

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВЯТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

ДУДИНА ЛЮБОВЬ ГЕННАДЬЕВНА

**ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЦЕПЦИИ
БАКТЕРИЯМИ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* И
YERSINIA PESTIS СПЕЦИФИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ**

03.02.03 Микробиология

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Бывалов Андрей Анатольевич

Киров – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Возбудители псевдотуберкулёза и чумы	15
1.1.1 Общая характеристика бактерий <i>Y. pseudotuberculosis</i> и <i>Y. pestis</i>	15
1.1.1.1 Описание вызываемых <i>Y. pseudotuberculosis</i> и <i>Y. pestis</i> заболеваний ...	15
1.1.1.2 Филогенез патогенных иерсиний	18
1.1.1.3 Лечебно-профилактические средства и их недостатки	22
1.1.2 Характеристика поверхностных структур псевдотуберкулёзного и чумного микробов	24
1.1.2.1 Строение наружной мембраны грамотрицательных бактерий	24
1.1.2.2 Липополисахарид.....	26
1.1.2.3 Белки наружной мембраны.....	30
1.1.2.4 Везикулы чумного и псевдотуберкулёзного микробов	34
1.1.3 Моноклональные антитела к антигенам <i>Y. pestis</i> и <i>Y. pseudotuberculosis</i> ..	35
1.2 Бактериофаги, специфичные в отношении <i>Y. pseudotuberculosis</i> и <i>Y. pestis</i>	38
1.2.1 Общие сведения о бактериофагах	38
1.2.1.1 Жизненный цикл бактериофагов.....	38
1.2.1.2 Химический состав и морфология бактериофагов.....	39
1.2.1.3 Химическая природа рецепторов бактериофагов.....	40
1.2.2 Чумные и псевдотуберкулёзные бактериофаги.....	43
1.2.2.1 Характеристика чумных бактериофагов	43
1.2.2.2 Характеристика псевдотуберкулёзных бактериофагов	45
1.2.2.3 Использование бактериофагов для лечения и диагностики.....	46
1.2.3 Методические подходы к характеристике рецепторов бактериофагов	49
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	51
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	51
2.1 Штаммы микроорганизмов	51

2.2 Бактериофаги	51
2.3 Антигенные препараты.....	51
2.4 Антитела и антивидовые конъюгаты	52
2.5 Оборудование	53
2.6 Методы	53
2.6.1 Определение концентрации микроорганизмов.....	53
2.6.2 Определение титра бактериофагов	54
2.6.3 Методика выделения и очистки иерсиниозных бактериофагов	54
2.6.4 Методика определения влияния инфицирующей дозы (МОІ) на выход бактериофага псевдотуберкулёзного диагностического	56
2.6.5 Оценка культуральных свойств бактериофагов при различных температурах.....	57
2.6.6 Оценка влияния бактериофагов на везикулообразование иерсиний.....	58
2.6.7 Методика оценки адсорбционной активности живых и убитых бактерий иерсиний.....	58
2.6.8 Определение химической природы рецепторов бактериофагов.....	59
2.6.9 Методика оценки конкуренции антител и бактериофагов за сайты адсорбции.....	60
2.6.10 Твёрдофазный иммуноферментный анализ	60
2.6.11 Обработка антигенных препаратов периодатом натрия	61
2.6.12 Обработка антигенных препаратов протеазами	62
2.6.13 Вертикальный электрофорез.....	63
2.6.14 Иммуноблотинг	64
2.6.15 Дот-вариант ИФА	64
2.6.16 Просвечивающая электронная микроскопия	65
2.6.17 Статистическая обработка полученных результатов	65
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	66
3.1 Культурально-морфологические свойства иерсиниозных бактериофагов	66

3.1.1 Влияние температуры культивирования иерсиний на литическую способность бактериофагов псевдотуберкулёзного диагностического и чумного Покровской	66
3.1.2 Особенности глубинного культивирования бактериофага псевдотуберкулёзного диагностического	68
3.1.3 Морфология псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага	71
3.1.4 Влияние бактериофагов на морфологию клеток и везикулообразование иерсиний.....	72
3.1.4.1 Влияние бактериофага чумного Покровской на морфологию клеток и везикулообразование <i>Y. pestis</i>	73
3.1.4.2 Влияние бактериофага псевдотуберкулёзного диагностического на морфологию клеток и везикулообразование <i>Y. pseudotuberculosis</i>	76
3.2 Иммунохимическая природа антигенных эпитопов, распознаваемых моноклональными антителами МКАт1-9	81
3.2.1 Взаимодействие МКАт с антигенами иерсиний.....	81
3.2.2 Определение химической природы эпитопов, выявляемых МКАт, методом ИФА	84
3.2.2.1 Иммунохимическая характеристика окисленных периодатом натрия антигенных препаратов	84
3.2.2.2 Иммунохимическая характеристика обработанных протеазами антигенных препаратов	88
3.2.3 Иммунохимическая характеристика МКАт1-9 методом иммуноблотинга	90
3.2.3.1 Определение химической природы эпитопов, выявляемых МКАт1-4 .	90
3.2.3.2 Определение химической природы эпитопов, выявляемых МКАт5-997	
3.3 Химическая природа рецепторов бактериофагов псевдотуберкулёзного диагностического и чумного Покровской	100
3.3.1 Отработка метода адсорбции иерсиниозных бактериофагов на бактериальных клетках.....	100
3.3.2 Определение химической природы рецепторов бактериофага Покровской	104

3.3.3 Определение химической природы рецепторов псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага	105
3.4 Конкуренция иерсиниозных бактериофагов и МКАт1-9 за сайты связывания на поверхности бактериальных клеток	107
3.4.1 Конкуренция бактериофага Покровской и МКАт	107
3.4.2 Конкуренция псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага и МКАт	109
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	112
ВЫВОДЫ	116
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	118

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

DDH	дидеоксигексоза
ECA	общий энтеробактериальный полисахаридный антиген
<i>hms</i>	hemin storage locus (локус пигментсорбции)
MOI	multiplicity of infection (инфицирующая доза бактериофага)
OMVs	везикулы
SM	буфер для работы с бактериофагами
Б-антиген-37	Б-антиген, выделенный из клеток <i>Y. pseudotuberculosis</i> , выращенных при температуре 37 °С
Б-антиген-10	Б-антиген, выделенный из клеток <i>Y. pseudotuberculosis</i> , выращенных при температуре 10 °С
БОЕ	бляшкообразующая единица
БСА	бычий сывороточный альбумин
ДДС	додецилсульфат натрия
ЗФР	забуференный физиологический раствор
ИФА	твёрдофазный иммуноферментный анализ
КБК	карбонат-бикарбонатный буфер
Клетки <i>Y. pestis</i> EV-27	клетки <i>Y. pestis</i> EV, выращенные при температуре 27 °С
Клетки <i>Y. pseudotuberculosis</i> -10	клетки <i>Y. pseudotuberculosis</i> , выращенные при температуре 10 °С

Клетки <i>Y. pseudotuberculosis</i> -27	клетки <i>Y. pseudotuberculosis</i> , выращенные при температуре 27 °С
Клетки <i>Y. pseudotuberculosis</i> -37	клетки <i>Y. pseudotuberculosis</i> , выращенные при температуре 37 °С
КОЕ	колониеобразующая единица
ЛПБК	липополисахаридбелковый комплекс
ЛПС	липополисахарид
ЛПС <i>E. coli</i>	липополисахарид, выделенный из клеток <i>Escherichia coli</i> 055:B5
ЛПС <i>Y. pestis</i> EV-27	липополисахарид, выделенный из клеток штамма EV <i>Y. pestis</i> , выращенных при температуре 27 °С
ЛПС <i>Y. pseudotuberculosis</i> -10	липополисахарид, выделенный из клеток <i>Y. pseudotuberculosis</i> , выращенных при температуре 10 °С
ЛПС <i>Y. pseudotuberculosis</i> -37	липополисахарид, выделенный из клеток <i>Y. pseudotuberculosis</i> , выращенных при температуре 37 °С
МКА _T	моноклональные антитела
ОП	оптическая плотность
ПААГ	полиакриламидный гель
ПЧС	поликлональная лошадиная агглютинирующая сыворотка к живым клеткам <i>Y. pestis</i>
ПЭГ	полиэтиленгликоль

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы и степень разработанности темы исследования

Бактерии рода *Yersinia* включают три патогенных для человека вида – *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis*. Возбудители первых двух видов являются энтеропатогенами и вызывают соответственно кишечный иерсиниоз и псевдотуберкулёз – заболевания, достаточно широко распространенные на территории России. *Y. pestis* является этиологическим агентом чумы – тяжелого системного заболевания, послужившего причиной трёх пандемий за историю человечества [1]. Даже в последние десятилетия заболевание чумой регистрируется с частотой приблизительно до 2500 случаев в год [2]. В регионах естественного распространения *Y. pestis* периодически возникают вспышки чумы, уносящие сотни жизней людей [3].

В последнее время в медицине всё более актуальной становится проблема возникновения антибиотикорезистентных штаммов патогенных микроорганизмов, вызываемые ими болезни очень трудно поддаются лечению. Так, имеются данные об обнаружении полиантибиотикорезистентных штаммов *Y. pestis* [4-7]. В отношении возбудителя чумы ситуация осложняется существованием угрозы целенаправленного конструирования устойчивого к действию антибиотиков штамма *Y. pestis*, который может быть использован как средство биотерроризма [8]. Имеются также литературные данные о выделении антибиотикорезистентных штаммов *Y. pseudotuberculosis* [9, 10], а отсутствие своевременной и адекватной терапии псевдотуберкулёза зачастую приводит к переходу заболевания в хроническую форму [11].

Поиск альтернативных средств лечения инфекционных заболеваний вызвал новый виток интереса к фаготерапии [12]. Однако при использовании бактериофагов в качестве лечебного средства важно хорошо понимать все фазы их жизненного цикла. В частности, процесс адсорбции бактериофага на поверхность бактериальной клетки является одной из критических стадий их взаимодействия [13]. Это отчасти связано с тем, что одним из требований, предъявляемых к

бактериофагам, которые можно было бы использовать в терапии инфекционных заболеваний, является то, что мутации, приводящие к инактивации рецепторов, распознаваемых бактериофагами, должны приводить к снижению вирулентности патогена [14]. Знание химической природы и локализации рецепторов, распознаваемых бактериофагами, имеет большое значение и при их использовании в диагностических целях.

В настоящее время известен ряд специфичных в отношении *Y. pestis* литических бактериофагов, которые потенциально могут быть использованы для лечения чумы [14]. Бактериофаг Покровской является одним из достаточно хорошо изученных и используемых в диагностической практике чумных бактериофагов, однако механизм его адсорбции иммунохимическими методами практически не исследовался. Относительно бактериофагов, специфичных в отношении псевдотуберкулёзного микроба, в литературных источниках данных представлено значительно меньше. Таким образом, комплексное изучение процессов адсорбции на микробных клетках иерсиниозных бактериофагов, в том числе иммунохимическими методами, является актуальным направлением исследования.

Цель работы – иммунохимически охарактеризовать адгезивность бактерий *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* в отношении специфических бактериофагов.

Задачи исследования:

1. Установить химическую природу и локализацию на бактериальной клетке эпитопов, распознаваемых набором моноклональных антител (МКАт1-9) к поверхностным антигенам иерсиний.
2. Изучить химическую природу рецепторов иерсиний, комплементарных бактериофагам псевдотуберкулёзному диагностическому и чумному Покровской.
3. Иммунохимически охарактеризовать процесс адсорбции на клетках иерсиний бактериофагов псевдотуберкулёзного диагностического и чумного Покровской методом конкурентного ингибирования с помощью панели моноклональных антител.
4. Охарактеризовать морфологические и культуральные свойства бактериофага псевдотуберкулёзного диагностического.

5. Оценить способность бактерий *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* продуцировать внеклеточные везикулы, а также возможность влияния иерсиниозных бактериофагов на везикулообразование.

Научная новизна и теоретическая значимость работы

Определена химическая природа эпитопов, распознаваемых моноклональными антителами к поверхностным антигенам иерсиний (МКАт1-9). Показано, что МКАт5-9 выявляют неидентичные эпитопы антигенов иерсиний белковой природы, не являющихся поринами Omp F и Omp C. МКАт1-4 выявляют неидентичные видоспецифические детерминанты, расположенные на O-боковых цепях липополисахарида (ЛПС) *Y. pseudotuberculosis*.

Установлен факт образования бактериями *Y. pseudotuberculosis 1b* и *Y. pestis EV* внеклеточных везикул. Показано, что инкубация указанных микробов с, соответственно, бактериофагами псевдотуберкулёзным диагностическим и чумным Покровской приводит к повышению уровня везикулообразования и изменению морфологии бактериальных клеток.

Показано, что рецептор псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага ассоциирован с коровой областью липополисахарида *Y. pseudotuberculosis*.

Определено, что моноклональные антитела, взаимодействующие с эпитопами белковой природы, способны частично блокировать рецепцию двух использованных в работе бактериофагов. МКАт5-8 ингибировали адгезию к соответствующим микробным клеткам псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага, а МКАт5, 7 и 8 – бактериофага чумного Покровской.

Научно-практическая значимость работы

Разработан методический подход, основанный на использовании инактивированных формальдегидом бактериальных клеток в опытах по количественной оценке адсорбции частиц иерсиниозных бактериофагов. Показано, что за счёт увеличения времени инкубирования можно повысить количество адсорбированных частиц бактериофага без риска получения недостоверных результатов, связанных с ранним выходом дочерних фаговых частиц. Данный

методический подход особенно актуален при работе с высокопатогенными бактериями, а также бактериофагами, характеризующимися относительно высокой и низкой скоростями адсорбции.

В целях изучения процессов взаимодействия в системе «бактерия рода *Yersinia* – специфический бактериофаг» применен новый методический подход, основанный на конкурентном ингибировании процесса адсорбции бактериофагов с помощью моноклональных антител.

Охарактеризованная панель моноклональных антител может быть использована для разработки более совершенных средств иммунохимического выявления возбудителя псевдотуберкулёза.

Методы исследования

В работе были использованы микробиологические, иммунохимические, биохимические, физико-химические, химические методы исследования, просвечивающая электронная микроскопия.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Эпитопы, распознаваемые моноклональными антителами МКАт1-4, расположены на О-боковых цепях липополисахарида *Y. pseudotuberculosis*. МКАт5-9 взаимодействуют с неидентичными белковыми детерминантами на внешней мембране *Y. pseudotuberculosis*.

2. МКАт5-8 ингибируют адсорбцию к бактериям *Y. pseudotuberculosis* частиц псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага, а МКАт5, 7 и 8 – адсорбцию к клеткам *Y. pestis* бактериофага чумного Покровской.

3. Бактерии *Y. pseudotuberculosis* 1b и *Y. pestis* EV способны к везикулообразованию, степень которого повышается в присутствии бактериофагов псевдотуберкулёзного диагностического и чумного Покровской соответственно.

Степень достоверности результатов исследования и апробация работы

Достоверность полученных в работе результатов подтверждается использованием современных методов исследования и высокотехнологичного оборудования, прошедшего поверку. Выводы сделаны на основе анализа достаточно представительного массива экспериментальных данных. Результаты

исследований обработаны с помощью общепринятых методов статистического анализа.

Материалы работы представлены на II Всероссийской (XVII) молодежной научной конференции «Молодежь и наука на севере» (Сыктывкар, 2014), XIII Всероссийской молодежной научной конференции Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике» (Сыктывкар, 2014), XXVI Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», II Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология» (Саратов, 2014), IV Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология» (Киров, 2018), а также на Всероссийских ежегодных научно-практических конференциях «Общество, наука, инновации» в 2012 -2018 годах (Киров).

Публикации результатов исследования

По теме диссертации опубликованы 22 работы, из них семь из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК России.

Связь работы с научными программами и личный вклад автора

Работа выполнена на базе ФГБОУ ВО «Вятского государственного университета» в лаборатории физиологии микроорганизмов ФГБУН Института физиологии Коми НЦ УрО РАН в рамках плановых научно-исследовательских тем: «Механизмы взаимодействия клеток млекопитающих и бактерий *Yersinia pseudotuberculosis*», №ГР №01201350808 (2013-2016 гг.) и «Механизмы везикулообразования иерсиний», №ГР№ АААА-А17-117012310155-3 (2017-2020 гг.), а также Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», Проект: 12-П-4-1051 «Разработка тест-системы псевдотуберкулёзной моноклональной», 2012-2014 гг.

Автор участвовала в планировании и выполнении экспериментов с помощью микробиологических, физико-химических и иммунохимических методов, статистической обработке результатов исследования, анализе и обобщении экспериментальных и литературных данных.

Результаты просвечивающей электронной микроскопии получены совместно с к.б.н. А.В. Чернядьевым в НОЦ Нанотехнологии ФГБОУ ВО «Вятского государственного университета».

Препараты поринов Omp F, Omp C и рекомбинантного порина Omp F, а также поликлональная сыворотка к рекомбинантному порину Omp F любезно предоставлены д.х.н. О.Д. Новиковой из ФГБУН Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, трёх глав, заключения, выводов и библиографического списка.

Во введении обозначена актуальность, сформулированы цель и задачи, научная новизна и научно-практическая значимость работы.

В первой главе представлен обзор литературы, в котором содержатся современные данные о бактериях *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* и о специфичных в отношении данных бактерий бактериофагах. Больше внимание уделено описанию компонентов наружной мембраны указанных бактерий, описанию моноклональных антител, полученных различными группами исследователей к этим компонентам, а также обзору свойств бактериофагов, специфичных в отношении псевдотуберкулёзного и чумного микробов, перспективам фаготерапии и методам определения локализации рецепторов, распознаваемых бактериофагами.

Во второй главе перечислены использованные в работе объекты исследования и оборудование, подробно описаны методы исследования.

Третья глава посвящена описанию и обсуждению полученных результатов, а именно характеристике культурально-морфологических свойств иерсиниозных бактериофагов, установлению факта влияния бактериофагов псевдотуберкулёзного диагностического и чумного Покровской на везикулообразование исследуемых иерсиний, определению химической природы детерминант, распознаваемых МКАт1-9, и рецепторов, распознаваемых указанными бактериофагами, а также выявлению конкурентных отношений между

моноклональными антителами МКАт1-9 и исследуемыми бактериофагами за сайты адсорбции на внешней мембране *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*.

В заключении приведены итоги работы после чего сформулированы выводы.

Диссертация изложена на 146 страницах текста, состоит из перечня сокращений, введения, трёх глав, заключения и выводов. Диссертация проиллюстрирована 11 таблицами и 21 рисунком. Библиографический список включает 254 источника, в том числе 48 отечественных и 206 зарубежных.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю доктору медицинских наук Бывалову Андрею Анатольевичу за помощь и поддержку в ходе проведения исследований; коллективу лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН за препараты поринов и поликлональных антител, которые они предоставили; коллективу кафедры биотехнологии ВятГУ за поддержку во время выполнения диссертационной работы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Возбудители псевдотуберкулёза и чумы

1.1.1 Общая характеристика бактерий *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*

В настоящее время род *Yersinia* включает в себя по крайней мере 18 видов [15], три из которых являются патогенными для человека – это *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* [16].

1.1.1.1 Описание вызываемых *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* заболеваний

Псевдотуберкулёз – сапрозоонозное заболевание, распространенное во многих регионах Америки, Азии, Европы, Океании [17], в том числе и на территории РФ. За сходство симптоматики со скарлатиной и учитывая эпидемические вспышки на Дальнем Востоке данное заболевание в нашей стране некоторое время называли дальневосточной скарлатиноподобной лихорадкой [11]. В.А. Знаменский в результате самозаражения показал, что возбудителем этого заболевания является бактерия *Y. pseudotuberculosis*. По данным Роспотребнадзора, за 2014-2017 года заболеваемость псевдотуберкулёзом в России составляла 0,4-0,94 случая на 100 тысяч населения [18], причем порядка 60-70 % заболевших являются детьми в возрасте до 14 лет.

Г.П. Сомов с соавторами в своей монографии [11] дает наиболее полное описание заболевания. Клиническая картина псевдотуберкулёза характеризуется чрезвычайным разнообразием симптомов. Заражение людей происходит, как правило, с пищей. Длительность инкубационного периода чаще всего колеблется от 7 до 10 дней. Псевдотуберкулёз в большинстве случаев начинается остро. В этот период проявляются симптомы инфекционной интоксикации, а также присутствует большое количество других симптомов – от болей в животе до конъюнктивита; однако свойственные только этому заболеванию клинические проявления отсутствуют. Начальный период заболевания длится от 1 до 5 дней. В период разгара, длящийся 1-10 дней, наиболее ярко проявляются такие симптомы

как лихорадка, сыпь, выраженная интоксикация, сопровождающаяся поражением центральной нервной системы, а также происходит увеличение лимфатических узлов, поражение опорно-двигательного аппарата, органов дыхания, почек, печени, сердечно-сосудистой системы. Следует отметить, что поражение желудочно-кишечного тракта зачастую является главным признаком болезни. Период угасания болезни длится от 4 до 30 дней и часто характеризуется шелушением кожи. Прогноз при псевдотуберкулезе чаще всего благоприятный, летальные случаи хоть и наблюдаются, но очень редко. Возможно затяжное и хроническое течение заболевания [19]. На территории России чаще всего (93-98 % от числа выделенных штаммов) псевдотуберкулез вызывает 1 серовариант *Y. pseudotuberculosis* [11].

Большинство случаев заболевания псевдотуберкулезом, а также эпидемические вспышки приходятся на холодное время года, а заражение происходит через продукты питания (корнеплоды, овощи, молочные продукты и т.д.), хранившиеся при относительно низкой температуре. Псевдотуберкулезный микроб попадает на овощи в почве, либо при их транспортировке, переработке или хранении. При низких температурах культивирования (4-30 °С) у *Y. pseudotuberculosis* проявляются свойства, реализуемые в дальнейшем на стадии инициации инфекционного процесса – подвижность, хемотаксис, высокая адгезивность, инвазивность и токсичность. Повышение температуры до 37 °С приводит к снижению вирулентности патогена [11]. Все это указывает на то, что *Y. pseudotuberculosis* является психрофильным микроорганизмом.

Y. pestis является возбудителем чумы – болезни, вызвавшей три пандемии за современную историю человечества [1]. В природе носителями чумы являются дикие грызуны, а переносчиками – блохи. Природные очаги распространения чумного микроба расположены на всех континентах, кроме Австралии и Антарктиды [20]. Заражение происходит через укусы зараженных блох, контакты с тканями или жидкостями инфицированных животных, вдыхание находящихся в воздухе выделений людей и животных, больных легочной формой чумы, иногда через не прошедшее достаточную термическую обработку мясо [20]. Разделяют три клинические формы чумы: бубонную, легочную и септическую [2, 21, 22]. Это

несколько условная классификация, так как септическая и легочная формы могут развиваться из бубонной. При несвоевременном либо неадекватном лечении смертность от бубонной чумы составляет порядка 40-60 % [21]. Редко *Y. pestis* может вызывать острый фарингит или менингит [8].

При бубонной форме чумы инкубационный период составляет 3-6 дней, для первичных легочной и септической форм он значительно меньше – от нескольких часов до 1-2 дней. Во всех случаях начало заболевания сопровождается повышением температуры до 39-40 °С, недомоганием, головной и мышечной болями и болью в животе, нарушениями сознания, а также расстройствами пищеварения [2]. Возбудитель распространяется по лимфатическим узлам с образованием болезненных бубонов, которые, как правило, находятся в бедренной, паховой, подмышечной областях, либо в зоне шейного отдела. Расположение бубонов определяется местом проникновения патогена через кожу. В случае отсутствия лечения, далее возбудитель распространяется по лимфатической и кровеносной системам в другие лимфатические узлы [23]. В 5-15 % случаев развиваются вторичные легочная или септическая формы чумы, которые приводят к летальному исходу, если зараженный не получает необходимое лечение на очень ранних стадиях [2].

Также развиваются симптомы прогрессирующей гипоксии тканей, тяжелой интоксикации, геморрагический синдром с пурпурой, множественные петехии на коже и слизистых оболочках, кровоизлияния в печени, почках, селезёнке и желудочно-кишечном тракте, диссеминированное внутрисосудистое свертывание с цианозом, некроз мелких кровеносных сосудов и гангрена дистальных отделов конечностей [2, 24]. Типичные синюшные изменения цвета кожи в терминальной стадии болезни приобретают темно-коричневый или черный оттенок. В связи с этим чума получила название «черная смерть».

Первичная септическая форма возникает при заражении высокими дозами патогена, а также при поступлении патогена непосредственно в кровь, минуя лимфатическую систему [25]. Она может развиваться у охотников и ветеринаров, когда возбудитель проникает через поврежденную кожу при контакте с

зараженным млекопитающим. В этом случае *Y. pestis* уже несёт факторы, способствующие быстрому росту в теле млекопитающего, что, учитывая непосредственное проникновение патогена в кровь, обеспечивает развитие генерализованной инфекции [2]. Клинически септическая форма чумы напоминает септицемию, вызываемую другими грамотрицательными бактериями, и сопровождается ознобом, головной болью, недомоганием и желудочно-кишечными расстройствами [21].

Первично легочная форма чумы возникает при вдыхании бактериальных аэрозолей, производимых зараженными *Y. pestis* людьми или животными [2, 22]. Эта форма характеризуется кашлем с кровавой мокротой. В первые часы болезни в мокроте содержится небольшое количество бактерий, но их концентрация постепенно возрастает в процессе инфекции, длительность которой редко превышает 1-3 дня [21]. Симптомы тяжелой пневмонии сопровождаются сердечно-сосудистой дисфункцией, сердечно-легочной недостаточностью и комой. Легочная чума является наиболее опасной и быстро передающейся формой заболевания [22].

Y. pestis не является психрофильным микробом. В большинстве случаев он способен находиться вне тела хозяина только непродолжительное время. Тем не менее существуют данные, говорящие о возможности возбудителя чумы находиться длительное время в окружающей среде [26-29]. Показано, что чумной микроб способен сохранять жизнеспособность после выдерживания в течение 21 дня в водопроводной воде при температуре 4 °C [30]. Также S.D. Torosian et al. [31] показали, что возбудитель чумы способен размножаться при температуре 4 °C.

1.1.1.2 Филогенез патогенных иерсиний

Иерсинии трех патогенных для человека видов на основании их клинических и эпидемиологических свойств можно разделить на две группы: с одной стороны это *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*, а с другой – *Y. pestis*. Для представителей этих двух групп характерны разные пути заражения, клинические симптомы и результаты течения болезни. Такие кардинальные отличия, наряду с

тесной генетической близостью соответствующих возбудителей, наталкивают на вопросы об отношениях между видами в ходе эволюции.

Принято считать, что общий предок всех представителей рода *Yersinia* появился в диапазоне от 41 до 186 миллионов лет назад [32]. *Y. pseudotuberculosis* отделилась от *Y. enterocolitica* порядка 0,4 – 1,9 миллионов лет назад [32]. На основании анализа нуклеотидных последовательностей ряда генов, секвенированных для большого спектра штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* было установлено, что чумной микроб произошел от псевдотуберкулёзного относительно недавно, приблизительно в течение последних 1500 – 20000 лет [32]. Согласно данным молекулярно-генетического анализа было показано, что хромосомы бактерий *Y. pseudotuberculosis* серотипа O:1b и *Y. pestis* гомологичны на 90 % [33].

В.В. Сунцов и Н.И. Сунцова в своих работах [34-37] предложили экологический сценарий происхождения *Y. pestis*. Согласно этой теории, чумной микроб появился в период позднего плейстоцена (22-15 тыс. лет назад), когда произошло сартанское похолодание на территории северной и центральной Азии. В это время почва промерзала до глубины расположения зимовочных камер, на 2-3 м и более, монгольских сурков *Marmota sibirica*. В силу положительного термотаксиса личинки сурочьей блохи *Oropsylla silantiewi*, которые обычно обитают в гнездовой выстилке, перемещались в шерстяной покров сурков. Оказавшиеся в ротовой полости личинки, являясь факультативными гемофагами, нарушали целостность слизистых оболочек. В места укусов проникали бактерии *Y. pseudotuberculosis*, которые были занесены вместе с фекальными частицами, используемыми сурками при строительстве зимовочной пробки. Существенное влияние на становление чумного микроба оказал тот факт, что температура тела сурков в течение периода спячки до 15 раз медленно изменялась в диапазоне 5-37 °С, вслед за чем изменялась и активность иммунной системы. В теплый сезон года температура тела сурка составляла 37 °С, и псевдотуберкулёзный микроб подавлялся иммунитетом здорового животного. Этот период эволюционирующий микроб стал переживать в теле блохи *O. silantiewi* в виде биопленки, формируя в

желудочно-кишечном тракте блок преджелудка. На последнем этапе отделения от псевдотуберкулёзного микроба возбудитель чумы приобрел способность к синтезу при температурах выше 26 °С бактериоцина пестицина. Пестицин подавляет рост бактерии *Y. pseudotuberculosis*, вследствие чего чумной и псевдотуберкулёзный микроб не могут сосуществовать вместе, являясь экологическими антагонистами [35].

Предположительный сценарий эволюции *Y. pestis* на молекулярно-генетическом уровне представлен на рисунке 1.

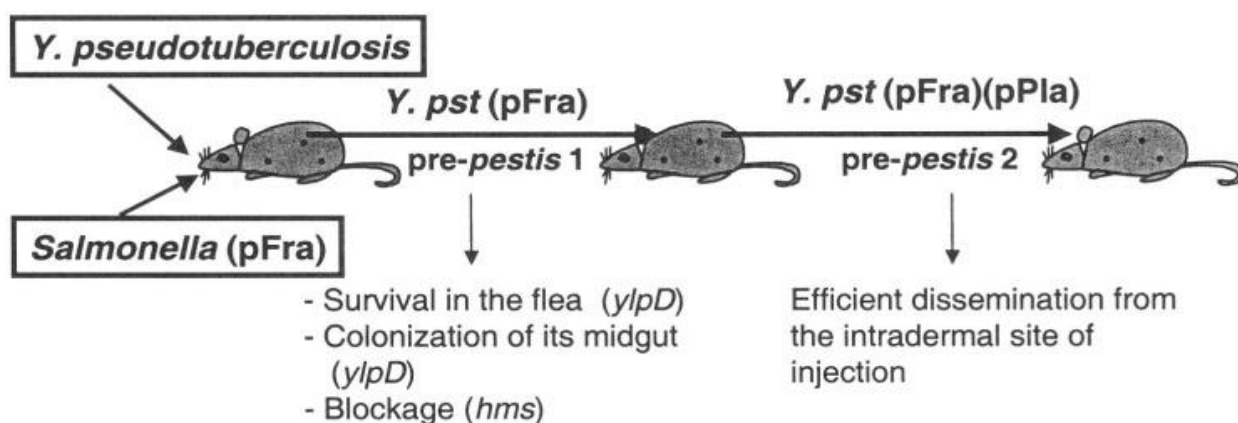


Рисунок 1 – Эволюционный сценарий передачи *Y. pestis* блохами [16]

В ходе эволюционного процесса появления *Y. pestis* при возникновении способности переноситься блохами, возможно, было необходимо стечение нескольких обстоятельств: 1) одновременное заражение восприимчивого млекопитающего бактерией-донором плазмиды p Fra и ее реципиентом – *Y. pseudotuberculosis*; 2) перенос плазмиды реципиенту; 3) присутствие в геноме реципиента генов, ответственных за появление блока преджелудка у блох; 4) распространение бактерии-реципиента по кровотоку инфицированного млекопитающего [16].

Во время эволюционного превращения *Y. pseudotuberculosis* в *Y. pestis* псевдотуберкулёзный микроб приобрел плазмиду p Fra. Наиболее вероятным источником данной плазмиды является бактерия *Salmonella enterica*, несущая плазмиду с высокой степенью гомологии нуклеотидной последовательности с p Fra

[38]. Эта плаزمида несёт ген *uplD*, кодирующий фосфолипазу D [39]. Ранее этот ген назывался геном мышинового токсина и благодаря ему бактерия *Y. pseudotuberculosis* получила возможность колонизировать преджелудок блох и выживать в их организме [40].

Присутствие в хромосоме *Y. pestis* *hemin storage locus (hms)* позволило этой бактерии создавать в пищеварительной системе блохи блок преджелудка [41]. Бактерия, несущая *p Fra*, но не имеющая локуса *hms*, не имела бы возможности эффективно распространяться за счет насекомых. Локус *hms* присутствует в хромосоме как *Y. pestis*, так и *Y. pseudotuberculosis* [16, 42].

Еще одним фактором патогенности, наличие которого имело критическое значение для становления *Y. pestis* как высокопатогенного возбудителя, является наличие у него плазмиды, названной в различных источниках как *p Pla*, *p PCP1*, или *p Pst* [16]. Данная плаزمида несёт ген *pla*, кодирующий биосинтез активатора плазминогена. Активатор плазминогена способствует распространению возбудителя из места инокуляции благодаря разрушению скоплений фибрина [43]. Предку *Y. pestis* плазмиды *p Pla* могла быть передана либо в теле восприимчивого млекопитающего, либо в кишечнике блохи. Так как потенциальные места диссеминации предка чумного микроба в организме млекопитающего (кровь, лимфатические узлы, печень и т.д.) в норме стерильны, более вероятно, что донор данной плазмиды был встречен в кишечнике блохи [16].

По всей видимости, плазмиды *p Fra* и *p Pla* не являются ответственными за продукцию основных факторов патогенности. Факторы патогенности в большей мере кодируются хромосомной ДНК *Y. pestis* [16]. Секвенирование геномов нескольких штаммов *Y. pestis*, в частности, CO92 [44], KIM [45] показало, что они характеризуются большим количеством инсерций (>130), расположенных по всей хромосоме. Также в этих геномах имеется большое количество неработающих генов (≥ 149 инактивированных последовательностей) [16]. Мутации в геноме, приводящие к лучшему переносу насекомыми, могли за счет изменений на генном уровне или на уровне регуляции также способствовать увеличению патогенности. Вероятным сценарием является и то, что гены, ответственные за перенос фекально-

оральным путем, больше не были нужны бактерии, поэтому прекратился селективный отбор против их мутаций. Возможно также, что инактивация каких-либо генов *Y. pestis* привела к увеличению патогенных свойств бактерии [16]. Однако такие гены до сих пор не идентифицированы.

Еще одним путем эволюции чумного микроба было приобретение новых генов с помощью нитчатых бактериофагов. Примером является бактериофаг Υ pfФ, который в геноме *Y. pestis* представляет собой стабильный профаг [46]. Υ pfФ влияет на патогенность чумного микроба для мышей, и дает селективные преимущества для *Y. pestis* в естественных условиях [47].

1.1.1.3 Лечебно-профилактические средства и их недостатки

Тяжесть и особенности течения псевдотуберкулёза и чумы определяют специфику антимикробной терапии.

Ввиду большого разнообразия клинических проявлений псевдотуберкулёза его дифференциальная диагностика представляет большие сложности [48]. В 8-55 % случаях происходят рецидивы и обострения. У 3-10 % заболевших псевдотуберкулёз переходит в подострую или хроническую форму [48]. В связи с учащением появления рецидивов и хронических форм, в последние годы появилась тенденция к необходимости лечения даже легких форм псевдотуберкулёза в стационарах с длительным курсом этиотропной терапии [48]. Курс лечения составляет не менее 10-12 дней с момента нормализации температуры тела. Профилактика псевдотуберкулёза заключается, как правило, в борьбе с грызунами, в соблюдении правил питания и водоснабжения, а также технологии хранения пищевых продуктов [49]. В настоящее время вакцины против псевдотуберкулёза не существует.

Успех лечения чумы зависит от своевременности назначения этиотропной терапии. Выбор препарата, схема и дозы зависят от формы заболевания. Лечение проводят только в стационарах, курс антибиотиков составляет 7-10 дней. Так как чума характеризуется симптомами тяжёлой интоксикации, то дополнительно проводят массивную дезинтоксикационную терапию, а также назначают

препараты, способствующие улучшению микроциркуляции и репарации, повышению диуреза, поддерживающие сердечно-сосудистую и дыхательную системы, жаропонижающие и симптоматические средства [48].

К способам профилактики заболеваемости чумой среди людей относят мероприятия по предотвращению завоза инфекции из других стран, возникновения заболевания в энзоотических очагах, а также вакцинацию сотрудников противочумных учреждений. В случае возникновения риска распространения чумы предусмотрено проведение профилактической иммунизации населения [48].

В практике вакцинации против чумы применяются живые и инактивированные вакцины. Убитые чумные вакцины имеют такие достоинства как стандартность и стабильность при хранении, относительно невысокую реактогенность, редкие аутоимунные реакции [50, 51]. Меньшие по сравнению с иммунизацией живыми вакцинами послепрививочные реакции привели к использованию инактивированных вакцин в США [52]. Однако эти вакцины по своим протективным свойствам значительно уступают живым чумным вакцинам [53-55].

Среди живых вакцин наибольшее распространение получила вакцина на основе штамма *EV* [56]. У этого штамма произошла делеция части хромосомной ДНК длиной 102 тысяч пар оснований, ответственной за продукцию ряда факторов патогенности [57, 58]. Вероятность возврата штамма *EV* к вирулентному состоянию считается чрезвычайно низкой [59]. Иммунизация людей живой вакциной на основе штамма *EV* во время эпидемии чумы на Мадагаскаре и северо-востоке Китая позволила снизить заболеваемость и летальность в среднем в 5-10 раз [56].

Считается, что чумной микроб восприимчив к антибиотикам, активным в отношении грамотрицательных бактерий. Однако существуют работы, в которых сообщается о выделении антибиотикорезистентных штаммов этого возбудителя [4-7]. Два полиантибиотикорезистентных штамма *Y. pestis* были выделены на Мадагаскаре в 90-е года прошлого века. Один из этих штаммов был невосприимчив ко всем антибиотикам, рекомендованным для лечения и профилактики чумы [7]. Показано, что гены, ответственные за невосприимчивость к антимикробной

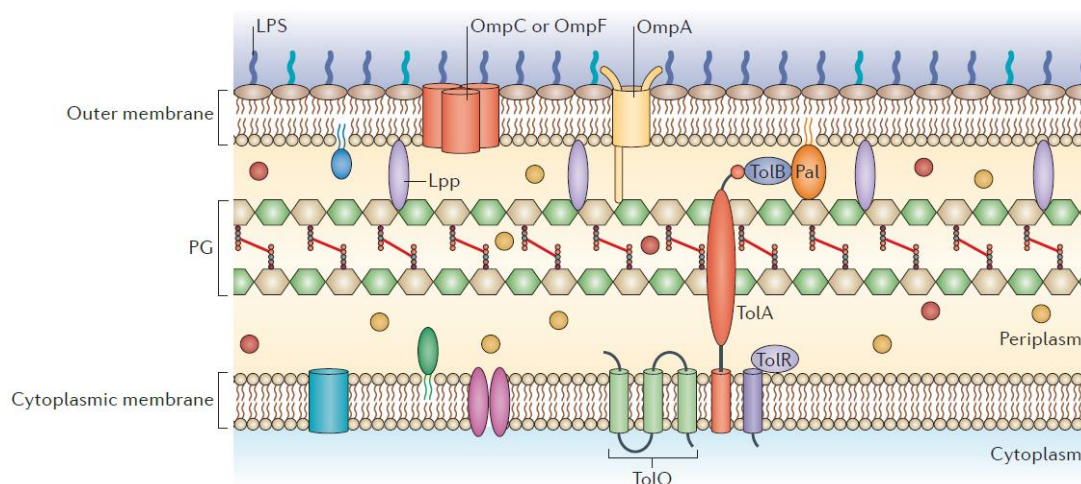
терапии, расположены на плаزمидах [4, 5, 60]. Такие штаммы *Y. pestis* являются потенциальным средством биотерроризма [61]. В литературных данных имеются также сообщения о возникновении невосприимчивых к антибиотикам штаммов псевдотуберкулёзного микроба, что связано с наличием у бактерии R-плазмиды [9, 10].

1.1.2 Характеристика поверхностных структур псевдотуберкулёзного и чумного микробов

1.1.2.1 Строение наружной мембраны грамотрицательных бактерий

Клетки грамотрицательных бактерий окружены наружной мембраной, которая отделена периплазматическим пространством от цитоплазматической мембраны. Схематическое изображение строения внешней мембраны представлено на рисунке 2.

В отличие от цитоплазматической мембраны, состоящей из бислоя фосфолипидов, наружная мембрана несёт на внутренней своей части фосфолипиды, а на внешней представлена в основном молекулами липополисахарида. Одним из интересных следствий присутствия молекул ЛПС на поверхности наружной мембраны является то, что благодаря этому бактериальная клетка становится гораздо сильнее электрически заряженной, чем если бы была покрыта слоем фосфолипидов. Заряд при нейтральном рН является преимущественно отрицательным, так как образован в основном фосфорильными и карбоксильными группами [63].



LPS – липополисахарид; Omp A, Omp C, Omp F – порины; Lpp – липопротеин Брауна; PG – пептидогликан; Tol-Pal – комплекс пептидогликана, ассоциированного с липопротеином; оранжевые и красные кружочки – растворимые белки периплазмы; розовые овалы и голубой цилиндр – трансмембранные белки; голубой и зеленый овалы – белки, ковалентно связанные с липидами мембраны (липопротеины)

Рисунок 2 – Строение внешней мембраны грамотрицательных бактерий [62]

Периплазма представляет собой окислительную среду, обеспечивающую фолдинг белков. В ней находится слой пептидогликана, который представляет собой полимер, состоящий из чередующихся молекул N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты. Сеть молекул пептидогликана обеспечивает бактерии ее форму и защищает от разрушения при перепадах осмотического давления. Белки периплазматического пространства находятся в растворимом виде (периплазматические белки), а также могут быть ассоциированными с мембранами, либо заякоренными в бислой за счет ковалентных связей с фосфолипидами.

Стабильность структуры внешней оболочки грамотрицательных бактерий поддерживается за счет перекрестных связей между слоями. Липопротеин Брауна образует ковалентные связи между внешней мембраной и пептидогликаном. Пептидогликан нековалентно связан с белками наружной мембраны – поринами Omp A. Также совместно с липопротеинами, периплазматическими и интегрированными в мембрану белками пептидогликан участвует в формировании

комплекса Tol-Pal, который через периплазму образует связь между наружной и цитоплазматической мембранами [62, 64].

Несмотря на свою стабильность, внешняя мембрана не статична. Например, считается, что молекулы ЛПС движутся по поверхности клетки, при этом вращаясь вокруг своей длинной оси, и сгибая O-боковые цепи. Факторы окружающей среды, а также связи с другими молекулами наружной мембраны, например, поринами, влияют на подвижность ЛПС [63].

1.1.2.2 Липополисахарид

Липополисахарид представляет из себя структуру, состоящую из липида А, олигосахарида кора и полисахаридов специфических O-боковых цепей [65, 66]. Выход ЛПС при его выделении по методу Вестфalia составляет 1-3 % от сухой биомассы [67].

При повышенных температурах культивирования псевдотуберкулёзный микроб образует колонии R-, либо SR-типа, синтезирующие лишенный O-боковых цепей, либо содержащий одну полимерную единицу O-боковых цепей ЛПС. Понижение температуры культивирования *Y. pseudotuberculosis* ниже 27 °C приводит к значительному повышению синтеза O-боковых цепей, что обуславливает образование гладких колоний S-типа [68]. Чумной микроб, неспособный синтезировать O-антиген, образует только колонии R-типа. Полисахаридная последовательность ЛПС *Y. pseudotuberculosis* серотипа O:1b представлена на рисунке 3.

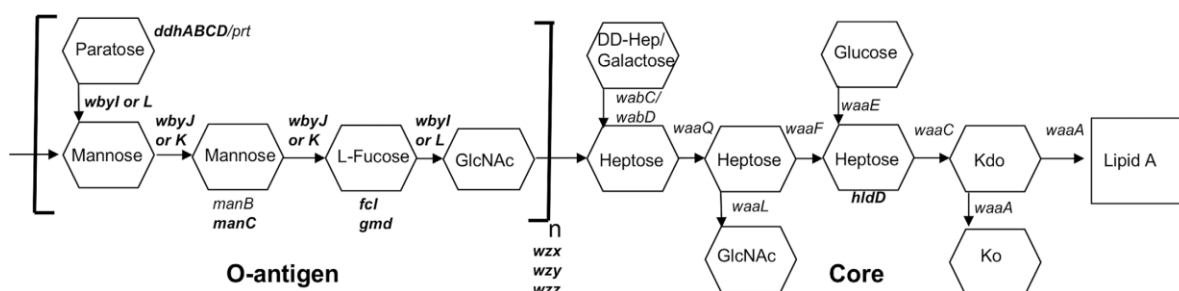


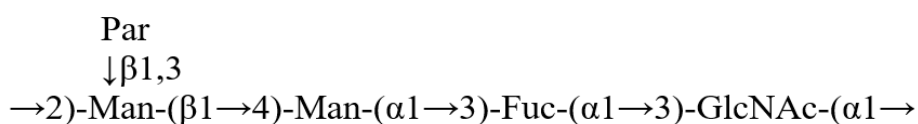
Рисунок 3 – Схематическое строение липополисахарида *Y. pseudotuberculosis* серотипа O:1b штамма IP32953 [69]

Липид А, как и кор изучаемых иерсиний, является высококонсервативной частью молекулы ЛПС. Так, показано, что липиды А *Y. pestis* и *Y. enterocolitica* имеют структуру, сходную с липидами А других энтеробактерий [70]. Встраивание липида А во внешнюю мембрану происходит за счет электростатических сил и гидрофобного взаимодействия [71]. Липид А имеет углеводную основу, представленную $\beta(1-6)$ -связанными остатками D-глюкозамина (GlcNI и GlcNII) [68]. Степень ацилирования липида А иерсиний находится в непосредственной зависимости от температуры культивирования. Для бактерий *Y. pestis*, выращенных при температуре 21 °С, характерно присутствие в основном гексаацилированного липида А, и в меньшем количестве тетра-, пента- и гептаацилированных форм. Встречаются и данные о триацильных формах [72, 73]. При температуре 37 °С липид А чумного микроба в основном тетраацилирован, но может быть также три- и пентаацилированным. *Y. pseudotuberculosis* продуцирует при пониженных температурах тетра-, пента- и гексаацилированные формы. При температуре 37 °С липид А псевдотуберкулёзного микроба находится главным образом в содержащей пальмитат С16:0 пентаацилированной форме [71, 74], но может быть также и тетра- и гексаацилирован.

Строение коровой части липополисахарида различных штаммов *Y. pestis* хорошо изучено [75-80]. Данных о строении кора псевдотуберкулёзного микроба в литературе значительно меньше [77, 82]. В структуре кора можно выделить высококонсервативный пентасахаридный фрагмент, называемый внутренним кором, в состав которого входят три остатка *L*-глицеро-*D*-манно-гептозы (LD-Нер) и два остатка 3-дезоксид-*D*-манно-окт-2-улозоновой кислоты (кетодезоксиоктоновой кислоты, Kdo) [72]. При понижении температуры культивирования остаток Kdo в боковой цепи заменяется остатком *D*-глицеро-*D*-тало-окт-2-улозоновой кислоты (Ko) [76, 77]. К внутреннему кору ЛПС бактерий двух названных видов могут быть присоединены характерные для иерсиний моносахариды и неуглеводные заместители, состав которых изменяется в зависимости от температуры культивирования микробов [75-77], либо, как в случае

штаммов *Y. pestis* биоваров *caucasica*, *altaica*, внешний остаток гептозы может не нести моносахаридного заместителя [72].

О-боковые цепи ЛПС псевдотуберкулёзного микроба являются гетерополимерами, состоящими из повторяющихся олигосахаридных звеньев [65]. На основании различий в структуре О-антигена в настоящее время выделяют 21 серотип псевдотуберкулёзного микроба [83-85], некоторые из них разделяются на подгруппы. Генетические и структурные данные по синтезу О-боковых цепей известны для 18 серотипов [83, 85-88]. В состав О-антигена *Y. pseudotuberculosis* входят остатки таких моносахаров как абеквоза, 6-деокси-альтрофураноза, аскарилоза, колитоza, дидеоксигексоза, L-фукоза, D-галактоза, N-ацетилгалактозамин, D-глюкоза, N-ацетилглюкозамин, 6-деокси-манно-гептопираноза, D-манноза, паратоза, тивелоза, иерсиниоза [84]. О-боковые цепи псевдотуберкулёзного микроба примечательны тем, что для большинства серовариантов характерно присутствие редкого иммунодоминантного сахара боковой ветви – 3,6-дидеоксигексозы (DDH) [83, 85, 88]. Согласно данным М. Skurnik et al. [87], повторяющееся звено О-боковых цепей ЛПС серотипа O:1b имеет структуру, представленную на рисунке 4.



Par – паратоза, Man – D-манноза, Fuc – L-фукоза, GlcNAc – N-ацетилглюкозамин

Рисунок 4 – Повторяющееся звено О-боковых цепей ЛПС *Y. pseudotuberculosis* серотипа 1b

В работе [85] указано, что О-антиген *Y. pseudotuberculosis* серотипа O:1b содержит в своем составе боковую ветвь DDH, а также что паратоза находится в фуранозной форме.

В геноме бактерий *Y. pestis* обнаружен кластер генов, на 98,9 % идентичный таковому, ответственному у *Y. pseudotuberculosis* серотипа O:1b за синтез О-боковых цепей [65]. Из 17 генов, идентифицированных в этом кластере у

Y. pseudotuberculosis O:1b, у чумного микроба 5 инактивированы за счет делеций или инсерций [65]. Среди инактивированных генов находятся ответственные за синтез молекул-предшественников компонентов O-боковых цепей, вследствие чего их сборка становится невозможной.

Помимо ЛПС на внешней мембране иерсиний присутствует еще один полисахаридный компонент – общий энтеробактериальный полисахаридный антиген (или ЕСА) [72]. Выделяют две формы этого полисахарида – линейную, присоединенную к фосфолипиду или липиду А, и безлипидную циклическую. Для *Y. pestis* определена структура циклической формы [89].

Спектр биологического действия ЛПС очень широк. В частности, ЛПС чумного микроба способствует устойчивости к комплементзависимому лизису и катионным антимикробным белкам, являющимся элементами врожденного иммунитета теплокровного животного [90].

Липид А ответствен за большинство физиологических эффектов, вызываемых ЛПС в организме животных и человека, таких как пирогенность, токсичность, реакция Швартцмана [11]. Благодаря своей уникальной структуре и конформации липид А играет существенную роль в функциях мембраны как барьера проницаемости для гидрофобных молекул и участвует в поддержании целостности мембраны и формы клетки. Возможно также, что благодаря гидрофобному взаимодействию липид А стабилизирует конформацию белков внешней мембраны [11]. Также за счет липида А ЛПС обладает цитокининдуцирующей активностью, которая уменьшается с уменьшением степени его ацилирования [72].

Кор ЛПС играет существенную роль в устойчивости бактерии к действию нормальной сыворотки крови. Вероятно, коровая часть способствует правильной укладке белка Ail, играющего ключевую роль в устойчивости к действию сыворотки [72]. Уменьшение размера кора ЛПС сказывалось в опытах *in vitro* на способности образовывать *Y. pestis* биопленки и на способности блокировать преджелудок блох [91].

Считается, что отсутствие в липополисахариде *Y. pestis* О-антигена способствует увеличению стехиометрической доступности активатора пламиногена Pla к высокомолекулярному субстрату, чем облегчает неконтролируемый протеолиз тканей зараженного млекопитающего и обеспечивает распространение чумного микроба внутри макроорганизма [72].

О-антиген энтеропатогенных иерсиний, в том числе и *Y. pseudotuberculosis*, также является фактором патогенности, играя важную роль в колонизации тканей хозяина, обеспечении устойчивости возбудителя к катионным антимикробным пептидам и комплемент-опосредованному лизису [92]. Показано, что О-антиген принимает участие в адгезии бактерий *Y. pseudotuberculosis* к эукариотическим клеткам [93], и, вполне вероятно, по этой причине лишенные О-боковых цепей мутантные штаммы иерсиний не способны достигать пейеровых бляшек, а также проникать в эпителиальные клетки так же эффективно, как бактерии дикого типа [65].

1.1.2.3 Белки наружной мембраны

Доминирующими белками наружной мембраны грамотрицательных бактерий являются так называемые неспецифические порины. Образующие поринами водозаполненные каналы за счет пассивной диффузии пропускают гидрофильные молекулы с размером до 600 Да [94-96]. Субъединица порина представляет собой состоящий из 8-16 β -тяжей антипараллельный β -баррель, несущий короткие периплазматические и длинные наружные петли [97]. Порины пересекают мембрану под углом от 35 до 50° [98]. В большинстве случаев три субъединицы формируют в наружной мембране гомономер, устойчивый к действию детергентов и протеаз. Однако в интактной мембране могут встречаться гексамеры и наномеры поринов [96]. Петля L2 ограничивает доступ к поре с внешней стороны мембраны, формируя своеобразный «козырек». Самая длинная петля L3 погружена внутрь канала и участвует в механизме его открытия-закрытия, образуя сужение – «глазок». Присутствующие в «глазке» заряженные остатки в значительной степени влияют на проницаемость и ионоселективность канала [96].

Неспецифические порины имеют как правило довольно высокую степень гомологии первичной структуры, порядка 60-80 %, и молекулярную массу субъединицы 30-50 кДа. В поринах отсутствуют достаточно протяженные участки, состоящие из гидрофобных аминокислотных остатков, которые прошивают мембранный бислой в случае α -спирализованных мембранных белков [96]. Особенности первичной структуры поринов патогенных иерсиний является высокое содержание глицина (11-13 %), значительное содержание кислых аминокислот (аспарагиновой и глутаминовой), отсутствие цистеина и низкое содержание лизина, а также достаточно высокое содержание ароматических аминокислот – около 13 % [97, 99, 100].

Результаты генетического анализа генов *ompF* и *ompC* показали, что порины Omp F псевдотуберкулёзного и чумного микробов имеют большую степень гомологии [99], чем порины Omp F и Omp C *Y. pseudotuberculosis* [100]. Факторы внешней среды оказывают существенное влияние на биосинтез поринов, наибольший вклад вносят температура, pH и осмолярность среды [100].

Для ряда бактерий показано, что порины Omp F синтезируются преимущественно при росте на бедных питательных средах при пониженных температурах и осмотическом давлении [101, 102]. Температура культивирования является ключевым фактором, влияющим на экспрессию порина Omp F [102]. Его синтез высок при пониженных температурах и снижается при температуре 37 °С. Кажущиеся молекулярные массы тримера порина Omp F и денатурированного мономера составляют соответственно 105-120 и 40 кДа [103]. Показано, что наружные петли порина Omp F псевдотуберкулёзного микроба характеризуются высокой внутри- и межвидовой гетерогенностью [97]. Это может свидетельствовать о высокой значимости этих участков для адаптации к разнообразным условиям внешней среды.

При повышенной температуре культивирования на богатой питательной среде при высоком осмотическом давлении бактерии *Y. pseudotuberculosis* преимущественно синтезируют порин Omp C [100]. Кажущаяся молекулярная масса денатурированного мономера порина Omp C составляет 41,3 кДа [100].

Показано, что порин Omp C псевдотуберкулёзного микроба ближе к Omp C *Escherichia coli*, нежели к белку Omp F *Y. pseudotuberculosis* [100]. Петли L2 и L6 участвуют в формировании антигенной структуры этого порина.

Порины являются термочувствительными белками. При их нагревании до температуры 50-70 °С происходит необратимый фазовый переход и тример распадается на мономеры [94].

Петли поринов могут являться рецепторами, распознаваемыми бактериоцинами, бактериофагами, белками системы комплемента и антителами [97, 104]. Известно, что гидрофильные антибиотики проникают в бактериальную клетку посредством неспецифических поринов. Уменьшение количества пор в наружной мембране для некоторых энтеробактерий является механизмом развития антибиотикорезистентности [102].

Помимо Omp F и Omp C существуют малоизученные порины наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis*, функции которых до конца не ясны, например порин Omp Y [105, 106].

Для обоих видов бактерий характерно присутствие в наружной мембране белка Omp A, который способствует выживанию патогенов внутри эукариотических клеток [107, 108]. Белок Omp A участвует в связывании наружной мембраны с пептидогликаном [109], а также обладает порообразующей активностью [110].

На наружной мембране рассматриваемых иерсиний также расположены белки, отвечающие за адгезию и инвазию патогенов. К ним относят инвазин, адгезин Yad A, белок Ail и др. [111].

Инвазин обеспечивает адгезию и проникновение бактерий внутрь клеток хозяина. У *Y. pestis* ген, ответственный за синтез инвазина, инактивирован в связи со сдвигом рамки считывания [111]. Этот белок с молекулярной массой 103 кДа максимально секретируется при температуре 25-30 °С и слабощелочных значениях pH, а также, в несколько меньшей степени, при 37 °С и кислых значениях pH [112, 113].

Для *Y. pseudotuberculosis* характерен синтез белка Yad A (*Yersinia adhesin A*), кодируемого плазмидой вирулентности иерсиний pYV [111]. У *Y. pestis* данный белок не синтезируется из-за сдвига рамки считывания соответствующего гена [114]. Синтез белка Yad A происходит при температуре 37 °С и не зависит от присутствия в среде ионов Ca²⁺, что характерно для других белков, кодируемых плазмидой вирулентности иерсиний [115, 116]. Адгезин Yad A представляет собой тример, образующий на поверхности бактерии фибриллярные структуры, часто имеющие форму леденца [117]. Адгезия за счет белка Yad A является неспецифичной и осуществляется посредством гидрофобных взаимодействий. Этот белок ответственен за прикрепление *Y. pseudotuberculosis* к эукариотическим внеклеточным и поверхностным структурам, клеткам и тканям, аутоагглютинацию, а также за защиту бактерий от действия человеческой сыворотки, но не влияет на вирулентность псевдотуберкулёзного микроба [111, 114, 116, 118-122].

Ail, называемый также Omp X, представляет собой белок с молекулярной массой 17 кДа [111], который локализуется на поверхности бактериальной клетки. Ail экспрессируется у *Y. pestis* при температурах 26-37 °С, но не при 6 °С [123]. Этот белок участвует в процессах адгезии патогенных иерсиний к компонентам внеклеточного матрикса эпителиальных клеток, инвазии, обеспечения резистентности к комплемент-опосредованному лизису клеток, выживания бактерий в клетках макрофагов и интернализации бактериальных клеток [124-126].

На поверхности бактерии *Y. pestis* при температуре выше 36 °С и pH ниже 6,7 синтезируются фимбрии, которые состоят из белка, названного pH6-антигеном (pH 6 Ag; Psa A) [127]. Этот антиген присутствует и в клетках *Y. pseudotuberculosis* [128]. pH6-антиген опосредует агглютинацию эритроцитов, адгезию микроба к эпителиальным клеткам, участвует в эффективной доставке эффекторных белков Yops в клетки хозяина [129, 130].

В последние годы идентифицирован ряд поверхностных белков патогенных иерсиний, участвующих в транспорте низкомолекулярных веществ и адгезии

бактерий к эукариотическим клеткам или белкам внеклеточного матрикса: Yар С [131], Yар Е [132], Yар V, Yар К, Yар J [133].

В составе наружной мембраны некоторых грамотрицательных бактерий, в том числе и *Y. pseudotuberculosis*, обнаружены так называемые multivalent adhesion molecules (МAM). Один из семейства названных белков, МAM7, с высокой эффективностью связывается с фибронектином и фосфатидной кислотой мембраны эукариотических клеток, усиливая патогенетический потенциал бактерий [134, 135].

Pla-белок локализуется на внешней мембране *Y. pestis* (клетки *Y. pseudotuberculosis* не способны к его продукции) и обладает протеолитической активностью, он может расщеплять и активировать плазминоген – свойство, которое, как было показано, имеет важное значение для способности *Y. pestis* инфицировать макроорганизм через периферический маршрут. Pla может также опосредовать адгезию *Y. pestis* к эпителиальным клеткам и внеклеточному матриксу млекопитающих [136].

1.1.2.4 Везикулы чумного и псевдотуберкулёзного микробов

Многие грамотрицательные бактерии способны продуцировать везикулы – OMVs (outer membrane vesicles). Они представляют собой частицы сферической или округлой формы, размером 20-250 нм, в состав которых входят фосфолипиды, белки наружной мембраны, ЛПС и содержимое периплазмы [137, 138]. OMVs позволяют ферментам достигать отдаленных целей в концентрированной и защищенной форме. Везикулы также играют роль в выживании бактерий: их продукция является бактериальной реакцией на стресс и важна для получения питательных веществ, развития биоплёнки и патогенеза [138].

Y. pestis продуцирует везикулы со средним размером около 100 нм, содержащие связанные с вирулентностью белки наружной мембраны, в том числе адгезин Ail, внешний фимбриальный F1-антиген и протеазу Pla [139]. Также OMVs *Y. pestis* способны связываться с компонентами внеклеточного матрикса, такими как фибронектин и ламинин. Количество OMV-ассоциированных белков

увеличивается с повышением температуры культивирования до 37 °С, а также в ответ на мембранный стресс и мутации в генах, кодирующих RseA, Hfq и липопротеин Брауна Lpp [139].

Для псевдотуберкулёзного микроба нами было показано, что антиген, известный ранее как Б-антиген представляет собой везикулы [140]. Б-антиген секретируется клетками *Y. pseudotuberculosis* при глубинном культивировании, имеет сходство с ЛПС по углеводному и жирнокислотному составам, но характеризуется достаточно высоким содержанием белка – 5-8 % [141, 142]. OMVs возбудителя псевдотуберкулёза синтезируется при температурах 10 и 37 °С. Размеры везикул *Y. pseudotuberculosis* колеблются от 10 до 250 нм [140].

1.1.3 Моноклональные антитела к антигенам *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*

В литературных источниках представлены сведения о получении моноклональных антител к антигенным детерминантам и чумного, и псевдотуберкулёзного микробов.

В.А. Фёдоровой с соавторами [143] получен набор гибридом, продуцирующих МКАт к коровой части ЛПС *Y. pestis* в R-форме. Панель этих МКАт была использована для определения видо- и родоспецифичных детерминант, расположенных на ЛПС *Y. pestis*.

Во многих лабораториях, в том числе и российских, были получены гибридомы, синтезирующие МКАт к F1-антигену *Y. pestis*, которые широко используются в исследовательской и биотехнологической практике. Так, линия гибридных культивируемых клеток животных *Mus musculus* 13F8 [144], которые продуцируют МКАт к этому антигену, относящиеся к IgG1 подклассу иммуноглобулинов мыши, депонирован в государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск», коллекционный номер Н18.

Моноклональные антитела F1-04-A-G, полученные к F1-антигену [145], а также моноклональные антитела МАб 7,3 к V-антигену [146] защищают мышей от

бубонной и легочной форм чумы [147]. Это позволяет надеяться на то, что указанные моноклональные антитела могут быть использованы для отработки схем лечения чумы человека.

Имеются данные о получении моноклональных антител к белку активатора плазминогена (Pla) *Y. pestis*. Так, описана панель моноклональных антител, специфически выявлявших в иммуноблотинге антиген Pla в области молекулярных масс 37 и 35 кДа [148]. Данные МКАт, будучи строго специфичными, могут быть использованы для обнаружения штаммов, не способных к синтезу F1-антигена. Также была получена панель МКАт, которые распознают различные эпитопы, расположенные на молекуле фибринолизина *Y. pestis* [149]. Эти МКАт являются видоспецифическими и не взаимодействуют в перекрестных реакциях с другими грамотрицательными бактериями, обладающими активностью активатора плазминогена. МКАт ингибируют фибринолитическую и коагулазную активности чумного микроба. На основе этих моноклональных антител была разработана тест-система, позволяющая быстро и строго специфично выявлять штаммы *Y. pestis* вне зависимости от температуры культивирования [149].

Имеется сообщение о получении моноклональных антител к искусственно синтезированному трисахариду гаптену, повторяющему часть внутреннего кора ЛПС чумного микроба [150]. Данные МКАт показали себя высокочувствительными и специфичными и могут быть использованы для разработки диагностических систем для выявления *Y. pestis*.

В литературе имеются данные о получении и использовании в исследовательской работе МКАт к другим антигенам чумного микроба. Вместе с тем сведений о получении гибридом, синтезирующих МКАт к антигенам *Y. pseudotuberculosis*, относительно мало. В работе [151] описано получение двух линий гибридом (1F₃ и 1D₅), секретирующих МКАт к *Y. pseudotuberculosis*, которые взаимодействуют с шестью серовариантами возбудителя вне зависимости от температуры культивирования бактерий. Данные антитела видоспецифичны в отношении псевдотуберкулёзного микроба. Было показано, что полученные антитела связываются с белком молекулярной массы 38±2 кДа в лизатах бактерий

Y. pseudotuberculosis серовариантов I, III, IV и V, или белком с молекулярной массой 40 ± 2 кДа в лизатах клеток *Y. pseudotuberculosis* II и VI серовариантов. Авторы сделали вывод, что эпитоп расположен на порине. МКАТ 1F₃ и 1D₅ могут найти применение при создании иммуноферментных тест-систем для лабораторной диагностики *Y. pseudotuberculosis* [151].

МКАТ 1B10, полученные к инвазину *Y. pseudotuberculosis*, были использованы для изучения функций этого белка [152].

В серии работ саратовских исследователей из НИПЧИ «Микроб» представлены результаты получения МКАТ к белковым эпитопам *Y. pseudotuberculosis* и их использованию для серотипирования возбудителя и проведения иных иммунохимических исследований [153-155]

Учитывая филогенетическую близость трёх патогенных видов иерсиний, некоторые из МКАТ, полученных к какому-либо антигену бактерий одного из них, с той или иной аффинностью могут взаимодействовать с антигенами других видов. Так, есть данные о получении кроличьих моноклональных антител RabMabs, выявляющих белок наружной мембраны YopM патогенных бактерий рода *Yersinia*. Одно из полученных антител, RabMabs 41.3, взаимодействующее с N-концевым участком YopM, распознавало все YopM-экспрессирующие штаммы патогенных иерсиний, но не распознавало непатогенные изоляты. Эта линия МКАТ может быть использована для обнаружения патогенных штаммов иерсиний [156].

Две линии из панели полученных моноклональных антител – Mab9-200 и Mab9-15 – к белкам *Y. enterocolitica*, кодируемым плазмидой кальцийзависимости и секретирующимся в среде с дефицитом ионов кальция, показали способность взаимодействовать с белками псевдотуберкулёзного микроба I и III серотипов [157].

Была получена панель из четырёх линий моноклональных антител, реагирующих с ЛПС чумного микроба. Эти МКАТ имели перекрестные реакции с клетками *Y. pseudotuberculosis* [78]. Набор гибридом, полученных В.А. Фёдоровой и соавторами к ЛПС *Y. pestis*, содержал гибридомы, продуцирующие МКАТ, которые выявляли ЛПС не только *Y. pestis*, но и ЛПС *Y. pseudotuberculosis* [143].

1.2 Бактериофаги, специфичные в отношении *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*

1.2.1 Общие сведения о бактериофагах

1.2.1.1 Жизненный цикл бактериофагов

Бактериофаги представляют собой вирусы, инфицирующие бактериальные клетки и археи [158]. Бактериофаги, или по крайней мере их генетический материал, внедряются внутрь восприимчивой бактериальной клетки и запускают цикл синтеза фаговых частиц. При этом происходит трансформация биосинтетического аппарата клетки, в частности рибосом и системы продукции АТФ. Различные пути перепрограммирования запускаются белками бактериофагов, транслирующимися с фаговой мРНК, которая синтезируется после инъекции [159].

Выделяют умеренные и литические бактериофаги. В ходе литического цикла сначала происходит репликация генетического материала бактериофага, затем синтез структурных белков фаговых частиц. После этого происходит сборка дочерних частиц бактериофага, которые впоследствии высвобождаются из клетки. В общем случае выброс фаговых частиц происходит в результате разрушения бактериальной оболочки и лизиса клеток, содержимое которых, включающее новые частицы фагов, поступает в окружающую среду. От момента заражения бактерии до лизиса проходит в среднем 40 минут [159]. Количество фаговых частиц, образовавшихся в результате лизиса одной бактериальной клетки, зависит от вида бактерии и бактериофага и может находиться в диапазоне от 20 до 1000 [13].

Умеренные бактериофаги имеют альтернативный жизненный цикл. При этом одна часть зараженных бактериальных клеток идет по литическому пути, в то время как другая часть выживает после инфицирования бактериофагом, после чего несёт в себе геном бактериофага, называемый профагом. Под воздействием определённых факторов, например, облучения ультрафиолетом, клетки, несущие профаг, могут вновь перейти на литический путь [159].

1.2.1.2 Химический состав и морфология бактериофагов

По химическому составу бактериофаги состоят как минимум из двух компонентов, представленных в структуре вириона в приблизительно равных пропорциях, – белков и нуклеиновых кислот [13]. Нуклеиновые кислоты некоторых бактериофагов, например, T2, T4 и T6, имеют уникальную химическую структуру [13]. Генетический материал разных видов бактериофагов может быть представлен одноцепочечными или двухцепочечными нитями как ДНК, так и РНК [158]. Белки являются структурными компонентами, формирующими капсид. Рецептор-связывающие белки также играют ключевую роль в процессе адсорбции бактериофагов на поверхность клетки-хозяина [160, 161].

Существуют бактериофаги, которые имеют в своем составе также липидный компонент [162-166]. Липиды в виде бислоя могут либо образовывать самый внешний слой вириона, либо располагаться внутри капсида [167]. Липидсодержащие бактериофаги чаще всего относятся к семействам *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Cystoviridae* и *Plasmaviridae* [167, 168]. Жирнокислотный состав липидного компонента бактериофагов сходен с таковым клетки-хозяина [162, 164]. Липидный бислой необходим таким бактериофагам в процессе проникновения в восприимчивую бактериальную клетку [164, 167].

Н.-В. Askermann за десятки лет исследований изучил с помощью электронной микроскопии более 5500 различных бактериофагов [158, 169-171]. Показано, что абсолютное большинство вирионов (порядка 96 %) имеют хвосты и относятся к порядку *Caudovirales* [171]. Более 60 % имеющих хвосты бактериофагов принадлежат к семейству *Siphoviridae* и имеют длинный несокращающийся хвост. Остальные представители имеют полиэдрическое, нитчатое или плеоморфное строение, и различные семейства этих бактериофагов не группируются в порядок [158]. Разнообразие морфотипов бактериофагов представлено на рисунке 5.

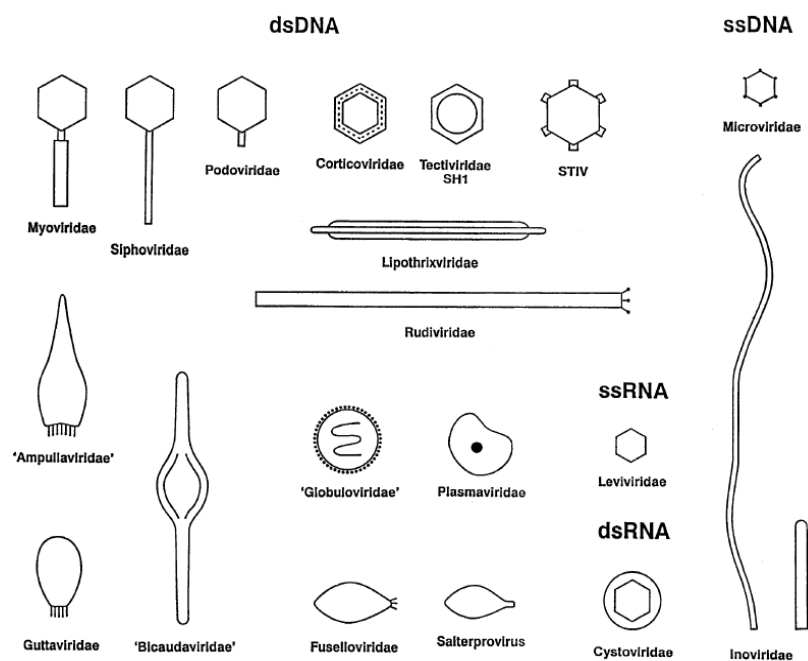


Рисунок 5 – Морфотипы бактериофагов [158]

В настоящее время таксономическая классификация бактериофагов продолжает уточняться и дополняться [173].

1.2.1.3 Химическая природа рецепторов бактериофагов

Адсорбция бактериофагов в общем случае происходит в три стадии. На стадии первоначального контакта происходят случайные столкновения между фаговыми частицами и бактериальными клетками за счет Броуновского движения, дисперсии, диффузии или движения жидкости. Затем происходит стадия обратимого прикрепления, благодаря чему бактериофаг остаётся вблизи поверхности клеток для поиска специфичных рецепторов [174]. На последней стадии адсорбции происходит необратимое прикрепление бактериофага. Некоторые бактериофаги обладают ферментативной активностью, обеспечивающей доступ к рецепторам [175]. Для ряда бактериофагов характерно наличие двух рецепторов. Рецептор-связывающие белки бактериофага и рецепторы на поверхности бактерии не всегда одни и те же в процессах обратимого и необратимого связывания [176-181]. Например, в случае бактериофага T5, специфичного в отношении бактерии *E. coli*, хвостовые нити обратимо связываются с полиманнозой группой O-антигена ЛПС, а необратимое

взаимодействие происходит за счет связывания хвостового белка P_b 5 с белком наружной мембраны Fhu A [182].

Ввиду сложности строения и высокой плотности упаковки клеточной стенки грамположительных бактерий, рецепторы, с которыми взаимодействуют специфичные бактериофаги, на настоящий момент недостаточно хорошо изучены. Работ в отношении рецепторов бактериофагов грамположительных бактерий гораздо меньше, чем посвященных рецепторам бактериофагов грамотрицательных бактерий [183]. В целом можно сказать, что большинство рецепторов бактериофагов грамположительных бактерий расположены на пептидогликане или тейхоевых кислотах [175, 184]. Подавляющее большинство бактериофагов, использующих для адсорбции альтернативные структуры на поверхности бактериальных клеток (белки, пелликулы), используют пептидогликан и тейхоевые кислоты для обратимого прикрепления [175]. Это указывает на чрезвычайную важность названных структур для процесса адсорбции бактериофагов на поверхность грамположительных бактерий.

Бактериофаги грамотрицательных бактерий могут взаимодействовать с различными компонентами наружной мембраны. Рецепторы бактериофагов могут быть расположены на коре или О-антигене ЛПС. Ввиду того, что О-антиген является высоковариабельной структурой, а коровая часть – более консервативной, то бактериофаги, специфичные в отношении бактерий S-типа, в основном имеют более узкий диапазон хозяев, чем те, которые взаимодействуют с R-типом бактерий [185]. Рецепторами бактериофагов могут быть также белки наружной мембраны, в частности порообразующие белки Omp A, Omp F и Omp C, рецепторы витаминов, белки Ton A (Fhu A) и Ton B, белок Omp X и другие белки [175, 185]. Ряд бактериофагов для рецепции используют одновременно белковые и полисахаридные структуры [186, 187]. Ещё одним примечательным фактом является то, что некоторые бактериофаги семейства *Podoviridae* не только адсорбируются на наружной мембране, но и способны энзиматически разрушать углеводные структуры О-антигена [185, 184].

Бактериальные структуры, обращённые в окружающую среду, такие как капсула, жгутики и пили, также могут участвовать в процессе адсорбции бактериофагов. И хотя эти структуры присущи и грамположительным бактериям, в настоящее время в литературе имеются данные об их участии в рецепции только для грамотрицательных бактерий [175, 184, 185].

Капсулы, а также слои слизи образованы вырабатываемыми бактериями липкими веществами, состоящими из полисахаридов и белков [188]. Адсорбция бактериофагов на указанные структуры опосредуется энзиматическим расщеплением экзополисахаридов, которые входят в состав таких слоев. Это является стадией обратимого прикрепления, необратимое связывание происходит за счет взаимодействия бактериофага со структурами на внешней мембране [185]. Большинство бактериофагов, обладающих рецептор-распознающими белками, которые взаимодействуют с экзополисахаридами, относятся к семейству *Podoviridae* [175].

Белки жгутиков бактерий могут участвовать в обратимой адсорбции бактериофагов. Спиральное движение жгутиков позволяет бактериофагам двигаться к поверхности бактериальной клетки, где происходит необратимое связывание вблизи основания жгутика [189-191]. Например, бактериофаги φ CbK и φ Cb13 используют для обратимого прикрепления жгутики, а необратимое связывание происходит с пили-портами на полюсе клетки [191]. Пили для прикрепления чаще всего используют бактериофаги, отличные от бактериофагов порядка *Caudovirales* [175]. Примечательно, что бактериофаги могут быть избирательны по отношению к определенным частям пилей. Например, колифаг *f1* взаимодействует только с концевой частью пилей [192], а фаг φ б связывается с их боковой частью [193].

1.2.2 Чумные и псевдотуберкулёзные бактериофаги

1.2.2.1 Характеристика чумных бактериофагов

Исходя из различий в антигенных свойствах, морфологии, вирулентности, структуре генома и специфичности в отношении *Y. pestis*, было выделено четыре серовара чумных бактериофагов [194]. Серовар 1 включает в себя все известные литические бактериофаги, такие как d'Herelle, Покровской, φA1122, Н (описанный D.M. Molnar и W.D. Lawton), Y, Yер-phi, Berlin, Yерe2, YpP-R, YpP-G, YpsP-G и ещё 21 бактериофаг [46]. Эти бактериофаги имеют изометрическую гексагональную головку и короткий конический несокращающийся хвост. Они принадлежат к семейству *Podoviridae*, морфотип С1 [46, 194, 195]. К серовару 2 относится большинство всех известных умеренных чумных бактериофагов, таких как N, фаг Н, описанный Н.Н. Новосельцевым (не тот же бактериофаг, который принадлежит серовару 1), L-94 и L-413. Они имеют изометричную полигональную головку и длинный (110-160 нм), способный к сокращению хвост. Бактериофаги второго серовара относятся к семейству *Myoviridae*, морфотипу А1 [46, 194, 195]. К серовару 3 принадлежит только один лизогенный бактериофаг II [196]. К серовару 4 принадлежат умеренные бактериофаги Tal и 513 [197].

Бактериофаг φA1122 был выделен в 1933 году из крови больного бубонной формой чумы [195]. Этот бактериофаг является близкородственным колифагу Т7 [195] и относится к семейству *Podoviridae* и морфотипу С1 [175]. Бактериофаг φA1122 используется американскими центрами по контролю и профилактике заболеваний (Centers for Disease Control and Prevention – CDC) для идентификации чумного микроба [198]. φA1122 лизирует *Y. pestis* при температурах 20 и 37 °С, а также псевдотуберкулёзный микроб, выращенный при температурах выше 28 °С [195, 198]. Помимо названных иерсиний данный бактериофаг лизирует *E. coli* К-12 штамма J511, но значительно менее эффективно, чем чумной микроб [195]. Геном бактериофага φA1122 секвенирован (GenBank accession no. AY247822) [195]. Показано, что рецептор, распознаваемый бактериофагом φA1122, расположен на коре ЛПС в области HerI/Glc – Kdo/Ко [14, 195].

Литический бактериофаг Покровской является высокоэффективным в отношении *Y. pestis*. Он был выделен в 1929 г. М.П. Покровской из тканей зараженных чумой сусликов *Spermophilus sp.*, используется в России и странах СНГ в диагностических целях для выявления чумного микроба [46]. Этот бактериофаг относится к семейству *Podoviridae*, морфотипу C1 [175]. Рецептор бактериофага Покровской расположен на участке НерIII/НерII – НерI/Glc кора ЛПС чумного микроба [14]. Бактериофаг Покровской способен лизировать от 6,1 до 19 % штаммов псевдотуберкулёзного микроба [199].

Геном бактериофага Yere2 полностью секвенирован (GenBank accession no. EU734170) [200]. Наиболее генетически близким к Yere2 является бактериофаг YrP-G [201]. Область кора ЛПС, имеющая критическое значение для успешной адсорбции Yere2, является НерIII/НерII [202].

Бактериофаг L-413C является мутантом, способным к лизису бактерии *Y. pestis*, произошедшим от умеренного бактериофага L-413 [199]. Этот бактериофаг структурно и генетически наиболее близок энтеробактериофагу P2 [194]. Среди всех диагностических бактериофагов он является наиболее видоспецифичным в отношении *Y. pestis*, он не способен к лизису псевдотуберкулёзного микроба [199]. Согласно [199], имеются литературные данные о существовании штаммов чумного микроба, невосприимчивых к бактериофагу L-413C, некоторые штаммы *E. coli* и шигелл являются восприимчивыми к рассматриваемому бактериофагу. По ультраструктуре вириона бактериофаг L-413C относится к семейству *Myoviridae*, морфотипу A1 [199]. Он имеет способный к сокращению хвост и изометрическую головку. Рецептор, с которым взаимодействует бактериофаг L-413C, расположен на участке кора ЛПС НерIII/НерII(GlcNAc) – НерI/Glc [14]. Геном бактериофага L-413C секвенирован (GenBank accession no. EU734170) [199].

В Китае для выявления чумного микроба используется выделенный там же бактериофаг Yer-phi. Геном этого бактериофага секвенирован (GenBank accession no. HQ333270) [200]; показано, что он генетически наиболее близок бактериофагу Berlin, геном которого также секвенирован (GenBank accession no. AM183667) [200,

201]. Бактериофаг Yер-phi генетически довольно близок и бактериофагу Yерe2 [200, 201]. Yер-phi является T7-родственным бактериофагом и относится к семейству *Podoviridae* [203]. Согласно [203], бактериофаг Yер-phi является более видоспецифичным в отношении *Y. pestis*, чем бактериофаг φA1122, он не способен лизировать бактерии других видов рода *Yersinia* независимо от температуры их культивирования. В рецепции этого бактериофага принимают участие ЛПС R-типа, а также белки наружной мембраны Ail и Omp F [203].

Для ряда иных, менее употребляемых в диагностической практике чумных бактериофагов показано, что их прикрепление к бактериальной клетке происходит на молекуле ЛПС; определены участки, имеющие критическое значение для их рецепции: для P2 *vir 1* – GlcNAc, для φJA1 – Kdo/Ko, для T7_{Yp} – HerI/Glc, для Y – HerI/Glc [14].

1.2.2.2 Характеристика псевдотуберкулёзных бактериофагов

В целом, псевдотуберкулёзные бактериофаги, в сравнении с чумными, охарактеризованы хуже. Многие бактериофаги, признанные специфичными в отношении *Y. pestis*, способны к лизису *Y. pseudotuberculosis* [195, 198, 199, 204]. Выделяют как минимум три серовара псевдотуберкулёзных бактериофагов [205]. В настоящее время наиболее хорошо охарактеризованными псевдотуберкулёзными бактериофагами являются d'Herelle-m, R и PST.

Бактериофаг d'Herelle-m использовался для идентификации псевдотуберкулёзного микроба на постсоветском пространстве [206]. А.А. Филиппов et al. называют его также «псевдотуберкулёзным диагностическим бактериофагом» [206], однако в соответствующей литературе нет сведений о том, является ли выпускаемый РосНИПЧИ «Микроб» «бактериофаг псевдотуберкулёзный диагностический» бактериофагом d'Herelle-m. Бактериофаг d'Herelle-m относится к группе бактериофагов T7 [202], семейству *Podoviridae* [201]. Геном бактериофага d'Herelle-m полностью секвенирован (GenBank accession no. JQ965703) [46]. В настоящее время в литературных источниках

отсутствуют данные о расположении рецептора, распознаваемого данным бактериофагом [202].

Бактериофаги R и PST способны лизировать 92-100 % штаммов *Y. pseudotuberculosis*, а также большинство штаммов *Y. pestis* [14]. R-бактериофаг (R означает «Русский») также называют бактериофагом Котляровой [14, 206]. Он родственен бактериофагу T7 [202], относится к семейству *Podoviridae* [201]. Рецептор, распознаваемый этим бактериофагом, расположен за пределами коровой части ЛПС [14].

Бактериофаг PST по своей морфологии имеет сходство с бактериофагом T4 [207, 202]. Относится к семейству *Myoviridae* [201], серовару III [205]. Рецептор, распознаваемый бактериофагом PST, расположен на коре ЛПС псевдотуберкулёзного и чумного микробов на участке НерII/НерIII [14].

1.2.2.3 Использование бактериофагов для лечения и диагностики

Идея лечения инфекционных заболеваний бактериофагами зародилась в 20-х годах XX века с работ F. d'Herelle и других исследователей [208]. Открытие антибиотиков после Второй мировой войны, а также неустойчивая эффективность лечения бактериофагами привели к тому, что применение фаготерапии было прекращено по всему миру, за исключением стран Восточной Европы, главным образом Польши, России и Грузии [208]. В России препараты бактериофагов назначают перорально, в виде аэрозолей, используют для орошения ран и вводят в дренированные полости [209].

Интерес к бактериофагам как возможному лечебному средству вновь усилился в связи с появлением в последние десятилетия устойчивых к антибиотикам штаммов патогенов [210]. В настоящее время продолжаются споры о целесообразности использования бактериофагов в качестве терапевтического средства [211, 212, 213].

На ранних этапах становления фаготерапии ученые и медики сталкивались с такими проблемами, как недостаточное понимание биологии бактериофагов, что вело за собой выбор умеренных бактериофагов в качестве антимикробного

средства, недостаточная очистка используемых препаратов от бактериальных клеток и бактериального дебриса, инактивация бактериофагов в процессе хранения [210, 214]. Одной из проблем, связанных с применением бактериофагов, является их свойство быстро выводиться из организма пациента. Для решения этой проблемы в настоящее время получены бактериофаги, способные циркулировать в организме млекопитающих длительное время [210, 214]. В целом, возможности фаготерапии требуют дальнейшего анализа, глубокого изучения природы бактериофагов и их рецепторов, особенно важно изучение взаимодействия бактериофага с бактерией в условиях *in vivo*, а также проведение клинических испытаний с соблюдением всех современных методик постановки таких исследований. Возможно также применение бактериофагов совместно с антибиотиками [210, 211].

В 1925 году в качестве первой попытки лечения бактериофагами чумы F. d'Herelle обработал высоковирулентным чумным бактериофагом, выделенным в 1920 году, четверых заболевших бубонной чумой [25]. Препарат бактериофага был введен путем инъекции в бубоны, после чего было зафиксировано понижение температуры тела заболевших и уменьшение болевых ощущений в бубонах [25].

Литические бактериофаги L-413C и фA1122 являются перспективными средствами терапии чумы, что было показано в опытах на мышах [14]. Однако показано, что бактериофаги, как потенциальные средства противочумной терапии, не способны лизировать находящиеся внутри макрофагов бактерии *Y. pestis* [14].

Перспективным может быть создание препаратов, содержащих несколько бактериофагов, что позволит расширить спектр бактерий-хозяев, в отношении которых возможна эффективная фаготерапия. Такой подход позволяет также снизить риск возникновения невосприимчивых к разнородному «фаговому коктейлю» бактериальных штаммов за счет присутствия в нем бактериофагов, взаимодействующих с различными рецепторами на поверхности бактериальной клетки. Так, был разработан состоящий из пяти бактериофагов препарат, названный «YPP-100», который позволял лизировать 59 штаммов *Y. pestis* на твердых поверхностях [201].

В качестве альтернативы антибиотикам также предлагают использовать фаговые лизины, способные гидролизовать пептидогликан. Была разработана методика получения гибридного лизина, способного проникать через наружную мембрану чумного микроба и разрушать глубже расположенный пептидогликан [215].

Представляется интересным использование бактериофагов при разработке вакцин. Так, например, модифицированный бактериофаг T4, несущий белок F1mut-V, был использован для создания чумной вакцины [216, 217]. Белок F1mut-V состоит из двух частей: мутированного капсульного белка F1 и V-антигена (белка Lcr V), которые индуцируют высокий уровень образования специфических антител, но слабый клеточный иммунный ответ [218].

Бактериофаги традиционно используются в диагностических целях. Ряд литических бактериофагов высокоспецифичны в отношении *Y. pestis* и используются для выявления этого возбудителя. К этим бактериофагам относятся бактериофаги Покровской, φA1122, L-413C и Yер-phi [194, 195, 198, 199, 200, 203].

Согласно данным литературы, на территории России ведется поиск и селекция специфичных в отношении возбудителя псевдотуберкулёза бактериофагов, позволяющих в том числе проводить дифференциацию штаммов *Y. pseudotuberculosis* [219, 220]. Также имеются сообщения о разработке диагностического биопрепарата на основе специфичных в отношении псевдотуберкулёзного микроба бактериофагов [220, 221].

Недостатками стандартной методики проведения литического теста является то, что он занимает 24-36 ч и требует оборудованной лаборатории [222]. Были разработаны усовершенствованные методы диагностики, позволяющие существенно сократить время анализа. Например, за счет введения гена *luxAB* был получен флуоресцентно-меченый бактериофаг φA1122 [222]. Использование этого бактериофага позволяет получать положительный сигнал в течение 10-15 мин после добавления фага к культуре *Y. pestis*. Бактериофаги L-413C и φA1122 были использованы в разработке быстрого метода выявления бактерий *Y. pestis* за счет использования подхода количественной ПЦР в реальном времени qPCR [223].

1.2.3 Методические подходы к характеристике рецепторов бактериофагов

Существует ряд методических подходов, используемых для выявления рецепторов, с которыми связываются бактериофаги.

Первый принципиальный подход к изучению расположения рецепторов бактериофагов заключается в разрушении различными способами структур, ответственных за взаимодействие с бактериофагами с последующей оценкой литической способности фага. Потенциальными рецепторами на поверхности грамотрицательных бактерий, как правило, являются белки наружной мембраны и ЛПС. Для разрушения компонентов наружной мембраны белковой природы используют протеиназы, чаще всего протеиназу К (КФ 3.4.21.64), способную расщеплять нативные неденатурированные белки. [198, 203]. Протеиназа К относится к сериновым протеиназам и имеет оптимум рН в диапазоне 7.5 – 12.0. Каталитическая активность этого фермента направлена на пептидные связи, соседствующие с карбоксильной группой алифатических и ароматических аминокислот [224]. Для разрушения полисахаридных компонентов в такого рода экспериментах используют йодную кислоту или ее соль – периодат натрия [198, 203], под действием которых расщепляются углеродные связи, по обе стороны от которых расположены ОН-группы, в процессе чего образуются диальдегиды [225].

Второй подход состоит в получении мутантных бактериальных клеток, невосприимчивых к бактериофагу. Мутантные клетки могут быть спонтанно возникающими естественным путем. В этом случае для установления структуры, ответственной за рецепцию бактериофага, ищут различия в химическом составе наружных мембран или клеточных стенок невосприимчивых и восприимчивых к бактериофагу бактериальных клеток [186, 226]. В последнее время все большее распространение приобрел способ получения мутантных клеток с помощью генной модификации, когда прицельно изменяются гены, ответственные за синтез потенциальных для адсорбции бактериофагов химических структур [14, 227-230]. Используются также случайные вставки в бактериальный геном заранее известной последовательности нуклеотидов [231].

Еще одним подходом к изучению механизма рецепции является ингибирование бактериофага. Методика заключается в добавлении к суспензии бактериофага выделенного и очищенного компонента, который является потенциальным носителем рецептора. Если бактериофаг связался с рецептором, то в дальнейшем он не может адсорбироваться на бактериальных клетках и образовывать бляшки [232-235].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Штаммы микроорганизмов

В работе использовали следующие штаммы микроорганизмов:

- 1) *Y. pseudotuberculosis*, серотип *1b*, получен из коллекции ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (кат. № 474), с 1980 г. хранился в лиофилизированном состоянии;
- 2) *Y. pestis*, штамм *EV*, вакцинный, получен из коллекции ООО «Агровет»;
- 3) *E. coli*, штамм *M17*, выделен из препарата «Колибактерин» производства ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России;
- 4) *Staphylococcus aureus*, штамм № 6538-*p*, получен из коллекции АТСС (США).

2.2 Бактериофаги

В работе были использованы следующие препараты бактериофагов:

- 1) коммерческий бактериофаг псевдотуберкулёзный диагностический производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», сер. 15, концентрация бактериофага - $1.8 \cdot 10^8$ БОЕ/ мл;
- 2) коммерческий бактериофаг чумной Покровской производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», сер. 15, концентрация бактериофага – $7 \cdot 10^6$ БОЕ/ мл.

Содержимое ампул коммерческих препаратов бактериофагов перед использованием разводили в 1 мл буфера для работы с бактериофагами (SM) (0.58 % NaCl, 0.2 % MgSO₄·7 H₂O, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5) [236].

2.3 Антигенные препараты

- 1) препараты ЛПС *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* лабораторного изготовления, выделенные методом О. Westphal с помощью водно-фенольной экстракции [67];
- 2) коммерческий препарат ЛПС, выделенный из клеток *E. coli* 055:B5 («Difco», США);

3) препараты Б-антигена выделяли из культуральных жидкостей, полученных в результате культивирования *Y. pseudotuberculosis* при температурах 10 и 37 °С в жидкой питательной среде на основе солянокислотного гидролизата казеина методом аффинной хроматографии, используя колонку с CNBr-активированной сефарозой («Sigma», США), конъюгированной с МКАт1 (см. ниже);

4) порины OmpF и OmpC *Y. pseudotuberculosis* получены из Тихоокеанского института биоорганической химии, где были выделены и очищены согласно методикам, описанным в работе [237].

2.4 Антитела и антивидовые конъюгаты

1) В музее нашей лаборатории хранятся гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела девяти линий. Гибридомы, продуцирующие МКАт1-4, были получены путем иммунизации мышей линии BALB/с клетками *Y. pseudotuberculosis* с бустерным введением смеси препаратов ЛПС, которые были выделены из культур, выращенных при температуре 37 и 10 °С. Для получения гибридом-продуцентов МКАт5-9 мышей иммунизировали Б-антигеном, выделенным из клеток *Y. pseudotuberculosis*, которые выращивали при температуре 37 °С. Скрининг гибридом первой группы проводили по ЛПС *Y. pseudotuberculosis*, второй группы – по Б-антигену, но не ЛПС. Культуры указанных гибридом внутрибрюшинным способом вводили мышам линии BALB/с в дозе 2–5 млн живых клеток на одно животное, через 9–12 суток отсасывали и центрифугировали содержимое брюшной полости. В работе использовали соответствующие препараты надосадочной жидкости, обозначенные как МКАт1-9.

2) Поликлональная лошадиная агглютинирующая сыворотка (ПЧС) к цельным клеткам *Y. pestis* (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»).

3) Конъюгат пероксидазы с козьими антителами к иммуноглобулинам G, M, A мыши («Sigma», США).

4) Конъюгат пероксидазы с (Fab)₂-фрагментами козьих антител против иммуноглобулинов G, A, M мыши («Sigma», США).

2.5 Оборудование

Термостат BD 53 (E2) (Binder, Германия); нагревающее устройство с магнитной мешалкой RCT basic safety control (IKA-Werke, Германия); магнитная мешалка HI 180 (Hanna instruments, Италия); шейкер-инкубатор IKA KS 4000 ic control (IKA-Werke, Германия); электронный микроскоп JEM-2100 (Jeol, Япония); камера Keen View (Olympus, Германия); устройство для промывки микропланшет PW 40 (Bio-Rad, США); микропланшетный ридер Anthos 2020 (ЗАО «БиоХимМак», Россия); Protean II xi Cell (Bio-Rad, США); Trans-Blot SD semi-dry transfer cell (Bio-Rad, США); набор оборудования для проведения вертикального электрофореза, (Bio-Rad, США); термошейкер Thermo Shaker PST-60HL-4 (BIOSAN, Латвия); шейкер IKA KS 4000 ic control (IKA-Werke, Германия); центрифуга Centrifuge 5424 (Eppendorf, Германия); pH-метр «pH-410» (Аквилон, Россия); термостат ТС-80М-2 (ПО Медлабортехника, Россия); ультрафильтрационная установка (Владисарт, Россия); ультрафильтрационные ячейки с набором мембран (Millipore, США); спектрофотометр SmartSpecPlus (BioRad, США); микроскоп Бимам-13, центрифуга Universal 320 (Hettich, Германия); замораживатель (Иней 3-4); термостат жидкостной MultiTemp III (Amersham Biosciences, Швеция); микроскоп инвертированный Микромед И (Микромед, Россия); автоклав Tuttnauer 3870 M (Tuttnauer Europe BV, Нидерланды); весы аналитические Vibra AF-R220CE (Shinko, Япония); холодильник низкотемпературный MDF-U2086S (Sanyo, Япония); система водоподготовки Elix 3 (Millipore, Германия); ламинарные шкафы I и II класса защиты; дистиллятор ДЭ-4М (Электромедоборудование, Россия); весы UW420H (Shimadzu, Япония).

2.6 Методы

2.6.1 Определение концентрации микроорганизмов

Общую концентрацию микробных клеток определяли по стандартному образцу мутности ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича, а также по оптической

плотности (ОП) при длине волны 600 нм на спектрофотометре SmartSpecPlus (BioRad, США).

Концентрацию жизнеспособных клеток определяли высевом на чашки Петри с БТН-агаром («Биотехновация», Россия) методом серийных разведений.

2.6.2 Определение титра бактериофагов

Определение титра бактериофага проводили методом агаровых слоев Грациа [238] с незначительными модификациями. Готовили серию десятикратных разведений бактериофага в буфере SM. В стеклянных пробирках смешивали 1 мл соответствующего разведения бактериофага и 100 мкл суспензии бактерий тест-штамма в концентрации $(2-3) \cdot 10^8$ м.к./мл. Для адсорбции фаговых частиц на бактериальные клетки пробирки термостатировали на водяной бане при температуре 37 °С в течение 20 мин для псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага, либо в течение 10 мин для бактериофага Покровской. Затем в пробирки приливали по 3 мл 1.5 % БТН-агара («Биотехновация», Россия), предварительно нагретого до температуры 47 °С. Содержимое пробирки перемешивали интенсивным вращением в ладонях и выливали на чашки Петри с предварительно подсушенным нижним 3 % БТН-агаром. Подсчет бляшек проводили для *Y. pseudotuberculosis* через 17-20 ч культивирования при температуре 37 °С, для *Y. pestis* штамма EV – через 40-48 ч при температуре 27 °С.

2.6.3 Методика выделения и очистки иерсиниозных бактериофагов

Культуры *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* выращивали на чашках Петри с БТН-агаром («Биотехновация», Россия) в течение ночи при температуре 37 °С либо в течение двух суток при температуре 27 °С соответственно. Газон с чашки Петри смывали 2 мл раствора SM. Концентрацию клеток доводили до значения $2 \cdot 10^{10}$ м.к./мл. Концентрация препарата бактериофага псевдотуберкулёзного диагностического составляла $1.8 \cdot 10^8$ БОЕ/мл, бактериофага Покровской – $7 \cdot 10^6$ БОЕ/мл. Смешивали 1 мл суспензии бактериальных клеток с 200 мкл препарата специфического бактериофага. Полученную суспензию

помещали на 20 минут на водяную баню, нагретую до температуры 37 °С, для адсорбции.

Колбу Эрленмейера вместимостью 1 л, содержащую 200 мл жидкой питательной среды на основе солянокислотного гидролизата казеина (солянокислотный гидролизат казеина, разведенный в фосфатном буферном растворе до содержания аминного азота 100 мг%, рН 7.6; среда предварительно была простерилизована автоклавированием при 1 атм в течение 15 мин) предварительно подогревали до температуры 37 °С. Из колбы в пробирку отбирали 3 мл питательной среды в качестве контроля. Содержимое пробирки с адсорбированным на бактериальные клетки бактериофагом переносили в колбу Эрленмейера, перемешивали и отбирали 3 мл суспензии в стерильную стеклянную пробирку. Дополнительно готовили пробирку с жидкой питательной средой, содержащей бактериальную культуру в концентрации, аналогичной концентрации бактерий в колбе.

Колбы и пробирки культивировали на шейкере-инкубаторе ИКА KS 4000 ic control («ИКА», Германия) при 100 качаниях/ мин и температурах 37 или 27 °С в течение ночи или двух суток для псевдотуберкулезного и чумного микробов соответственно. Окончание процесса культивирования определяли по контрольным пробиркам, фиксируя, что в пробирке с бактериальной культурой без бактериофага наблюдался заметный рост.

Для выделения и очистки бактериофага в колбу с культуральной жидкостью добавляли 4 мл хлороформа и выдерживали 10 минут при температуре 37 °С и 100 качаниях/ мин на шейкере-инкубаторе ИКА KS 4000 ic control («ИКА», Германия). Затем колбу охлаждали до комнатной температуры, добавляли ДНКазу («Boehringer Mannheim GmbH», Германия) и РНКазу («Boehringer Mannheim GmbH», Германия) до конечной концентрации каждого из ферментов 1 мкг/ мл и выдерживали в течение 30 минут. После этого к суспензии приливали 50 мл 5М раствора хлорида натрия и выдерживали в течение 1 часа на льду. Бактериальный дебрис осаждали на центрифуге Universal 320 R (Hettich, Германия) при 1000 g в течение 15 мин при температуре 4 °С. Объем супернатанта измеряли и добавляли

требуемое для получения 10 %-ного раствора количество ПЭГ-8000 («AppliChem», Германия). Раствор выдерживали в течение ночи на льду до выпадения кристаллов. Кристаллы осаждали центрифугированием при 11000 g при температуре 4 °С в течение 15 минут. После удаления супернатанта пробирки помещали в перевернутое наклонное положение на 5 минут для удаления остатков жидкости. После этого в каждую пробирку приливали по 0.15 - 1 мл буфера SM в зависимости от объёма осадка, перемешивали с помощью пипетки с широким носиком и оставляли на 1 час при комнатной температуре. Содержащий бактериофаг раствор SM собирали в центрифужную пробирку и добавляли равное по объёму количество хлороформа. Содержимое пробирки интенсивно перемешивали вращением в течение 30 сек. Разделение фракций производили центрифугированием при 3000 g при температуре 4 °С в течение 15 минут, затем отбирали содержащую бактериофаг водную фракцию и добавляли к препарату азид натрия до концентрации 0.1 %. При отработке методики применялся метод стерилизации полученных препаратов бактериофагов микрофильтрацией через нитроцеллюлозу с диаметром пор 0.2 мкм. Полученный препарат хранили в холодильнике при температуре 4 °С. Титр полученного препарата бактериофага определяли по методу Грациа.

Для фиксирования изменения концентрации бактериофага на каждой стадии выделения и очистки отбирали пробы по 1 мл соответствующей содержащей бактериофаг жидкости и определяли титр бактериофага по методу Грациа. Объёмы получаемых растворов измеряли.

2.6.4 Методика определения влияния инфицирующей дозы (MOI) на выход бактериофага псевдотуберкулёзного диагностического

В 10 mM растворе сульфата магния готовили суспензию клеток *Y. pseudotuberculosis* с концентрацией $1 \cdot 10^9$ м.к./ мл. Псевдотуберкулёзный диагностический бактериофаг разводили в буфере SM с десятикратным шагом препарата, начиная с исходной концентрации $5 \cdot 10^8$ БОЕ/ мл и заканчивая концентрацией $5 \cdot 10^4$ БОЕ/ мл. В стерильных пробирках смешивали 100 мкл

бактериальной суспензии со 100 мкл каждого из разведений бактериофага. В пробирке, являющейся контрольной, смешивали 100 мкл бактериальной суспензии со 100 мкл буфера SM. Пробирки помещали на 20 минут на водяную баню, нагретую до температуры 37 °С, и затем в каждую из пробирок приливали по 4 мл жидкой питательной среды на основе солянокислотного гидролизата казеина, среда предварительно была простерилизована микрофльтрацией через фильтры из нитроцеллюлозы («Владисарт», Россия) с диаметром пор 0.2 мкм. В дополнительную стерильную пробирку была прилита только питательная среда без внесения образцов бактерий или бактериофага для контроля стерильности. Пробирки культивировали в термостате при температуре 37 °С в течение двух суток. По окончании процесса культивирования измеряли оптическую плотность в образцах при длине волны 600 нм (в качестве образца с нулевой оптической плотностью использовали стерильную питательную среду). Бактериальные клетки и дебрис осаждали центрифугированием при 1000 g в течение 10 минут на центрифуге Universal 320 R («Hettich», Германия), и в супернатанте определяли титр бактериофага по методу Грациа.

2.6.5 Оценка культуральных свойств бактериофагов при различных температурах

Культуры *Y. pseudotuberculosis* серотипа 1b и *Y. pestis* штамма EV в концентрации 300-400 млн м.к./ мл высевали по 100 мкл на три чашки Петри с плотной питательной средой на основе БТН-агара для получения равномерного газона. После подсыхания поверхность агара делили на два сектора и наносили на каждую из чашек в соответствующий сектор по 5 мкл коммерческих препаратов бактериофагов псевдотуберкулёзного диагностического либо чумного Покровской. Чашки помещали в термостаты с температурами инкубирования 10, 27 и 37 °С. Результаты оценивали на первые и вторые сутки для культур, выращенных при температурах 27 и 37 °С, и на шестые сутки для культур, выращенных при 10 °С.

2.6.6 Оценка влияния бактериофагов на везикулообразование иерсиний

Бактериальные культуры выращивали на плотной питательной среде на основе БТН-агара («Биотехновация», Россия) и в жидкой питательной среде на основе солянокислотного гидролизата казеина в течение 1 суток при температуре 37 °С для *Y. pseudotuberculosis* и при температуре 27 °С для *Y. pestis*. Общую концентрацию микробов оценивали по оптической плотности при длине волны 600 нм. Концентрацию жизнеспособных бактерий определяли чашечным методом. Концентрацию фаговых частиц определяли по методу Грациа.

Инкубацию объединенной суспензии микробных клеток (в общей концентрации $\sim 8 \cdot 10^8$ м.к./мл) и бактериофага в соотношении $\sim 1:1$ (по общей концентрации бактерий и частиц фага) проводили в течение 20 минут при температуре 37 °С для *Y. pseudotuberculosis* и при температуре 27 °С для *Y. pestis*. По истечении времени инкубации осуществляли высеv клеток методом серийных разведений. Одновременно готовили для высева образцы бактериофага, с этой целью к объединенной суспензии бактерий и фага добавляли хлороформ (2.5 %). Титр фаговых частиц далее определяли по методу Грациа.

Число везикулообразующих бактерий определяли методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ).

2.6.7 Методика оценки адсорбционной активности живых и убитых бактерий иерсиний

После культивирования на БТН-агаре («Биотехновация», Россия) *Y. pseudotuberculosis* в течение ночи (18-20 ч) при температуре 37 °С, *Y. pestis* – в течение 48 часов при температуре 27 °С бактериальные клетки смывали с поверхности агара забуференным физраствором (ЗФР) (0.01 М фосфатный буфер с 0.8% NaCl, pH 7.3). К половине полученной суспензии бактерий добавляли формальдегид до концентрации 0.3 % и выдерживали в течение 2 часов при комнатной температуре. Бактериальные культуры разводили в жидкой питательной среде на основе солянокислотного гидролизата казеина, простерилизованной микрофльтрацией через нитроцеллюлозный фильтр с

диаметром пор 0.2 мкм («Владисарт», Россия), до концентрации $1 \cdot 10^9$ м.к./ мл. Бактериофаги разводили до концентрации $8 \cdot 10^5$ БОЕ/ мл в буфере SM. Объединяли 500 мкл указанной суспензии бактериальных клеток со 100 мкл препарата бактериофага. В качестве контроля суспензию бактериофага смешивали с жидкой питательной средой в аналогичном объёмном соотношении. Смесь бактериальных клеток с бактериофагами и контрольный препарат выдерживали на термошейкере Thermo Shaker PST-60HL-4 («BIOSAN», Латвия) при 500 качаниях/ мин и температуре 37 °С. После инкубации бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 15870 g на центрифуге Centrifuge 5424 («Eppendorf», Германия) в течение 10 мин. 100 мкл разведенной в буфере SM надосадочной жидкости смешивали со 100 мкл суспензии живых бактериальных клеток в концентрации $\sim 5 \cdot 10^8$ м.к./ мл. Для подсчета числа БОЕ проводили высев образцов по методу Грациа.

2.6.8 Определение химической природы рецепторов бактериофагов

Культуры иерсиний смывали с помощью ЗФР с питательного агара, инактивировали путем добавления формальдегида до концентрации 0.3 % и доводили концентрацию клеток до значения $2 \cdot 10^9$ м.к./ мл. Клетки обрабатывали периодатом натрия и протеиназой К по описанным ниже методикам. Бактериофаг разводили до концентрации $8 \cdot 10^5$ БОЕ/ мл в буфере SM. Смешивали 500 мкл каждого препарата бактериальных клеток, разведенных в простерилизованной микрофильтрацией через фильтры из нитроцеллюлозы с диаметром пор 0.2 мкм («Владисарт», Россия) жидкой питательной среде на основе солянокислотного гидролизата казеина, со 100 мкл раствора бактериофага и выдерживали на термошейкере Thermo Shaker PST-60HL-4 («BIOSAN», Латвия) при 500 качаниях/ мин и температуре 37 °С в течение 1.5 ч. В качестве контроля 100 мкл препарата бактериофага смешивали с 500 мкл жидкой питательной среды. После инкубации препараты центрифугировали при 15870 g на центрифуге Centrifuge 5424 («Eppendorf», Германия) в течение 10 мин. Надосадочную жидкость разводили в SM 1:100 и смешивали 100 мкл разведения и 100 мкл суспензии живых

бактериальных клеток в концентрации $\sim 2 \cdot 10^8$ м.к./ мл. Дальнейшее определение вели согласно методике определения титра бактериофага.

2.6.9 Методика оценки конкуренции антител и бактериофагов за сайты адсорбции

Инактивированные 0.3 % формальдегидом бактериальные клетки доводили до концентрации $8 \cdot 10^9$ м.к./ мл с помощью ЗФР, содержащего МКАт. Моноклональные антитела и ПЧС были разведены следующим образом: МКАт 1, 2, 5, 6, 7, 9 и ПЧС – 1:100; МКАт3, 4, 8 – 1:50. Бактериальные клетки выдерживали в растворе антител 1.5 ч при температуре 37 °С, осаждали центрифугированием при 15870 g на центрифуге Centrifuge 5424 («Eppendorf», Германия) в течение 10 мин и отмывали однократно в жидкой питательной среде, простерилизованной микрофильтрацией через фильтры из нитроцеллюлозы («Владисарт», Россия) с диаметром пор 0.2 мкм. Концентрацию клеток доводили до значения оптической плотности 1.2 при длине волны 600 нм и смешивали 500 мкл суспензии бактериальных клеток со 100 мкл раствора бактериофага в концентрации $8 \cdot 10^5$ БОЕ/ мл. Полученную смесь выдерживали в течение 1,5 ч на термошейкере Thermo Shaker PST-60HL-4 («BIOSAN», Латвия) при 500 качаниях/ мин и температуре 37 °С. Бактериальные клетки, адсорбировавшие на своей поверхности частицы бактериофага, осаждали центрифугированием при 15870 g на центрифуге Centrifuge 5424 («Eppendorf», Германия) в течение 10 мин. 10 мкл надосадочной жидкости разводили в 100 раз в SM и объединяли 100 мкл разведенной надосадочной жидкости со 100 мкл суспензии живых бактериальных клеток в концентрации $\sim 2 \cdot 10^8$ м.к./ мл. Дальнейший анализ вели согласно методике определения титра бактериофага.

2.6.10 Твёрдофазный иммуноферментный анализ

Лунки микротитровальных планшетов («Greiner BioOne», Германия) в течение 18 ч при температуре 6–8 °С сенсibilизировали 100 мкл препаратов ЛПС, Б-антигена в концентрации 10 мкг/мл или инактивированных клеток в концентрации $2 \cdot 10^8$ м.к./ мл, разведенных в карбонат-бикарбонатном буфере

(КБК). Лунки трижды отмывали ЗФР, содержащим 0.05% твин-20 (буфер для отмывки) с помощью устройства для промывки микропланшет PW 40 («Bio-Rad», США). Затем проводили блокировку лунок планшета 250 мкл блокирующего буфера (1 % бычий сывороточный альбумин (БСА) («Диаэм», Россия) в буфере для отмывки) в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего выдерживали в течение 30 мин в 250 мкл буфера для отмывки. Далее в лунки добавляли 100 мкл МКАт, разведенных в буфере для отмывки (МКАт1, 2, 5, 7, 9 – 1:2000, МКАт3, 4, 8 – 1:200, МКАт6 – 1:500), и инкубировали при температуре 37 °С в течение 1.5 ч. Затем отмывали 4 раза, вносили 100 мкл козьего антимышиного конъюгата в разведении 1:2000 в буфере для отмывки с 0.5% БСА и после инкубации (1 ч при комнатной температуре) четырежды отмывали. Вносили 100 мкл субстрата (0,04 % ортофенилендиамин («Alfa Aesar», Великобритания) в 0.1 М цитратном буфере, рН 4.7–5.0, с добавлением 0.05 % пероксида водорода) и после 30 мин инкубации в защищенном от света месте вносили 50 мкл 1н H₂SO₄ для остановки реакции. Результаты реакции регистрировали с помощью микропланшетного ридера Anthos 2020 (ЗАО «БиоХимМак», Россия) и выражали в единицах оптической плотности при $\lambda = 492$ нм (ОП₄₉₂).

2.6.11 Обработка антигенных препаратов периодатом натрия

Для исследования методом ИФА инактивированные формальдегидом клетки ресуспендировали в 0.05 М ацетатном буфере, рН 5.2, со 100 мМ периодата Na («Acros Organics», США) (при исследовании влияния концентрации периодата использовали 33, 100, 300 и 900 мМ растворы окислителя) и инкубировали в течение 2 ч в защищенном от света месте при комнатной температуре. Суспензию центрифугировали (360 g, 10 мин), и клетки трижды отмывали в КБК при том же режиме центрифугирования. Осадок клеток ресуспендировали в КБК до концентрации $2 \cdot 10^8$ м.к./ мл. Контролем служили микробные клетки, необработанные периодатом Na, отмывые аналогично опытными образцам. Препараты ЛПС в концентрации 1 мг/мл обрабатывались так же, как микробные

культуры, исключая стадии отмывки, с последующим разведением КБК до концентрации 10 мкг/мл.

Для изучения влияния периодатного окисления на антигенную активность методом иммуноблотинга препараты ЛПС и инактивированные формальдегидом клетки разводили до концентраций 1 мг/мл и 10^{10} м.к./мл соответственно в 0.05 М ацетатном буфере с 400 мМ периодата Na. После инкубации в течение 2 ч при комнатной температуре в защищенном от света месте препараты диализовали в дистиллированной воде в течение 1 сут. В качестве контроля использовались необработанные периодатом препараты ЛПС и клеток, подвергшиеся диализу. Дальнейшую подготовку препаратов проводили, как описано в методике электрофореза (п. 2.6.13).

Для изучения влияния окисления периодатом натрия на способность бактерий связываться со специфичными бактериофагами препараты инактивированных формальдегидом клеток разводили в 2 мл 0.05 М ацетатного буфера, содержащего 100 мМ периодата натрия, до концентрации $2 \cdot 10^9$ м.к./мл. Образцы выдерживали 2 ч при комнатной температуре в защищенном от света месте, после чего осаждали центрифугированием при 15870 g в течение 10 мин и отмывали однократно в 1 мл SM. Концентрацию клеток доводили стерильной жидкой питательной средой до значений, соответствующих оптической плотности 1.2 при длине волны 600 нм. В качестве контрольного использовали препарат бактериальных клеток, разведенный в 0.05 М ацетатном буферном растворе без добавления периодата натрия и подвергшийся аналогичной обработке.

2.6.12 Обработка антигенных препаратов протеазами

Для исследования методом ИФА инактивированные формальдегидом клетки ресуспендировали в ЗФР, pH 7.3, содержащем 0.2 мг/мл фермента (протеиназа К, КФ 3.4.21.64, «Serva», США; трипсин КФ 3.4.21.4, «Ferak Berlin GmbH», Германия; пепсин КФ 3.4.23.1 «Реахим», Россия) и инкубировали в течение 3 ч при температуре 37 °С. Далее клетки (обработанные и контрольные) трижды отмывали и ресуспендировали в КБК, как и при периодатном окислении. Препараты Б-

антигена в концентрации 1 мг/мл обрабатывались так же, как микробные культуры, исключая стадии отмывки, с последующим разведением КБК до концентрации 10 мкг/мл.

Обработку антигенных препаратов протеиназой К для последующего исследования методом иммуноблотинга проводили по Р.Д. Hitchcock и Т.М. Brown [239].

Для оценки влияния действия протеиназы К на способность бактериофагов взаимодействовать с бактериями инактивированные формальдегидом клетки ресуспендировали в 2 мл ЗФР, содержащего 0.2 мг/мл протеиназы К, до концентрации $2 \cdot 10^9$ м.к./мл. Препараты выдерживали на водяной бане 3 ч при температуре 37 °С, осаждали клетки центрифугированием при 15870 g в течение 10 мин и однократно отмывали в буфере SM. Контролем служил препарат бактериальных клеток, разведенных в ЗФР, прогретых 3 ч при температуре 37 °С и отмывтых аналогично рабочему образцу. Концентрацию клеток в препаратах доводили стерильной жидкой питательной средой до значения 1.2 при ОП₆₀₀. Полученную суспензию использовали в методике определения химической природы рецепторов бактериофагов.

2.6.13 Вертикальный электрофорез

Электрофоретическому разделению в ПААГ с Na-ДДС по U.K. Laemmly [240] подвергали очищенные препараты ЛПС (нагрузка на дорожку – 12.5 мкг), поринов (нагрузка на дорожку – 10 мкг), Б-антигена (нагрузка на дорожку – 30 мкг), а также микробные клетки иерсиний (нагрузка на дорожку клеточного лизата соответствовала $200 \cdot 10^6$ м.к.) после кипячения в литическом буфере в течение 5 мин (15 мин для поринов). Электрофорез проводили с помощью Protean II xi Cell («Bio-Rad», США) при постоянной мощности 15 Вт с ограничением по напряжению 400 В в 12.5%-ном ПААГ размером 164·170·0.75 мм с добавлением 4 М мочевины.

Окрашивание геля проводили Кумасси R-250 [241] либо нитратом серебра по С.М. Tsai и С.Е. Frasch [242].

2.6.14 Иммуноблотинг

После электрофоретического разделения антигенные препараты методом полусухого переноса (в Trans-Blot SD semi-dry transfer cell, «Bio-Rad», США) переносили на нитроцеллюлозную бумагу («Millipore», США) при силе тока 2 мА/см² в течение 30 мин в буфере переноса (38.6 мМ глицин, 47.9 мМ Трис, 20 % этанол). После инкубирования в течение 1 ч при комнатной температуре в буфере для блокировки неспецифической сорбции и гибридизации (5 % сухого обезжиренного молока в фосфатном буфере, рН 7.4) лист нитроцеллюлозы инкубировали в течение 3 ч при температуре 26 °С на шейкере ИКА KS 4000 ic control («ИКА-Werke», Германия) при 100 качаниях/ мин в буфере для блокировки неспецифической сорбции и гибридизации, содержащем моноклональные антитела в рабочем разведении: для МКАт1 – 1:2000 (в блотинге, результаты которого отражены на рисунке 14 – 1:500), МКАт2, 5, 7, 9 – 1:1000, МКАт3, 4, 8 – 1:200, МКАт6 – 1:500. По окончании гибридизации лист 3 раза по 5 мин выдерживали в буфере для отмывания (5 % сухого обезжиренного молока, 0.1 % твина-20 в фосфатном буфере, рН 7.4) и инкубировали в буфере для гибридизации, содержащем конъюгат пероксидазы с козьими антителами к иммуноглобулинам G, M, A мыши («Sigma», США) в разведении 1:1000 в течение 2.5 ч при температуре 26 °С на шейкере при 100 качаниях/ мин. Отмывку осуществляли сначала в буфере для отмывания (3 раза по 5 мин), а затем в 0.05 М Na-фосфатном буфере, рН 7.0, в течение 10 мин на шейкере при 100 качаниях/ мин. Блот помещали в раствор субстрата (50 мМ Na-фосфатный буфер, рН 7.0, содержащий 2.3 мМ 3.3'-диаминобензидин хлорида, 0.005 % пероксида водорода и 0.04 % никеля двухлористого) до проявления окрашивания.

2.6.15 Дот-вариант ИФА

Антигенные препараты разводили до концентрации 150 мкг/мл в КБК рН 9.5, а также в литическом буфере для подготовки образцов к электрофорезу, которые подвергались либо не подвергались прогреву на кипящей водяной бане в течение 15 мин. По 3 мкл каждого из препаратов наносили на полоску

нитроцеллюлозы («Millipore», США) и высушивали при комнатной температуре. Дальнейшие процедуры проводили аналогично методике проявления иммуноблотов после перенесения образцов на нитроцеллюлозу. Сыворотки антител использовали в следующих разведениях: МКАт1, 2, 5, 6, 7, 9 – 1:500, МКАт3, 4, 8 – 1:100.

2.6.16 Просвечивающая электронная микроскопия

Препараты микробных клеток и соответствующего бактериофага в соотношении 1:100 (число клеток: число частиц) фиксировали в течение 1 ч при комнатной температуре 2.5 % раствором глутарового альдегида («Serva», Германия). Исследуемые препараты наносили на медные сеточки (200 меш), покрытые углеродной пленкой-подложкой, сорбировали 2 мин, проводили негативное контрастирование 2 % уранилацетатом. Снимки получали на электронном микроскопе JEM-2100 («Jeol», Япония) при ускоряющем напряжении 160 кВ. Фотографирование проводили CCD с помощью камеры Keen View («Olympus», Германия). Ультратонкие срезы контрастировали в растворе уранилацетата и азотнокислого свинца по E.S. Reynolds [243].

При оценке уровня везикулообразования за клетки, образующие везикулы, принимали такие, на теле которых и/или в непосредственной близости вокруг них выявлялись везикулы и/или их агрегаты.

2.6.17 Статистическая обработка полученных результатов

Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами [244].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Культурально-морфологические свойства иерсиниозных бактериофагов

В исследовании были использованы бактериофаги псевдотуберкулёзный диагностический и чумной Покровской, способные лизировать бактерии *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* соответственно. Согласно литературным данным, бактериофаг Покровской в значительной мере охарактеризован [14, 46, 175, 199], в то время как сведений о псевдотуберкулёжном диагностическом бактериофаге производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» в литературных источниках практически нет. В этой связи на первоначальном этапе работы с иерсиниозными бактериофагами следовало дать сравнительную оценку литической способности двух вышеуказанных бактериофагов, а также охарактеризовать культуральные свойства и морфологические особенности псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага.

3.1.1 Влияние температуры культивирования иерсиний на литическую способность бактериофагов псевдотуберкулёзного диагностического и чумного Покровской

Бактерии *Y. pseudotuberculosis* и, в меньшей степени, *Y. pestis* способны расти в широком диапазоне температур. Возбудитель псевдотуберкулёза является психрофилом и способен размножаться при температурах от 4 до 40 °С [11]. Известно также, что температура культивирования оказывает существенное влияние на состав наружной мембраны чумного и псевдотуберкулёзного микробов, что может приводить к изменению концентрации рецепторов, распознаваемых бактериофагами, или влиять на их доступность. В этой связи представлялось целесообразным проверить восприимчивость исследуемых бактерий, выращенных при различных температурных условиях, в отношении бактериофагов псевдотуберкулёзного диагностического и Покровской. Результаты этих исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Литическая активность иерсиниозных бактериофагов при различных температурах культивирования бактерий

Оцениваемый показатель		Бактериальная культура	<i>Y. pseudotuberculosis</i> серотипа 1b					<i>Y. pestis</i> , штамм EV				
			10 °C	27 °C		37 °C		10 °C	27 °C		37 °C	
Температура культивирования			6	1	2	1	2	6	1	2	1	2
Время культивирования, сутки												
Выраженность лизиса для бактериофага...	чумного Покровской		-	-	-	-	-	++	++	++	+	++
	псевдотуберкулезного диагностического		-	+	+	++	++	-	++	++	+	+

Примечание. «-» – отсутствие зоны лизиса; «+», «++» – лизис наблюдается, диаметр зоны лизиса «+» меньше, чем «++».

Как можно видеть из представленных в таблице 1 данных, бактериофаг псевдотуберкулезный диагностический показал способность лизировать культуры бактерий обоих видов, в то время как бактериофаг Покровской оказался видоспецифичным в отношении *Y. pestis*. Бактериофаг Покровской лизировал *Y. pestis* штамма EV с приблизительно одинаковой эффективностью вне зависимости от температуры культивирования бактерии. Меньшие размеры зон лизиса на первые сутки для культур *Y. pestis*, выращенных при температуре 37 °C, по сравнению с таковыми, выращенными при температуре 27 °C, можно объяснить замедленной скоростью роста данного возбудителя при повышенной температуре по сравнению со скоростью роста при оптимальной для нее температуре 27 °C [245] и, соответственно, меньшей скоростью размножения бактериофага.

Бактериофаг псевдотуберкулезный диагностический лизировал культуры бактерий обоих исследуемых видов. При взаимодействии с клетками

Y. pseudotuberculosis бактериофаг оказался способным к размножению в бактериях, выращенных при температурах 27 и 37 °С, но не при температуре 10 °С. Причем лизис активнее шел в отношении культуры, растущей при температуре 37 °С, в сравнении с культурой, находившейся при температуре 27 °С. Таким образом для псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага наблюдается повышение литической активности в отношении псевдотуберкулёзного микроба с ростом температуры культивирования. Этот факт дает возможность предположить, что О-боковые цепи ЛПС, синтезируемые бактериями *Y. pseudotuberculosis* при пониженных температурах, не участвуют в рецепции бактериофага, и даже могут препятствовать его адсорбции на поверхность бактериальной клетки, так как известно, что с понижением температуры культивирования усиливается экспрессия О-антигена иерсиний [65].

Псевдотуберкулёзный диагностический бактериофаг при высеве на чашки с *Y. pestis* показал литическую активность в отношении культур, выращенных при температурах 27 и 37 °С. Интересным представляется отсутствие зон лизиса на культуре *Y. pestis*, выращенной при температуре 10 °С. По всей видимости, при понижении температуры культивирования происходят изменения структуры внешней мембраны клеток *Y. pestis*, препятствующие бактериофагу либо прикрепляться к бактериальной клетке, либо производить инъекцию своего генетического материала и запускать литический цикл.

3.1.2 Особенности глубинного культивирования бактериофага псевдотуберкулёзного диагностического

В целях наработки достаточно больших количеств бактериофага был выбран глубинный способ культивирования бактерий штамма-хозяина.

На первом этапе работы было проверено предположение о том, что исходное количество бактериальных клеток, приходящееся на одну фаговую частицу, может влиять на выход бактериофага. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Влияние МОІ псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага на его выход

МОІ	ОП ₆₀₀	Титр полученного препарата бактериофага, БОЕ/мл
Суспензия бактерий без бактериофага (контроль)	0.278	-
1:2	0.014	$4.8 \cdot 10^8$
1:20	0.107	$1.5 \cdot 10^8$
1:200	0.080	$3.8 \cdot 10^8$
1:2000	0.102	$5.2 \cdot 10^8$
1:20000	0.106	$3.2 \cdot 10^8$

Примечание. МОІ – отношение числа частиц бактериофага к числу бактериальных клеток.

Результаты измерения оптической плотности препаратов (таблица 2) свидетельствуют о том, что при всех использованных соотношениях бактериальных клеток, приходящихся на одну частицу бактериофага, наблюдается лизис бактерий. Изменение этого соотношения не оказывало существенного влияния на выход бактериофага. В дальнейшей работе было принято решение использовать МОІ от 1:500 до 1:1000.

Для лучшего понимания и оптимизации процесса культивирования были определены потери бактериофага псевдотуберкулёзного диагностического на различных стадиях выделения и очистки с помощью осаждения в присутствии ПЭГ-8000. В методике получения очищенных препаратов бактериофагов, подробно описанной в пункте 2.6.3, можно выделить шесть основных стадий:

- 1) получение содержащей бактериофаг культуральной жидкости;
- 2) отделение бактериального дебриса;
- 3) осаждение бактериофага в кристаллах ПЭГ-8000;
- 4) экстракция бактериофага из кристаллов;
- 5) удаление из раствора органических примесей с помощью хлороформа;
- 6) стерилизация или консервирование готового препарата бактериофага.

Результаты оценки потерь бактериофага на различных стадиях выделения и очистки представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Потери бактериофага псевдотуберкулёзного диагностического на различных стадиях выделения и очистки

Номер стадии, после которой бралась проба	Название образцов	Объем, мл	Концентрация, БОЕ/ мл	Содержание БОЕ, % от исходного количества
1	Культуральная жидкость после добавления хлороформа	230	$8 \cdot 10^8$	100
2	Надосадочная жидкость после первого центрифугирования	280	$8 \cdot 10^8$	~100
3	Надосадочная жидкость после отделения кристаллов ПЭГ-8000	372	$1.5 \cdot 10^8$	30
5	Конечный препарат бактериофага без микрофльтрации	2.9	$3.9 \cdot 10^9$	6
6	Препарат бактериофага после стерилизации микрофльтрацией через нитроцеллюлозу с диаметром пор 0.2 мкм.	2.9	$1.7 \cdot 10^8$	0.3

Как можно видеть из данных, представленных в таблице 3, вместе с кристаллами ПЭГ-8000 осаждалось порядка 70 % находящихся в растворе частиц бактериофага, однако на стадии экстракции бактериофага из осадка происходила потеря основной биомассы полученного бактериофага, и в итоговый препарат переходило только порядка 6 % образовавшихся фаговых частиц. Потери при стерилизации полученного препарата бактериофага микрофльтрацией показало, что на фильтре оставалось порядка 95 % БОЕ. В этой связи стерилизация раствора бактериофага микрофльтрацией является неперспективной, и для

предотвращения контаминации в полученный препарат добавляли азид натрия до конечной концентрации 0.1 %.

Отработанные условия глубинного культивирования после соответствующей апробации оказались приемлемыми и использовались также для выращивания бактериофага Покровской.

3.1.3 Морфология псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага

Как показали результаты просвечивающей электронной микроскопии, частицы обоих фагов (бактериофаг Покровской использовался в качестве препарата сравнения) состоят из головки (икосаэдрического капсида), имеющей на плоскости гексагональную форму. У частиц бактериофагов имеются короткие хвостовые отростки длиной до 15 нм. Головка псевдотуберкулёзной фаговой частицы несколько вытянута вдоль центральной оси (рисунок 6). Диаметр головок вдоль центральной оси составляет (52.3 ± 2.2) и (50.3 ± 1.8) нм, их ширина – (50.2 ± 0.9) и (50.2 ± 1.3) нм, длина отростков – (13.0 ± 1.2) и (10.4 ± 1.0) нм соответственно для бактериофагов псевдотуберкулёзного диагностического и Покровской. По принятой классификации [158, 171] бактериофаг псевдотуберкулёзный диагностический следует отнести к семейству *Podoviridae*, морфотипу C1, к которому относятся большинство чумных литических бактериофагов, в том числе, как было показано ранее, и фаг Покровской [175], микрофотографии прикрепившихся к клетке *Y. pestis* частиц которого представлены на рисунке 7.

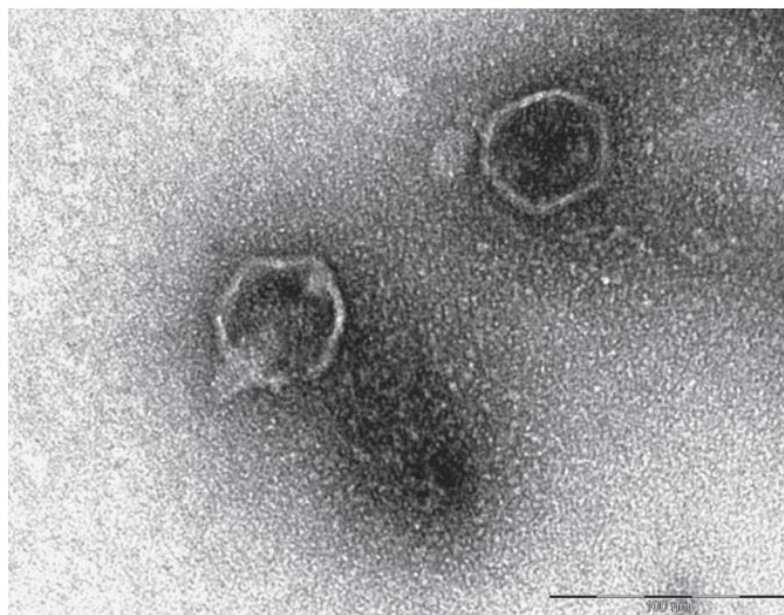


Рисунок 6 – Частицы псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага

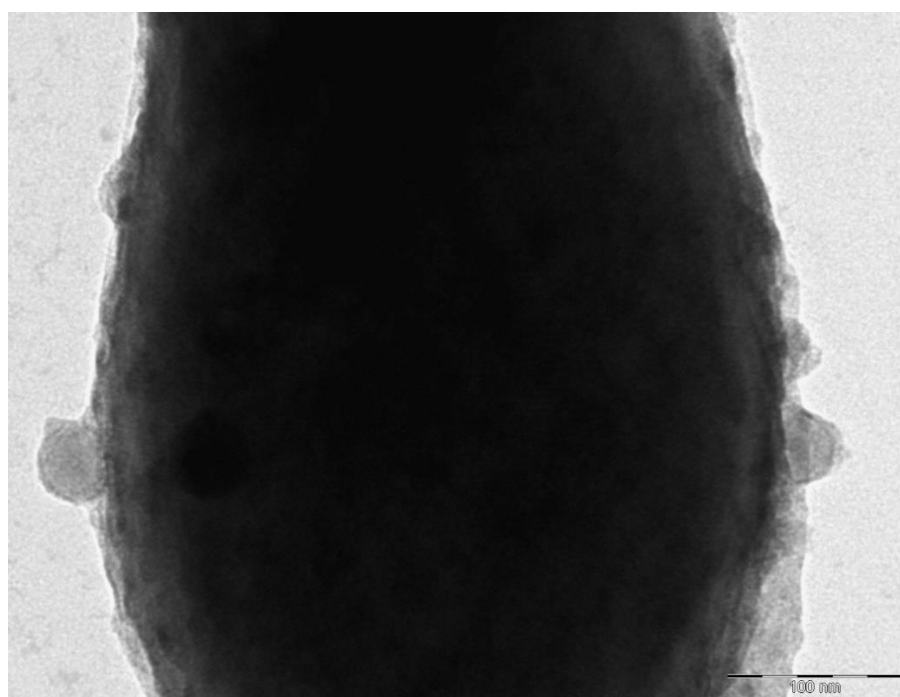


Рисунок 7 – Частицы бактериофага Покровской, адгезированные на клетке *Y. pestis*, штамм *EV*

3.1.4 Влияние бактериофагов на морфологию клеток и везикулообразование иерсиний

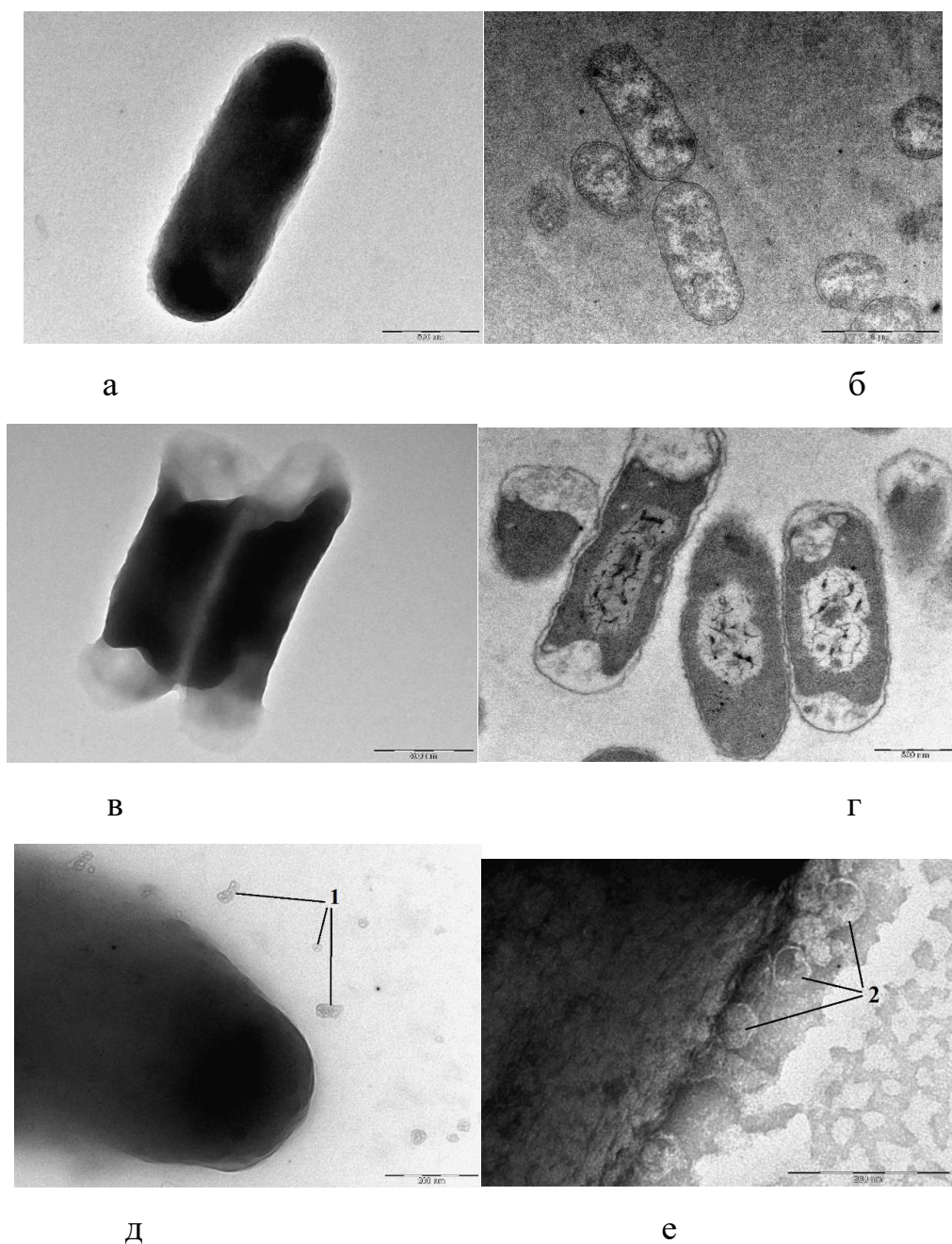
Везикулы имеют большое значение в физиологии бактерий, о чем свидетельствует разнообразие тех функций, которые они выполняют. Имеются данные литературы о способности *Y. pestis* продуцировать везикулы [139, 246].

Такая способность позднее была показана нами и для псевдотуберкулёзного микроба [140]. Так как процесс везикулообразования некоторых грамотрицательных и грамположительных бактерий, как считается, усиливается в ответ на стрессорные воздействия, к числу которых относится и контакт с бактериофагами, представлялось важным оценить влияние изучаемых иерсиниозных бактериофагов на процесс везикулообразования бактерий *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*.

3.1.4.1 Влияние бактериофага чумного Покровской на морфологию клеток и везикулообразование *Y. pestis*

В ходе проведенных исследований было показано, что бактерии *Y. pestis* вакцинного штамма *EV* способны продуцировать внеклеточные везикулы размером 8-120 нм как при поверхностном, так и при глубинном культивировании. Однако доля везикулообразующих клеток оказалась низкой – как правило, значительно меньше 10 %.

Результаты электронно-микроскопического исследования препаратов показали, что для контрольной, не обработанной бактериофагом, поверхностной культуры *Y. pestis* штамма *EV* была характерна морфологическая однородность бактериальных клеток, имеющих типичную цилиндрическую форму с закругленными концами (рисунок 8а). У небольшой части популяции на поверхности клеток отмечался тонкий неравномерный слой матрикса, часто фрагментарный. Наличие везикул отмечалось лишь у малой части клеток. Культуры нередко содержали небольшие плотные агрегаты бактерий. На ультратонких срезах видно, что клеточная стенка не имеет выраженной извилистости, протоплазма относительно однородная во всем объеме клетки, нуклеоид не выделен, периплазматическое пространство равномерное, выраженных включений или вакуолизации не отмечено (рисунок 8б).



Клетки *Y. pestis* штамма *EV*: а,б – intactные, в,г,д,е – обработанные бактериофагом Покровской; б, г – ультратонкие срезы; а,б,в,г – бактерии выращены на плотной, д,е – в жидкой питательных средах; 1 – везикулы, 2 – фаговые частицы

Рисунок 8 – Просвечивающая электронная микроскопия клеток *Y. pestis* штамма *EV*

После 20 мин инкубации поверхностной культуры *Y. pestis* штамма *EV* с бактериофагом Покровской большинство клеток значительно изменило свои размеры (таблица 4) и морфологию, появились клетки с «обрубленными» концами, пустотами на полюсах и выраженной бугристостью поверхности (рисунок 8в,г).

Слой матрикса на клетках остался рыхлым неоднородным, мало отличаясь от контроля. Выявлено некоторое повышение, по сравнению с контролем, доли клеток, продуцирующих везикулы; одна из таких клеток представлена на рисунке 8д. Свободно лежащие в культуре фаговые частицы обнаруживались крайне редко, однако в нескольких случаях зафиксированы клетки, достаточно густо покрытые фаговыми частицами (рисунок 8е). По всей видимости, это следствие вторичной генерации фага, высвободившегося из разрушенной клетки и адгезировавшего на соседней, до этого неинфицированной клетке. 20-минутного инкубирования бактерий со специфическим фагом оказалось достаточно для осуществления полного цикла лизиса некоторой, очень малой доли клеток. На это указывает и появление мертвых бактерии в виде пустых оболочек. На ультратонких срезах хорошо видны изменения морфологии бактерий – повышенная извилистость клеточной стенки, просветление в области нуклеоида, более плотная протоплазма, часто с гранулами электронно-прозрачных включений. Цитоплазма таких клеток отходит от клеточной стенки (обычно на полюсах) с образованием крупных округлых просветлений (рисунок 8г).

Инкубация культуры штамма *EV* с псевдотуберкулёзным диагностическим бактериофагом, который, по результатам наших предварительных исследований, эффективно лизирует бактерии *Y. pestis*, во всяком случае этого штамма, приводила к аналогичным, но, по-видимому, менее выраженным изменениям морфологии клеток.

Контрольные, интактные бактерии глубинной культуры практически не отличались по морфологической картине от таковых контрольной поверхностной культуры. Отмечено только то, что клетки глубинных культур имели несколько большие длину (таблица 4) и содержание делящихся особей, а также меньшую склонность к агрегации. Однако при взаимодействии с бактериофагом Покровской у глубинных культур не было выявлено столь резкого изменения морфологии клеток. Большинство клеток в меньшей степени изменили свои характерные форму и размеры; отличие, в основном, проявилось в более выраженной активизации процесса везикулообразования (таблица 4) и появлении мертвых особей,

представленных пустыми оболочками клеток – результат выхода вторичных фаговых частиц. Инкубация с псевдотуберкулёзным бактериофагом бактерий, выращенных в жидкой питательной среде, не вызвала повышения уровня везикулообразования.

Таблица 4 – Влияние иерсиниозных бактериофагов на размеры клеток штамма *EV Y. pestis* и уровень везикулообразования

Питательная среда для выращивания бактерий	Оцениваемый параметр	Интактные клетки (контроль)	Клетки с фагом Покровской	Клетки с фагом псевдотуберкулёзным диагностическим
Плотная	Длина клеток, мкм	1.51 ± 0.11 (n = 128)	1.04 ± 0.07 (n = 187)	1.13 ± 0.08 (n = 88)
	Содержание клеток с везикулами, %	7.8 ± 4.3 (n=143)	10.3 ± 4.3 (n=195)	14.7 ± 7.1 (n=95)
Жидкая	Длина клеток, мкм	1.94 ± 0.15 (n=165)	1.67 ± 0.10 (n=223)	1.68 ± 0.10 (n=172)
	Содержание клеток с везикулами, %	4.6 ± 4.9 (n=208)	17.7 ± 4.9 (n=231)	4.6 ± 3.5 (n=131)

Примечания: 1. n – число исследованных клеток.

2. Значения показателей представлены в виде $\bar{X} \pm I_{95}$, где I_{95} – доверительный интервал для $p = 0.95$.

3.1.4.2 Влияние бактериофага псевдотуберкулёзного диагностического на морфологию клеток и везикулообразование *Y. pseudotuberculosis*

На первом этапе было проанализировано влияние совместной инкубации при температуре 37 °С выращенных различными способами бактериальных клеток и частиц бактериофага на концентрацию каждого из названных компонентов в смеси. Результаты исследования представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Влияние специфического бактериофага на везикулообразование и размер клеток *Y. pseudotuberculosis*

Питательная среда для выращивания бактерий	Оцениваемый параметр	Интактные клетки (или фаг без клеток)	Клетки с фагом псевдотуберкулёзным диагностическим
Плотная	Концентрация жизнеспособных клеток, м.к./ мл×10 ⁷ (N=8)	39.8 ± 5.1	6.7 ± 0.3
	Концентрация бактериофага, БОЕ/ мл×10 ⁷ (N=8)	68.5 ± 5.7 (фаг без клеток)	30.4 ± 8.3
	Длина клеток, мкм	1.23 ± 0.01 (n=1066)	1.12 ± 0.01 (n=1108)
	Содержание клеток с везикулами, %	33.8 ± 5.3 (n=363)	71.6 ± 5.3 (n=747)
Жидкая	Концентрация жизнеспособных клеток, м.к./ мл×10 ⁷ (N=3)	25.8 ± 7.1	28.1 ± 11.3
	Концентрация бактериофага, БОЕ/ мл×10 ⁷ (N=3)	62.3 ± 16.9 (фаг без клеток)	47.9 ± 21.5
	Длина клеток, мкм	1.39 ± 0.05 (n=325)	1.28 ± 0.06 (n=288)
	Содержание клеток с везикулами, %	17.1 ± 12.0 (n=270)	67.5 ± 16.3 (n=256)

Примечания. 1. N – число опытов.

2. n – число исследованных клеток.

3. Значения показателей представлены в виде $\bar{X} \pm I_{95}$, где I_{95} – доверительный интервал для $p = 0.95$.

При использовании бактериальных клеток, выращенных на плотной питательной среде, после 20 минут совместной инкубации происходило снижение концентрации жизнеспособных клеток практически в 6 раз по сравнению с контролем – суспензией интактных клеток. При этом концентрация бактериофага псевдотуберкулёзного диагностического уменьшилась более чем в 2 раза по сравнению с исходной. При исследовании клеток, выращенных в жидкой питательной среде, инкубация с бактериофагом при указанных условиях приводила к незначительному снижению количества БОЕ при оставшемся

практически неизменном количестве жизнеспособных клеток (таблица 5). Данный факт свидетельствуют о наличии выраженных отличий в процессе взаимодействия бактериофага псевдотуберкулёзного диагностического с бактериями двух типов. Это может объясняться существенным влиянием условий культивирования на морфологические и химические особенности поверхностных структур клетки псевдотуберкулёзного микроба, которые, вероятно, затрагивают и рецепторный аппарат.

Из представленных в таблице 5 данных видно, что присутствие бактериофага в суспензии бактериальных культур обоих видов приводит к значительному повышению уровня везикулообразования бактерии *Y. pseudotuberculosis*. При этом, по результатам просвечивающей электронной микроскопии, не было обнаружено везикул, несущих на своей поверхности частиц бактериофага, хотя и считается, что одной из функций везикулообразования является защита бактериальной клетки от бактериофага посредством создания необратимых связей между фаговыми частицами и везикулами [247].

По данным просвечивающей электронной микроскопии, выращенная поверхностным способом контрольная культура *Y. pseudotuberculosis* (без обработки бактериофагом), представляет собой клетки морфологически однородные, ровные, у большинства на поверхности выявляется тонкий слой матрикса толщиной до 50 нм. Основная часть бактерий везикул не имеет. Клетки часто собраны в небольшие плотные агрегаты (рисунок 9а). На ультратонких срезах (рисунок 9б) видно, что клеточная стенка не имеет выраженной извилистости, протоплазма выглядит однородной во всем объёме клетки с равномерно расположенными уплотнениями, нуклеоид не выделен, периплазматическое пространство равномерное, без изменений (кроме небольшого увеличения на концах отдельных клеток), выраженных включений или вакуолизации нет.

Большинство клеток культуры *Y. pseudotuberculosis* после инкубации со специфическим бактериофагом имело типичную морфологию, однако отмечено наличие измененных форм – клеток с «обрубленными» концами и пустотами на

полюсах, а также особей с бугристой поверхностью (рисунок 9в). Кроме того, в культуре появляются переживающие формы (персистеры). Слой матрикса на поверхности многих клеток более толстый (около 80 нм), чем в контроле, часто неровный, фрагментарный.

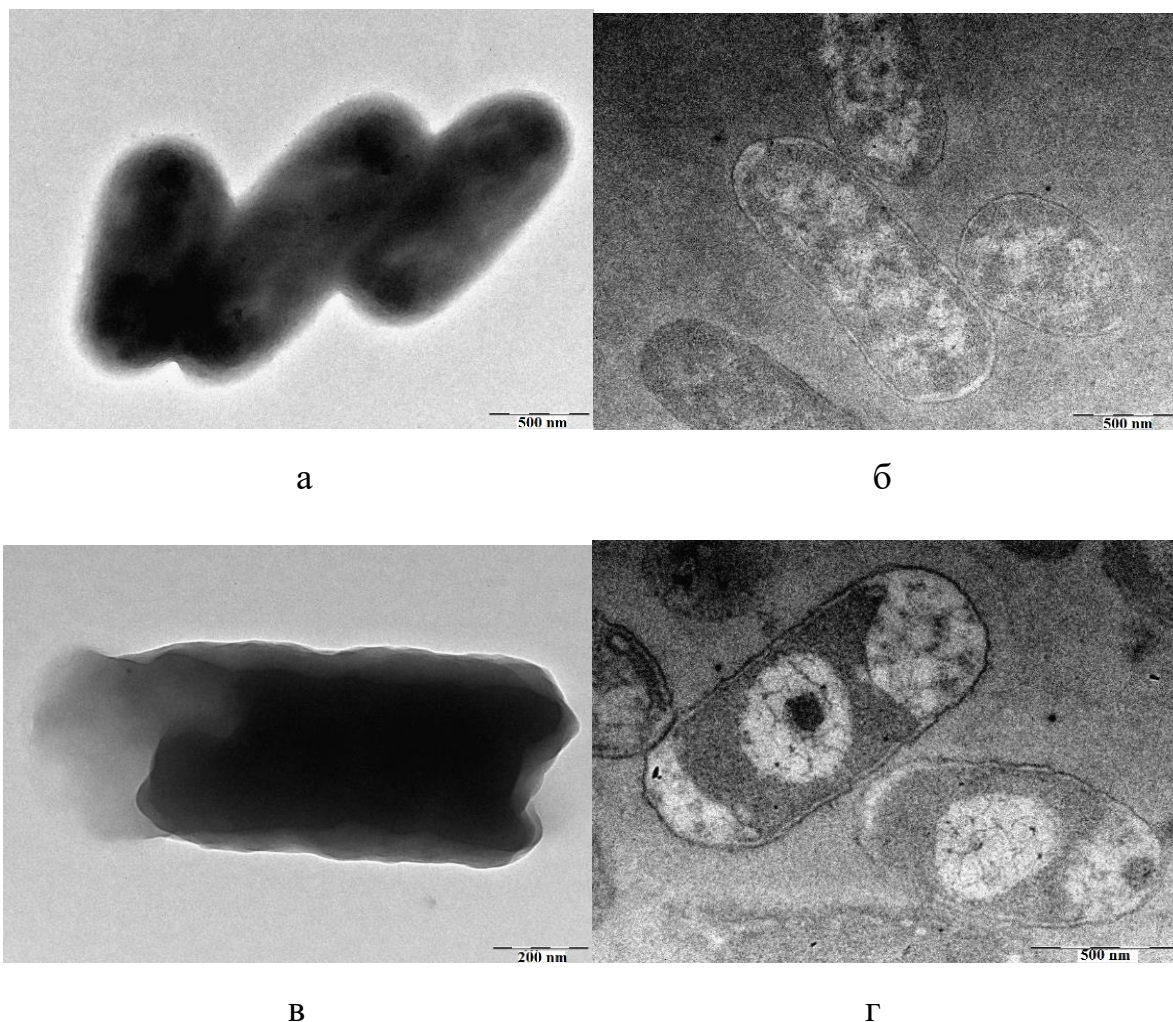
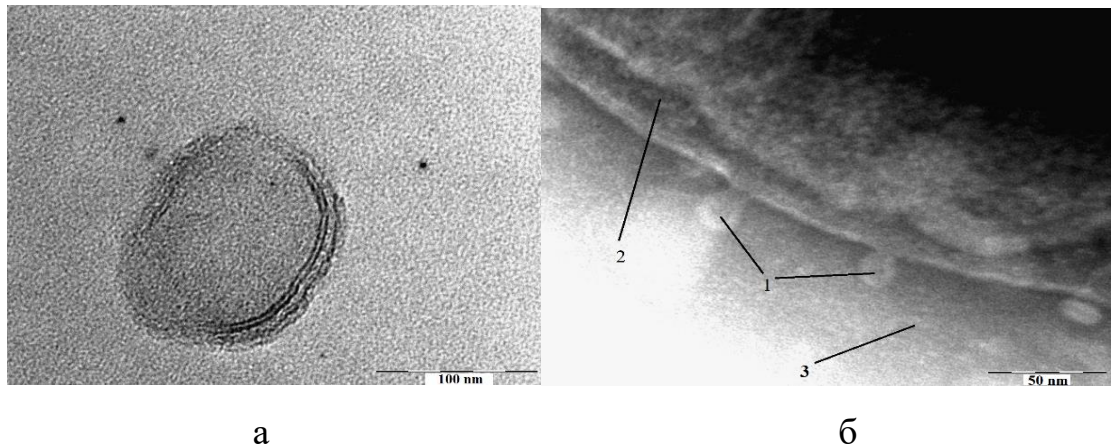


Рисунок 9 – Клетки *Y. pseudotuberculosis*: а – intactные, в – обработанные бактериофагом; ультратонкие срезы клеток: б – intactных, г – обработанных бактериофагом

У многих клеток выявлено образование везикул. Электронно-микроскопическая картина везикул представлена на рисунке 10а, б. Фаговые частицы в основном обнаруживались на поверхности микробных клеток, часто по 2-3 штуки (рисунок 11), и редко в межклеточном пространстве. У отдельных клеток

отмечены разрывы с выходом вторичных фаговых частиц, а также мертвые бактерии в виде пустых оболочек.



1 – везикулы, 2 – тело клетки *Y. pseudotuberculosis*, 3 – внеклеточный матрикс

Рисунок 10 – Везикулы *Y. pseudotuberculosis*: а - сформированная внеклеточная везикула; б – везикулы на стадии отпочкования

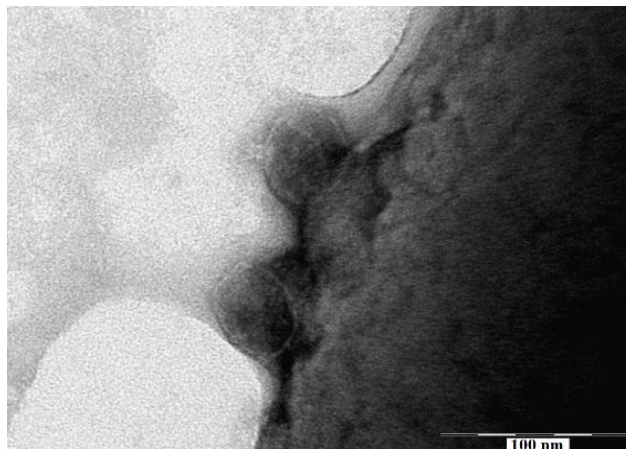


Рисунок 11 – Частицы бактериофага псевдотуберкулёзного диагностического, адгезированные на клетке *Y. pseudotuberculosis*

На ультратонких срезах у измененной части бактерий отмечались повышенная извилистость клеточной стенки, просветление округлой формы в области нуклеоида, часто с уплотненным центром. Цитоплазма таких клеток выглядит более плотной, цитоплазматическая мембрана четко очерчена и заметно утолщена, она отходит от клеточной стенки, особенно на полюсах с образованием

крупных округлых просветлений. У некоторых клеток отмечено появление гранул электронно-прозрачных включений (рисунок 9г). Следует также отметить существенное укорочение длины клеток под воздействием 20-минутной инкубации с бактериофагом (таблица 5).

Электронно-микроскопическое изучение глубинных культур *Y. pseudotuberculosis* показало, что они практически не отличались по морфологической картине от поверхностных культур как в контроле, так и при взаимодействии со специфическим бактериофагом. Однако было отмечено, что клетки глубинных культур имели несколько большую длину, а также толщину слизистого слоя, их отличало и большее содержание делящихся особей, меньшая склонность к агрегации.

3.2 Иммунохимическая природа антигенных эпитопов, распознаваемых моноклональными антителами МКАт1-9

Ранее в нашей лаборатории были получены гибридомы, продуцирующие МКАт девяти линий к поверхностным эпитопам *Y. pseudotuberculosis* [140, 237]. Данные МКАт планировалось использовать для иммунохимической характеристики рецепторов иерсиниозных бактериофагов. Такие исследования предполагалось проводить методом конкурентного ингибирования процесса адсорбции частиц бактериофагов на поверхности бактериальной клетки с помощью МКАт. Однако для оценки результатов такого подхода первоначально было необходимо установить химическую природу и локализацию эпитопов, с которыми взаимодействуют исследуемые МКАт1-9. Для этих целей использовались различные иммунохимические подходы, результаты применения которых представлены ниже.

3.2.1 Взаимодействие МКАт с антигенами иерсиний

На первом этапе определения химической природы детерминант, распознаваемых МКАт1-9, необходимо было определить активность моноклональных антител в отношении разнокачественных антигенных препаратов

семейства *Enterobacteriaceae* и, в частности, рода *Yersinia*. Были использованы как цельные клетки иерсиний, так и выделенные и очищенные антигены, такие как ЛПС и Б-антиген, в отношении которых проводили получение и отбор тех или иных гибридом. Результаты скрининга активности МКАт1-9 с различными антигенными препаратами представлены в таблице 6.

Согласно данным таблицы 6, моноклональные антитела можно условно разделить на две резко отличающиеся группы: МКАт1-4 и МКАт5-9. МКАт1-4 гораздо активнее взаимодействовали с «холодовыми» препаратами клеток и ЛПС *Y. pseudotuberculosis*, в то время как МКАт5-9 в целом эффективнее выявляли клетки *Y. pseudotuberculosis*, выращенные при температуре 37 °С, а также препараты *Y. pestis* и Б-антигена. Следует отметить, что разведения антител выбирались таким образом, чтобы значения ОП₄₉₂ были приблизительно одинаковы при взаимодействии МКАт1-4 с ЛПС, полученным из выращенных при температуре 10 °С клеток *Y. pseudotuberculosis*, а МКАт5-9 – с Б-антигеном, т.е. целевыми антигенами, на которые и получали соответствующие гибридомы. МКАт1-3 практически не выявляли ЛПС, выделенный из клеток *Y. pestis* и *E. coli*, что говорит об их высокой специфичности в отношении псевдотуберкулёзного микроба. МКАт1-4, равно как и МКАт5-9 очень эффективно выявляли Б-антиген вне зависимости от температуры культивирования бактерий, из которых он был выделен. Исключение составляют МКАт9, которые значительно активнее реагировали с Б-антигеном, полученным из выращенных при температуре 37 °С клеток *Y. pseudotuberculosis*. Значения оптической плотности при взаимодействии МКАт5, 7 и МКАт9 со всеми использованными препаратами ЛПС были на уровне фона.

Таблица 6 – Специфическая активность МКАт1-9 в ИФА с антигенами иерсиний

Антигенный препарат	Значение ОП ₄₉₂ ($\bar{X} \pm I_{95}$) в ИФА								
	МКАт1	МКАт2	МКАт3	МКАт4	МКАт5	МКАт6	МКАт7	МКАт8	МКАт9
Клетки <i>Y. pseudotuberculosis</i> -10 (n≥5)	2.122 ± 0.498	1.577 ± 0.406	1.520 ± 0.420	1.333 ± 0.649	0.201 ± 0.088	1.126 ± 0.715	0.470 ± 0.225	0.632 ± 0.302	0.135 ± 0.065
Клетки <i>Y. pseudotuberculosis</i> -37 (n≥5)	1.357 ± 0.419	1.160 ± 0.356	1.102 ± 0.383	1.130 ± 0.399	1.505 ± 0.591	1.897 ± 0.504	1.820 ± 0.636	1.615 ± 0.576	1.132 ± 0.442
Клетки <i>Y. pestis EV-27</i> (n≥2)	0.168 ± 0.089	0.192 ± 0.074	0.179 ± 0.56	0.445 ± 0.245	0.955 ± 0.368	1.223 ± 0.654	1.182 ± 0.254	1.054 ± 0.412	0.596 ± 0.123
ЛПС <i>Y. pseudotuberculosis</i> -10 (n≥4)	2.042 ± 0.362	2.021 ± 0.315	1.382 ± 0.269	1.870 ± 0.427	0.255 ± 0.135	0.552 ± 0.411	0.210 ± ± 0.099	0.492 ± 0.245	0.175 ± 0.173
ЛПС <i>Y. pseudotuberculosis</i> -37 (n≥4)	0.886 ± 0.344	0.651 ± 0.264	0.453 ± 0.090	0.548 ± 0.121	0.147 ± 0.061	0.499 ± 0.236	0.265 ± 0.104	0.506 ± 0.252	0.093 ± 0.026
ЛПС <i>Y. pestis EV-27</i> (n≥2)	0.160 ± 0.045	0.193 ± 0.051	0.149 ± 0.062	0.402 ± 0.127	0.171 ± 0.065	0.470 ± 0.349	0.288 ± 0.222	0.641 ± 0.231	0.081 ± 0.034
ЛПС <i>E. coli</i> (n≥2)	0.110 ± 0.106	0.131 ± 0.106	0.254 ± 0.125	0.280 ± 0.147	0.133 ± 0.038	0.499 ± 0.214	0.320 ± 0.146	0.712 ± 0.171	0.080 ± 0.083
Б-антиген-37 (n≥4)	2.074 ± 0.982	2.259 ± 0.801	1.681 ± 0.944	1.882 ± 0.637	2.218 ± 0.865	2.001 ± 0.504	2.434 ± 0.844	2.110 ± 0.741	1.274 ± ±0.362
Б-антиген-10 (n=1)	2.691	2.548	2.580	2.629	2.290	1.768	2.650	2.106	0.536

Примечания: 1. МКАт1, 2, 5, 7 и 9 использовали в разведении 1:2000, МКАт3, 4 и 8 – в разведении 1:100, МКАт6 – в разведении 1:500.

2. Числа 10,27,37 в первом столбце означают температуру выращивания культуры микробов, из которой получали антигенные препараты.

3. I_{95} – доверительный интервал для $p = 0.95$.

Возможно, что МКАт4 обладают меньшей специфичностью в отношении *Y. pseudotuberculosis* по сравнению с другими антителами группы МКАт1-4, о чем свидетельствуют результаты ИФА, полученные при взаимодействии этих антител с ЛПС, выделенным из *Y. pestis*. В пользу более низкой специфичности МКАт6 и особенно МКАт8 говорит уровень сигнала, полученный при взаимодействии с ЛПС *E. coli*. Однако, повышенные значения оптической плотности, полученные для МКАт4, 6 и 8 при взаимодействии с вышеназванными препаратами, можно объяснить использованием низких разведений (относительно высоких концентраций) данных антител и, как следствие, появлением неспецифических реакций.

3.2.2 Определение химической природы эпитопов, выявляемых МКАт, методом ИФА

Данные таблицы 6 позволяют предположить, что детерминанты, выявляемые моноклональными антителами МКАт1-4 и МКАт5-9, имеют различную природу. Исследование химической природы эпитопов, распознаваемых исследуемыми моноклональными антителами, проводили путём использования методических подходов, заключающихся в обработке антигенных препаратов периодатом натрия и протеазами [198]. Периодат натрия разрушает компоненты углеводной природы, в то время как протеазы действуют на белковые структуры биополимеров.

3.2.2.1 Иммунохимическая характеристика окисленных периодатом натрия антигенных препаратов

В таблице 7 представлены результаты обработки антигенных препаратов периодатом натрия в стандартной для данной методики концентрации 100 мМ. В целом, можно отметить, что разрушение на поверхности бактериальной клетки компонентов полисахаридной природы приводит к уменьшению оптической плотности при выявлении антигенов в ИФА с помощью МКАт1-4, а при использовании МКАт5-9, наоборот, к повышению. Отдельно можно выделить МКАт1, для которых характерно значительное падение оптической плотности при взаимодействии с обработанными периодатом натрия препаратами. Объединив эти

результаты с данными таблицы 6, можно предположить, что эпитопы, выявляемые МКАт1, имеют полисахаридную природу. Для МКАт2 и 3 наблюдалось незначительное повышение значений ОП₄₉₂ при взаимодействии с обработанными клетками *Y. pseudotuberculosis*, выращенными при температуре 10 °С, одновременно с падением, в среднем, значений этого показателя при периодатном окислении других антигенов. Такой феномен вероятно объясняется глубоким расположением эпитопов, которые становятся более доступными в результате действия периодата натрия на «холодовые» клетки. Для МКАт4 характерно незначительное повышение ОП₄₉₂ при взаимодействии со всеми антигенными препаратами. Однако данные, полученные на необработанных антигенных препаратах (таблица 6), свидетельствуют в пользу того, что МКАт4 отличаются от моноклональных антител группы МКАт5-9, характеризующихся аналогичной реакцией в ИФА на окисление периодатом натрия антигенных препаратов.

Для МКАт5-9 было продемонстрировано резко выраженное повышение оптической плотности при взаимодействии с обработанными периодатом натрия клетками *Y. pseudotuberculosis*, выращенными при температуре 10 °С, *Y. pestis* штамма EV, а также со всеми препаратами липополисахаридов. При использовании клеток *Y. pseudotuberculosis*, выращенных при температуре 37 °С, происходило понижение оптической плотности по сравнению с контролем. На реакционную способность Б-антигена с МКАт5-8 периодатное окисление не оказало действия, однако оно способствовало понижению оптической плотности при использовании МКАт9.

Таблица 7 – Влияние периода та Na на иммунохимическую активность антигенов иерсиний в ИФА с использованием МКАТ

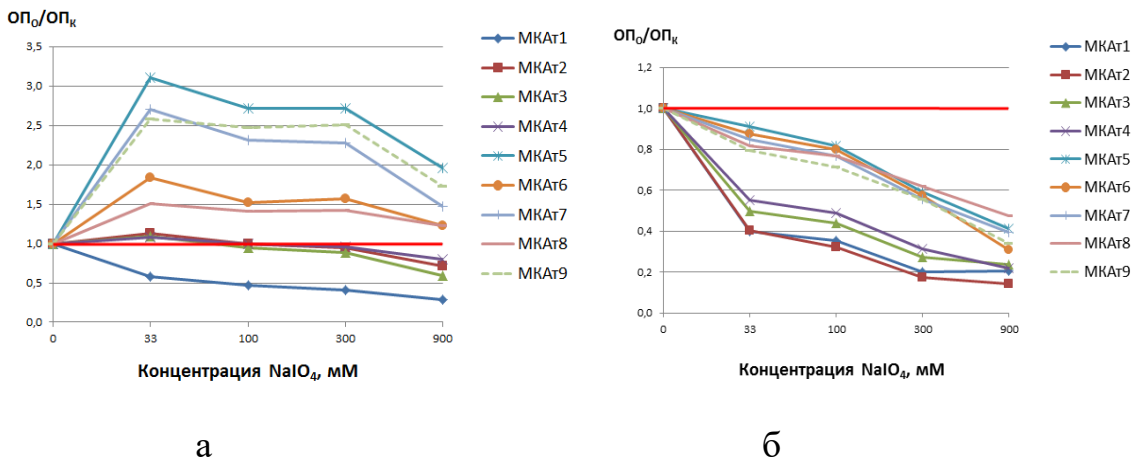
Антигенный препарат	Значение ОП _о /ОП _к ± I ₉₅ (число определений)								
	МКАТ1	МКАТ2	МКАТ3	МКАТ4	МКАТ5	МКАТ6	МКАТ7	МКАТ8	МКАТ9
Клетки <i>Y. pseudotuberculosis</i> -10	0.50 ± 0.19 (10)	1.11 ± 0.09(9)	1.18 ± 0.10(8)	1.19 ± 0.12(10)	3.44 ± 1.51 (6)	1.85± 0.52 (5)	3.66 ± 0.97 (6)	1.93 ± 0.35 (6)	3.46 ± 0.94 (4)
Клетки <i>Y. pseudotuberculosis</i> -37	0.58 ± 0.18(9)	0.66 ± 0.20(10)	0.81 ± 0.21(10)	1.02 ± 0.13(10)	0.82 ± 0.38 (4)	0.80 ± 0.19 (4)	0.77 ± 0.30 (4)	0.76 ± 0.16 (4)	0.71 ± 0.29 (4)
Клетки <i>Y. pestis</i> EV-27	Н/о	Н/о	Н/о	1.19 ± 0.41(3)	1.73 (1)	1.51 (1)	1.58(1)	1.21(1)	2.62 (1)
ЛПС <i>Y. pseudotuberculosis</i> -10	0.45 ± 0.14(19)	0.65 ± 0.22(19)	0.84 ± 0.25(19)	1.13 ± 0.29(12)	1.23 ± 0.30 (5)	1.70 ± 0.30 (4)	1.47 ± 0.30 (4)	1.53 ± 0.68 (4)	Н/о
ЛПС <i>Y. pseudotuberculosis</i> -37	0.51 ± 0.12(16)	0.86 ± 0.23 (16)	1.24 ± 0.21(15)	1.99 ± 0.63(16)	Н/о	1.23 ± 0.22 (6)	1.25 ± 0.20 (6)	1.07 ± 0.09 (6)	Н/о
ЛПС <i>Y. pestis</i> EV-27	Н/о	Н/о	1.35(1)	1.20(1)	Н/о	1.34 ± 0.05 (2)	1.43 (1)	1.58 (1)	Н/о
ЛПС <i>E. coli</i>	Н/о	Н/о	1.15(1)	1.24(1)	Н/о	1.38 ± 0.03 (2)	1.10 ± 0.18 (3)	1.01 ± 0.31 (3)	Н/о
Б-антиген-37	0.42 ± 0.08 (7)	0.80 ± 0.28 (7)	0.88 ± 0.23 (7)	1.04 ± 0.15 (6)	1.04 ± 0.09 (4)	1.04 ± 0.08 (5)	1.06 ± 0.05 (4)	1.03 ± 0.05 (5)	0.91 ± 0.37 (4)
Б-антиген-10	0.34 (1)	1.03 (1)	0.88 (1)	1.07 (1)	1.02 (1)	1.04 (1)	1.07 (1)	1.05 (1)	0.59 (1)

Примечания: 1.Н/о – не определяли, значения ОП_к были менее 0.2.

2. ОП_к – оптическая плотность в лунке с необработанным (контроль), ОП_о – обработанным периодом Na антигенным препаратом.

3. I₉₅ – доверительный интервал для p = 0.95.

Более углубленное представление о химической природе эпитопов, распознаваемых МКАт1-9, дают графики, представленные на рисунке 12.



а – клетки *Y. pseudotuberculosis*-10, б – клетки *Y. pseudotuberculosis*-37

Рисунок 12 – Влияние периодатного окисления на активность в ИФА бактериальных клеток *Y. pseudotuberculosis*, выращенных при температурах 10 °С и 37 °С

Результаты, приведенные на рисунке 12, показывают, что имеются выраженные качественные различия в антигенной структуре клеток *Y. pseudotuberculosis*, выращенных при температурах 10 и 37 °С. Среди использованных моноклональных антител можно выделить МКАт1, для которых окисление «холодовых» бактерий *Y. pseudotuberculosis* периодатом натрия даже в минимальной из использованных концентраций приводило к значительному падению оптической плотности. Для МКАт2, 3 и 4 существенное снижение интенсивности иммунной реакции происходило лишь при использовании высоких концентраций периодата Na (>300 мМ). Прямо противоположным оказалось действие периодатного окисления на иммунохимическую активность «холодовых» клеток при исследовании в ИФА МКАт 5–9: даже при использовании максимальной концентрации окислителя (900 мМ) значения оптической плотности не опускались ниже значений, полученных для необработанных клеток.

При использовании клеток *Y. pseudotuberculosis*, выращенных при температуре 37 °С, отмечается монотонное снижение значений оптической

плотности с повышением концентрации периодата Na. Большой наклон линий свидетельствует о более выраженном падении реакционной способности МКАт1-4 в отношении антигенных препаратов при увеличении концентрации окислителя.

Совокупность представленных данных позволяет предположить, что МКАт1-4 взаимодействуют с детерминантами углеводной природы, а МКАт5-9 – с белковыми эпитопами. При этом О-боковые цепи, синтезируемые *Y. pseudotuberculosis* при низких температурах, могут пространственно блокировать детерминанты белковой природы, о чем свидетельствует резкое повышение оптической плотности для МКАт5-9 при обработке периодатом натрия выращенных при температуре 10 °С клеток. Падение оптической плотности при взаимодействии МКАт5-9 с выращенными при температуре 37 °С клетками *Y. pseudotuberculosis* может быть связано с нарушением конформации распознаваемых белков, к которому приводит разрушение полисахаридных компонентов наружной мембраны под действием периодатного окисления.

3.2.2.2 Иммунохимическая характеристика обработанных протеазами антигенных препаратов

В работе использовали стандартный для данной методики фермент – протеиназу К, а также дополнительные протеазы – трипсин и пепсин. Результаты протеолитического действия на антигенные препараты представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Влияние протеаз на иммунохимическую активность антигенов иерсиний в ИФА с использованием МКАт

Антигенный препарат	Фермент	Значение ОП _О /ОП _К ± I ₉₅ (число определений)								
		МКАт1	МКАт2	МКАт3	МКАт4	МКАт5	МКАт6	МКАт7	МКАт8	МКАт9
Клетки <i>Y. pseudotuberculosis</i> -10	Протеиназа К	0.23 ± 0.10(4)	0.36 ± 0.06(4)	0.24 ± 0.17(4)	0.89 ± 0.25(4)	Н/о	0.48 ± 0.28 (4)	0.68 ± 0.28 (4)	0.69 ± 0.30 (4)	Н/о
	Трипсин	0.49(1)	0.35 (1)	0.42(1)	Н/о	Н/о	0.37 (1)	0.58 (1)	0.85 (1)	Н/о
	Пепсин	0.42(1)	0.37(1)	0.25(1)	Н/о	0.72 (1)	0.38 (1)	0.39 (1)	0.63 (1)	Н/о
Клетки <i>Y. pseudotuberculosis</i> -37	Протеиназа К	0.22 ± 0.11(6)	0.29 ± 0.18(6)	0.32 ± 0.22(6)	0.55 ± 0.30(5)	0.19 ± 0.06 (7)	0.26 ± 0.16 (5)	0.23 ± 0.10 (7)	0.37 ± 0.11 (7)	0.17 ± 0.07 (7)
	Трипсин	0.64(1)	0.56(1)	0.57(1)	Н/о	0.55 (1)	0.59 (1)	0.56 (1)	0.76 (1)	0.52 (1)
	Пепсин	0.79(1)	0.67(1)	0.71(1)	Н/о	0.71 (1)	0.72 (1)	0.77 (1)	0.84 (1)	0.76 (1)
Клетки <i>Y. pestis</i> EV-27	Протеиназа К	Н/о	Н/о	Н/о	0.80 ± 0.26(4)	0.21 (1)	0.49 (1)	0.38 (1)	0.34 (1)	0.34 (1)
Б-антиген-37	Протеиназа К	0.67 (1)	0.87 (1)	0.59 (1)	0.94 (1)	0.82 (1)	0.94 (1)	0.86 (1)	0.98 (1)	0.63 (1)

Примечания: 1.Н/о – не определяли, значения ОП_К были менее 0.2.

2. ОП_К – оптическая плотность в лунке с необработанным (контроль), ОП_О – обработанным протеазами антигенным препаратом.

3. I₉₅ – доверительный интервал для p = 0.95.

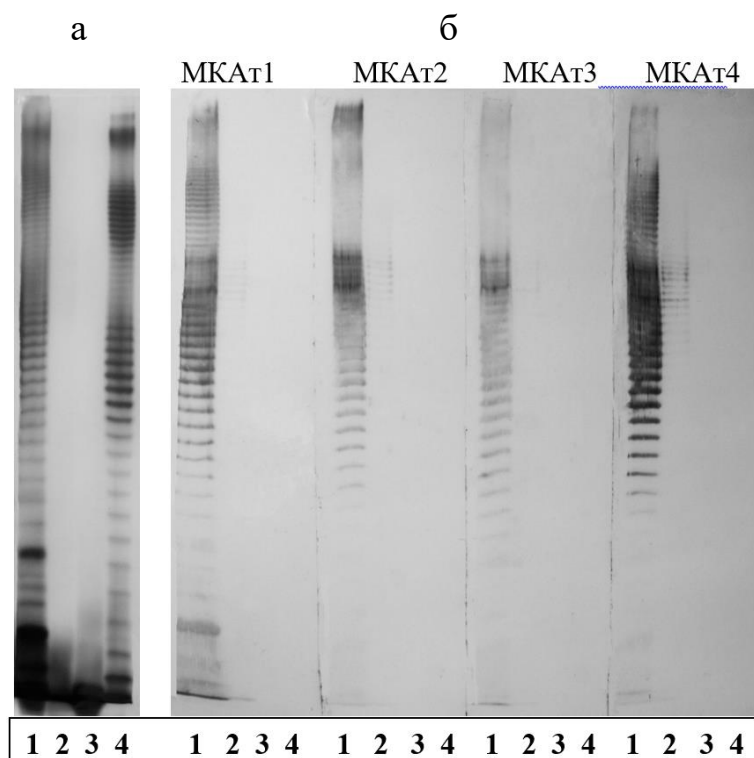
Обработка антигенных препаратов протеазами приводила к уменьшению значений оптической плотности при использовании моноклональных антител всех девяти линий. Наибольшей инактивирующей способностью среди использованных ферментов обладала протеиназа К. Ингибирующее действие ферментов на иммунохимическую активность антигенных препаратов, наблюдаемое для МКАт1-4, вероятно, можно объяснить происходящими под действием протеаз конформационными изменениями во внешней мембране, приводящими к ограничению пространственной доступности эпитопов для указанных моноклональных антител. Для Б-антигена ингибирующий эффект действия протеаз был менее выражен. Данное обстоятельство может быть объяснено особенностями строения везикул антигена, которые несут на своей поверхности слой О-боковых цепей, которые защищают белковые компоненты от действия фермента [140].

3.2.3 Иммунохимическая характеристика МКАт1-9 методом иммуноблотинга

Для дальнейшего выяснения вопроса о локализации детерминант, выявляемых моноклональными антителами исследуемых девяти линий, был использован метод иммуноблотинга, позволяющий получить наглядные изображения, характеризующие выявляемые МКАт детерминанты.

3.2.3.1 Определение химической природы эпитопов, выявляемых МКАт1-4

Основываясь на данных, полученных с помощью иммуноферментного анализа, было выдвинуто предположение, что МКАт1-4 выявляют антигенные детерминанты углеводной природы. В этой связи в иммуноблотинге использовали препараты липополисахаридов, выделенные из культур *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis* и *E. coli*. ЛПС, выделенные из *Y. pestis* и *E. coli*, были использованы для характеристики специфичности данных моноклональных антител. Результаты иммуноблотинга названных антигенных препаратов с МКАт1-4 представлены на рисунке 13.



а – электрофореграмма препаратов ЛПС, окрашенная нитратом серебра; б – иммуноблот препаратов ЛПС с МКАт1-4; 1 – ЛПС *Y. pseudotuberculosis*-10; 2 ЛПС – *Y. pseudotuberculosis*-37; 3 – ЛПС *Y. pestis* EV-27; 4 – ЛПС *E. coli*. Рабочие разведения: МКАт1 – 1:2000, МКАт2 – 1:1000, МКАт3, 4 – 1:200

Рисунок 13 – Иммунохимическая активность МКАт1-4 в отношении
иерсиниозных липополисахаридов

В результате окрашивания нитратом серебра полиакриламидного геля (рисунок 13а) на дорожках, полученных при использовании препаратов ЛПС, которые были выделены из культуры *Y. pseudotuberculosis*, выращенной при температуре 10 °С, а также из культуры *E. coli* видна «лестница», характерная для О-боковых цепей липополисахарида. При использовании ЛПС *Y. pseudotuberculosis*, выделенного из культуры, выращенной при температуре 37 °С, выявляется низкомолекулярная коровая часть ЛПС, а О-боковые цепи слабо заметны – как известно, уменьшение синтеза О-антигена наблюдается при повышении температуры культивирования псевдотуберкулёзного микроба [68]. При окрашивании нитратом серебра препарата ЛПС, выделенного из клеток *Y. pestis* штамма EV, обнаруживается только коровая часть. Это подтверждает данные литературы о том, что бактерии *Y. pestis* не способны к синтезу О-боковых

цепей [65]. Иммуноблоты, представленные на рисунке 13б, свидетельствуют о том, что МКАт1-4 выявляют О-боковые цепи препаратов ЛПС, выделенных из культур *Y. pseudotuberculosis*, которые выращивали при температурах как 10, так и 37 °С. Они не взаимодействуют с электрофоретически разделенными препаратами ЛПС *E. coli* и *Y. pestis*, что говорит о высокой специфичности МКАт1-4.

На основании данных иммуноблотинга можно заключить, что МКАт1-4 не взаимодействуют с низкомолекулярными фрагментами (кором и липидом А) ЛПС иерсиний.

Однако известно, что препараты ЛПС, выделенные даже таким жёстким методом как водно-фенольная экстракция, могут содержать примеси белка, который может быть прочно связан с молекулой ЛПС, в том числе и с О-боковыми цепями [67]. На необходимость проверить эту возможность указывали данные, полученные при обработке клеток протеазами.

Известно, что выделяемые из клеток энтеробактерий эндотоксины представляют собой липополисахариды или липополисахаридбелковые комплексы (ЛПБК). Белковая составляющая ЛПБК может включать до 12 полипептидов [66]. Часть из них, в том числе и порообразующие белки, прочно (но не ковалентно) связана с липополисахаридным компонентом наружной мембраны, что является важным условием для проявления микробами таких свойств, как рецепция бактериоцинов, бактериофагов, конъюгативность, транспорт низкомолекулярных веществ, адгезия, инвазия в эукариотические клетки, обеспечение устойчивости микробов к антибиотикам [95, 248, 249]. В ряде работ показано, что порины способны стимулировать антителообразование [103, 249, 250]. Согласно литературным данным, с одной молекулой порина с разной степенью прочности может быть связано до 10 субъединиц ЛПС. Вероятно, одна молекула липополисахарида может попадать в зону межмономерного взаимодействия в тримере порина и быть очень тесно интегрирована в структуру белка [251]. Таким образом, порообразующий белок *Y. pseudotuberculosis* связан в том числе и с О-боковыми цепями [252] и мог выявляться в блотинге с МКАт к белковым детерминантам порина, связанного с фрагментами О-антигена. Однако результаты

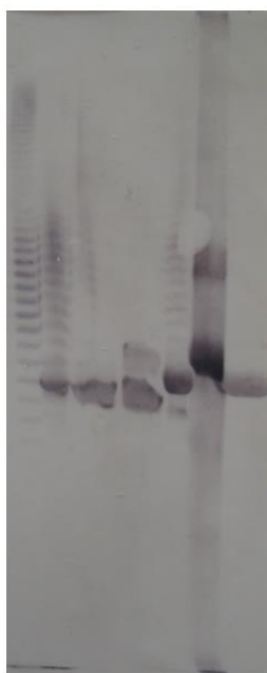
иммуноферментного анализа (таблица 9) с порином Omp F из наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis*, не подвергшимся предварительному прогреванию, с МКАт1-4 не показали ни для одного из антител положительной реакции. После предваряющего ИФА кипячения препарата Omp F в течение 15 мин положительный сигнал регистрировался, однако значения ОП₄₉₂ были невысоки и находились в интервале 0.5–0.6 для всех четырех МКАт. Эти данные подтверждают также результаты иммуноблотинга (рисунок 13б), указывающие на терморезистентность эпитопов, выявляемых МКАт1–4.

Таблица 9 – Иммунохимическая активность поринов в ИФА

Антитела	Оптическая плотность при длине волны 492 нм	
	Негретый порин Omp F	Гретый порин Omp F
Мышиная поликлональная сыворотка к порину Omp F	0.872	0.982
МКАт1	0.322	0.497
МКАт2	0.269	0.633
МКАт3	0.292	0.525
МКАт4	0.286	0.595

Примечание. Кипячение препарата Omp F проводилось в течение 15 мин перед постановкой ИФА

Дальнейшее изучение природы эпитопов, выявляемых полученными МКАт, проводили методом иммуноблотинга ряда антигенных препаратов, включая порины Omp F и Omp C *Y. pseudotuberculosis*, с МКАт1–4 и мышинной поликлональной сывороткой к порину Omp F. На рисунке 15 представлен иммуноблот, полученный с использованием одной из линий МКАт (МКАт1), а на рисунке 14 – с вышеуказанной поликлональной сывороткой.

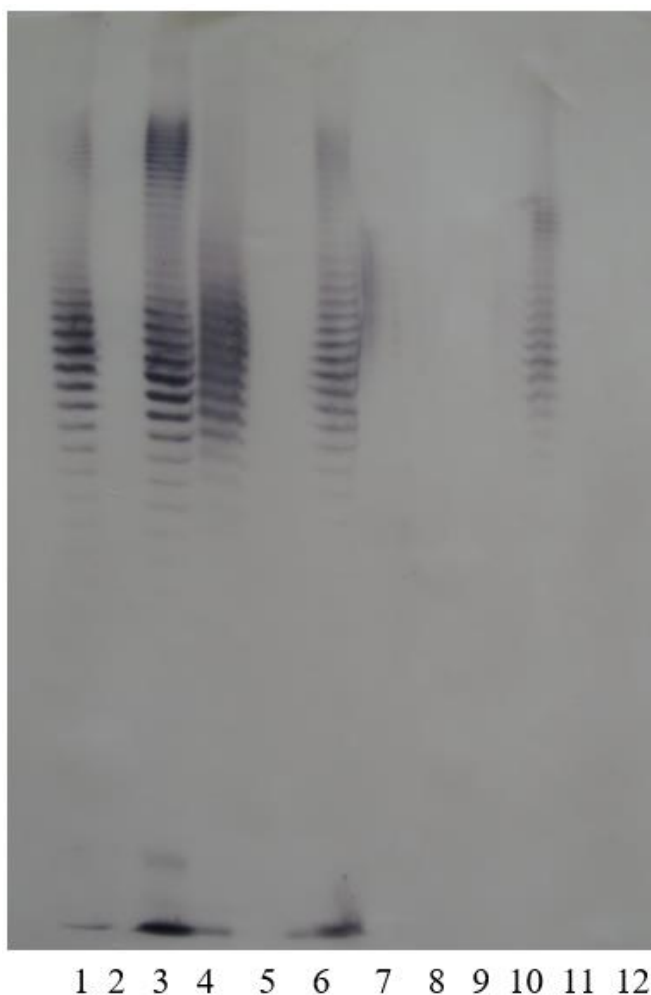


1 2 3 4 5 6 7

1 – ЛПС *Y. pseudotuberculosis*-10; 2 – клетки *Y. pseudotuberculosis*-10; 3 – клетки *Y. pseudotuberculosis*-37; 4 – клетки *Y. pestis* EV-27; 5 – гретый препарат порина Omp F ; 6 – гретый препарат рекомбинантного порина Omp F; 7 – гретый препарат порина Omp C.
Разведение антисыворотки к порину Omp F – 1: 250.

Рисунок 14 – Иммуноблот антигенных препаратов иерсиний с мышшиной поликлональной антисывороткой к порину Omp F

На рисунке 14 видно, что поликлональная сыворотка к Omp F взаимодействует с белками-поринами, а также с O-боковыми цепями, выявляя эти компоненты также и в бактериальных клетках, в том числе белковые компоненты в препарате клеток *Y. pestis*. Эти данные свидетельствуют о наличии общих, родоспецифических антигенных детерминант поринов наружной мембраны иерсиний.



1 – ЛПС *Y. pseudotuberculosis*-10; 2 – ЛПС *Y. pseudotuberculosis*-10, обработанный периодатом Na; 3 – ЛПС *Y. pseudotuberculosis*-10, обработанный протеиназой К; 4 – клетки *Y. pseudotuberculosis*-10; 5 – эти же клетки, обработанные периодатом Na; 6 – эти же клетки, обработанные протеиназой К; 7 – клетки *Y. pseudotuberculosis*-27; 8 – клетки *Y. pseudotuberculosis*-37; 9 – клетки *Y. pestis* EV-27; 10 – гретьй препарат порина Omp F; 11 – гретьй препарат рекомбинантного порина Omp F; 12 – гретьй препарат порина Omp C

Рисунок 15 – Иммуноблот препаратов ЛПС *Y. pseudotuberculosis*-10, клеток *Y. pseudotuberculosis* и поринов с МКАт1 (в разведении 1 : 500)

Как можно видеть на рисунке 15, периодатное окисление *Y. pseudotuberculosis*, выращенных при температуре 10 °С, а также выделенного из них препарата липополисахарида полностью инактивировало эпитопы, распознаваемые МКАт1; протеиназа К не оказывала влияния на иммунохимическую активность вышеупомянутых препаратов. На иммуноблоте препарата Omp F МКАт1 с невысокой активностью выявляли «лестницу», характерную для O-боковых цепей ЛПС, который присутствует в препарате порина

в качестве прочно связанной примеси. Белковых линий, выявляемых при использовании поликлональной сыворотки к порину, в случае применения МКАт1 обнаружено не было. Качественно идентичная картина наблюдалась и в блотинге с МКАт2–4 (данные не приведены).

В целом, оценивая разнородные результаты реагирования в ИФА МКАт1-4 с различными антигенными препаратами (таблицы 6–8), можно утверждать, что моноклональные антитела четырёх линий выявляют неидентичные детерминанты на молекуле ЛПС псевдотуберкулёзного микроба и не взаимодействуют с молекулами использованных поринов. Полученные данные однозначно свидетельствуют о том, что эпитопы, распознаваемые МКАт1-4, ассоциированы с О-боковыми цепями ЛПС *Y. pseudotuberculosis*.

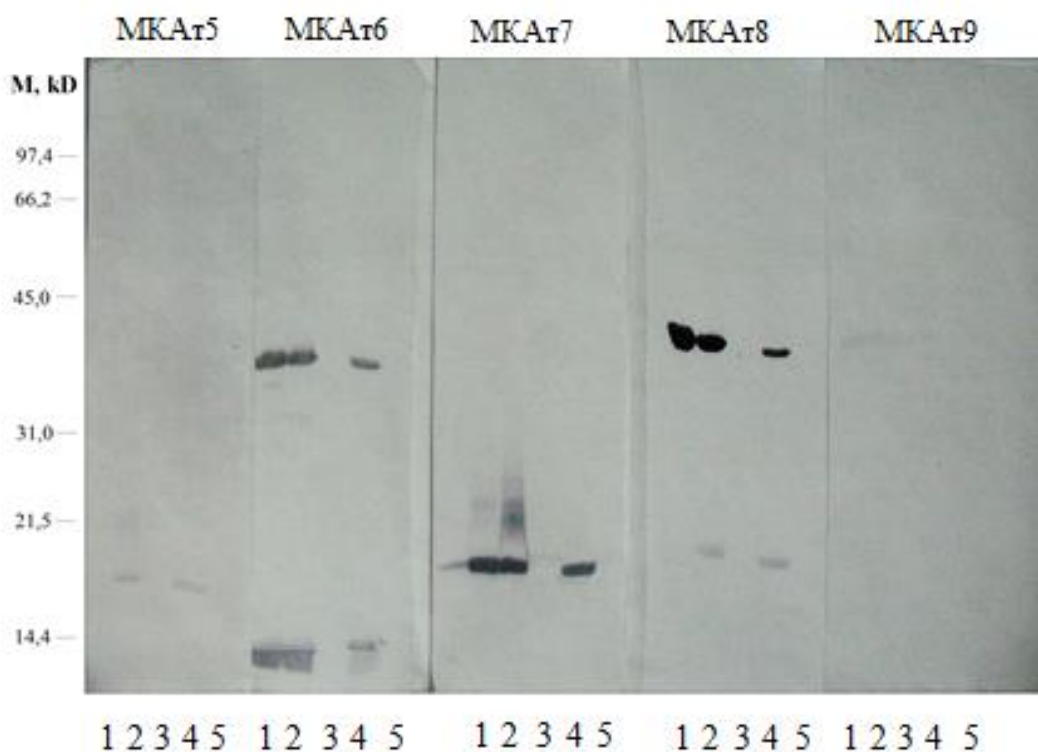
Также можно утверждать, что имеющие значительные отличия МКАт1 и МКАт4 выявляют детерминанты, расположенные на различных участках О-боковых цепей ЛПС. По всей видимости, МКАт1 выявляют эпитопы, локализованные на наружной, расположенной во внеклеточном пространстве области О-боковых цепей. В пользу этого говорит высокая активность в ИФА цельноклеточных препаратов *Y. pseudotuberculosis* (таблица 6), а также тот факт, что периодатное окисление оказывало выраженное инактивирующее влияние на антигенную активность микробов, определяемую в ИФА с МКАт1 (таблица 7). Эпитопы, распознаваемые МКАт4, по всей видимости расположены на прилегающем к коровой области ЛПС наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis* участке О-боковых цепей, менее доступном для взаимодействия с антителами. На это указывают относительно низкая активность как цельных клеток псевдотуберкулёзного микроба, так и препаратов ЛПС в ИФА (данные таблицы 6 получены с помощью МКАт4, взятых в высокой концентрации). Также подтверждением данного предположения служит отсутствие инактивирующего влияния периодата натрия на реакционную способность МКАт4 в отношении клеток *Y. pseudotuberculosis* (таблица 7). Предшествующая же электрофорезу обработка препаратов ЛПС в литическом буфере способствует обнажению

термоустойчивых эпитопов, с высокой эффективностью выявляемых МКАт4 в иммуноблотинге (рисунок 13б).

Полученные результаты, свидетельствующие о видоспецифичности МКАт1-4, позволили разработать иммуноферментную тест-систему для выявления возбудителя псевдотуберкулёза серотипа 1 b на основе МКАт2. Чувствительность тест-системы оказалась не ниже 400 тыс. м.к./мл и ~1000 тыс. м.к./мл для культур, выращенных при температурах 10 и 37 °С соответственно. Специфичность тест-системы подтверждена в опытах с культурами *Y. pestis EV*, *Y. enterocolitica E9*, *E. coli 157*, *Escherichia paracoli 192*, полученными из коллекции ООО «Агровет» в концентрации $100 \cdot 10^6$ м.к. / мл. По результатам этих исследований подана заявка на предполагаемое изобретение «Способ иммуноферментного выявления возбудителя псевдотуберкулеза 1 серотипа на основе моноклональных антител к О-боковым цепям липополисахарида» рег. № 2018124577 от 04.07.2018.

3.2.3.2 Определение химической природы эпитопов, выявляемых МКАт5-9

Для дальнейшего выяснения природы эпитопов, с которыми взаимодействуют МКАт5-9, препараты клеток *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*, а также Б-антиген были подвергнуты электрофорезу с последующим иммуноблотингом. Результаты иммуноблотинга представлены на рисунке 16.

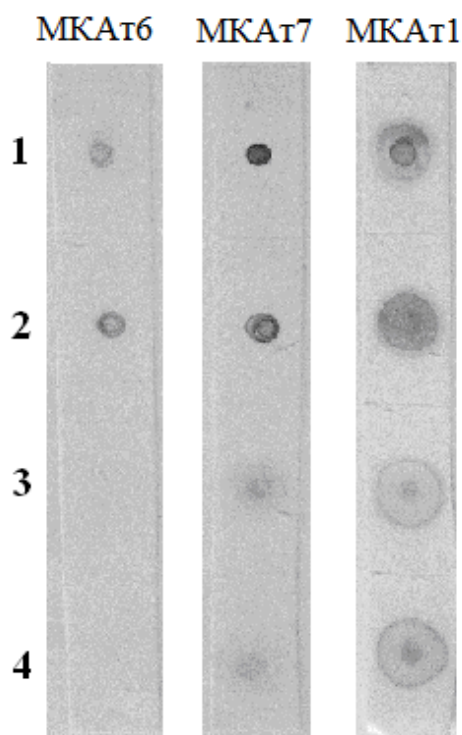


1 – клетки *Y. pseudotuberculosis*-10, 2 – клетки *Y. pseudotuberculosis*-37; 3 – клетки *Y. pseudotuberculosis*-37, обработанные протеиназой К; 4 – клетки *Y. pestis* EV-27, 5 – Б-антиген-10

Рисунок 16 – Иммуноблоты антигенов иерсиний с моноклональными антителами

Как можно видеть на рисунке 16, МКАт5-9 выявляют неидентичные линии, исчезающие при предваряющей электрофорез обработке клеток *Y. pseudotuberculosis* протеиназой К и, соответственно, имеющие белковую природу. Эти данные подтверждают результаты ИФА, свидетельствующие об угнетающем действии протеаз на рецепторы, выявляемые МКАт5-9 (таблица 8), а также об усилении антигенной активности препаратов в отношении этих пяти антител, происходящем при их обработке периодатом натрия (таблица 7).

Интересным представляется тот факт, что в иммуноблотах не выявлялся электрофоретически разделенный препарат Б-антигена, несмотря на его высокую реакционную способность в ИФА. Для выяснения причин этого явления был проведен дот-ИФА с препаратами Б-антигена, подвергавшимися различной обработке.



Препараты Б-антигена: 1 – необработанного, 2 – обработанного протеиназой К, 3, 4 – кипяченого в литическом буфере в течение 3 и 10 мин соответственно

Рисунок 17 – Результаты дот-ИФА препаратов Б-антигена-10 с моноклональными антителами

Результаты, представленные на рисунке 17, свидетельствуют о том, что кипячение в литическом буфере образцов Б-антигена приводило к полной или весьма существенной утрате реакционной способности препарата при взаимодействии с МКАт6 и 7, а также с остальными антителами из группы МКАт5-9 (данные не представлены). Однако, при использовании МКАт1 пробоподготовка Б-антигена к электрофорезу оказывала лишь незначительный ослабляющий эффект. Таким образом, можно говорить о том, что белковые составляющие Б-антигена значительно более восприимчивы к разрушающему действию литического буфера, в отличие от полисахаридной части.

В целом, результаты изучения химической природы эпитопов, с которыми взаимодействуют моноклональные антитела, продуцируемые имеющимися в нашем распоряжении гибридами, позволяют заключить, что МКАт1-4 являются видоспецифическими и взаимодействуют с различными детерминантами, расположенными на О-боковых цепях молекулы ЛПС псевдотуберкулёзного

микроба, а МКАт5-9 выявляют неидентичные эпитопы, находящиеся на белках, являющихся общими для бактерий *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*.

3.3 Химическая природа рецепторов бактериофагов псевдотуберкулёзного диагностического и чумного Покровской

Для выяснения вопроса о локализации и химическом составе рецепторов бактериофагов псевдотуберкулёзного диагностического и Покровской были применены методики, направленные на разрушение соответствующих компонентов наружной мембраны бактерии с дальнейшей оценкой изменений способности бактериофагов к адсорбции. Подобные подходы позволяют определять химическую природу рецепторов. Так как наружная мембрана грамотрицательных бактерий состоит преимущественно из ЛПС, имеющего в своем составе главным образом компоненты углеводной природы, и белков, разрушение этих структур проводили соответственно с помощью периодата натрия и протеиназы К.

3.3.1 Отработка метода адсорбции иерсиниозных бактериофагов на бактериальных клетках

При работе с псевдотуберкулёзным диагностическим бактериофагом возникли методические сложности, связанные с использованием живых клеток в качестве тест-культуры. Оказалось, что данный бактериофаг имеет низкую скорость адсорбции на бактериальной клетке, поэтому для получения выраженных значений уровня адсорбции, что необходимо, главным образом, для уверенной констатации факта адгезии фага или ее отсутствия в каждом отдельном опыте, возникла необходимость в более длительной экспозиции суспензии бактерий с бактериофагом. Однако, при увеличении времени инкубации с использованием живых клеток *Y. pseudotuberculosis* фаговые частицы, сумевшие прикрепиться к поверхности отдельных клеток в начале совместной инкубации, успевали инициировать полный цикл лизиса и произвести второе поколение бактериофага, что приводило к появлению некорректных результатов в опытах по адсорбции. Подобные случаи были описаны М.Н. Adams [13] в его фундаментальной работе

по бактериофагам. В этой связи было принято решение оценить возможность использования при исследовании адсорбции бактериофагов убитые клетки тест-штамма.

Для инактивации бактериальных клеток был использован формальдегид. Согласно литературным данным, подвергшиеся действию относительно небольших концентраций формальдегида бактерии сохраняют свои антигенность и морфологическую структуру, стабильны при длительном хранении [253].

На первом этапе работы была проанализирована специфичность адсорбции псевдотуберкулёзного бактериофага на инактивированные формальдегидом бактерии *Y. pseudotuberculosis*. Результаты представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Специфичность адсорбции бактериофага псевдотуберкулёзного диагностического на живых и убитых бактериях

Бактериальная культура	Количество неадсорбировавшегося бактериофага, %
Контроль (без бактериальных клеток)	100
Клетки <i>Y. pseudotuberculosis</i> -37, живые	75
Клетки <i>Y. pseudotuberculosis</i> -37, убитые	57
<i>E. coli</i> , живые	Зарост чашек культурой <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i> , убитые	108
<i>St. aureus</i> , живые	108
<i>St. aureus</i> , убитые	93

Примечание. Время совместной инкубации бактериальных клеток и бактериофага – 10 минут.

Как видно из таблицы 10, живые и инактивированные формальдегидом клетки *Y. pseudotuberculosis* за равное время (10 мин) совместной инкубации с псевдотуберкулёзным диагностическим бактериофагом адсорбируют на своей поверхности сопоставимые количества фаговых частиц. Допускается вероятность возникновения неспецифической адсорбции бактериофага, вызванной действием

формальдегида на бактериальные клетки, но, по всей видимости, этот эффект незначителен и компенсируется повышением удобства проведения дальнейших экспериментов и получением статистически значимых результатов в опытах по адсорбции псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага. Псевдотуберкулёзный диагностический бактериофаг не адсорбировался ни на живых, ни на убитых клетках *St. aureus*, равно как и на инактивированных клетках *E. coli*. На всех чашках Петри с живой культурой *E. coli* наблюдался сплошной газон бактериальной культуры, отличной от культуры псевдотуберкулёзного микроба, ни одной бляшки не наблюдалось. Это позволяет утверждать, что псевдотуберкулёзный диагностический бактериофаг не способен лизировать культуру *E. coli*. Следует отметить, что использованные условия низкоскоростного центрифугирования не позволяют количественно осажать бактерии, поэтому оставшиеся в надосадочной жидкости клетки *E. coli* в дальнейшем размножились на поверхности питательного агара, подавляя рост тест-штамма *Y. pseudotuberculosis*, характеризующегося существенно меньшей скоростью роста.

В таблице 11 представлены результаты сравнения адгезии бактериофагов псевдотуберкулёзного диагностического и Покровской на живых и убитых клетках при выбранных временных режимах совместной инкубации.

Как можно видеть из таблицы 11, за десять минут на поверхности жизнеспособных клеток *Y. pseudotuberculosis* адсорбируется, в среднем, 27 процентов находящихся в суспензии частиц псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага. Данный уровень адсорбции недостаточен для получения достоверных результатов в каждом отдельном опыте. А при увеличении длительности инкубирования, как отмечалось выше, происходит лизис отдельных бактериальных клеток и соответственно выброс дочерних фаговых частиц, что делает некорректной процедуру определения титра фага. Методический подход с использованием инактивированных клеток псевдотуберкулёзного микроба позволил существенно увеличить количество прикрепившихся к бактериям частиц специфического бактериофага.

Таблица 11 – Эффективность адсорбции иерсиниозных бактериофагов на живые и инактивированные клетки

Бактериофаг	Тест-штамм бактерий	Жизнеспособность клеток	Время совместной инкубации бактериальных клеток и бактериофага	Количество неадсорбированного бактериофага, % ($\bar{X} \pm I_{95}$)
Псевдотуберкулезный диагностический	<i>Y. pseudotuberculosis 1b</i>	Живые	10 мин	73 ± 15
		Убитые	3 ч	42 ± 17
Покровской	<i>Y. pestis EV</i>	Живые	5 мин	24 ± 13
			10 мин	Сплошной лизис
		Убитые	3 ч	12 ± 8

Примечание. I_{95} – доверительный интервал для $p = 0.95$.

Бактериофаг Покровской характеризуется большей скоростью адсорбции. Как видно из таблицы 11, за десять минут инкубации происходит лизис части бактерий и выброс размножившихся фаговых частиц во внеклеточное пространство. За пять минут инкубации к поверхности клеток *Y. pestis* прикрепляется приблизительно 76 процентов частиц бактериофага Покровской. Увеличение времени инкубации до трех часов за счет использования убитых 0.3 % формальдегидом бактерий позволило увеличить адсорбцию до 88 %.

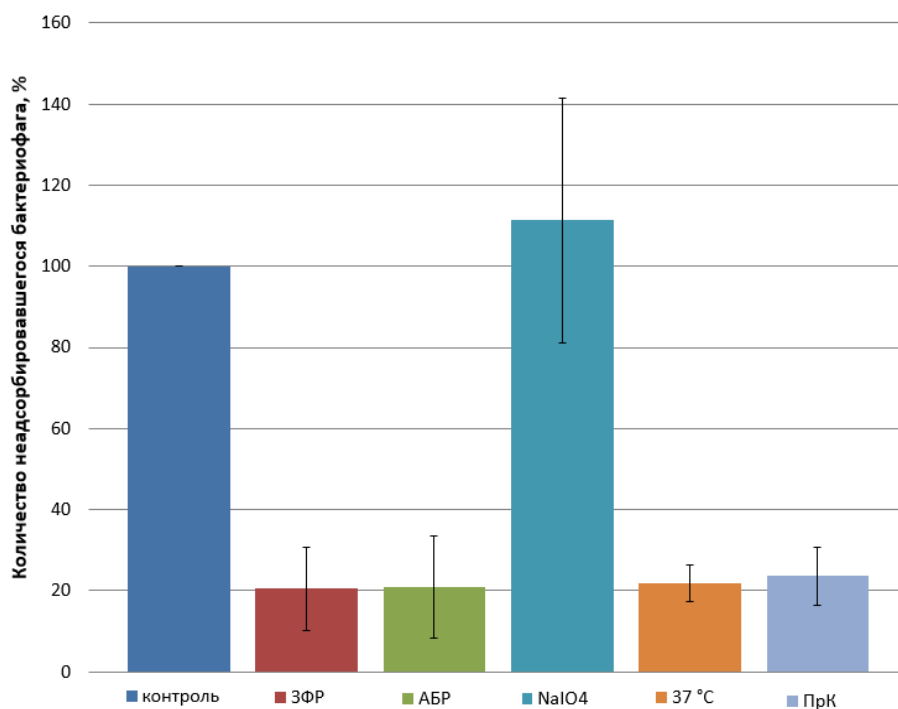
Таким образом, в результате проведенных исследований отработана методика адсорбции бактериофагов псевдотуберкулезного диагностического и Покровской на инактивированные 0.3 % формалином бактериальные клетки. Показано, что данный подход позволяет увеличить количество прикрепившихся фаговых частиц за счет увеличения времени совместного инкубирования с бактериальными клетками. Благодаря использованию убитых клеток повышается воспроизводимость методики и достоверность получаемых результатов, расширяется сфера ее применения. Данный подход особенно актуален при работе с медленно адсорбирующимися бактериофагами, либо фагами, обладающими

очень высокой скоростью адсорбции и лизиса, а также с высокопатогенными бактериями.

Учитывая вышеприведенные результаты, дальнейшие исследования по изучению природы рецепторов иерсиниозных бактериофагов проводились с использованием бактерий, инактивированных 0.3 %-ным формальдегидом.

3.3.2 Определение химической природы рецепторов бактериофага Покровской

Для определения химической природы рецепторов бактериофага Покровской использовали обработку бактериальных клеток периодатом натрия и протеиназой К, результаты которой представлены на рисунке 18.



Контроль – бактериофаг без микробных клеток; ЗФР, АБР – клетки, выдержанные соответственно в забуференном физиологическом растворе либо ацетатном буферном растворе; NaIO₄, ПрК – клетки, обработанные 100 мМ периодатом натрия и протеиназой К соответственно, 37 °C – клетки, выдержанные в забуференном физиологическом растворе при температуре 37 °C

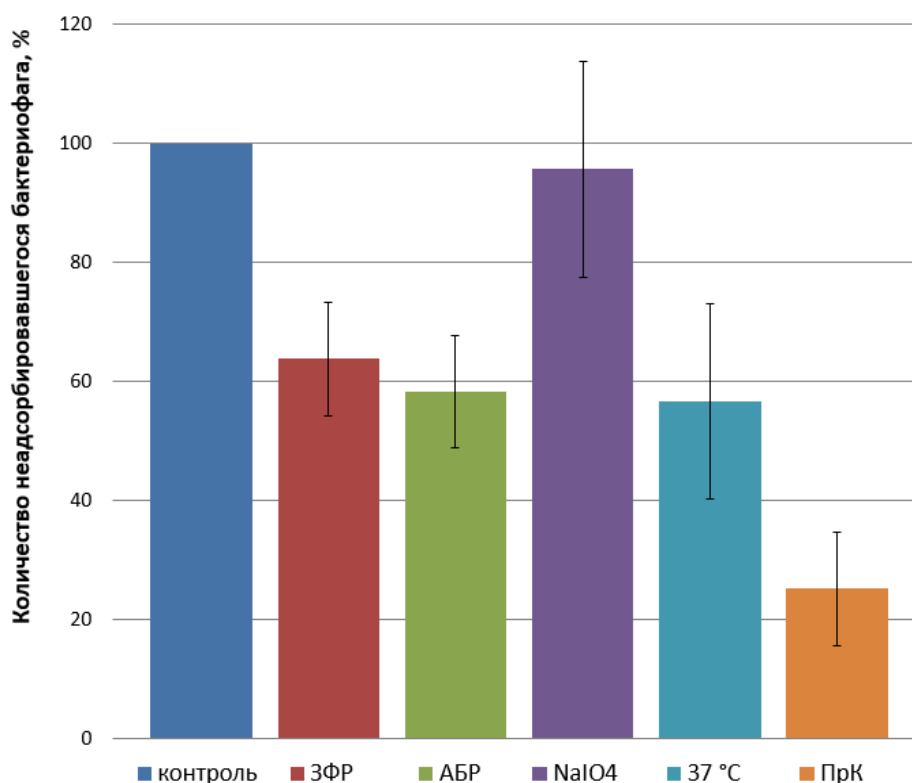
Рисунок 18 – Влияние обработки клеток *Y. pestis EV* периодатом натрия и протеиназой К на адсорбцию бактериофага Покровской

Как можно видеть на рисунке 18, интактные клетки *Y. pestis* адсорбировали на своей поверхности порядка 80 % находящихся в суспензии фаговых частиц.

Практически равное этому количество бактериофага Покровской прикреплялось к поверхности бактерий в дополнительных контролях – при использовании ацетатного буфера и при выдерживании суспензии клеток при температуре 37 °С –, которые соответствовали условиям проведения периодатного окисления и обработки протеиназой К соответственно. Количество прикрепившихся частиц бактериофага Покровской практически не менялось при обработке клеток *Y. pestis* штамма *EV* протеиназой К, в то время как обработка бактерий периодатом натрия приводила к тому, что клетки полностью теряли способность адсорбировать бактериофаг на своей поверхности. Данные результаты позволяют предположить, что бактериофаг Покровской взаимодействует с рецепторами полисахаридной природы, расположенными вероятнее всего на коровой части молекулы липополисахарида. Полученные результаты согласуются с данными А.А. Филиппова и соавторов [14], показавшими, что рецептор бактериофага Покровской ассоциирован с областью Нер II/Нер III на внутренней части кора ЛПС.

3.3.3 Определение химической природы рецепторов псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага

Для определения химической природы рецепторов псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага бактериальные клетки *Y. pseudotuberculosis 1b* подвергались воздействию периодата натрия и протеиназы К. На рисунке 19 представлены результаты этих экспериментов.



Контроль – без микробных клеток; ЗФР, АБР – клетки, выдержанные соответственно в забуференном физиологическом растворе, либо ацетатном буферном растворе; NaIO₄ – клетки, обработанные 100 мМ периодатом натрия, 37 °С – клетки, выдержанные в забуференном физиологическом растворе при температуре 37 °С, ПрК – клетки, обработанные протеиназой К

Рисунок 19 – Влияние обработки клеток *Y. pseudotuberculosis* периодатом натрия и протеиназой К на адсорбцию бактериофага псевдотуберкулёзного диагностического

Как можно видеть на рисунке 19, интактные клетки *Y. pseudotuberculosis* адсорбировали на своей поверхности порядка 40 % псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага. Приблизительно такие же значения уровня адсорбции наблюдались для контрольных препаратов, обозначенных «АБР» и «37 °С», в которых не происходило разрушения компонентов наружной мембраны. После обработки клеток *Y. pseudotuberculosis* периодатом натрия они теряли способность к сорбции псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага, и несвязанными оставалось приблизительно 95.5 % фаговых частиц. Примечательно, что разрушение белковых компонентов наружной мембраны протеиназой К приводило к существенному увеличению количества прикрепившихся к

микробным клеткам частиц псевдотуберкулёзного бактериофага, что можно объяснить повышением доступности рецепторов вследствие гидролитического расщепления соседних белковых структур. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что рецептор псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага имеет полисахаридную природу. Приняв во внимание данные таблицы 1, а также на основании свойств бактериофагов, подобных исследуемому, можно предположить, что рецептор псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага расположен на коровой части молекулы ЛПС.

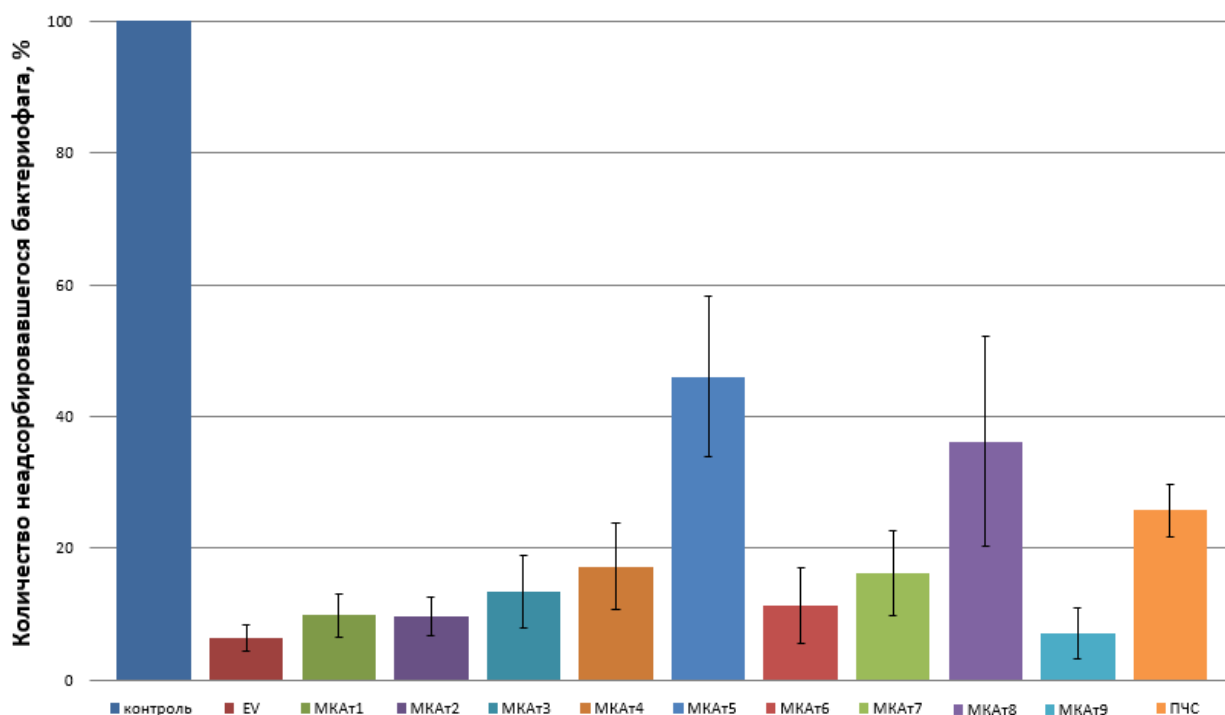
3.4 Конкуренция иерсиниозных бактериофагов и МКАт1-9 за сайты связывания на поверхности бактериальных клеток

Для дальнейшего исследования представлялось важным оценить возможную конкуренцию специфических бактериофагов со специфическими антителами за сайты адсорбции на поверхности бактериальной клетки. Это связано с тем, что при использовании бактериофагов в качестве терапевтического средства, их взаимодействие с микробными клетками в организме человека либо животного может происходить в присутствии антител к возбудителю инфекции. Кроме того, при отработке эффективных и экспрессных схем лечения (и профилактики) ряда бактериальных инфекций следует определить принципиальную возможность сочетанного применения средств фаго- и серотерапии.

Для оценки конкуренции двух иерсиниозных бактериофагов и МКАт1-9 за сайты адсорбции использовали методический подход, основанный на принципе конкурентного ингибирования.

3.4.1 Конкуренция бактериофага Покровской и МКАт

Результаты, полученные для бактериофага Покровской, представлены на рисунке 20.



Препараты бактериофага: без микробных клеток (контроль); с интактными клетками (EV); с клетками, обработанными моноклональными антителами (МКАт1-МКАт9), противочумной сывороткой (ПЧС)

Рисунок 20 – Конкуренция МКАт1-9 и бактериофага Покровской за сайты связывания на поверхности клеток *Y. pestis*-27, штамм EV

Данные, представленные на рисунке 20, свидетельствуют о том, что интактные клетки *Y. pestis* штамма EV адсорбировали из раствора на своей поверхности порядка 90 % фаговых частиц. МКАт1-4, взаимодействующие, как было показано ранее, с О-боковыми цепями молекулы ЛПС *Y. pseudotuberculosis*, практически не влияли или слабо влияли на адсорбцию бактериофага. Это хорошо соотносится с данными о том, что в молекуле липополисахарида чумного микроба полностью отсутствует О-антиген. При этом наблюдалась тенденция к неспецифическому ингибированию рецепторов моноклональными антителами МКАт3 и МКАт4. Обработка клеток поликлональной чумной агглютинирующей сывороткой (ПЧС) приводила к уменьшению количества адсорбированных частиц бактериофага Покровской. Вполне вероятно, что в составе ПЧС содержатся антитела, комплементарные рецепторам этого бактериофага. Возможно также пространственное перекрытие доступа частицам бактериофага к рецепторам,

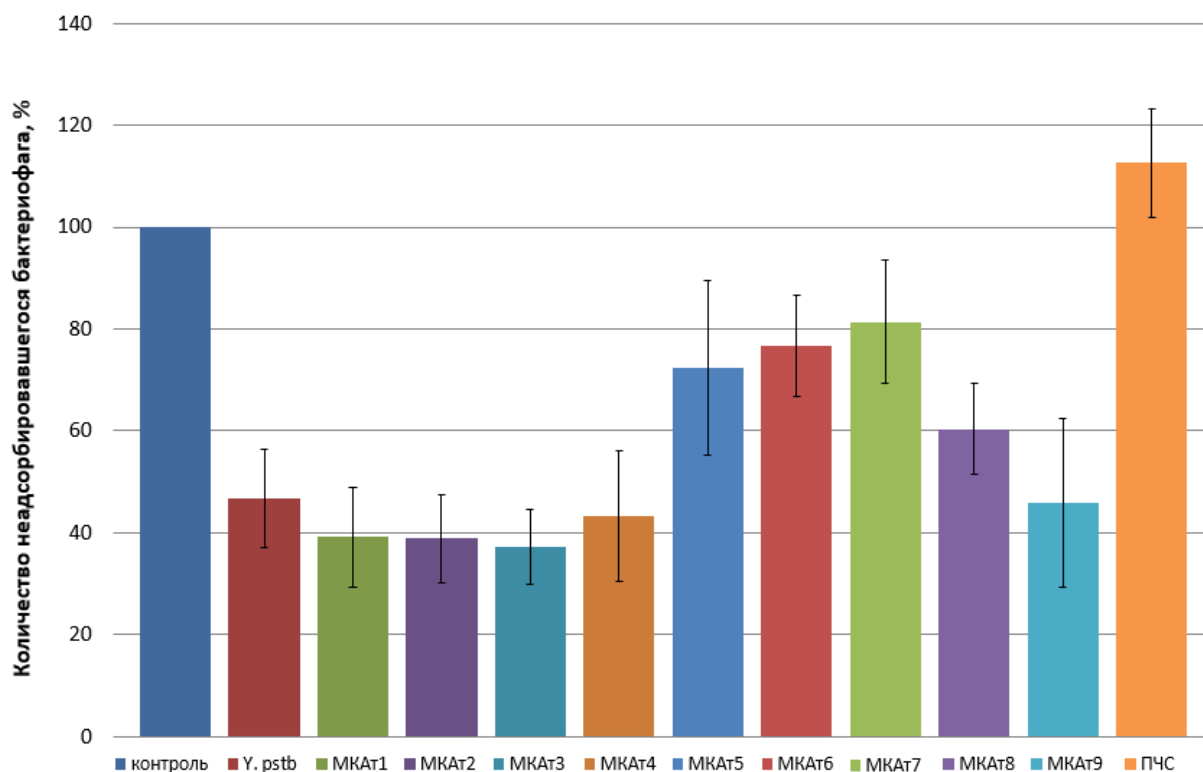
расположенным вблизи эпитопов, распознаваемых антителами, входящими в состав ПЧС. Однако, очевидно, количество конкурирующих с бактериофагом антител в составе ПЧС недостаточно для полной блокировки адсорбции бактериофага Покровской. МКАт6 и МКАт9 не соперничали с бактериофагом за сайты адсорбции. Среди моноклональных антител наибольший блокирующий эффект показали МКАт5 и МКАт8. У МКАт7 способность к ингибированию рецепции была не столь выражена. Так как ранее нами было показано, что МКАт5 и МКАт8 взаимодействуют с детерминантами белковой природы, а рецепторы бактериофага Покровской расположены на коровой части ЛПС [14], полученные результаты объясняются, по-видимому, частичным пространственным экранированием указанными моноклональными антителами доступа бактериофага к близкорасположенным рецепторам карбогидратной природы.

3.4.2 Конкуренция псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага и МКАт

Аналогичный вышеприведенному методический подход был применен и в исследованиях с псевдотуберкулёзным диагностическим бактериофагом. Их результаты представлены на рисунке 21.

На рисунке 21 видно, что МКАт1-4, распознающие эпитопы на О-боковых цепях ЛПС *Y. pseudotuberculosis*, не препятствовали рецепции псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага. Как было показано ранее (пункт 3.1.1), О-боковые цепи не участвуют в адсорбции бактериофага, а их синтез бактериями *Y. pseudotuberculosis* при пониженных температурах приводит к ослаблению способности фаговых частиц взаимодействовать с микробной клеткой. Обработка клеток поликлональной сывороткой ПЧС позволяла полностью предотвратить адсорбцию псевдотуберкулёзного бактериофага на клетки *Y. pseudotuberculosis*. Вероятно, в ее составе содержатся антитела, комплементарные рецепторам псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага, учитывая высокую степень сходства химического состава коровой области ЛПС *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* [72]. Кроме того, столь мощное

ингибирование ПЧС адсорбции бактериофага объясняется и пространственным экранированием сайтов связывания бактериофага антителами к соседним рецептору бактериофага эпитопам ЛПС.



Препараты бактериофага: без микробных клеток (контроль); с интактными клетками *Y. pseudotuberculosis* (*Y. pstb*); с клетками, обработанными моноклональными антителами (МКАт1-МКАт9), противочумной сывороткой (ПЧС)

Рисунок 21 – Конкуренция МКАт1-9 и псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага за сайты связывания на поверхности клеток *Y. pseudotuberculosis* 1b-37

Интересно отметить, что степень такого «неспецифического» ингибирования оказалась выше по сравнению с таковым при использовании системы «клетки *Y. pestis* – ПЧС – бактериофаг Покровской» (рисунок 20). Сам факт такого ингибирования вполне объясним ввиду тесного антигенного родства бактерий этих двух видов. А внешне эти не совсем ожидаемые данные могут объясняться рядом причин: различиями в глубине расположения в наружной мембране рецепторов фагов, несоответствием между антигенностью иммунохимически активных компонентов бактерий *Y. pestis*, использовавшихся для получения ПЧС, и их

количественной экспрессией на поверхности клеток двух видов, выраженной способностью к продукции бактериями *Y. pseudotuberculosis* иммуноглобулинсвязывающих белков, неспецифически (через Fc-фрагмент) взаимодействующих с антителами сыворотки [254], что может вызвать повышенное стерическое блокирование рецепции псевдотуберкулезного фага и др.

МКАт9 не влияли на количество связавшихся фаговых частиц. Клетки *Y. pseudotuberculosis*, обработанные МКАт5, 6, 7 и, в меньшей степени, МКАт8 адсорбировали достоверно меньшее количество бактериофага. Ввиду того, что была показана карбогидратная природа рецепторов псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага и белковая природа эпитопов, распознаваемых МКАт5-8, наиболее вероятным объяснением наблюдаемого явления может служить пространственное экранирование рецепторов бактериофага антителами, присоединившимися к соседним комплементарным белковым эпитопам. Следует отметить, что имеются данные литературы, показывающие возможность одновременного участия в рецепции бактериофага компонентов наружной мембраны как белковой, так и полисахаридной природы [203]. Однако, выше (пункт 3.3.3) было показано, что обработка клеток *Y. pseudotuberculosis* протеиназой К не влияла на способность псевдотуберкулёзного диагностического бактериофага адсорбироваться на бактериальные клетки, что, по-видимому, исключает такую возможность.

Анализируя данные по конкуренции моноклональных антител с использованными в работе иерсиниозными бактериофагами за сайты адсорбции можно сделать вывод о том, что МКАт1-4, взаимодействующие с эпитопами О-антигена, практически не препятствуют адсорбции обоих бактериофагов к соответствующим клеткам-мишеням. МКАт5-8, выявляющие белковые эпитопы наружной мембраны иерсиний, частично блокируют рецепцию бактериофагов псевдотуберкулёзного диагностического и Покровской, по всей видимости, неспецифически препятствуя доступу бактериофагов к рецепторам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы были исследованы иммунохимические особенности механизмов рецепции бактериофагов псевдотуберкулёзного диагностического и чумного Покровской. Показано, что бактериофаг псевдотуберкулёзный диагностический производства ФКУЗ НИПЧИ «Микроб» не является видоспецифическим и способен лизировать также клетки *Y. pestis*. Выявлено заметное ослабление литической способности псевдотуберкулёзного бактериофага с понижением температуры культивирования бактерий тест-штамма *Y. pseudotuberculosis*, что указывает на неучастие О-боковых цепей липополисахарида возбудителя в рецепции бактериофага. Показано, что бактериофаг псевдотуберкулёзный диагностический относится, как и чумной Покровской, к семейству *Podoviridae*, морфотип С1. Он имеет головку икосаэдрической формы диаметром вдоль центральной оси (52.3 ± 2.2) и шириной (50.2 ± 0.9) нм и короткие не способные к сокращению хвосты длиной (13.0 ± 1.2) нм.

В ходе исследования установлено, что *Y. pseudotuberculosis 1b* и *Y. pestis EV* способны к образованию везикул, присутствие специфических бактериофагов в бактериальной суспензии усиливает везикулообразование, а также вызывает морфологические изменения клеток.

Установлено, что моноклональные антитела девяти линий (МКАТ1-9), использованные для изучения механизмов рецепции иерсиниозных бактериофагов, распознают неидентичные эпитопы на поверхности клеток *Y. pseudotuberculosis*. Их можно разделить на две группы – МКАТ1-4 и МКАТ5-9. МКАТ1-4 проявляют наибольшую активность в ИФА с клетками *Y. pseudotuberculosis*, выращенными при низких температурах, а также выделенными из них препаратами ЛПС. МКАТ5-9 более эффективно взаимодействуют с Б-антигеном, представляющим собой везикулы псевдотуберкулёзного микроба, а также клетками *Y. pseudotuberculosis*, выращенными при температуре 37 °С, и клетками *Y. pestis*. Показано, что обработка иерсиниозных антигенных препаратов периодатом натрия, в целом, приводила к снижению их иммунохимической активности при взаимодействии с МКАТ1-4, но

при этом вызывала значительное повышение регистрируемого сигнала для МКАт5-9. Протеолитические ферменты при анализе методом ИФА угнетающе действовали на активность таких препаратов в ИФА с моноклональными антителами всех девяти линий. Совокупность результатов, полученных с использованием нескольких методов (иммуноблотинг, ИФА, электрофорез в ПААГ) позволила установить, что МКАт1-4 выявляют О-боковые цепи ЛПС *Y. pseudotuberculosis*, а МКАт5-9 – белковые эпитопы наружной мембраны патогенных иерсиний, локализованные не на поринах Omp F или Omp C.

Была отработана методика адсорбции частиц бактериофага на убитые бактериальные клетки. Инактивацию псевдотуберкулезного и чумного микробов осуществляли добавлением формальдегида до конечной концентрации 0.3 %. Показано, что за счет увеличения времени совместной инкубации бактериальных клеток и бактериофага можно повысить количество адсорбированных фаговых частиц. Это позволяет воспроизводимо получать более достоверные результаты при работе с бактериофагами, характеризующимися либо высокой либо низкой скоростью адгезии к бактериальной клетке, а также делает более безопасной работу с высокопатогенными возбудителями.

При исследовании химической природы рецепторов, распознаваемых исследуемыми бактериофагами, было установлено, что окисление полисахаридных компонентов наружной мембраны бактериальных клеток чумного микроба периодатом натрия позволяло полностью предотвратить адсорбцию бактериофага Покровской. Этот факт подтверждает имеющиеся в литературных источниках данные, что рецептор бактериофага Покровской расположен на коре липополисахарида чумного микроба [14].

Адсорбция бактериофага псевдотуберкулезного диагностического также прекращалась после обработки клеток *Y. pseudotuberculosis* периодатом натрия. Действие протеиназы К приводило к увеличению числа адсорбированных частиц псевдотуберкулезного диагностического бактериофага. Эти данные, а также результаты оценки литической способности псевдотуберкулезного бактериофага при различных температурах культивирования бактерий позволяют заключить, что

рецептор данного бактериофага ассоциирован с коровой областью липополисахарида *Y. pseudotuberculosis*.

Результаты исследования процесса адсорбции бактериофага Покровской методом конкурентного ингибирования с помощью имеющихся моноклональных антител свидетельствуют о том, что МКАт1-4 не подавляли процесс адсорбции этого бактериофага. Для МКАт3 и 4 отмечается тенденция к частичному, очевидно, неспецифическому экранированию рецепторов бактериофага, что может объясняться их пространственной близостью к комплементарным названным антителам эпитопам, расположенным на О-боковых цепях, по-видимому, достаточно близко к коровой области ЛПС. Поликлональная чумная агглютинирующая сыворотка, содержащая антитела к различным эпитопам на поверхности чумного микроба, в том числе, возможно, и детерминантам кора ЛПС, в большей мере, чем МКАт3 и МКАт4, блокировала рецепцию бактериофага Покровской. Среди использованных моноклональных антител существенный ингибирующий эффект на процесс адсорбции бактериофага Покровской оказали МКАт5 и МКАт8, в несколько меньшей степени – МКАт7. Очевидно, блокирующее действие этих антител определяется их взаимодействием с белковыми эпитопами наружной мембраны, находящимися в непосредственной близости к рецептору фага.

Было установлено также, что МКАт1-4 и 9 не препятствуют рецепции псевдотуберкулезного диагностического бактериофага, в то время как поликлональная чумная агглютинирующая сыворотка полностью блокировала рецепторы псевдотуберкулезного бактериофага либо за счет взаимодействия непосредственно с рецептором бактериофага, либо за счет пространственного неспецифического экранирования рецепторов антителами к близкорасположенным структурам наружной мембраны. Очевидно, по этой же причине регистрировали уменьшение количества частиц прикрепившегося к клеткам *Y. pseudotuberculosis* бактериофага при использовании МКАт5-8.

Представленные результаты работы позволяют глубже понять механизмы рецепции иерсиниозных бактериофагов к поверхности микробной клетки.

Полученные знания могут быть востребованы в исследованиях, направленных на разработку средств и методов иммунодиагностики и фаготерапии инфекций, вызываемых патогенными иерсиниями.

ВЫВОДЫ

1. Иммунохимически охарактеризованы моноклональные антитела, продуцируемые гибридомами 9 линий и выявляющие поверхностные антигены иерсиний. Показано, что эпитопы, распознаваемые моноклональными антителами МКАт1-4, являются неидентичными и расположены на О-боковых цепях молекулы липополисахарида *Y. pseudotuberculosis*; МКАт5-9 выявляют различные белковые эпитопы наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis*, расположенные не на поринах Omp F и Omp C.

2. Методом конкурентного ингибирования выявлена способность МКАт5-8 частично блокировать адсорбцию бактериофага псевдотуберкулёзного диагностического, а МКАт5,7 и 8 – бактериофага чумного Покровской на клетках *Y. pseudotuberculosis 1b* и *Y. pestis EV* соответственно. МКАт1-4 не оказывали выраженного ингибирующего влияния на адсорбционную способность двух указанных бактериофагов.

3. Установлено, что бактериофаг псевдотуберкулёзный диагностический относится к морфотипу С1 семейства *Podoviridae* и способен лизировать бактерии *Y. pestis EV*. Его рецепторы, так же как и рецепторы бактериофага чумного Покровской, ассоциированы с коровой областью липополисахарида бактерий.

4. Показана возможность проведения исследований по оценке адсорбционной способности бактериофагов на нежизнеспособных микробных клетках. Использование инактивированных формальдегидом бактерий *Y. pseudotuberculosis* позволяет существенно повысить уровень адсорбции бактериофага псевдотуберкулёзного диагностического, характеризующегося низкой скоростью адсорбции, за счет увеличения времени совместной инкубации. Усовершенствованная методика позволяет повысить воспроизводимость анализа и достоверность получаемых результатов, упрощает работу с вирулентными бактериями.

5. Впервые показана способность бактерий *Y. pseudotuberculosis* продуцировать внеклеточные везикулы. Инкубация бактериофагов

псевдотуберкулёзного диагностического и чумного Покровской соответственно с клетками *Y. pseudotuberculosis 1b* и *Y. pestis EV* приводит к повышению уровня везикулообразования и выраженным морфологическим изменениям бактерий.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Stenseth, N.C. Plague: Past, Present, and Future / N.C. Stenseth, B.B. Atshabar, M. Begon, S.R. Belmain, E. Bertherat, E. Carniel, K.L. Gage, H. Leirs, L. Rahalison // *PLoS Medicine*. – 2008. – V. 5. – № 1. – e3.
2. Feodorova, V.A. Prospects for new plague vaccines / V.A. Feodorova, M.J. Corbel // *Expert Rev. Vaccines*. – 2009. – V. 8 – № 12. – P. 1721-1738.
3. World Health Organization Regional Office for Africa. Plague outbreak situation reports 2017 [Электронный ресурс]: Режим доступа: <http://www.afro.who.int/health-topics/plague/plague-outbreak-situation-reports>. свободный. – Проверено: 15.08.2018.
4. Galimand, M. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid / M. Galimand, A. Guiyoule, G. Gerbaud, B. Rasoamanana, S. Chanteau, E. Carniel, P. Courvalin // *The New England Journal of Medicine*. – 1997. – V. 337. – № 10. – P. 677-680.
5. Guiyoule, A. Transferable Plasmid-Mediated Resistance to Streptomycin in a Clinical Isolate of *Yersinia pestis* / A. Guiyoule, G. Gerbaud, C. Buchrieser, M. Galimand, L. Rahalison, S. Chanteau, P. Courvalin, E. Carnie // *Emerging Infectious Disease*. – 2001. – V. 7. – № 1. – P. 43-48.
6. Riedel, S. Plague: from natural disease to bioterrorism / S. Riedel // *BUMC Proceedings*. – 2005 – V. 7. – № 1. – P. 116-124.
7. Galimand, M. Resistance of *Yersinia pestis* to Antimicrobial Agents / M. Galimand, E. Carniel, P. Courvalin // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2006. – V. 50. – № 10. – P. 3233-3236.
8. Inglesby, T.V. Plague as a Biological Weapon / T.V. Inglesby, D.T. Dennis, D.A. Henderson, J.G. Bartlett, M.S. Ascher, E. Eitzen, A.D. Fine, A.M. Friedlander, J. Hauer, J.F. Koerner, M. Layton, J. McDade, M.T. Osterholm, T. O'Toole, G. Parker, T.M. Perl, P.K. Russell, M. Schoch-Spana, K. Tonat // *JAMA*. – 2000. – V. 283. – № 17. – P. 2281-2290.
9. Kanazawa, Y. Isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from human specimens and their drug-resistance in the Niigata District of Japan / Y.

- Kanazawa, K. Ikemura // *Contributions to Microbiology and Immunology*. – 1979. – V. 5. – P. 106-114.
10. Kimura, S.R. Plasmids from *Yersinia* / S. Kimura, T. Ikeda, T. Eda, Y. Mitsui K. Nakata // *Journal of General Microbiology*. – 1976. – V. 97. – P. 141-144.
11. Псевдотуберкулёз / Сомов Г.П. [и др.]; М.: Медицина, 2001. 256 с.
12. Cisek, A.A. Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages / A.A. Cisek, I. Dąbrowska, K.P. Gregorczyk, Z. Wyżewski // *Curr Microbiol*. – 2017. – V. 74. – № 2. – P. 277-283.
13. *Bacteriophages* / Adams, M.H.; N.Y.: Interscience Publishers, Inc., 1959. 618 pp.
14. Filippov, A.A. Bacteriophage-Resistant Mutants in *Yersinia pestis*: Identification of Phage Receptors and Attenuation for Mice / A.A. Filippov, K.V. Sergueev, Y. He, X.-Z. Huang, B.T. Gnade, A.J. Mueller, C.M. Fernandez-Prada, M.P. Nikolich // *PLoS ONE*. – 2011. – V. 6. – № 9. – e25486.
15. Fredriksson-Ahomaa, M. Identification of *Yersinia* at the Species and Subspecies Levels Is Challenging / M. Fredriksson-Ahomaa, S. Joutsen, R. Laukkanen-Ninios // *Current Clinical Microbiology Reports*. – 2018. – V. 5. – № 2. – P. 135–142.
16. Carniel, E. Evolution of Pathogenic *Yersinia*, Some Lights in the Dark // *The Genus Yersinia*. – 2003. – P. 3-12.
17. Seecharran, T. Phylogeographic separation and formation of sexually discreet lineages in a global population of *Yersinia pseudotuberculosis* / T. Seecharran, L. Kalin-Mänttari, K.A. Koskela, S. Nikkari, B. Dickins, J. Corander, Mikael Skurnik, A. McNally // *Microbial Genomics*. – 2017. – V. 3. – № 10. – P. 1-9.
18. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации [Электронный ресурс]: Режим доступа: http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic_detail.php?ID=7804&sphrase_id=910699. – Проверено: 17.08.2018.
19. Тимченко, Н.Ф. Актуальные вопросы микробиологии, клиники и диагностики дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки, вызванной *Yersinia pseudotuberculosis* / Н.Ф. Тимченко, А.Ф. Попов, Б.Г. Андрюков // *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. – 2015. – Т. 2. – № 60. – С. 94-100.

20. Книрель, Ю.А. В борьбе за контролем над чумой. Прошлое и настоящее «Чёрного моря» / Ю.А. Книрель, В.А. Фёдорова, А.П. Анисимов // Вестник российской академии наук. – 2011. – Т. 81. – № 1. – С. 33-42.
21. Perry, R.D. *Yersinia pestis* – Etiologic Agent of Plague / R.D. Perry, J.D. Fetherston // *Clinical Microbiology Reviews*. – 1997. – V. 10. – № 1. – P. 35-66.
22. Pechous, R.D. Pneumonic plague: the darker side of *Yersinia pestis* / R.D. Pechous, V. Sivaraman, N. M. Stasulli, W.E. Goldman // *Trends in microbiology*. – 2016. – V. 24. – № 3. – P. 190-197.
23. Gonzalez, R. J. A deadly path: bacterial spread during bubonic plague / R. J. Gonzalez, V. L. Miller // *Trends in microbiology*. – 2016. – V. 24. – № 4. – P. 239-241.
24. Feodorova, V.A. The interaction of *Yersinia pestis* with erythrocytes / V.A. Feodorova, Z.L. Devdariani // *Journal of medical microbiology*. – 2002. – V. 51. – № 2. – P. 150-158.
25. Anisimov, A.P. Treatment of plague: promising alternatives to antibiotics / A.P. Anisimov, K.K. Amoako // *Journal of Medical Microbiology*. – 2006. – V. 55. – P.1461–1475.
26. Ayyadurai, S. Long-term persistence of virulent *Yersinia pestis* in soil / S. Ayyadurai, L. Houhamdi, H. Lepidi, C. Nappez, D. Raoult, M. Drancourt // *Microbiology*. – 2008. – V. 154. – № 9. – P. 2865-2871.
27. Eisen, R.J. Persistence of *Yersinia pestis* in soil under natural conditions / R.J. Eisen, J.M. Petersen, C.L. Higgins, D. Wong, C.E. Levy, P.S. Mead, M.E. Schriefer, K.S. Griffith, K.L. Gage, C.B. Beard // *Emerging infectious diseases*. – 2008. – V. 14. – № 6. – P. 941-943.
28. Breneva, N.V. The population variability of *Yersinia pestis* in soil samples from the natural focus of plague / N.V. Breneva, A.S. Maramovich, V.T. Klimov // *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. – 2006. – V. 2. – P. 7-11.
29. Suchkov I.G. The possibility of preserving the causative agent of plague in soil in resting (nonculturable) form / Iu.G. Suchkov, I.V. Khudiakov, E.N. Emel'ianenko, M.I. Levi, V.I. Pushkareva, I.Iu. Suchko, V.Iu. Litvin, E.V. Kulesh, R.S. Zotova, A.L.

Gintsburg // Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii. – 1997. – № 4. – P. 42-46.

30. Pawlowski, D.R. Entry of *Yersinia pestis* into the viable but nonculturable state in a low-temperature tap water microcosm / D.R. Pawlowski, D.J. Metzger, A. Raslawsky, A. Howlett, G. Siebert, R.J. Karalus, S. Garrett., C.A. Whitehouse // PLoS One. – 2011. – V. 6. – № 3. – e17585.

31. Torosian, S.D. A refrigeration temperature of 4° C does not prevent static growth of *Yersinia pestis* in heart infusion broth / S.D. Torosian, P.M. Regan, T. Doran, M.A. Taylor, A. Margolin // Canadian journal of microbiology. – 2009. – V. 55. – № 9. – P. 1119-1124.

32. Achtman, M. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis* / M. Achtman, K. Zurth, G. Morelli, G. Torrea, A. Guiyoule, E. Carniel // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1999. – V. 96. – № 24. – P. 14043-14048.

33. 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, J. Brault, G.R. Fanning, A.G. Steigerwalt, D.J. Brenner // Current microbiology. – 1980. – V. 4. – № 4. – P. 225-229.

34. Сунцов, В.В. Видообразование и внутривидовая адаптивная радиация возбудителя чумы – микроба *Yersinia pestis* как градуалистический эволюционный процесс / В.В. Сунцов, В.В. Сунцова // Медицинский академический журнал. – 2010. – Т. 10. – № 2. – С. 58-63.

35. Сунцов, В.В. Происхождение возбудителя чумы – микроба *Yersinia pestis*: концепция популяционно-генетической макроэволюции в переходной среде / В.В. Сунцов // Журнал общей биологии. – 2015. – Т. 76. – № 1. – С. 324-332.

36. Сунцов, В.В. Экологические аспекты происхождения возбудителя чумы *Yersinia pestis*: концепция промежуточной среды / В.В.Сунцов // Сибирский экологический журнал. – 2014. – № 1. – С. 3-16.

37. Сунцов, В.В. Происхождение и мировая экспансия возбудителя чумы *Yersinia pestis*: фактор изоляции / В.В.Сунцов // Успехи современной биологии. – 2014. – Т. 134. – № 4. – С. 409–423.
38. Prentice, M.B. *Yersinia pestis* pFra Shows Biovar-Specific Differences and Recent Common Ancestry with a *Salmonella enterica* Serovar Typhi Plasmid / M.B. Prentice, K.D. James, J. Parkhill, S.G. Baker, K. Stevens, M.N. Simmonds, K.L. Mungall, C. Churcher, P.C.F. Oyston, R.W. Titball, B.W. Wren, J. Wain, D. Pickard, T.T. Hien, J.J. Farrar, G. Dougan // *Journal of bacteriology*. – 2001. – V. 183. – № 8. – P. 2586-2594.
39. Rudolph, A.E. Expression, Characterization, and Mutagenesis of the *Yersinia pestis* Murine Toxin, a Phospholipase D Superfamily Member / A.E. Rudolph, J.A. Stuckey, Y. Zhao, H.R. Matthews, W.A. Patton, J. Moss, J.E. Dixon // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – V. 274. – № 17. – P. 11824-11831.
40. Hinnebusch, B.J. Role of *Yersinia murine* toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector / B. J. Hinnebusch, A.E. Rudolph, P. Cherepanov, J.E. Dixon, T.G. Schwan, A. Forsberg // *Science*. – 2002. – V. 296. – № 5568. – P. 733-735.
41. Hinnebusch, B.J. Role of the *Yersinia pestis* hemin storage (hms) locus in the transmission of plague by fleas / B.J. Hinnebusch, R.D. Perry, T.G. Schwan // *Science*. – 1996. – V. 273. – N 5273. – P. 367-370.
42. Pendrak, M.L. Characterization of a hemin-storage locus of *Yersinia pestis* / Pendrak M. L., Perry R. D. // *Biology of metals*. – 1991. – V. 4. – № 1. – P. 41-47.
43. Sodeinde, O.A. A surface protease and the invasive character of plague / O.A. Sodeinde, Y.V. Subrahmanyam, K. Stark, T. Quan, Y. Bao, J.D. Goguen // *Science*. – 1992. – V. 258. – № 5084. – P. 1004-1007.
44. Parkhill, J. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague / J. Parkhill, B.W. Wren, N.R. Thomson, R.W. Titball, M.T.G. Holden, M.B. Prentice, M. Sebaihia, K.D. James, C. Churcher, K. L. Mungall, S. Baker, D. Basham, S. D. Bentley, K. Brooks, A. M. Cerdeño-Tárraga, T. Chillingworth, A. Cronin, R.M. Davies, P. Davis, G. Dougan, T. Feltwell, N. Hamlin, S. Holroyd, K. Jagels, A.V. Karlyshev, S. Leather, S. Moule, P.C.F. Oyston, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead, B.G. Barrell // *Nature*. – 2001. – V. 413. – № 6855. – P. 523-527.

45. Deng, W. Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM / W. Deng, V. Burland, G. Plunkett III, A. Boutin, G.F. Mayhew, P. Liss, N.T. Perna, D.J. Rose, B. Mau, S. Zhou, D.C. Schwartz, J.D. Fetherston, L.E. Lindler, R.R. Brubaker, G.V. Plano, S.C. Straley, K.A. McDonough, M.L. Nilles, J.S. Matson, F.R. Blattner, R.D. Perry // *Journal of bacteriology*. – 2002. – V. 184. – № 16. – P. 4601-4611.
46. Zhao, X. Bacteriophages of *Yersinia pestis* / X. Zhao, M. Skurnik // *Yersinia pestis: Retrospective and Perspective*. – 2016. – P. 361-375.
47. Derbise, A.A Horizontally acquired filamentous phage contributes to the pathogenicity of the plague bacillus / A. Derbise, V. Chenal-Francisque, F. Pouillot, C. Fayolle, M.-C. Prévost, C. Médigue, B.J. Hinnebusch, E. Carniel // *Molecular microbiology*. – 2007. – V. 63. – № 4. – P. 1145-1157.
48. Инфекционные болезни и эпидемиология: Учебник / Покровский В.И. [и др.]; М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 816 с.
49. Афанасьев, Н.Н. Псевдотуберкулёз у детей / Н.Н. Афанасьев // *Мать и дети в Кузбассе*. – 2008 - № 1. – С. 3-5.
50. Meyer K.F. Fortschritte in der Erforschung und Behandlung der Pest. / K.F. Meyer // *Schweiz. Med. Wochenschr.* – 1960. – Bd. 90. – P. 1392-1398.
51. Шанина Л.Н. Аутоиммунные реакции у животных, привитых живой, убитой и «химической» противочумными вакцинами / Л.Н. Шанина, С.М. Дальвадянец // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 1978. - №5. – С. 63-64.
52. Meyer K. F. Recent studies on the immunity response to administration of different plague vaccines // *Bull. WHO* – 1953. – V. 9. – № 5. – P. 619-636.
53. Дальвадянец, С.М. Сравнительное изучение напряженности противочумного иммунитета у белых мышей, привитых «химической» и живой чумными вакцинами / С.М. Дальвадянец, Т.М. Дробышева // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 1977. - № 6. – С. 31-33.
54. Александров, Н.И. Активная специфическая профилактика инфекционных заболеваний и пути ее усовершенствования / Н.И. Александров, Н.Е. Гефен // Под ред. Е.И. Смирнова. М.: Воениздат, 1962. 391 с.

55. Girard, G. La vaccination de l'homme contre la peste au moyen de bacilles vivants (virus vaccin EV), son application a Madagascar / G. Girard, J. Robic // Bull. Off. Int. Hyg. Publ. – 1936. – V. 28. – № 6. – P. 1078-1087.
56. Живая противочумная вакцина (теория и практика иммунопрофилактики чумы) / Коробкова Е.И.; М.: Медгиз, 1956. 208 с.
57. Кутырев, В. В. Сравнительная генетическая характеристика вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV и его предполагаемых «вирулентных производных» / Кутырев В.В., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Виноградова Н.А. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2009. – №. 3. – С. 50-56.
58. Anisimov, A.P. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis* / A.P. Anisimov, L.E. Lindler, G.B. Pier // Clinical microbiology reviews. – 2004. – V. 17. – № 2. – P. 434-464.
59. Молекулярная чумная вакцина / Бывалов А.А.; Екатеринбург: УрО РАН, 2011. 96 с.
60. Welch, T.J. Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk / T.J. Welch, W.F. Fricke, P.F. McDermott, D.G. White, M.-L. Rosso, D.A. Rasko, M.K. Mammel, M. Eppinger, M.J. Rosovitz, D. Wagner, L. Rahalison, J.E. LeClerc, J.M. Hinshaw, L.E. Lindler, T.A. Cebula, E. Carniel, J. Ravel, // PloS one. – 2007. – V. 2. – № 3. – e309.
61. Ligon, B.L. Plague: A Review of its history and potential as a biological weapon / B.L. Ligon // Seminars in pediatric infectious diseases. – WB Saunders, 2006. – V. 17. – № 3. – P. 161-170.
62. Schwechheimer, C. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions / C. Schwechheimer, M.J. Kuehn // Nature reviews microbiology. – 2015. – V. 13. – № 10. – P. 605-619.
63. Beveridge, T.J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles / T.J. Beveridge // Journal of bacteriology. – 1999. – V. 181. – № 16. – P. 4725-4733.
64. Michel, L.V. Dual orientation of the outer membrane lipoprotein Pal in *Escherichia coli* / L.V. Michel, J. Shaw, V. MacPherson, D. Barnard, J. Bettinger, B. D'Arcy, N.

Surendran, J. Hellman, M.E. Pichichero // *Microbiology*. – 2015. – V. 161. – № 6. – P. 1251-1259.

65. Skurnik, M. The biosynthesis and biological role of lipopolysaccharide O-antigens of pathogenic *Yersinia* / M. Skurnik, J.A. Bengoechea // *Carbohydrate research*. – 2003. – V. 338. – № 23. – P. 2521-2529.

66. Goldman, R.C. Identification of outer membrane proteins, including known lymphocyte mitogens, as the endotoxin protein of *Escherichia coli* 0111 / R.C. Goldman, D. White, L. Leive // *The Journal of Immunology*. – 1981. – V. 127. – № 4. – P. 1290-1294.

67. Westphal, O. Bacterial lipopolysaccharide. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure / O. Westphal, K. Jann // *Methodes Carbohydr. Chem.* – 1965. – V. 5. – P. 83-91.

68. Дентовская С.В. Молекулярно-генетические механизмы образования и функциональная значимость липополисахарида *Yersinia pestis* : диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук : 03.02.03 - микробиология 03.01.04 – биохимия. М., 2012.

69. Erickson, D.L. Lipopolysaccharide biosynthesis genes of *Yersinia pseudotuberculosis* promote resistance to antimicrobial chemokines / D.L. Erickson, C.S. Lew, B. Kartchner, N.T. Porter, S.W. McDaniel, N.M. Jones, S. Mason, E. Wu, E. Wilson // *PloS one*. – 2016. – V. 11. – № 6. – e0157092.

70. Aussel, L. Novel variation of lipid A structures in strains of different *Yersinia* species / L. Aussela, H. Therisoda, D. Karibiana, M.B. Perryb, M. Bruneteauc, M. Caroff // *FEBS letters*. – 2000. – V. 465. – № 1. – P. 87-92.

71. Bacterial Lipopolysaccharides: Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cells / Knirel Y.A., M.A. Valvano; N.Y.: Springer Wien NewYork, 2011. 453 pp.

72. Книрель, Ю. А. Липополисахарид чумного микроба *Yersinia pestis*: структура, генетика, биологические свойства / Ю.А. Книрель, А.П. Анисимов // *Acta Naturae* (русскаяязычная версия). – 2012. – Т. 4. – №. 3. – С. 49-61.

73. Kawahara, K. Modification of the structure and activity of lipid A in *Yersinia pestis* lipopolysaccharide by growth temperature / K. Kawahara, H. Tsukano, H. Watanabe, B. Lindner, M. Matsuura // *Infection and immunity*. – 2002. – V. 70. – № 8. – P. 4092-4098.
74. Rebeil, R. Variation in lipid A structure in the pathogenic yersiniae / R. Rebeil, R.K. Ernst, B.B. Gowen, S.I. Miller, B.J. Hinnebusch // *Molecular microbiology*. – 2004. – V. 52. – № 5. – P. 1363-1373.
75. Knirel, Y.A. Cold temperature-induced modifications to the composition and structure of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis* / Y.A. Knirel, B. Lindner, E. Vinogradov, R.Z. Shaikhutdinova, S.N. Senchenkova, N.A. Kocharova, O. Holst, G.B. Pier, A.P. Anisimov // *Carbohydrate research*. – 2005. – V. 340. – № 9. – P. 1625-1630.
76. Knirel, Y. A. Temperature-dependent variations and intraspecies diversity of the structure of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis* / Y.A. Knirel, B. Lindner, E.V. Vinogradov, N.A. Kocharova, S.N. Senchenkova, R.Z. Shaikhutdinova, S.V. Dentovskaya, N.K. Fursova, I.V. Bakhteeva, G.M. Titareva, S.V. Balakhonov, O. Holst, T.A. Gremyakova, G.B. Pier, A.P. Anisimov // *Biochemistry*. – 2005. – V. 44. – № 5. – P. 1731-1743.
77. Knirel Y.A. New features of *Yersinia* lipopolysaccharide structures as revealed by high-resolution electrospray ionization mass spectrometry / Y.A. Knirel, A.N. Kondakova, O.V. Bystrova, B. Lindner, R.Z. Shaikhutdinova, S.V. Dentovskaya, A.P. Anisimov // *Advanced Science Letters*. – 2008. – V. 1. – № 2. – P. 192-198.
78. Prior, J. L. Characterization of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis* / J.L. Prior, P.G. Hitchenb, E.D. Williamson, A.J. Reason, H.R. Morris, A. Dell, B. W. Wren, R.W. Titball // *Microbial pathogenesis*. – 2001. – V. 30. – № 2. – P. 49-57.
79. Vinogradov, E.V. The core structure of the lipopolysaccharide from the causative agent of plague, *Yersinia pestis* / E.V. Vinogradov, B. Lindner, N.A. Kocharova, S.N. Senchenkova, A.S. Shashkov, Y.A. Knirel, O. Holst, T.A. Gremyakova, R.Z. Shaikhutdinova, A.P. Anisimov // *Carbohydrate research*. – 2002. – V. 337. – № 9. – P. 775-777.
80. Gremyakova, T.A. et al. The core structure of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis* strain KM218 / T.A. Gremyakova, E.V. Vinogradov, B. Lindner, N.A. Kocharova,

- S.N. Senchenkova, A.S. Shashkov, Y.A. Knirel, O. Holst, R.Z. Shaikhutdinova, A.P. Anisimov // *The Genus Yersinia*. – 2004. – P. 229-232.
81. Tomshich, S.V. Lipopolysaccharide from *Yersinia pseudotuberculosis*, Type 1B: A Structural Study of O Specific Chains / S.V. Tomshich, R.P. Gorshkova, Y.N. Elkin, Y.S. Ovodov // *European journal of biochemistry*. – 1976. – V. 65. – № 1. – P. 193-199.
82. Ovodov, Y. S. Chemical and immunochemical studies on lipopolysaccharides of some *Yersinia* species – a review of some recent investigations / Y.S. Ovodov, R.P. Gorshkova, S.V. Tomshich, N.A. Komandrova, V.A. Zubkov, E.N. Kalmykova, V.V. Isakov // *Journal of carbohydrate chemistry*. – 1992. – V. 11. – № 1. – P. 21-35.
83. De Castro, C. The O-specific polysaccharide structure and gene cluster of serotype O: 12 of the *Yersinia pseudotuberculosis* complex, and the identification of a novel L-quinovose biosynthesis gene / C. De Castro, J.J. Kenyon, M.M. Cunneen, A. Molinaro, O. Holst, M. Skurnik, P.R. Reeves // *Glycobiology*. – 2012. – V. 23. – № 3. – P. 346-353.
84. Skurnik, M. Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic 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. Peippo, E. Ervelä // *Molecular microbiology*. – 2000. – V. 37. – № 2. – P. 316-330.
85. Reeves, P.R. O antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* / P.R. Reeves, E. Pacinelli, L. Wang // *The Genus Yersinia*. – Springer, Boston, MA, 2004. – P. 199-206.
86. Kondakova A. N. Structural studies of the O-antigens of *Yersinia pseudotuberculosis* O: 2a and mutants thereof with impaired 6-deoxy-D-manno-heptose biosynthesis pathway / A.N. Kondakova, N. Ho, O.V. Bystrova, A.S. Shashkov, B. Lindner, C. Creuzenet, Y.A.Knirel // *Carbohydrate research*. – 2008. – V. 343. – № 8. – P. 1383-1389.
87. Skurnik, M. Molecular genetics and biochemistry of *Yersinia* lipopolysaccharide / Skurnik M., Zhang L. // *Apmis*. – 1996. – V. 104. – № 7-8. – P. 849-872.

88. Samuelsson, K. Structure of O-specific side chains of lipopolysaccharides from *Yersinia pseudotuberculosis* / K. Samuelsson, B. Lindberg, R.R. Brubaker // *Journal of bacteriology*. – 1974. – V. 117. – № 3. – P. 1010-1016.
89. Vinogradov, E.V. The structure of the cyclic enterobacterial common antigen (ECA) from *Yersinia pestis* / E.V. Vinogradov, Y.A. Knirel, J.E. Thomas-Oates, A.S. Shashkov, V.L. L'vov // *Carbohydrate research*. – 1994. – V. 258. – P. 223-232.
90. Гремякова Т. А. Структурно-функциональная вариабельность антигенов *Yersinia pestis* и методология конструирования противочумных иммунопрофилактических препаратов : диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук : 03.00.07. М., 2004.
91. Darby, C. Identification of *gmhA*, a *Yersinia pestis* gene required for flea blockage, by using a *Caenorhabditis elegans* biofilm system / C. Darby, S.L. Ananth, L. Tan, B.J. Hinnebusch // *Infection and immunity*. – 2005. – V. 73. – № 11. – P. 7236-7242.
92. Holtz, O. Lipopolysaccharides of *Yersinia* / O. Holtz // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003. V. 529. P. 219-228.
93. Бывалов, А.А. Влияние О-боковых цепей липополисахарида на адгезивность *Yersinia pseudotuberculosis* к макрофагам J774, установленное методом оптической ловушки. 2017 г. / А.А. Бывалов, В.Л. Кононенко, И.В. Конышев / *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2017. – Т. 53. – № 2. – С. 234–243.
94. Новикова, О. Д. Порообразующие белки наружной мембраны некоторых грамотрицательных бактерий. Структура и свойства / О.Д. Новикова, В.А. Хоменко, О.П. Вострикова, О.Ю. Портнягина, О.В. Сидорова, Д.К. Чистюлин, Т.Ф. Соловьева // *Вестник ДВО РАН*. – 2014. – № 1. – С. 120-134.
95. Issaeva, M.P. Porin from *Yersinia pseudotuberculosis*: cloning and analysis of primary structure / M.P. Issaeva, K.V. Guzev, O.D. Novikova, T.F. Solovjeva, S. Degtyarev, V.A. Rasskazov // *The Genus Yersinia*. – Springer, Boston, MA. – 2004. – P. 257-260.
96. Портнягина, О.Ю. Бактериальные порины как перспективные антигены для диагностики и вакцинопрофилактики инфекционных заболеваний /

О.Ю.Портнягина, О.Д.Новикова, О.П.Вострикова, В.А.Хоменко, Т.Ф.Соловьева // Вестник ДВО РАН. – 2004. – № 3. – С. 35-44.

97. Стенкова, А.М. OmpF порины бактерий рода *Yersinia*: молекулярно-генетические аспекты / А.М. Стенкова, Е.П. Быстрицкая, К.В. Гузев, В.А. Рассказов, М.П. Исаева // Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. – 2014. – № 1. – С. 142-148.

98. Cowan, S.W. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins / S.W. Cowan, T. Schirmer, G. Rummel, M. Steiert, R. Ghosh, R. A. Paupit, J.N. Jansonius, J. P. Rosenbusch // *Nature*. – 1992. – V. 358. – № 6389. – P. 727-733.

99. Guzev, K.V. Molecular characteristics of OmpF-like porins from pathogenic *Yersinia* / K.V. Guzev, M.P. Isaeva, O.D. Novikova, T.F. Solov'eva, V.A. Rasskazov // *Biochemistry (Moscow)*. – 2005. – V. 70. – № 10. – P. 1104-1110.

100. Новикова О.Д. OmpC-подобный порин из *Yersinia pseudotuberculosis*: молекулярная характеристика, физико-химические и функциональные свойства / О.Д. Новикова, В.А. Хоменко, В.И. Емельяненко, Г.Н. Лихацкая, Е.А. Зелепуга, Н.Ю. Ким, М.П. Исаева, О.Ю. Портнягина, О.П. Вострикова, О.В. Сидорова, Т.Ф. Соловьева // *Биологические мембраны*. – 2011. – Т. 28. – № 2. – С. 95-110.

101. Hutsul, J.A. Molecular characterization of the *Serratia marcescens* OmpF porin, and analysis of *S. marcescens* OmpF and OmpC osmoregulation / J.A. Hutsul, E. Worobec // *Microbiology*. – 1997. – V. 143. – № 8. – P. 2797-2806.

102. Быстрицкая, Е.П. Исследование регуляции экспрессии ompF порина-основного белка наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* / Е.П. Быстрицкая // Вестник ДВО РАН. – 2014. – № 1. – С. 164-168.

103. Новикова О.Д. Молекулярная организация и биологические свойства иерсинина–порина из псевдотуберкулезного микроба *Yersinia pseudotuberculosis* / О.Д. Новикова, Г.Н. Лихацкая, Г.М. Фролова, О.П. Вострикова, В.А. Хоменко, Н.Ф. Тимченко, Т.Ф. Соловьева, Ю.С. Оводова // *Биол. мембраны*. – 1990. – Т. 7. – № 5. – С. 453-461.

104. W. Achouak Multiple facets of bacterial porins / W. Achouak, T. Heulin, J.M. Pagès // *FEMS microbiology letters*. – 2001. – V. 199. – № 1. – P. 1-7.

105. Соловьева, Т.Ф. Исследование влияния замены предпоследнего остатка в OmpY порине *Yersinia pseudotuberculosis* на его экспрессию, структуру и функциональные свойства / Т.Ф. Соловьева, Н.М. Тищенко, В.А. Хоменко, О.Ю. Портнягина, Н.Ю. Ким, Г.Н. Лихацкая, О.Д. Новикова, М.П. Исаева // Биохимия. – 2014. – Т. 79. – №. 7. – С. 873-887.
106. Solov'eva, T. F. A novel OmpY porin from *Yersinia pseudotuberculosis*: structure, channel-forming activity and trimer thermal stability / T.F. Solov'eva , G.N. Likhatskaya , V.A. Khomenko , A.M. Stenkova , N.Y. Kim , O.Y. Portnyagina , O.D. Novikova , E.V. Trifonov , E.A. Nurminski, M.P. Isaeva // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. – 2011. – V. 28. – № 4. – P. 517-533.
107. Bartra, S.S. The outer membrane protein A (OmpA) of *Yersinia pestis* promotes intracellular survival and virulence in mice / S.S. Bartra, X. Gong, C.D. Lorica, C. Jain, M.K.M. Nair, D. Schifferli, L. Qian, Z. Li, G.V. Plano, K. Schesser // Microbial pathogenesis. – 2012. – V. 52. – № 1. – P. 41-46.
108. Zhang, J.J. The bacterial outer membrane protein that reacts with anti-HLA-B27 antibodies is the OmpA protein / J.J Zhang, M. Hamachi, T. Hamachi, Y.P. Zhao, D.T. Yu // The Journal of Immunology. – 1989. – V. 143. – № 9. – P. 2955-2960.
109. Park, J.S. Mechanism of anchoring of OmpA protein to the cell wall peptidoglycan of the gram-negative bacterial outer membrane / J.S. Park, W.C. Lee, K.J. Yeo, K.-S. Ryu, M. Kumarasiri, D. Heseck, M. Lee, S. Mobashery, J.H. Song, S.I. Kim, J.C. Lee, C. Cheong, Y.H. Jeon, H.-Y. Kim // The FASEB Journal. – 2012. – V. 26. – № 1. – P. 219-228.
110. Sugawara, E. Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli* / E. Sugawara, H. Nikaido // Journal of Biological Chemistry. – 1992. – V. 267. – № 4. – P. 2507-2511.
111. Ценева Г.Я. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний / Г.Я. Ценева, Н.Ю. Солодовникова, Е.А. Воскресенская // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2002. – Т. 4. - № 3. – С. 248-266.
112. Simonet, M. Invasin expression in *Yersinia pseudotuberculosis* / M. Simonet, S. Falkow // Infection and immunity. – 1992. – V. 60. – № 10. – P. 4414-4417.

113. Mikula, K.M. Yersinia infection tools – characterization of structure and function of adhesins / K.M. Mikula, R. Kolodziejczyk, A. Goldman //Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2013. – V. 2. – P. 1-14.
114. Cornelis, G.R. The virulence plasmid of Yersinia, an antihost genome / G.R. Cornelis, A. Boland, A.P. Boyd, C. Geuijen, M. Iriarte, C. Neyt, M.-P. Sory, I. Stainier // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 1998. – V. 62. – № 4. – P. 1315-1352.
115. Michiels, T. Analysis of virC, an operon involved in the secretion of Yop proteins by Yersinia enterocolitica / T. Michiels, J.C. Vanooteghem, C. Lambert de Rouvroit, B. China, A. Gustin, P. Boudry, G.R. Cornelis // Journal of bacteriology. – 1991. – V. 173. – № 16. – P. 4994-5009.
116. Paerregaard, A. Role of the Yersinia outer membrane protein YadA in adhesion to rabbit intestinal tissue and rabbit intestinal brush border membrane vesicles / A. Paerregaard, F. Espersen, M. Skurnik // Apmis. – 1991. – V. 99. – № 3. – P. 226-232.
117. Mühlenkamp, M. Yersinia adhesin A (YadA)–beauty & beast / M. Mühlenkamp, P. Oberhettinger, J.C. Leo, D. Linke, M.S. Schütz // International Journal of Medical Microbiology. – 2015. – V. 305. – № 2. – P. 252-258.
118. Han, Y.W. Reevaluation of the virulence phenotype of the inv yadA double mutants of Yersinia pseudotuberculosis / Y.W. Han, V.L. Miller //Infection and immunity. – 1997. – V. 65. – № 1. – P. 327-330.
119. Kapperud, G. Plasmid-mediated surface fibrillae of Yersinia pseudotuberculosis and Yersinia enterocolitica: relationship to the outer membrane protein YOP1 and possible importance for pathogenesis / G. Kapperud, E. Namork, M. Skurnik, T. Nesbakken //Infection and immunity. – 1987. – V. 55. – № 9. – P. 2247-2254.
120. Gripenberg-Lerche, C. Role of YadA-mediated collagen binding in arthritogenicity of Yersinia enterocolitica serotype O: 8: experimental studies with rats / C. Gripenberg-Lerche, M. Skurnik, P. Toivanen // Infection and immunity. – 1995. – V. 63. – № 8. – P. 3222-3226.
121. Schulze-Koops H. Outer membrane protein YadA of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin / H. Schulze-Koops, H.

- Burkhardt, J. Heesemann, T. Kirsch, B. Swoboda, C. Bull, S. Goodman, F. Emmrich // *Infection and immunity*. – 1993. – V. 61. – № 6. – P. 2513-2519.
122. Bliska, J.B. The *Yersinia pseudotuberculosis* adhesin YadA mediates intimate bacterial attachment to and entry into HEp-2 cells / J.B. Bliska, M.C. Copass, S. Falkow // *Infection and immunity*. – 1993. – V. 61. – № 9. – P. 3914-3921.
123. Bartra, S.S. Resistance of *Yersinia pestis* to complement-dependent killing is mediated by the Ail outer membrane protein / S.S. Bartra, K.L. Styer, D.M. O'Bryant, M.L. Nilles, B.J. Hinnebusch, A. Aballay, G.V. Plano // *Infection and immunity*. – 2008. – V. 76. – № 2. – P. 612-622.
124. Kolodziejek, A.M. Phenotypic characterization of OmpX, an Ail homologue of *Yersinia pestis* KIM / A.M. Kolodziejek, D.J. Sinclair, K.S. Seo, D.R. Schnider, C.F. Deobald, H.N. Rohde, A.K. Viall, S.S. Minnich, C.J. Hovde, S.A. Minnich, G.A. Bohach // *Microbiology*. – 2007. – V. 153. – № 9. – P. 2941-2951.
125. Chauhan N. *Yersinia* adhesins: An arsenal for infection / N. Chauhan, A. Wrobel, M. Skurnik, J.C. Leo // *PROTEOMICS–Clinical Applications*. – 2016. – V. 10. – № 9-10. – P. 949-963.
126. Yamashita S. Structural insights into Ail-mediated adhesion in *Yersinia pestis* / S. Yamashita, P. Lukacik, T.J. Barnard, N. Noinaj, S. Felek, T.M. Tsang, E.S. Krukoni, B.J. Hinnebusch, S.K. Buchanan // *Structure*. – 2011. – V. 19. – № 11. – P. 1672-1682.
127. Lindler, L.E. *Yersinia pestis* pH 6 antigen forms fimbriae and is induced by intracellular association with macrophages / L.E. Lindler, B.D. Tall // *Molecular microbiology*. – 1993. – V. 8. – № 2. – P. 311-324.
128. Yang, Y. The *psa* locus is responsible for thermoinducible binding of *Yersinia pseudotuberculosis* to cultured cells / Y. Yang, J.J. Merriam, J.P. Mueller, R.R. Isberg // *Infection and immunity*. – 1996. – V. 64. – № 7. – P. 2483-2489.
129. Huang, X.Z. The pH 6 antigen is an antiphagocytic factor produced by *Yersinia pestis* independent of *Yersinia* outer proteins and capsule antigen / X.Z. Huang, L.E. Lindler // *Infection and immunity*. – 2004. – V. 72. – № 12. – P. 7212-7219.

130. Yang, Y. The *psa* locus is responsible for thermoinducible binding of *Yersinia pseudotuberculosis* to cultured cells / Y. Yang, J.J. Merriam, J.P. Mueller, R.R. Isberg // *Infection and immunity*. – 1996. – V. 64. – № 7. – P. 2483-2489.
131. Felek, S. The *Yersinia pestis* autotransporter YapC mediates host cell binding, autoaggregation and biofilm formation / S. Felek, M.B. Lawrenz, E.S. Krukonis // *Microbiology*. – 2008. – V. 154. – № 6. – P. 1802-1812.
132. Lawrenz, M.B. A novel autotransporter adhesin is required for efficient colonization during bubonic plague / M.B. Lawrenz, J.D. Lenz, V.L. Miller // *Infection and immunity*. – 2009. – V. 77. – № 1. – P. 317-326.
133. Nair, M.K.M. The adhesive properties of YapV and paralogous autotransporter proteins of *Yersinia pestis* / M.K.M. Nair, L. De Masi, M. Yue, E.M. Galván, H. Chen, F. Wang, D.M. Schifferli // *Infection and immunity*. – 2015. – V. 83. – № 5. – P. 1809–1819.
134. Krachler, A.M. Outer membrane adhesion factor multivalent adhesion molecule 7 initiates host cell binding during infection by gram-negative pathogens / A.M. Krachler, H. Ham, K. Orth // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2011. – V. 108. – № 28. – P. 11614-11619.
135. Krachler, A.M. Functional characterization of the interaction between the bacterial adhesin multivalent adhesion molecule 7 (MAM7) and its host cell ligands / A.M. Krachler, K. Orth // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – V. 286. – № 45. – P. 38939–38947.
136. Huang, X.Z. The pH 6 antigen is an antiphagocytic factor produced by *Yersinia pestis* independent of *Yersinia* outer proteins and capsule antigen / X.Z. Huang, L.E. Lindler // *Infection and immunity*. – 2004. – V. 72. – № 12. – P. 7212-7219.
137. Kesty, N.C. Incorporation of heterologous outer membrane and periplasmic proteins into *Escherichia coli* outer membrane vesicles / N.C. Kesty, M.J. Kuehn // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – V. 279. – № 3. – P. 2069-2076.
138. Kulp, A. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles / A. Kulp, M.J. Kuehn // *Annual review of microbiology*. – 2010. – V. 64. – P. 163-184.

139. Eddy, J.L. Production of outer membrane vesicles by the plague pathogen *Yersinia pestis* / J.L. Eddy, L.M. Gielda, A.J. Caulfield, S.M. Rangel, W.W. Lathem // *PLoS One*. – 2014. – V. 9. – № 9. – e107002.
140. Бывалов, А.А. Иммунохимическая активность Б-антигена *Yersinia pseudotuberculosis* / А.А. Бывалов, Л.Г. Дудина, А.В. Чернядьев, И.В. Конышев, С.Г. Литвинец, Ю.С. Оводов // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. – 2015. – Т. 33. – № 2. – С. 32-38.
141. Бывалов, А.А. Идентификация и выделение антигена, защищающего морских свинок от экспериментальной чумы / А.А. Бывалов, И.В. Дармов, В.И. Евстигнеев, Е.В. Пименов // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2005. – Т. 89. – С. 54–58.
142. Бывалов, А.А. Иммуногенность Б-антигена при экспериментальной чуме и псевдотуберкулезе лабораторных животных / А.А. Бывалов, В.В. Крупин, К.Е. Гаврилов // *Журнал эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2006. – Т. 3. – С. 49–53.
143. Fedorova, V.A. Study of antigenic determinants of *Yersinia pestis* lipopolysaccharide using monoclonal antibodies / V.A. Fedorova, Z.L. Devdariani // *Molekuliarnaia Genetika, Mikrobiologiiia i Virusologiiia*. – 1998. – V. 3. – P. 22-26.
144. Пат. 2460788 Российская федерация. Штамм гибридных культивируемых клеток животных *Mus musculus* 13F8 – продуцент моноклональных антител, специфичных к капсульному F1 антигену *Yersinia pestis* / Белова Е.В., Иващенко Т.А., Игнашина Е.Н., Шемякин И.Г.; заявитель и патентообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (RU). - № 2002135928/13; заявл. 28.07.2011; опубл. 10.09.2012.
145. Anderson, G.W. Protection of mice from fatal bubonic and pneumonic plague by passive immunization with monoclonal antibodies against the F1 protein of *Yersinia pestis* / G.W. Anderson, Jr.P.L. Worsham, C.R. Bolt, G.P. Andrews, S.L. Welkos, A.M. Friedlander, J.P. Burans // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 1997. – V. 56. – P. 471–473.
146. Hill, J. Regions of *Yersinia pestis* V antigen that contribute to protection against plague identified by passive and active immunization / J. Hill, S.E.C. Leary, K.F. Griffin,

E.D. Williamson, R.W. Titball // *Infection and immunity*. – 1997. – V. 65. – № 11. – P. 4476-4482.

147. Hill, J. Synergistic protection of mice against plague with monoclonal antibodies specific for the F1 and V antigens of *Yersinia pestis* / J. Hill, C. Copse, S. Leary, A.J. Stagg, E.D. Williamson, R.W. Titball // *Infection and immunity*. – 2003. – V. 71. – № 4. – P. 2234-2238.

148. Mahesh S. Molecular detection of *Yersinia pestis* isolates of Indian origin by using Pla specific monoclonal antibodies / S. Mahesh, J. Shukla, U. Tuteja, H.V. Batra // *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. – 2005. – V. 28. – № 2. – P. 131-144.

149. Feodorova, V.A. Development, characterisation and diagnostic application of monoclonal antibodies against *Yersinia pestis* fibrinolysin and coagulase / V. A Feodorova, Z.L. Devdariani // *Journal of medical microbiology*. – 2000. – V. 49. – № 3. – P. 261-269.

150. Anish, C. Plague Detection by Anti-carbohydrate Antibodies / C. Anish, X. Guo, A. Wahlbrink, P.H. Seeberger // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2013. – V. 52. – № 36. – P. 9524-9528.

151. Федорова, В.А. Изучение и характеристика видоспецифического эпитопа *Yersinia pseudotuberculosis* с помощью моноклональных антител / В.А. Федорова, Ж.Г. Самелия, З.Л. Девдариани // *Биотехнология*. – 2001. - № 6. – С. 8-13.

152. Isberg, R.R. Cultured mammalian cells attach to the invasin protein of *Yersinia pseudotuberculosis* / R.R. Isberg, J.M. Leong // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1988. – V. 85. – № 18. – P. 6682-6686.

153. Fedorova, V.A. Characterization of *Yersinia pseudotuberculosis* heat stable serovar specific polypeptides with the use of monoclonal antibodies / V.A. Fedorova, Z.L. Devdariani, Zh.G. Sameliia // *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, i Immunobiologii*. – 2004. - № 3. – P. 10-15.

154. Fedorova, V.A. Development of a competitive immunoassay based on monoclonal antibodies for the detection of specific antibodies to pseudotuberculosis pathogen / V.A.

- Fedorova, Zh.G. Sameliia, Z.L. Devdariani, D.V. Utkin, O.F. Eremina, E.P. Liapina, M.N. Liapin // *Klinicheskaia Laboratornaia Diagnostika*. – 2003. - № 11. – P. 45-47.
155. Fedorova, VA, Monoclonal antibodies for studying antigens of protein origin in serotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* / V.A. Fedorova, Zh.G. Sameliia, Z.L. Devdariani, G.P. Shvedun // *Molekuliarnaia Genetika, Mikrobiologiia i Virusologiia*. – 2001. - № 3. – P. 28-35.
156. Rüter, C. Rabbit monoclonal antibodies directed at the T3SS effector protein YopM identify human pathogenic *Yersinia* isolates / C. Rüter, M. R. Silva, B. Grabowski, M.-L. Lubos, J. Scharnert, M. Poceva, D. von Tils, A. Flieger, J. Heesemann, J.B. Bliska, M.A. Schmidt // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2014. – V. 304. – № 3-4. – P. 444-451.
157. Heesemann, J. Monoclonal antibodies directed against plasmid-encoded released proteins of enteropathogenic *Yersinia* / J. Heesemann, H. Kalthoff, F. Koch // *FEMS Microbiology Letters*. – 1986. – V. 36. – № 1. – P. 15-19.
158. Ackermann, H.W. 5500 Phages examined in the electron microscope / H.W. Ackermann // *Archives of virology*. – 2007. – V. 152. – № 2. – P. 227-243.
159. Campbell, A. The future of bacteriophage biology / A. Campbell // *Nature Reviews Genetics*. – 2003. – V. 4. – № 6. – P. 471-477.
160. Fokine, A. Structural and functional similarities between the capsid proteins of bacteriophages T4 and HK97 point to a common ancestry / A. Fokine, P.G. Leiman, M.M. Shneider, B. Ahvazi, K.M. Boeshans, A.C. Steven, L.W. Black, V.V. Mesyanzhinov, M.G. Rossmann // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – V. 102. – № 20. – P. 7163-7168.
161. Simpson, D.J. Development of an assay for the identification of receptor binding proteins from bacteriophages / D.J. Simpson, J.C. Sacher, C.M. Szymanski // *Viruses*. – 2016. – V. 8. – № 1. – P. 17.
162. Davis, T.N. The virion of the lipid-containing bacteriophage PR4 / T.N. Davis, E.D. Muller, Jr J.E. Cronan // *Virology*. – 1982. – V. 120. – № 2. – P. 287-306.
163. Espejo, R.T. Properties of bacteriophage PM2: a lipid-containing bacterial virus / R.T. Espejo, E.S. Canelo // *Virology*. – 1968. – V. 34. – № 4. – P. 738-747.

164. Vidaver, A.K. Bacteriophage $\phi 6$: a lipid-containing virus of *Pseudomonas phaseolicola* / A.K. Vidaver, R.K. Koski, J.L. Van Etten // *Journal of Virology*. – 1973. – V. 11. – № 5. – P. 799-805.
165. Bamford, D. Structure of the lipid-containing bacteriophage PRD1: disruption of wild-type and nonsense mutant phage particles with guanidine hydrochloride / D. Bamford, L. Mindich // *Journal of virology*. – 1982. – V. 44. – № 3. – P. 1031-1038.
166. Bamford, D.H. Comparison of the lipid-containing bacteriophages PRD1, PR3, PR4, PR5 and L17 / D.H. Bamford, L. Rouhiainen, K. Takkinen, H. Söderlund // *Journal of General Virology*. – 1981. – T. 57. – №. 2. – C. 365-373.
167. Atanasova, N.S. Comparison of Lipid-Containing Bacterial and Archaeal Viruses / N.S. Atanasova, A.S. Majja, K. Pietilä, E. Roine, H.M. Oksanen, D.H. Bamford // *Advances in Virus Research*. – 2015. – V. 92. – P. 1-61.
168. Twest R.V. Bacteriophage Enrichment from Water and Soil / R.V. Twest, A.M. Kropinski // *Bacteriophages*. – 2009. – P. 15-22.
169. Ackermann, H.W. Tailed bacteriophages: the order Caudovirales / H.W. Ackermann // *Advances in virus research*. – 1998. – V. 51. – P. 135-201.
170. Ackermann, H.W. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000 / H.W. Ackermann // *Archives of virology*. – 2001. – V. 146. – № 5. – P. 843-857.
171. Ackermann, H.W. Bacteriophage observations and evolution / H.W. Ackermann // *Research in Microbiology*. – 2003. – V. 154. – № 4. – P. 245-251.
172. Ackermann, H. W. Phage classification and characterization / H.W. Ackermann // *Bacteriophages*. – 2009. – C. 127-140.
173. Krupovic, M. Taxonomy of prokaryotic viruses: update from the ICTV bacterial and archaeal viruses subcommittee / M. Krupovic, B.E. Dutilh, E.M. Adriaenssens, J. Wittmann, F.K. Vogensen, M.B. Sullivan, J. Rumnieks, D. Prangishvili, R. Lavigne, A.M. Kropinski, J. Klumpp, A. Gillis, F. Enault, R.A. Edwards, S. Duffy, M.R.C. Clokie, J. Barylski, H.-W. Ackermann, J.H. Kuhn // *Archives of virology*. – 2016. – V. 161. – № 4. – P. 1095-1099.

174. Kokjohn, T.A. Gene transfer in the environment: transduction / T.A. Kokjohn, R.V. Miller // Release of genetically engineered and other microorganisms. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. – 1992. – P. 54-81.
175. Silva, J.B. Host receptors for bacteriophage adsorption / J.B. Silva, Z. Storms D. Sauvageau // FEMS microbiology letters. – 2016. – V. 363. – № 4. – P. 1-11.
176. Heller, K. Polymannose O-antigens of Escherichia coli, the binding sites for the reversible adsorption of bacteriophage T5⁺ via the L-shaped tail fibers / K. Heller, V. Braun // Journal of virology. – 1982. – V. 41. – № 1. – P. 222-227.
177. Heller, K.J. Identification of the phage gene for host receptor specificity by analyzing hybrid phages of T5 and BF23 / K.J. Heller // Virology. – 1984. – V. 139. – № 1. – P. 11-21.
178. Riede, I. Receptor specificity of the short tail fibres (gp12) of T-even type Escherichia coli phages / I. Riede // Molecular and General Genetics MGG. – 1987. – V. 206. – № 1. – P. 110-115.
179. Baptista, C. Phage SPP1 reversible adsorption to Bacillus subtilis cell wall teichoic acids accelerates virus recognition of membrane receptor YueB / C. Baptista, M.A. Santos, C. São-José // Journal of bacteriology. – 2008. – V. 190. – № 14. – P. 4989-4996.
180. Vinga, I. Role of bacteriophage SPP1 tail spike protein gp21 on host cell receptor binding and trigger of phage DNA ejection / I. Vinga, C. Baptista, I. Auzat, I. Petipas, R. Lurz, P. Tavares, M.A. Santos, C. São-José // Molecular microbiology. – 2012. – V. 83. – № 2. – P. 289-303.
181. Chatterjee, S. Interaction of bacteriophage λ with its E. coli receptor, LamB / S. Chatterjee, E. Rothenberg // Viruses. – 2012. – V. 4. – № 11. – P. 3162-3178.
182. Heller, K.J. Molecular interaction between bacteriophage and the gram-negative cell envelope / K.J. Heller // Archives of microbiology. – 1992. – V. 158. – № 4. – P. 235-248.
183. Mahony, J. Gram-positive phage-host interactions / J. Mahony, D. van Sinderen // Frontiers in microbiology. – 2015. – V. 6. – Article 61.
184. Phage Receptor Database [Электронный ресурс]: Режим доступа: <http://phred.herokuapp.com/>. свободный. – Проверено: 24.08.2018.

185. Rakhuba, D.V. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell / D.V. Rakhuba, E.I. Kolomiets, E. Szwajcer Dey, G.I. Novik // *Pol. J. Microbiol.* – 2010. – V. 59. – № 3. – P. 145-155.
186. German, G.J. The TolC protein of *Escherichia coli* serves as a cell-surface receptor for the newly characterized TLS bacteriophage1 / G.J. German, R. Misra // *Journal of molecular biology.* – 2001. – V. 308. – № 4. – P. 579-585.
187. Kim, M. Spontaneous and transient defence against bacteriophage by phase – variable glucosylation of O-antigen in *S almonella enterica* serovar T yphimurium / M. Kim, S. Ryu // *Molecular microbiology.* – 2012. – V. 86. – № 2. – P. 411-425.
188. Brock biology of microorganisms / Michael T.M. [et. al.]; NY.: Benjamin Cummings, 2006. 1152 pp.
189. Schade, S.Z. How bacteriophage χ attacks motile bacteria / S.Z. Schade, J. Adler, H. Ris // *Journal of virology.* – 1967. – V. 1. – № 3. – P. 599-609.
190. Lindberg, A.A. Bacteriophage receptors / A.A. Lindberg // *Annual Reviews in Microbiology.* – 1973. – V. 27. – № 1. – P. 205-241.
191. Guerrero-Ferreira, R.C. Alternative mechanism for bacteriophage adsorption to the motile bacterium *Caulobacter crescentus* / R.C. Guerrero-Ferreira, P.H. Viollier, B. Ely, J.S. Poindexter, M. Georgieva, G.J. Jensen, E.R. Wright // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2011. – V. 108. – № 24. – P. 9963-9968.
192. Click, E.M. The TolQRA proteins are required for membrane insertion of the major capsid protein of the filamentous phage ϕ 1 during infection / E.M. Click, R.E. Webster // *Journal of bacteriology.* – 1998. – V. 180. – № 7. – P. 1723-1728.
193. Daugelavičius, R. Penetration of enveloped double-stranded RNA bacteriophages ϕ 13 and ϕ 6 into *Pseudomonas syringae* cells / R. Daugelavicius, V. Cvirkaite, A. Gaidelyte, E. Bakiene, R. Gabrenaite-Verkhovskaya, D.H. Bamford1 // *Journal of virology.* – 2005. – V. 79. – № 8. – P. 5017-5026.
194. Garcia, E. Molecular characterization of L-413C, a P2-related plague diagnostic bacteriophage / E. Garcia, P. Chain, J.M. Elliott, A.G. Bobrov, V.L. Motin, O. Kirillina, V. Lao, R. Calendar, A.A. Filippov // *Virology.* – 2008. – V. 372. – № 1. – P. 85-96.

195. Garcia, E. The genome sequence of *Yersinia pestis* bacteriophage ϕ A1122 reveals an intimate history with the coliphage T3 and T7 genomes / E. Garcia, J.M. Elliott, E. Ramanculov, P.S.G. Chain, M.C. Chu, I.J. Molineux // *Journal of bacteriology*. – 2003. – V. 185. – № 17. – P. 5248-5262.
196. Novosel'tsev, N.N. *Y. pestis* phage of a new serovar / N.N. Novosel'tsev, V.I. Marchenkov // *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. – 1990. - № 11. – P. 9-12.
197. Novosel'tsev, N.N. Phages of the IV serovar of *Yersinia pestis* / N.N. Novosel'tsev, V.I. Marchenkov, Iu.I. Arutiunov // *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. – 1994. – № 6. – P. 9–10.
198. 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, A.P. Anisimov, Y.A. Knirel, J.A. Bengoechea, O. Holst, M. Skurnik // *Journal of bacteriology*. – 2011. – V. 193. - № 18. – P. 4963-4972.
199. Филиппов, А.А. Определение нуклеотидной последовательности генома чумного диагностического бактериофага Л-413С / А.А. Филиппов, Дж.М. Эллиотт, А.Г. Бобров, О.А. Кириллина, В.Л. Мотин, П.С. Чейн, Э. Гарсия // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2005. – №. 2. – С. 49-52.
200. Zhao, X. The complete genome sequence and proteomics of *Yersinia pestis* phage Yep-phi / X. Zhao, W. Wu, Z. Qi, Y. Cui, Y. Yan, Z. Guo, Z. Wang, H. Wang, H. Deng, Y. Xue, W. Chen, X. Wang, R. Yang // *Journal of General Virology*. – 2011. – V. 92. – № 1. – P. 216-221.
201. 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. Revazishvili, T. Dean, A. Butani, K. Verratti, K.A. Bishop-Lilly, S. Sozhamannan, A. Sulakvelidze, C. Rajanna// *Bacteriophage*. – 2012. – V. 2. – № 3. – P. 168-177.
202. Filippov, A.A. Can phage effectively treat multidrug-resistant plague? / A.A. Filippov, K.V. Sergueev, M.P. Nikolich // *Bacteriophage*. – 2012. – V. 2. – № 3. – P. 186-189.

203. Zhao X. Outer membrane proteins ail and OmpF of *Yersinia pestis* are involved in the adsorption of T7-related bacteriophage Yep-phi / X. Zhao, Y. Cui, Y. Yan, Z. Du, Y. Tan, H. Yang, Y. Bi, P. Zhang, L. Zhou, Dongsheng Zhou, Y. Han, Y. Song, X. Wang, R. Yang // *Journal of virology*. – 2013. – V. 87. - № 22. – P. 12260-12269.
204. Schwudke, D. Broad-host-range *Yersinia* phage PY100: genome sequence, proteome analysis of virions, and DNA packaging strategy / D. Schwudke, A. Ergin, K. Michael, S. Volkmar, B. Appel, D. Knabner, A. Konietzny, E. Strauch // *Journal of bacteriology*. – 2008. – V. 190. – № 1. – P. 332-342.
205. Gurleva, G.G. Serologic affinity and specificity of action of pseudotuberculosis and coli-dysentery phages / G.G. Gurleva, Iu.I. Arutiunov, E.E. Khaliapina // *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. – 1981. - № 5. – P. 65-68.
206. Filippov, A.A. Bacteriophages capable of lysing *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*: efficiency of plating tests and identification of receptors in *Escherichia coli* K-12 / A.A. Filippov, K.V. Sergueev, Y. He, M.P. Nikolich // *Advances in Yersinia Research*. – 2012. – P. 123-134.
207. Knapp, W. Morphological differences between *Pasteurella*-bacteriophages / W. Knapp, L.O. Zwillenberg // *Archiv für die gesamte Virusforschung*. – 1964. – V. 14. – № 4. – P. 563-566.
208. Weinberg, G.A. Phages in Infections /G.A. Weinberg // *Pediatrics in Review*. – 2002. – V.23 – №.9 – P. 329-330.
209. Акимкин, В.Г. Бактериофаги: исторические и современные аспекты их применения: опыт и перспективы / В.Г. Акимкин, О.С. Дарбеева, В.Ф. Колков // *Клиническая практика*. – 2010. – Т. 4. – № 4. – С. 48.
210. Carlton, R.M. Phage therapy: past history and future prospects / R.M. Carlton // *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis-English Edition*-. – 1999. – V. 47. – P. 267-274.
211. Skurnik, M. Phage therapy: facts and fiction / M. Skurnik, E. Strauch // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2006. – V. 296. – № 1. – P. 5-14.
212. Projan, S. Phage-inspired antibiotics? / S. Projan // *Nature biotechnology*. – 2004. – V. 22. – № 2. – P. 167.

213. Schoolnik, G.K. Phage offer a real alternative / G.K. Schoolnik, W.C. Summers, J.D. Watson // *Nature biotechnology*. – 2004. – V. 22. – № 5. – P. 505.
214. Merrill, C.R. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents / C.R. Merrill, B. Biswas, R. Carlton, N.C. Jensen, G.J. Creed, S. Zullo, S. Adhya // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. – V. 93. – № 8. – P. 3188-3192.
215. Lukacik, P. Using a bacteriocin structure to engineer a phage lysin that targets *Yersinia pestis* / P. Lukacik, T.J. Barnard, S.K. Buchanan // *Biochem. Soc. Trans.* – 2012. – V. 40. – P. 1503–1506.
216. Tao, P. Mutated and bacteriophage T4 nanoparticle arrayed F1-V immunogens from *Yersinia pestis* as next generation plague vaccines / P. Tao, M. Mahalingam, M.L. Kirtley, C.J. van Lier, J. Sha, L.A. Yeager, A.K. Chopra, V.B. Rao // *PLoS pathogens*. – 2013. – V. 9. – № 7. – e1003495.
217. Tao, P. In vitro and in vivo delivery of genes and proteins using the bacteriophage T4 DNA packaging machine / P. Tao, M. Mahalingam, B.S. Marasa, Z. Zhang, A.K. Chopra, V.B. Rao // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – V. 110. – № 15. – P. 5846-5851.
218. Smiley, S.T. Current challenges in the development of vaccines for pneumonic plague / S.T. Smiley // *Expert review of vaccines*. – 2008. – V. 7. – № 2. – P. 209-221.
219. Македонова, Л.Д. Бактериофаги *Yersinia pseudotuberculosis*: обнаружение в штаммах различных О-сероваров и их идентификация / Л.Д. Македонова, Т.А. Кудрякова, Г.В. Качкина, Н.Е. Гаевская // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2013. – № 8. – С. 52-53.
220. Катмакова, Н.П. Поиск и селекция псевдотуберкулёзных бактериофагов / Н.П. Катмакова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // *Ветеринарная медицина*. – 2009. – № 4. – С. 19-20.
221. Катмакова, Н.П. Разработка и применение биопрепарата на основе бактериофагов *Yersinia pseudotuberculosis* / Н.П. Катмакова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Биологически активные вещества микроорганизмов: прошлое, настоящее, будущее: Всероссийский симпозиум с международным участием. Москва, МГУ имени М.В.Ломоносова. Биологический факультет. 27-29 января

- 2011 г. : Материалы / Отв.ред. Нетрусов А.И., Колотилова Н.Н. – М.: МАКС Пресс, 2011. - 160 с. – С. 57.
222. Schofield, D. Diagnostic bioluminescent phage for detection of *Yersinia pestis* / D.A. Schofield, I.J. Molineux, C. Westwater // *Journal of clinical microbiology*. – 2009. – V. 47. – № 12. – P. 3887-3894.
223. Sergueev, K.V. Rapid and sensitive detection of *Yersinia pestis* using amplification of plague diagnostic bacteriophages monitored by real-time PCR / K.V. Sergueev, Y. He, R.H. Borschel, M.P. Nikolich, A.A. Filippov // *PLoS One*. – 2010. – V. 5. – № 6. – e11337.
224. Ebeling, W. Proteinase K from *Tritirachium album limber* / W. Ebeling, N. Henrich, M. Klockow, H. Metz, H.D. Orth, H. Lang // *European Journal of Biochemistry*. – 1974. – V. 47. – № 1. – P. 91-97.
225. Биохимия. Химические реакции в живой клетке. Том 1. / Мецлер Д.; М.: Мир, 1980. 407 с.
226. Wolin, M.J. Cell wall polymers and phage lysis of *Lactobacillus plantarum* / M.J. Wolin, L.J. Douglas // *Biochemistry*. – 1971. – V. 10. – № 9. – P. 1551-1555.
227. Ho, T.D. OmpC is the receptor for Gifsy-1 and Gifsy-2 bacteriophages of *Salmonella* / T.D. Ho, J.M. Slauch // *Journal of bacteriology*. – 2001. – V. 183. – № 4. – P. 1495-1498.
228. Ainsworth, S. Differences in lactococcal cell wall polysaccharide structure are major determining factors in bacteriophage sensitivity / S. Ainsworth, I. Sadovskaya, E. Vinogradov, P. Courtin, Y. Guerardel, J. Mahony, T. Grard, C. Cambillau, M.-P. Chapot-Chartier, D. van Sinderen // *MBio*. – 2014. – T. 5. – № 3. – e00880-14.
229. Marti, R. Long tail fibres of the novel broad-host-range T-even bacteriophage S 16 specifically recognize *Salmonella* OmpC / R. Marti, K. Zurfluh, S. Hagens, J. Pianezzi, J. Klumpp, M.J. Loessner // *Molecular microbiology*. – 2013. – V. 87. – № 4. – P. 818-834.
230. Davison, S. Identification of the *Bacillus anthracis* γ phage receptor / S. Davison, E. Couture-Tosi, T. Candela, M. Mock, A. Fouet // *Journal of bacteriology*. – 2005. – V. 187. – № 19. – P. 6742-6749.

231. Shin, H. Receptor diversity and host interaction of bacteriophages infecting *Salmonella enterica* serovar Typhimurium / H. Shin, J.-H. Lee, H. Kim, Y. Choi, S. Heu, S. Ryu // *PloS one*. – 2012. – V. 7. – № 8. – e43392.
232. Reske, K. Enzymatic Degradation of O-Antigenic Lipopolysaccharides by Coliphage $\Omega 8$ / K. Reske, B. Wallenfels, K. Jann // *European journal of biochemistry*. – 1973. – V. 36. – № 1. – P. 167-171.
233. Beczała, A. Structure and genetic basis of *Yersinia similis* serotype O: 9 O-specific polysaccharide / A. Beczała, O.G. Ovchinnikova, N. Datta, L. Mattinen, K. Knapska, J. Radziejewska-Lebrecht, O. Holst, M. Skurnik // *Innate immunity*. – 2015. – V. 21. – № 1. – P. 3-16.
234. Pinta, E. Identification and role of a 6-deoxy-4-keto-hexosamine in the lipopolysaccharide outer core of *Yersinia enterocolitica* serotype O: 3 / E. Pinta, K.A. Duda, A. Hanuszkiewicz, Z. Kacznyski, B. Lindner, W.L. Miller, H. Hyytiinen, C. Vogel, S. Borowski, K. Kasperkiewicz, J.S. Lam, J. Radziejewska-Lebrecht, M. Skurnik, O. Holst // *Chemistry—A European Journal*. – 2009. – V. 15. – № 38. – P. 9747-9754.
235. Takeda, K. In vitro interaction between phage and receptor lipopolysaccharide: A novel glycosidase associated with *Salmonella* phage $\epsilon 15$ / K. Takeda, H. Uetake // *Virology*. – 1973. – V. 52. – № 1. – P. 148-159.
236. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol.1. 3rd ed. / J. Sambrook, D.W. Russell.; NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. – 794 pp.
237. Бывалов А. А. Исследование поверхностных антигенных эпитопов *Yersinia pseudotuberculosis* с помощью моноклональных антител / А.А. Бывалов, Л.Г. Дудина, С.Г. Литвинец, О.Д. Новикова, В.А. Хоменко, О.Ю. Портнягина, Ю. С. Оводов // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2014. – Т. 50. – № 2. – С. 203-210.
238. *Микробиология с техникой микробиологических исследований* / Лабинская А.С.; М.: Медицина, 1978. – 394 с.
239. Hitchcock, P.J. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. / P.J. Hitchcock, T.M. Brown // *J. Bacteriol.* – 1983. – V. 154. – № 1. – P. 269–277.

240. Laemmly, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmly // *Nature*. – 1979. – V. 227. – № 5259. – P. 680–685.
241. Fairbanks, G. Coomassie blue R250 used in isopropanol-acetic acid / G. Fairbanks, T.L. Steck, D.F.H. Wallach // *Biochemistry*. – 1971. – V. 10. – № 13. – P. 2602-2618.
242. Tsai, C.M. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels / C.M. Tsai, C.E. Frasch // *Anal. Biochem.* – 1982. – V. 119. – № 1. – P. 115–119.
243. Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy / E.S. Reynolds // *J. Cell Biol.* – 1963. – V. 17. – P. 208-212.
244. Биометрия / Лакин Г.Ф.; М.: Высш. шк., 1980. – 293 с.
245. Brubaker, R.R. Physiology of *Yersinia pestis* / R.R. Brubaker // *Yersinia pestis: Retrospective and Perspective*. – 2016. – V. 918. – P. 79-99.
246. Kolodziejek, A.M. Physiological Levels of Glucose Induce Membrane Vesicle Secretion and Affect the Lipid and rotein Composition of *Yersinia pestis* Cell Surfaces / A.M. Kolodziejek, A.B. Caplan, G.A. Bohach, A.J. Paszczynski, S.A. Minnich, C.J. Hovdea // *Appl Environ Microbiol.* – 2013. – V. 79. – № 14. – P. 4509–4514.
247. Manning, A.J. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense / A.J. Manning, M.J. Kuehn // *BMC microbiology*. – 2011. – V. 11. – № 1. – P. 258-272.
248. Lugtenberg, B. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria / B. Lugtenberg, L. Van Alphen // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*. – 1983. – V. 737. – № 1. – P. 51-115.
249. Портнягина, О.Ю. Иммунохимическая характеристика синтетических пептидов, включающих т- и в-клеточные эпитопы неспецифических поринов патогенных иерсиний / О.Ю. Портнягина, О.В. Сидорова, О.Д. Новикова, О.П. Вострикова, В.А. Хоменко, Т.Ф. Соловьева // *Биоорг. химия*. – 2010. – Т. 36. – № 5. – С. 1–10.
250. Новикова, О.Д. Конформационная стабильность и иммунохимические свойства иерсинина - основного белка внешней мембраны псевдотуберкулезного

микроба / О.Д. Новикова, Г.М. Фролова, Т.И. Вахорина, З.А. Таранкова, В.П. Глазунов, Т.Ф. Соловьева, Ю.С. Оводов // Биоорганич. химия. – 1989. – Т. 15. – № 6. – С. 763–772.

251. Holzenburg, A. Rapid isolation of OmpF porin-LPS complexes suitable for structure-function studies / A. Holzenburg, A. Engel, R. Kessler, H.J. Manz, A. Lustig, U. Aebi // Biochemistry. – 1989. – V. 28. – № 10. – P. 4187-4193.

252. Набережных, Г.А. Кооперативное взаимодействие между белком-порином и липополисахаридом / Г.А. Набережных, В.А. Хоменко, И.Н. Красикова, Н.Ю. Ким, Т.Ф. Соловьева // Биоорганическая химия. – 1996. – Т. 22. – №. 9. – С. 671-677.

253. Бирюченков, Д.А. Инактивация *Actinobacillus pleuropneumoniae* формальдегидом / Д.А. Бирюченков, В.С. Русалеев, А.П. Пономарев // Ветеринарная патология. – 2007. – № 4. – С. 59-63.

254. Сидорин, Е.В. Иммуноглобулинсвязывающие белки *Yersinia pseudotuberculosis* : диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук : 02.00.10. Владивосток, 2009.