative stress, inflammation and carcinogenesis are controlled through the pentose phosphate pathway by transaldolase / A. Perl, R. Hanczko, T. Talarico [et al.] // Trend Mol. Med. – 2011. – Vol.17, No.7, - P.395-403.

305. Perry, R.D. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague / R.D. Perry, J.D. Fetherston // Clin. Microbiol. Rev.-1997.-Vol.10.-P.35-66.

306. Peterson, T.N. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions / T.N.Peterson, S. Brunac, G. VonHeijne [et al.] // Nat. Methods. – 2011. - Sep29. - Vol.8(10). – P.785-786. doi:10.1038/nmeth.1701.

307. Portnoy, D. A. Evidence for two evolutionary lineages of highly pathogenic *Yersinia* species / D. A. Portnoy, S. Falkow // J. Bacteriol. -1995. - Vol.177, No.9. - P. 2292-2298.

308. Pourcel, C. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* / C. Pourcel, F. Andre-Meseaud, H. Neubauer [et al.] // BMC Microbiology. – 2004. – Vol.4, No.22. – P.1-17.

309. Prentice, M.B. *Yersinia pestis* pFra show biovar-specific differences and recent common ancestry with a *Salmonella enterica* serovar *Typhi* plasmid / M.B. Prentice, K.D. James, J. Parkhill [et al.] // J. Bacteriol. – 2001. – Vol. 183. – P.2586-2594.

310. Press, N. Clinical and microbiological follow-up of an outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* serotype 1b / N. Press, M. Fyfe, W. Bowie [et al.] // Scand J. Infect. Dis. - 2001. - Vol.33, No.7, - P. 523-526.

311. Price, S. The *Yersinia pestis* V antigen is a regulatory protein necessary for Ca²⁺- dependent growth and maximal expression of low-Ca²⁺ response virulence

genes / S Price, C. Cowan., R. Perry [et al.] // J. Bacteriol. – 1991. – Vol.173. – P. 2649-2653.

312. Protsenko, O.A. Integration of the plasmid encoding the synthesis of capsular antigen and murine toxin into *Yersinia pestis* chromosome / O.A Protsenko, A.A. Filippov, V.V. Kutyrev // Microb. Patholog. – 1991. – Vol.11 – P.123-128.

313. Radnedge, L. Identification of nucleotide sequences for the specific and rapid detection of *Yersinia pestis* / L. Radnedge, S. Gamezchin, P.M. McCready [et al.] // Appl. Environmental Microbiology. -2001. –Vol. 67, No. 8. -P. 3759-3762.

314. Radnedge, L. Genome plasticity in *Yersinia pestis* / L. Radnedge, P.G. Agron, P.L. Worsham [et al.] // Microbiology. – 2002. – Vol,148. – P.1687-1698.

315. Rakin, A. Structural and functional organization of the *Yersinia pestis* bacteriocin pesticin gene cluster / A. Rakin, E. Boolgakova, J. Heesemann // Microbiol. – 1996. – Vol. 142. – P.3415-3424.

316. Rashid, M.H. A *Yersinia pestis*-specific, lytic phage preparation significantly reduces viable *Y. pestis* on various hard surfaces experimentally contaminated with the bacterium / M.H. Rashid, T. Revasishvilli, T. Dean [et al.] // Bacteriophage. - 2012. – Vol2, No.3. – P.168-177.

317. Rudolf, A.E. Expression characterization, and mutagenesis of the *Yersinia pestis* murine toxin, a phospholipase D superfamily member / A.E. Rudolf, J. Stuckey, Y. Zhao [et al.] // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274. – P.11824-11831.

318. Sarker, M. The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for expression of the translocators YopB and YopD / M. Sarker, C. Neut, I. Stainier [et al.] // J. Bacteriol. – 1998. – Vol.180, No.5. – P.1207-1214.

319. Savin, C. The *Yersinia pseudotuberculosis* complex: Characterization and delineation of a new species, *Yersinia wautersii* / C. Savin, M. Liliane, C. Bouchierb[et al.] // International Journal of Medical Microbiology. – 2014. – Vol. 304. – P. 452–463. doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.02.002.

320. Sebbane, F. The silencing and reactivation of urease in *Yersinia pestis* is determined by one G residue at a specific position in the ureD gene / F. Sebbane, A.

Devalkenaere, J. Faulon [et al.] // Infect. Immun. – 2002. – Vol.69, No.1. – P.170-176.

321. Sebbane, F. The *Yersinia pestis* *cafIM1A1* fimbrial capsule operon promotes transmission by flea bite in mouse model of bubonic plague / F. Sebbane, C. Jarrett, D. Gardner [et al.] // Infect.Immun. – 2009. - Vol.77, No.3. – P.1222-1229.

322. Sha, J. Characterization of an F1 deletion mutant of *Yersinia* CO92, pathogenetic role of F1 antigen in bubonic and pneumonic plague, and evaluation of sensitivity and specificity of F1 antigen capture-based Dipsticks /J.Sha, F. Sebbane, C. Jarrett, [et al.] // J. Clin.Microbiol. – 2011. – Vol.49, No.5. – P.1708 - 1715.

323. Shaban, H. Effect of natural polymorphism on structure and function of the *Yersinia pestis* outer membrane protein F (OmpF porin): A computational study / H. Shaban, I. Na, A. A. Kislichkina [et al.] // Journal of Biomolecular Structure & DynamicsURL: <http://mc.manuscriptcentral.com/jbsd>
Email: Rhs07@albany.edu

324. Simonet, M. Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the *inv* gene / M. Simonet, B. Riot, N. Fortineau [et al.] // Infect.Immun. – 1996. – Vol.64. –P.375 - 379.

325. Simpson, W.J. Recombinant capsular antigen (Fraction 1) from *Yersinia pestis* induces a protective antibody response in BALB/c mice / W.J. Simpson, R.E. Thomas, T.G. Schwan // Trop.Med.Hyg. – 1990. – Vol.43. – P.389 – 396.

326. Skrzypek, E. Differential effects of deletions in *lcrV* on of V antigen, regulation of the low- Ca^{2+} response, and virulence of *Yersinia pestis* /E. Skrzypek, S. Straley // J. Bacteriol. – 1995. – Vol.177. No.9. – P.2530 – 2545.

327. Skurnik, M. Analysis of the YopA gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* subsp. / M. Skurnik, H. Wolf-Watz //Mol. Microbiol. – 1989. – Vol.3., No4. – P.517 – 531.

328. Skurnik, M. Characterization of the O-antigen gene cluster of *Yersinia pseudotuberculosis* and criptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from

Y.pseudotuberculosis serotype O:1b / M. Skurnik, A. Peipp, E. Ervelä // Mol. Microbiol. – 2000. – Vol.37. – P.316 - 330.

329. Steinert, M. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii* / M. Steinert, L. Emödy, R. Amann., J. Yacker // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – Vol.63, No.5. – P.2047-2053.

330. Straley, S.C. Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in *Yersinia* / S.C. Straley, R.D. Perry // Trends in Microbiology. - 1995. - Vol.3, No.8, - P.310-313.

331. Surgalla, M.L. Properties of virulent and avirulent strains of *Pasteurella pestis* / M.L. Surgalla // Ann. N.Y. Acad. Sci. - 1960. – Vol.88. – P.1136-1145.

332. Surgalla, M.J. Congo red agar plating medium for detecting pigmentation in *Pasteurella pestis* / M.J. Surgalla, E.D. Beesley // Appl. Micr. – 1969– Vol.18, No.5. – P.834-837.

333. Tann, Y. Cellular fatty acids as chemical markers for differentiation of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* / Y. Tann, M. Wu, X. Dong, Z. Guo [et al.] // Lett. Apl. Microbiol. – 2010. – Vol. 50. – P.104. – 111.

334. Towbin, H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamid gels to nitrocellulose sheets^procedure and some applications /H. Towbin, J. Gordon // Proc.Natl.Acad. Sci USA – 1970. - Vol.76. –P.4350-4354.

335. Tsubokura, M. Special features of distribution of *Yersinia pseudotuberculosis* in Japan / M. Tsubokura, K. Otsuki, K. Sato [et al.] // J. Clin. Microbiol. - 1989. - Vol. 27, No.4. - P.790-791.

336. Tsubokura, M. A simplified antigenic scheme for serotyping of *Yersinia pseudotuberculosis*: phenotypic characterization of reference strains and preparation of O and H factor sera / M. Tsubokura, S. Aleksič // Contrib. Microbiol. Immunol. - Basel. Karper. – 1995. – Vol.13. – P.99-103.

337. Wang, R.F. A universal protocol for PCR detection of 13 species of footborne pathogens in foods / R.F. Wang, W.W. Cao, C.E. Cerniglia // J. Appl. Microbiol. – 1997. – Vol.83. – P.727-736.

338. Welcos, S.L. MudI1(Aplac) mutagenesis of *Yersinia pestis* plasmid pFra and identification of temperature-regulated loci associated with virulence / S.L. Welcos, G.P. Andrews, L.E. Linder [et al.] // Plasmid. - 2004. – Vol.51. – P.1-11.

339. Williams, J.S. Atypical plague bacilli isolated from rodents flees and man / J.S. Williams, D.N. Harrison, T.J. Quan [et al.] // Am. J. Public Health. – 1978. - Vol.58. – P.262-264.

340. Winter, C.C. An unusual strain of *P. pestis* isolated from a fatal human case of plague / C.C. Winter, W.B. Cherry, M.D. Moody // Bull. WHO. – 1960. – 23. – No.2-3. – P.408-409.

341. Wren, B.W. The *Yersinia* – a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens / B.W. Wren // Microbiology. - 2003, - Vol.1, No.1. - P.55-64.

342. Yang, R. Microbial forensics: a powerful tool for pursuing bioterrorism perpetrators and the need for an international database / R. Yang, P. Keim // J. Bioterr. Biodef. – 2012. - S3 <http://dx.doi.org/10.4172/2157-2526.S3-007> (ISSN: 2157-2526 JBTBD, an open access journal (P.1-8).

343. Yu, X. CafA usher possesses a *cafI* subunit-like that is crucial for *cafI* / X. Yu, G.R. Wisseswaran, L. Duck, [et al.] // Biochem. J. Immediate Publication. - 2008. – 25 nov. – Manuscript BJ20080992.

344. Yu, N.Y. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes / N.Y. Yu, J.R. Wagner, M.R. Laird [et al.] // Bioinformatics. – 2010. – Vol.26(13). – P.1608-1615.

345. Zav'yalov, V.P. Molecular modeling of the steric structure of the envelope F1 antigen of *Yersinia pestis* / V.P. Zav'yalov, A.L. Denesyk, G.A. Zav'yalova, T. Korpela // Immunol. Lett. – 1995. – Vol.45. – P.19-22.

346. Zhizhen Q.I. 3a negative *Yersinia pestis*, China / QI. Zhizhen, Yarong Wu, Yaniuni Li [et al.] // Infect. Dis. Transl. Med. – 2015. – Vol.1 – No.2. – P.61-62.

347. Zhou, D. Comparative and evolutionary genomics of *Yersinia pestis* / D. Zhou, Y. Han, Y. Song [et al.] // Microbes Infect. – 2004. – Vol.6. – P.1226-1234.

348. Zhou, D DNA microarrey analysis of genome dynamics in *Yersinia pestis*: insights into bacterial genome microevolution and niche adaptation / D. Zhou, Y. Han, Y. Song [et al.] // J. Bacteriol. – 2004. – Vol.186, No.15. – P.5138-5146.

349. Zhou, D. Identification of signature genes for rapid and specific characterization of *Yersinia pestis* / D. Zhou, Y. Han, E. Dai [et al.] // Microbiol. Immunol. – 2004. – Vol.48, No.4. – P.263-269.

350. Zhou, D. Genetic of metabolic variants between *Yersinia pestis* biovars and preposal of a new biovar *microtus* / D. Zhou, Z. Tong, Y. Song [et al.] // J. Bacteriol. – 2004. – Vol.186, No.15. – P.5147-5152.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота;
subsp. – <i>subspecies</i> :	– внутривидовая группа «подвид»
ПЦР	– полимеразная цепная реакция;
<i>caf</i> -оперон	– компактная группа функционально связанных генов, ответственная за продукцию капсульного антигена F1;
<i>cafI</i>	– ген, кодирующий структурную субъединицу белка антигена F1
<i>cafI</i>	– ген, кодирующий структурную субъединицу белка антигена F1
<i>cafR</i>	– ген, регулирующий синтез капсульного антигена F1;
<i>cafA</i> , <i>cafM</i>	– вспомогательные гены ашера и шаперона для продукции F1;
pFra	– плаزمида <i>Y. pestis</i> , отвечающая за синтез и продукцию антигена F1 и мышиноного токсина;
pPst	– плазмида <i>Y. pestis</i> , детерминирующая синтез пестицина, активатора плазминогена и ответственная за иммунитет к пестицину 1;
F1	– видоспецифический антиген «фракция 1» чумного микроба;

<i>bv</i>	– биовариант;
pCad (pYV)	– плаزمида патогенных иерсиний, обуславливающая зависимость роста иерсиний при 37°C от ионов Ca ²⁺ и детерминирующая синтез YOP (поверхностных) белков, связанных с вирулентностью;
ИЗФ _n	– индекс завершенности фагоцитоза, n=срок наблюдения в часах
МФ	– макрофаги;
FV	– видоспецифический антигенный комплекс «фракция 5» чумного микроба;
КоА, РКоА	– коаггутинация, реакция коаггутинации;
РАО	– реакция объемной агломерации;
РНИМФ	– реакция непрямой иммунофлюоресценции;
м.к.	– микробные клетки;
РНА _T , РНА _Г	– реакция нейтрализации антител/ антигена, соответственно;
РПГА	– реакция пассивной геммаггутинации;
Pst1	– пестицин 1 – бактериоцин чумного микроба;
МЖК	– музей живых культур;
Fra ⁺ , ⁻ , [±]	– обозначение фенотипа по продукции антигена F1 согласно иммунологическим тестам, соответственно: позитивный, негативный, сомнительный;
«JS»	– пара видоспецифичных праймеров «JSfor/JSrev», комплементарных фрагменту хромосомы, для идентификации псевдотуберкулёзного микроба;
«vIm12/IS» и «vIm33/IS»	– пары видоспецифичных «хромосомных» праймеров для идентификации <i>Y. pestis</i>
«vIm12for/ISrev216», «vIm33for/ISrev1754»	
IS1/IS2	– пара праймеров, детектирующие IS100 элемент иерсиний;
«3a»	– пара «хромосомных» праймеров, используемых при идентификации чумного микроба;
п.н.; п.о.; н.о.	– пары нуклеотидов; пары нуклеиновых оснований, нуклеиновые основания, соответственно
VNTR	– переменные по числу повторов тандемы нуклеотидов;
<i>hms</i>	– гены сорбции гема бактериями;
Pgm	– свойство сорбировать пигменты;

S-, O-, R-, OR-OS:	– круглые, гладкие; рыхлые с зубчатой каймой, переходные формы колоний;
Rha ⁺ / <i>rha</i>	– фенотип по ферментации рамнозы и соответствующие гены;
Ure ⁺ / <i>ure</i>	– фенотип по ферментации мочевины и соответствующие гены;
Mel ⁺ / <i>mel</i>	– фенотип по ферментации мелибиозы и соответствующие гены;
EtBr	– бромистый этидий;
МКА	– моноклональные антитела;
<i>cafIM</i>	– вспомогательный ген (шаперона) <i>caf</i> -оперона;
<i>cafIA</i>	– вспомогательный ген (ашера) <i>caf</i> -оперона;
PBS (ПБС)	– физиологический раствор с фосфатным буфером (1:50), рН 7,2;
ФИТС	– флуоресцирующие иммуноглобулины антивидовые против иммуноглобулинов (белой мыши, кролика);
ИФА	– иммуноферментный анализ;
DCL	– минимальная доза, вызывающая 100 % гибель биомоделей.

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.

Статьи в других рецензируемых журналах

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 rFga 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 *Yersin 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, T.E.** Detection of *Yersinia pestis* strains with different phenotypes in infected animals / A.L. Trukhachev, I.V. Morozova, **T.E. 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. предупрежд. 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.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Характеристика исследованных штаммов *Y. pestis*

№ п/п	Особый №	Инвентарный № РПЧИ	Общие сведения	Выявленные особенности диагностических признаков*)	Ампликоны в ПЦР с праймерами, п.н.	
					JS	vIm12/IS216
1	C-127	14714	Крыса, Вьетнам, типичный штамм, <i>bv. orientalis</i> (типичный)	R-форма, Rha ⁻ , Ure ⁻ , Mob ⁻ , Lac ⁻ Ara ⁺ , фаги/чувствительный. .полиауксотроф: (phe, met, cys, thr); pPst ⁺ , pCad ⁺ , pFra ⁺ (65; 47; 6 МД), Cad ⁺ , Fra ⁺ , Pst ^{+,R} , (glpDΔ, NapA ⁺), вирулентный	0	390
2	231	545	Сурок, Киргизия, В.Аксай <i>bv. antiqua</i> (типичный)	R-форма, Rha ⁻ , Ure ⁻ , Mob ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , фаги/чувствительный полиауксотроф: (phe, met, cys, thr); pPst ⁺ , pCad ⁺ , pFra ⁺ (65; 47; 6 МД), Cad ⁺ , Fra ⁺ , Pst ^{+,R} , (Glp ⁺ , NapA ⁺).вирулентный	0	390
3	C-293	11690	Кр. хв.песч., Грузия <i>bv. mediaevalis</i> (типичный)	R-форма, Rha ⁻ , Ure ⁻ , Mob ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , фаги/чувствительный. полиауксотроф: (phe, met, cys, thr); pPst ⁺ , pCad ⁺ , pFra ⁺ (65; 47; 6 МД), Cad ⁺ , Fra ⁺ , Pst ^{+,R} ,	0	390

				(Glp ⁺ , NapA ⁻) вирулентный		
4	1	1092	Клон бивакцины «1:17»	S,+R,Glp ⁻ /+, а вирулентный Rha ⁺ ,	0	390
5	1-Д	2242	Больной человек, Араломорская ПЧС	–	0	390
6	1/1-53	1/1-53	Сурок, Тянь-Шань	Rha ⁺	0	390
7	1/1-53	2243	Больной человек, Араломорская ПЧС	–	0	390
8	3	1555	Блохи песчанки, Гурьевская ПЧС	–	0	390
9	4	12851	Больной человек, Манчжурия	–	0	390
10	4(908)	4(908)	Лабораторный, Ростовский ПЧИ	Fra ⁻ , Фaг ^R	0	390
11	5-	1554	Блохи песчанки, Гурьевская ПЧС	–	0	390
12	7/1460-36Т	546	Сер.сурок, Тянь-Шань, Киргизия	Rha ⁺ , Ure ⁺	0	390
13	9	1559	Большая песчанка, Волго-Уральский очаг	Rha ⁺	0	390
14	P14B	13243	Больной человек, Вьетнам	Glp ⁻ /Nap ⁻ , Фaг ^R	0	390
15	16К	12638	Полуденная песчанка, Красноводск	Fra±	0	390
16	17	1093	Старый вакцинный штамм (Больной человек, Чита)	S+OS, Фaг ^R , pCad ⁻ , Творт, Авирулентен	0	390
17	21/10	13285	Блохи, Киргизия	Ure ⁺	0	390
18	23/2	13288	Песчанка, Киргизия	–	0	390
19	P29B	13244	Больной человек, Вьетнам	Фaг ^R , Glp ⁻ /Nap ⁻	0	390
20	30	1207	Суслик, Забайкалье	–	0	390
21	31a	12639	Большая песчанка, Красноводск	Fra±	0	390

22	33	17921	Кабардино-Балкария, горный суслик	+pro, +p4МД	0	390
23	40/3	13289	Блохи, Киргизия	Ure ⁺	0	390
24	46(68)	1856	Больной человек, Поволжье	+ilv, Rha ⁺ , pFra ⁻ , pPst ⁻	0	390
25	47	1909	Грызун, Африка	OS	0	390
26	P-50	14715	Больной человек, Вьетнам	–	0	390
27	52/13	13286	Блохи, Киргизия	Ure ⁺	0	390
28	52(80)	1857	Малый суслик, Правобережье Волги	OS+OR, Rha ⁺ Фag ^R	0	390
29	56	1216	Большая песчанка, Каракумы	+ilv	0	390
30	56	1317	Блохи нор, Азербайджан.	–	0	390
31	62/3	3480	Больной человек, Вьетнам	Rha ⁺	0	390
32	64/138	64/138	Больной человек, Вьетнам	Rha ⁺	0	390
33	C64	14709	Крыса, Вьетнам	–	0	390
34	67	67	Большая песчанка, Казахстан	Rha ⁺	0	390
35	75	1209	Гарбаган, Забайкалье	–	0	390
36	81	1910	Больной человек, Индия, Бомбей	OR	0	390
37	84(231-Т)	84(231-Т)	Экспериментальный, РостНИПЧИ	pFra ⁺ Fra ⁻	0	390
38	95(141)	13283	Больной человек, Забайкалье	R+S, Rha ⁺	0	390
39	96(143)	5190	Крыса, Индия	Rha ⁺ pFra ⁻	0	390
40	98(145)	1911	Больной человек, Индия	+ilv	0	390
41	98(145)/2	5191	Больной человек, Индия, Бомбей	Rha ⁺ , pCad ⁻ , Fra ⁻ Авирулентный.	0	390
42	99	13051	Гарбаган, Монголия	–	0	390
43	A100	1912	Больной человек, Африка	Авирулентный	0	390
44	100	11697	Клещи, Тянь-Шань	–	0	390
45	106	556	Вакцинный штамм Otten	pFra ⁻ , pCad ⁻	0	390
46	C118	13254	Крыса, Вьетнам	–	0	390
47	119	1211	Гарбаган, Монголия	–	0	390
48	P121B	14719	Больной человек, Вьетнам	–	0	390
49	125	1212	Длиннохвостый суслик, Монголия	–	0	390

50	126	1126	Большая песчанка, Средне-Азиатский ПЧИ	pFra ⁻ pPst ⁻	0	390
51	C-131	14711	Блохи, Вьетнам	–	0	390
52	132	875	Домовая мышь, Апшерон	Lac ⁺	0	390
53	133	14722	Полуденная песчанка, Уральская ПЧС	–	0	390
54	134	845	Блохи, Азербайджан	Lac ⁺	0	390
55	134	14723	Полуденная песчанка, Уральская ПЧС	–	0	390
56	C134	13255	Больной человек, Вьетнам	Glp ⁻ /Nap ⁻ , Фaг ^R	0	390
57	A-139	259	Большая песчанка, Талды-Курганская ПЧС	Fra [±]	0	390
58	143	11687	Малый суслик, Читинская.ПЧС		0	390
59	145	746	Блохи, Гурьевская ПЧС	RO, Творт, Glp ⁻	0	390
60	148	2245	Большая песчанка, Аральск.ПЧС	–	0	390
61	149	13277	Большая песчанка, Талды-Курганская ПЧС	+arg-	0	390
62	A-153	1353	Большая песчанка, Туркменская ПЧС	pFra ⁻ , pPst ⁻	0	390
63	161/236	1910	Больной человек, Индия	Авирулентный	0	390
64	169	319	Суслики, Северо-Запад. Прикаспий.	+arg, Фaг ^R	0	390
65	173/258	1858	Больной человек, Манчжурия	OR	0	390
66	186	17976	Горный суслик, Кабардино-Балкария	+ilv, +p4МД	0	390
67	192	892	Краснохвостая песчанка, Гурьевская ПЧС	Поражен фагом	0	390
68	C-192	11673	Блохи, Армения	Glp ⁺ /Nap ⁺ , pPst ⁻ , Rha ⁺	0	390
69	197	11670	Тарбаган, МНР	–	0	390

70	210/301	1909	Грызун, Африка	Rha ⁺	0	390
71	P216	13250	Больной человек, Вьетнам	Glp ⁻ /Nap ⁻ , Phage ^R	0	390
72	P-221	P-221	Клон штамма И23/6, Средне-Азиатский ПЧИ	+lys, Phage ^R	0	390
74	269/19	13287	Блохи, Киргизия	Ure ⁺	0	390
75	271	14777	Полуденная песчанка, Калмыкия	–	0	390
76	273	14776	Блохи, Элистинская ПЧС	–	0	390
77	279	1227	Малый суслик, Уральская ПЧС	–	0	390
78	C279	11675	Блохи, Армянская ПЧС	Glp ⁻ /Nap ⁻	0	390
79	291	13223	Крыса, Вьетнам	Pst ^s , Ara ⁻	0	390
80	293	1913	Больной человек, Индия	OS, pFra ⁻ , pCad ⁻ , авирулентный	0	390
81	301	18008	Горный суслик, Кабардино-Балкария,	+pro, +p4МД	0	390
82	302	725	Блохи, Уральская ПЧС	–	0	390
83	308	13224	Крыса, Вьетнам	Ara ⁻ , Pst ^s	0	390
84	312	17931	Горный суслик, Кабардино-Балкария,	–	0	390
85	335	1318	Краснохвостая песчанка, Шамхорское ПЧО	–	0	390
86	336	261	Большая песчанка, Туркмения	Glp ⁻	0	390
87	340	13225	Больной человек, Вьетнам	Pst ^s	0	390
88	342	13227	Больной человек, Вьетнам	Pst ^s	0	390
89	343	13228	Крыса, Вьетнам	Glp ⁻ /Nap ⁻ , Pst ^s	0	390
90	349	17940	Горный суслик, Кабардино-Балкария	+ilv, +p4МД	0	390
91	363	1300	Серый сурок. Киргизия	–	0	390
92	370	849	Блохи, Азербайджан	Lac ⁺	0	390
93	374	13236	Больной человек, Вьетнам	Pha ^R	0	390
94	375	375	Больной человек, Вьетнам	Pha [±]	0	390
95	376	13238	Больной человек, Вьетнам	Glp ⁻ /Nap ⁻	0	390

96	377	13238	Больной человек, Вьетнам	–	0	390
97	378	13240	Больной человек, Вьетнам	FagH ^R , Glp ⁻ /Nap ⁻	0	390
98	379	13241	Больной человек, Вьетнам	FagH ^R , Glp ⁻ /Nap ⁻	0	390
99	384	18013	Горный суслик Кабардино-Балкария	–	0	390
100	387	18022	Горный суслик, Кабардино-Балкария	–	0	390
101	C393	14712	Блохи, Вьетнам	pFra ⁻	0	390
102	B399	745	Малый суслик, Астраханская ПЧС	–	0	390
103	413	1219	Блохи большой песчанки Гурьевская ПЧС	–	0	390
104	420	1477	Даурский хомяк, Читинская. ПЧС	–	0	390
105	429	851	Краснохвостая песчанка, Азербайджан	Lac ⁺	0	390
106	445	17952	Горный суслик, Кабардино-Балкария	+ilv, +p4МД	0	390
107	456	17956	Горный суслик, Кабардино-Балкария	–	0	390
108	C457	13263	Крыса, Вьетнам	Fag ^R , Glp ⁻ /Nap ⁻	0	390
109	A477	3468	Больной человек, Кения	Fra ⁻ , pFra ⁻ , Glp ⁻	0	390
110	A481	3469	Больной человек, о.Мадагаскар	–	0	390
111	A483	3470	Больной человек, Сенегал	Fra ⁻ , pFra ⁻ , pPst ⁻	0	390
112	A-500	3477	Больной человек (Гамбург), институт им. Пастера, Париж	–	0	390
113	A-514	3479	Больной человек, Конго	–	0	390
114	515	3	Больной человек, Россия	-	0	390
115	A516	3480	Больной человек, Вьетнам	Pst ⁻	0	390
116	522	144	Большая песчанка, Талды-Курганская ПЧС	–	0	390
117	A527	3481	Больной человек, Кения	Прототроф, Pst ⁻	0	390
118	A528	3482	Больной человек, Вьетнам	met, Pst ⁻	0	390
119	534	1314	Краснохвостая песчанка, Шамхорское ПЧО	–	0	390

120	536	1315	Краснохвостая песчанка, Шамхорское ПЧО	–	0	390
121	547	P160	Малый суслик, Прикаспий	Фар ^R , S+R, Lac+, met	0	390
122	552	1319	Блохи песчанки, Шамхорское ПЧО	–	0	390
123	A-556	3487	Больной человек, Кения	Фар ^R +ilv, rbf, pFra ⁻	0	390
124	557	14726	Блохи, Гурьевская область	–	0	390
125	A557	3488	Больной человек, Вьетнам	met, Fra ⁻ , Tox ⁻ , pPst ⁻	0	390
126	A-559	3489	Больной человек, Турция	Fra ⁻ , pFra ⁺ , Glp ⁻ , met	0	390
127	560	14727	Блохи, Гурьевская ПЧС	–	0	390
128	A561	3490	Больной человек, Турция	–	0	390
129	I568	1482	Больной человек, Читинская ПЧС	Glp ⁻ , Rha+	0	390
130	580	1478	Блохи суслика, Читинская ПЧС	–	0	390
131	595	2080	Большая песчанка, Туркменская ПЧС	Lac+	0	390
132	603	18080	Горный суслик, Кабардино-Балкария	+рго, +р4МД	0	390
133	613	1321	Краснохвостая песчанка, Шамхорское ПЧО	–	0	390
134	A-618	11/1168	Сурок, Киргизская ПЧС	pFra ⁻	0	390
135	657	14787	Блохи, Элистинская ПЧС	Glp ⁻	0	390
136	C669	13266	Крыса, Вьетнам	Glp ⁻ /Nap ⁻	0	390
137	715эx	18046	Горный суслик, Кабардино-Балкария	+рго, +р4МД	0	390
138	743	358	Блохи песчанки, Каракумы	+ilv	0	390
139	798	1479	Даурский суслик, Читинская ПЧС	–	0	390
140	801	873	Песчанка малоазийская, Азербайджан	Rha+, Lac+	0	390
141	802	874	Блохи краснохвостой песчанки, Азербайджан	Lac+	0	390
142	803	875	Ленная мышь, Азербайджан	Rha+, Lac+	0	390
143	803	1480	Полёвка Брандта, Читинская ПЧС	Glp–	0	390
144	804	880	Домовая мышь, Азербайджан	Lac+	0	390

145	805	1481	Полевка Брандта, Читинская ПЧС	–	0	390
146	812	1316	Краснохвостая песчанка, Шамхорское ПЧО	–	0	390
147	С825	11693	Краснохвостая песчанка, Грузия	–	0	390
148	830	17982	Горный суслик, Кабардино-Балкария,	–	0	390
149	852	795	Песчанка, Араломорская ПЧС	–	0	390
150	867	886	Блохи, Гурьевская ПЧС	OS	0	390
151	868	906	Большая песчанка, Гурьевская ПЧС	–	0	390
152	С879	13268	Блохи, Вьетнам	–	0	390
153	С-903	13269	Крыса, Вьетнам	Rha+	0	390
154	916	766	Больной человек, Китай	–	0	390
155	917	767	Полёвки, Китай	–	0	390
156	918	768	Суслики, Китай	–	0	390
157	919	769	Крысы, Китай	–	0	390
158	920	770	Суслики, Китай	–	0	390
159	921	771	Суслики, Китай	–	0	390
160	922	772	Блохи сусликов, Китай	+trp	0	390
161	923(Р-134)	773	Даурский хомяк, Китай	+trp	0	390
162	923-97	773Л	Лабораторный штамм, Ростовский ПЧИ	+trp, Lac+, Фаг ^R	0	390
163	924	774	Гарбаганы, Китай	–	0	390
164	925	775	Кролики, Китай	+leu,arg,	0	390
165	926	776	Вариант вакцинного штамма Otten?	–	0	390
166	927	1901	Экспериментальный штамм, ин-т «Микроб»	pCad ⁻ , pPst ⁻ , Fra ⁻ , Фаг ^R	0	390
167	927(1)	5121	Больной человек, Араломорская ПЧС	Авирулентный	0	390
168	938	1229	Сурок, Фрунзенская ПЧС	–	0	390

169	942	942	Большая песчанка, Талды-Курганская ПЧС	pFra ⁻	0	390
170	956	1200	Суслик, Средне-Азиатский ПЧИ	–	0	390
171	962	18069	Горный суслик, Кабардино-Балкария	+prg, +p4МД	0	390
172	963	18056	Горный суслик, Кабардино-Балкария	+prg, +p4МД	0	390
173	966/68	14772	Полуденная песчанка, Калмыкия	–	0	390
174	982/996	14773	Полуденная песчанка, Элистинская ПЧС	–	0	390
175	994	887	Большая песчанка, Гурьевская ПЧС	OS	0	390
176	1024	1465	Гребенщикова песчанка, Гурьевская ПЧС	pFra ⁻	0	390
177	1026/16	1026/16	Серый хомяк, Таласс	Rha ⁺	0	390
178	1032	1220	Блохи малого суслика, Гурьевская ПЧС	RO, Glp [±]	0	390
179	1034	248	Большая песчанка, Талды-Курганская ПЧС	pCad ⁻	0	390
180	1035	2097	Большая песчанка, Туркменская ПЧС	Lac ⁺	0	390
181	1042	1230	Большая песчанка, Астраханская ПЧС	–	0	390
182	1061	1320	Краснохвостая песчанка, Шамхорское ПЧО	–	0	390
183	1072	1072	Блохи песчанки, Средне-Азиатский ПЧИ	Rha ⁺ , pFra ⁻	0	390
184	1099	16154	Большая песчанка, Чимкентская ПЧС	OS, 100 %Pgm ⁻	0	390
185	1099	11664	Погадка орла, МНР	–	0	390
186	C-1127	13270	Блохи, Вьетнам	–	0	390
187	1166	3133	Блохи, Талды-Курганская ПЧС	pCad ⁻ , pPst ⁻	0	390
188	1209	201	Большая песчанка, Гурьевская ПЧС	pFra ⁻ , pPst ⁻	0	390
189	P1230A	P1230A	Лабораторный, РостПЧИ	pFra ⁻ , ФagH ^R .	0	390

190	1247	902	Большая песчанка, Гурьевская ПЧС	–	0	390
191	1266	1201	Блохи нор, Джамбульская область.	Rha+	0	390
192	1271	1202	Краснохвостая песчанка, Джамбульская область.	Glp+, Nap+	0	390
193	1295	899	Блохи песчанки, Средне-Азиатский ПЧИ	Rha+, met	0	390
194	1313	1203	Блохи, Средне-Азиатский ПЧИ	Glp+, Nap+	0	390
195	1330	12636	Большая песчанка, Чарджоу ПЧС	(pFra-), интегрирована	0	390
196	1339	1204	Сер.сурок, Алма-Атинская область	–	0	390
197	1378	1205	Большая песчанка, А-Атинская обл.	–	0	390
198	1384	2250	Большая песчанка, Араломорская ПЧС	–	0	390
199	1450	20	Большая песчанка, Араломорская ПЧС	pFra ⁻ , pPst ⁻	0	390
200	1500	1221	Гамазовые клещи, Гурьевская ПЧС	–	0	390
201	1579	1579	Блохи песчанки, Средне-Азиат. ПЧИ	Rha+	0	390
202	1592	1670	Блохи, Азербайджан	Rha+	0	390
203	1651	237	Блохи, С-3. Прикаспий.	–	0	390
204	A-1786	13278	Красный сурок, Чимкентская ПЧС	pFra>65МД, Rha+	0	390
205	A-1809	13291	Блохи, Таласс,	Ure+, +p13МД, +p15МД	0	390
206	A-1814	13290	Полёвка, Таласс	Ure+, +p15МД	0	390
207	A1817	13276	Серый хомяк, Киргизия	Rha+, arg, leu	0	390
208	A-1819	13294	Блохи, Таласс	Ure+, +p15МД	0	390
209	1922	14730	Большая песчанка, Уральская ПЧС	–	0	390
210	2022	11680	Малый суслик, Читинская обл.	–	0	390
211	2046	P-145	Полуденная песчанка, Прикаспий,	S + R +p10МД	0	390
212	2063Д	11694	Горный суслик, Карачаево-Черкессия	+p4МД	0	390
213	2094	735	Блохи, Уральская ПЧС	OS	0	390
214	2232	12259	Блохи, МНР	pFra ⁻	0	390
215	2353	14743	Блохи, Уральская ПЧС	–	0	390

216	И-2442	11666	Длиннохвостый суслик, Тува	Fra [±]	0	183
217	2742	1322	Краснохвостая песчанка, Шамхорское ПЧО	–	0	390
218	2807	2253	Большая песчанка, Араломорская ПЧС	RO, Творт, гибель биопроб без культур	0	390
219	2823	2254	Большая песчанка, Араломорская ПЧС	RO, Творт, гибель биопроб без культур	0	390
220	2826	2255	Большая песчанка, Араломорская ПЧС	RO, Творт, гибель биопроб без культур	0	390
221	2849	2256	Большая песчанка, Араломорская ПЧС	RO, Творт, гибель биопроб без культур	0	390
222	2957	14759	Блохи суслика, Уральская область	–	0	390
223	3081	14732	Большая песчанка, Уральская ПЧС	OS	0	390
224	3083	733	Большая песчанка, Уральская. ПЧС	OS	0	390
225	3192	1222	Малый суслик, Гурьевская ПЧС	–	0	390
226	3559-3568	14792	Мышь домовая, Элистинская ПЧС	–	0	390
227	3595	14741	Большая песчанка, Уральская ПЧС	–	0	390
228	3672	2087	Большая песчанка, Туркменская ПЧС	Lac+	0	390
229	3720	888	Краснохвостая песчанка, Гурьевская ПЧС	OS	0	390
230	3756	2088	Большая песчанка, Туркменская ПЧС	Lac+	0	390
231	3978	2089	Большая песчанка, Туркменская ПЧС	Lac+	0	390
232	4033	2090	Большая песчанка, Туркменская ПЧС	Lac+	0	390
233	4098	11674	Краснохвостая песчанка, Азербайджанская ПЧС	–	0	390
234	4614	748	Клещи, Гурьевская обл	RO	0	390
235	4635	1379	Клещи, Араломорская ПЧС	–	0	390
236	5860	159	Емуранчик, С-3. Прикаспий	met	0	390

237	5865	14754	Малый суслик, Уральская ПЧС	–	0	225
238	5947	477	Блохи, С-3. Прикаспий.	–	0	390
239	5949	479	Блохи, С-3. Прикаспий.	–	0	390
240	5951	481	Блохи, С-3. Прикаспий.	–	0	390
241	5953	483	Блохи, С-3. Прикаспий.	–	0	390
242	6331	2091	Блохи песчанки, Туркменская ПЧС	Lac+	0	390
243	6497	2258	Большая песчанка, Араломорская ПЧС	RO, гибель биопроб без культур	0	390
244	6645	2092	Блохи песчанки, Туркменская ПЧС	Lac+	0	390
245	6663	2093	Большая песчанка, Туркменская ПЧС	Lac+	0	390
246	6848	2094	Большая песчанка, Туркменская ПЧС	Lac+	0	390
247	6955	2095	Блохи песчанка, Туркменская ПЧС	Lac+	0	390
248	8908	14766	Большая песчанка, Уральская ПЧС	–	0	390
249	8621	2259	Большая песчанка, Араломорская ПЧС	RO, гибель биопроб без культур	0	390
250	9849	2260	Большая песчанка, Араломорская ПЧС	RO, гибель биопроб без культур	0	390
251	11337	239	Гребенщикова песчанка, Прикаспий.	–	0	390
252	12708	1223	Домовая мышь, Гурьевская ПЧС	Фаг ^R	0	390
253	С-15015	11678	Персидская песчанка, Армения	Glp+/Nap–,	0	390
254	С-824	11692	Краснохвостая песчанка, Грузия	–	0	390
255	Alexander 195	2358	проф. Mollare, Париж, ин-т им. Пастера	–	0	390

256	EV76 линия (НИИЭГ)	EV1290	Коммерческая противочумная вакцина (контрольный штамм, <i>bv. orientalis</i>)	R-форма, Rha-, Ure-, Mob-, полиауксотроф: (phe, met, cys, thr); pPst, pCad, pFra Cad+, Fra+, Pst ^{+,R} , (<u>glpDΔ</u> , <u>NapA+</u>), <u>авирулентный</u>	0	390
257	EV	486 Клоны А	вариант вакцинного штамма EV, Китай	Glp+, прототроф,	0	390
		486 Клоны В	вариант вакцинного штамма EV, Китай	Glp+, прототроф,	223	0
258	EV-M	487	вариант вакцинного штамма EV, Китай	met	0	390
259	EV- Otten	488	вариант вакцинного штамма Otten, Китай	–	0	390
260	Ham-burg 15	3483	Больной человек, проф.Молляре, ин-т им. Пастера, Париж	–	0	390
261	Harbin	3440	Проф. Mollare, Париж	Phage ^R , p50MД	0	390
262	TRU	2357	Проф. Кнарр, Германия	RO, без плазмид	0	390
263	TS	2361	Проф. Кнарр, Германия	pPst-, pCad-	0	390
264	Yawa	2356	Проф. Кнарр, Германия	RO, без плазмид	0	390
265	«Анна»	12103	Больной человек, Россия	–	0	390
266	«берем. ♀ »	1214	Верблюд, Гурьевская ПЧС	Phage ^R	0	390
267	«Добитый»	1206	Тарбаган, Забайкалье	–	0	390
				Фаг ^R . прототроф, Rha+, без	223	0

268	ЖВР-25	19	Экспериментальный, ПЧИ «Микроб»	плазмид, S-форма, <i>Y. pseudotuberculosis</i>		
269	Кызыл- Кум-1	780	Экспериментальный Средне-Азиатский ПЧИ	вакцинный, Авирулентный, рPst ⁻ , Pgm-	0	390
270	Эльбрус-5	11691	Малый суслик, Карачаево-Черкесия	–	0	390

Пояснение: *) «—» атипичные признаки не обнаружены.

Характеристика исследованных штаммов *Y. pseudotuberculosis*

Приложение Б Типовые штаммы *Y. pseudotuberculosis***)

Инвентар- ный № РПЧИ	Особый №	Общие сведения	Выявленные особенности диагностических признаков*)	Ампликоны в ПЦР с праймерами, п.н.	
				JS	vIm12/IS2 16
17844	H141/84	Больной человек, Германия*)	Без плазмид, Mob-, O:1a	223	0
17845	H706/86	Больной человек, Япония	Без плазмид, Фаг ^R , SR, O:1b	223	0
17846	H2/91	Горная вода, Япония	+p6 и p4МД, Фаг ^R , S+R, ауксотроф±, O:1c	223	0
17847	H457/86	Больной человек, Япония	Фаг ^R , S+R, ауксотроф±, O:2a	223	0
17848	H143/84	Больной человек, Германия	+p10 МД, S+R, Ага-, ауксотроф±, O:2b	223	0
17849	H460/86	Больной человек, Япония	+p10 МД, O:2c	223	0
17850	H146/86	Больной человек, Германия	Ure±, Ауксотроф!!, O:3	223	0
17851	H452/86	Больной человек, Германия	+p30 МД Ure-, OR!, FV±, O:4a	223	0
17852	H715/86	Неизвестно, Франция	Фаг ^R S+R, ауксотроф±, O:4b	223	
17853	H719/86	Собака, Япония	Без плазмид, Mob- Фаг ^R Ага-, RR! Ауксотроф!!, O:5a	223	0
17854	H450/86	Больной человек, Япония	Ure- Ага-, Ауксотроф!!, O:5b	223	0
17855	H720/86	Больной человек, Япония	RS, ауксотроф±, FV±, O:6	223	0
17856	H455/86	Собака, Япония	Mob-, ауксотроф±, FV±, O:7	223	0
17857	H448/86	Дикая крыса, Япония	RR!, Ауксотроф!!, O:8	223	0
17858	H1112/90	Дикая крыса, Япония	Ure-, R+S, ауксотроф±, O:9	223	0
17859	H16/92	Енот, Япония	R, Фаг ^R ауксотроф±, O:10	223	0

17860	H1093/90	Дикая крыса, Япония	Фар ^R ауксотроф±, O:11	223	0
17861	H917/92	Горная вода, Япония	ауксотроф±, O:12	223	0
17862	H915/92	Домовая крыса, Китай	R, Фар ^R Ауксотроф!!, O:13	223	0
17863	H918/92	Дикая крыса, Китай	R+S Ауксотроф!!Ure-, Фар ^R , O:14	223	0
17864	H6516/94	Не указано	R, O:15	223	0
17865	H1180/95	Не указано	R, ауксотроф±, O:16	223	0

Пояснение: *) «←» атипичные признаки не обнаружены.

**) Штаммы из коллекции (Tsubokura, Aleksić, 1995), получены из Германии, г. Мюнхен. ин-т гигиены им. М.Петенкофера.

Приложение В Природные штаммы *Y. pseudotuberculosis*

№п	Особый №	Общие сведения	Выявленные особенности диагностических признаков*)	Ампликоны в ПЦР с прайме- рами, п.н.	
				JS	vIm12/IS 216
1	1(O:1)	От проф. Mollare, Париж, ин-т им. Пастера (типовой)	S-форма, Rha+, Ure+, Mob+, NapA+, Прототроф+, Фаг ^S , (p50), (p82), FV-	223	0
2	5(O:4)	Крыса, Мурманск	–	223	0
3	6R(O:?)	Больной человек. Саратов	–	223	0
4	7(O:2)	Крыса, Архангельск	–	223	0
5	9 (O:1)	Аппендикс, Псков	–	223	0
6	16(O:3)	Больной человек, С-Пб	+p8 МД	223	0
7	34(O:3)	Аппендикс, Калининград	–	223	0
8	52(O:5)	Типовой (Thal)	–	223	0
9	117(O:1)	Больной человек, Дальний Восток	Ure-	223	0
10	100(O:1)	Типовой (Thal)	–	223	0
11	136(O:1)	Больной человек, С-Пб	–	223	0
12	143(O:1)	Кормовая свёкла, С-Пб	–	223	0
13	193(O:2)	Крыса, Архангельск	–	223	0
14	206 (O:?)	Вода, Крым	p47МД	223	0
15	210(O:1)	Крыса, Азербайджан	–	223	0
16	274(O:1)	Полёвка обыкновенная, С-Пб	+p10МД, p3 МД	223	0
17	296 (O:5)	Типовой (Thal)	–	223	0
			R-pFra+, Rha+ Ure-FV+pPst+,		

18	320(O:1)	Крыса, СПб	Моб-, авирулентный, <i>Y. pestis</i>	0	390
19	322(O:1)	Крыса, С-Пб	Ауксотроф!!, Моб-Ure- Фаг ^R	223	0
20	354(O:1)	Мышь-малютка, С-Пб	–	223	0
21	370(O:1,2)	Мышь домовая, С.-Пб	–	223	0
22	402(O:1)	Лемминг, Мурманск	–	223	0
23	469(O:6)	Типовой (Thal)	–	223	0
24	485(O:3)	Больной человек, Дальний Восток	p47МД	223	0
25	489 S и R (O:4)	Морская свинка, С-Пб	1) S «диссоцианты» –	223	0
			2) R «диссоцианты»- Моб-Rha+/- Ura+/-pFra+, pPst+, <i>Y. pestis</i>	0	390
26	504(O:?)	Вода, Крым	–	223	0
27	629(O:1)	Больной человек, С-Пб	–	223	0
28	681(O:3)	Больной человек, Мурманск	–	223	0
29	770(O:1)	Крыса, Одесса	–	223	0
30	847(O:1)	От проф. Mollare, Париж	–	223	0
31	882(O:2)	Труп зайца, Новгородская СЭС	–	223	0
32	946(O:?)	Мышь домовая, С-Пб	–	223	0
33	952(O:1)	Крыса, С-Пб	–	223	0
34	978(O:1)	Полёвка, Новгородская СЭС	–	223	0
35	1129(O:2)	Бурозубка обык. С.-Пб	–	223	0
36	1336(O:1)	Крыса, С-Пб	Rha–	223	0
37	1656(O:5)	Крыса, С-Пб	–	223	0
38	1812(O:1)	Полёвка обыкновенная, С-Пб	–	223	0
39	1860	Лабораторные производные штаммов <i>Y. pestis</i> 50/74, 173, 52/80, 46/68, Саратов ПЧИ «Микроб»	Чумной фаг	223	0
40	1861		Покровской/чувствительны.	223	0
41	1862		R, OR, SR	223	0

42	1863			223	0
43	1870(O:1)	Крыса, СПб	p47МД	223	0
44	1923(O:3) (P-493)	От проф. Mollare, Париж	OR, Mob- (реципиент)	223	0
			OR, Mob-, Ure+, Rha+, Фaг ^S , pFra+/Fra+, caf1+(267 п.н.), FV-, Прототроф, <i>Y. pseudotuberculosis</i> , Fra+рекомбинант	223	0
45	1904(O:?)	Больной человек, Средне-Азиатский ПЧИ	Mob-	223	0
46	1983(O:3)	Морская свинка, С-Пб	–	223	0
47	1989(O:1)	Типовой, Франция	–	223	0
48	2093(O:4)	Больной человек, С-Пб	+p47МД, 10МД	223	0
49	2393(O:?)	Крыса, С.-Пб	–	223	0
50	2440(O:1)	Полёвка, Новгородская СЭС	–	223	0
51	3229(O:1)	Аппендикс, С.-Пб	–	223	0
52	3361(O:1)	Аппендикс, С.-Пб	+p60МД, p15МД, p12,5МД	223	0
53	3683(O:4)	Крыса, СПб	+p47МД, p10МД	223	0
54	4359(O:4)	Полёвка обыкновенная, С-Пб	–	223	0
55	5761	Крыса, С-Пб	1) S-«диссоциант»: –	223	0
			2) R-«диссоциант»: pFra+/Fra+, pPst+/Pst, Pla+, Mob- Rha+/- Ura+/-, <i>Y. pestis</i>	0	390
56	5764 (O:1)	Крыса, С-Пб	1)S-«диссоциант»: –	223	0

			2) R-«диссоциант»: pFra+/Fra+, pPst+/Pst,Pla+,, Mob- Rha+/- Ura+/-, <i>Y. pestis</i> , (есть клоны-прототрофы)	0	390
57	5765(O:1)	Крыса, С-Пб	1)S-«диссоциант»: –	223	0
			2)R-«диссоциант»: pFra+/Fra+, pPst+/Pst,Pla+, Mob- ,Rha+/- Ura+/-, <i>Y. pestis</i>	0	390
58	5851(O:5)	Крыса, СПб	–	223	0
59	6865(O:2)	Крыса, СПб	–	223	0
60	10588(O:1)	Крыса, СПб	+p17,5 МД	223	0

Пояснение: *) «←» атипичные признаки не обнаружены.