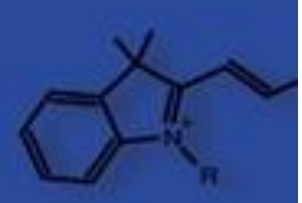
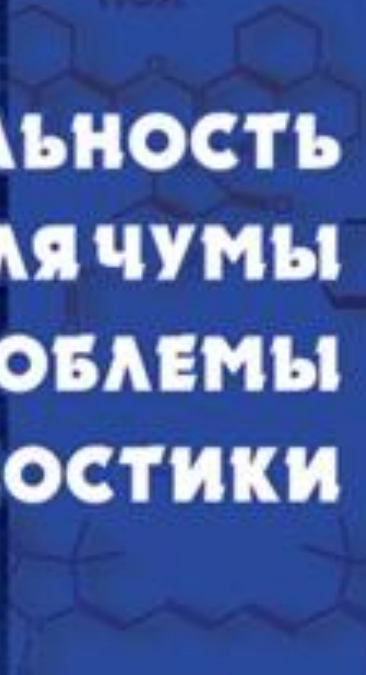


FAM



ROX



**ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ
ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ
И ПРОБЛЕМЫ
ЕГО ДИАГНОСТИКИ**



Главный редактор: заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор Юрий Михайлович ЛОМОВ

Научные редакторы: д.м.н., проф. С.А.ЛЕБЕДЕВА
к.м.н., с.н.с. Ю.И.АРУТЮНОВ

Рецензент: академик РАМН Ю.В.Лобзин

Коллектив авторов:

д.м.н., проф. С.А.Лебедева, к.м.н., А.Л.Трухачёв, к.б.н. В.С.Иванова, к.м.н. Ю.И.Арутюнов, к.б.н. Н.В.Божко, к.м.н. Л.М.Веркина, д.б.н., проф. Л.П.Алексеева, к.б.н. Коссе Л.В., к.б.н. Фейцайлова О.П.

АННОТАЦИЯ

В книге обобщены обширные исторические и современные данные литературы и результаты многолетних исследований авторов по характеристике основных видоспецифических признаков возбудителя чумы, их вариабельности и связанным с ними проблемам диагностики. Приведены сведения о микробиологических иммунологических, молекулярно-биологических методах идентификации типичных и изменённых форм чумного микроба. Подводится своеобразный итог определённого этапа исследований, который закончился в преддверии новых технологий и возможностей, с целью сохранения преемственности и тех результатов, которые в своё время по разным причинам незаслуженно не получили дальнейшего развития.

Представленные материалы трактуются с позиций современных биологических, физико-химических и молекулярно-генетических представлений. Рассмотрены ряд актуальных позиций и гипотез, которые побуждают к развитию имеющихся и появлению новых направлений исследований с использованием существующих теоретических положений и современной методологии.

Книга является систематизированным изложением основных положений, касающихся биологической и патогенетической активности, таксономических позиций и диагностики возбудителя чумы, инфекции высококонтагиозной и особо опасной, которая при отсутствии своевременного и эффективного лечения характеризуется высокой летальностью и выраженной склонностью к эпидемическому распространению.

Книга может быть предназначена для научных и практических работников различного профиля, занятых в области микробиологии, таксономии и диагностики возбудителя чумы, и может быть пособием для преподавателей и слушателей курсов специализации по особо опасным инфекциям, начинающих специалистов, аспирантов, студентов-медиков, интересующихся инфекционными и эпидемически опасными болезнями.

Введение

В последние годы при проведении контроля над инфекциями, всё больше внимания уделяется новым особо опасным для людей нозологическим формам микроорганизмов, особенно вирусам, подверженным значительным модификациям. Эти модификации могут индуцировать существенные вариации клинических проявлений, усугублять течение болезни и повышать летальность. Возбудители, малоизвестные и слабо изученные, а также вновь выявляемые, вызывают заболевания, имеющие всё больший удельный вес в спектре инфекционных болезней населения Земли.

Внимание к бактериальным особо опасным инфекциям, в частности к чуме, в настоящее время, к сожалению, несколько ослабло. Это происходит в определённой степени в связи со снижением числа заболеваний чумой. Интенсивные пандемические проявления этой инфекции в силу развития здравоохранения, лекарственной терапии и вакцинопрофилактики во многом изменились и ослабли. Однако, по сути своей, на фоне (1) наличия периодических заболеваний людей чумой в Азии, Африке, Северной и Южной Америке в условиях высокого уровня миграции населения, (2) при сохранении активности природных очагов чумы, в которых продолжает циркулировать возбудитель, (3) в связи с современным ослаблением внимания к чуме и уменьшением настороженности, (4) при сокращении мер контроля за инфекцией, а также (5) в связи с потенциальной угрозой терроризма, возбудитель чумы (*Yersinia pestis*) представляет прежнюю опасность и реальную угрозу жизни людей. Примером могут служить события 1994 года в Индии.

Превентивные меры и неблагоприятные условия существования в окружающей среде обитания, в организме грызунов-носителей и переносчиков возбудителя могут индуцировать появление атипичных форм чумного микроба, и соответственно, клинического течения заболевания. Одной из основных форм нетипичного течения инфекции является чума, вызванная штаммами возбудителя, лишенными основного диагностического капсульного антигена. Такие случаи могут быть пропущены при ориентации диагностики исключительно на классические

признаки. Сильно выраженная вариабельность микроба чумы обсуждается на международном уровне, включая целесообразность введения его подвидовой градации. Проблемы такой многоплановой изменчивости, с одной стороны, нуждаются в более детальном исследовании её биологической целесообразности и обеспечивающих механизмов. С другой, требует выяснения, равнозначна ли роль всех известных вариантных групп чумного микроба в индукции классической чумной инфекции у людей. Сомнения, которые возникают при изучении этой роли, побуждают к поиску приёмов чёткой идентификации вирулентных для людей вариантов *Y. pestis*, которые обладают этиологической активностью и представляют эпидемическую опасность.

Многие диагностические признаки утратили или снизили своё дифференцирующее значение после выявления внутри вида *Y. pestis* отдельных групп (по предложению отечественных специалистов – подвидов), более приближённых к возбудителю псевдотуберкулёза. Это требует специального обсуждения и поисков новых дифференциальных тестов, позволяющих с большей гарантией ориентироваться в вопросах микробиологии, эпидемиологии и диагностики чумы.

Установленная и описанная в литературе вариабельность результатов многих ранее предложенных микробиологических и биохимических тестов, свидетельствующая о различии свойств у всех представителей вида *Y. pestis*, отражает степень ненадёжности этих тестов.

Иммунологические тесты, с учётом регистрируемых проявлений неспецифичности и изменчивости возбудителя чумы, требуют в ряде случаев дополнительных подтверждений, точно так же, как многие микробиологические тесты.

Большую гарантию точной видовой и внутривидовой идентификации дают молекулярно-биологические и генетические методы (плазмидный скрининг, ПЦР-анализ, секвенирование и др.). Они свидетельствуют об особенностях структуры генома разных групп *Y. pestis*. Именно эти молекулярные методы (совместно с использованными ранее микробиологическими) создадут основу для более точного определения таксономических позиций возбудителя чумы, выяснения путей,

времени и механизмов его эволюционного развития. Они же, в комплексе с экологическими и эпидемиологическими подходами, позволят выяснить прошлое, разобраться с настоящим и предположить будущее возбудителя эпидемически опасной чумы.

В данной книге обобщены материалы, имеющиеся в литературе, и результаты собственных исследований авторов по разным аспектам, затрагивающим изменчивость и диагностику возбудителя чумы.

Книга по своей структуре отражает стоявшие перед авторами задачи: (1) дать общее представление о неоднородности бактериального вида *Yersinia pestis*, и его основных отличительных признаках, официально рекомендованных для его идентификации; (2) охарактеризовать эти признаки, их вариабельность, степень выраженности и надёжности для идентификации; (3) наметить перспективные направления исследований по уточнению биологической и патогенетической активности вида *Y. pestis*, определяющих особенности патогенеза, а также (4) уточнить таксономические позиций возбудителя чумы и способствовать совершенствованию диагностики.

Представлены данные литературы, достаточно подробно характеризующие механизмы и материальные основы признаков, рекомендуемых для диагностики. Обсуждаются вопросы, дискуссионные и индуцирующие интерес к последующим исследованиям. Анализ некоторых нерешённых или спорных вопросов подтверждает необходимость применения современных методов исследований: сравнительного секвенирования генома, ПЦР-анализа генома с помощью различных праймеров, определения наличия и уровня экспрессии исследуемых и «диагностических» генов с помощью микрочипов, протеомного и транскрипционного анализа экспрессии генов и т.п. Не все методы пока нашли у нас широкое применение, но в части опытов показали свою высокую эффективность. Краткое описание их имеется в соответствующих разделах книги.

В силу ограниченности условий для использования молекулярно-биологических методов на некоторых этапах контроля над чумой, чаще применяются серологические методы диагностики, которые во многих случаях являются более доступными. В нашей стране разработаны чумные

иммуноглобулиновые (поликлональные, моноклональные) и антигенные препараты, предназначенные для реакций различного типа. С переменным успехом ведётся создание коммерческих препаратов для детекции вариантов возбудителя чумы, уклоняющихся от приёмов диагностики, нацеленных на выявление специфического капсульного антигена «фракция 1» и антител к нему. Судя по публикациям, в практике исследований довольно часто используют оригинальные авторские варианты диагностикумов, которые, к сожалению, не получили широкого применения, поскольку их не проводили через этап официального признания.

В книге в виде глав собраны обзорные материалы по вопросам, связанным с проблемой диагностики возбудителя чумы в соответствии с историей их появления и с особенностями его биологии. Краткий перечень этих аспектов изложен в главе 1. Краткость изложения материалов по возрастающей степени сложности, на наш взгляд, будет способствовать восприятию недостаточно осведомленным читателем последних данных по отдельным частным вопросам биологии чумного микроба, полученных на высоком методическом уровне и опубликованных в современных специализированных журналах.

В главах имеются повторы ссылок на отдельные работы, позволяющие, с одной стороны, связать главы между собой, с другой – служить напоминанием читателю о предыдущих сведениях, что, на наш взгляд, будет повышать эффективность восприятия.

Возбудитель чумы многие годы изучала большая плеяда исследователей у нас в стране и за рубежом. В России большинство из них были сотрудниками научно-исследовательских и практических учреждений противочумной системы. Имеется большая литература, которая периодически выходила в свет. Многие работы были представлены в тезисном варианте и приурочены ко времени проведения специализированных конференций и широкому кругу читателей не всегда доступны. Отечественная библиография отражает вклад этих исследований и содержит большой фактический материал относительно различных аспектов характеристики чумы, её «возбудителя – носителей - переносчиков» и функционирования этой триады в природных очагах.

Ранее полученные сведения, касающиеся чумы и микробиологии классической формы её возбудителя, можно найти в отечественных монографиях и руководствах, написанных В.М. Туманским [1958], И.Л. Мартиневским [1969], И.В. Домарадским [1971], И.В. Домарадским и др. [1974], М.П. Козловым [1979], Г.П. Апариным и Е.П. Голубинским [1989], И.В. Домарадским [1998] и др. В них, в частности, затрагивается проблема изменчивости возбудителя чумы; дана информация о неоднородности вида *Y. pestis*; обсуждается необходимость введения подвидов по традиционным микробиологическим дифференциальным тестам, которые, к сожалению, в силу вариабельности возбудителя чумы не всегда гарантируют правильный ответ.

Снижение в 1990-х годах числа публикаций с результатами исследований по чуме, традиционно проводимых в нашей стране, и взрыв исследовательского интереса к чумной инфекции за рубежом, индуцированный угрозой бактериального терроризма, привели к накоплению новых данных. Они позволяют прояснить некоторые вопросы, связанные с возбудителем чумы, и по-новому взглянуть на проблемы. Более того, возникла необходимость совместить результаты многолетних разносторонних исследований наших специалистов с последними представлениями зарубежных авторов, использовавших самые современные методы исследования, которые, к сожалению, проведены на единичных штаммах или ограниченных коллекциях, не отражающих всё разнообразие вида.

В данной книге суммированы полученные в разное время и на разном методическом уровне результаты микробиологических, биохимических, иммунологических, биологических, генетических и молекулярно-биологических исследований возбудителя чумы по обсуждаемой проблеме. При этом внимание акцентируется на многообразии форм существования чумного микроба, неоднородности вида *Y. pestis*, на отличающейся биологической активности разных форм существования бактерий, составляющих в настоящее время этот вид.

В книге изложено также авторское видение обсуждаемых проблем. Насколько оно справедливо и плодотворно, покажет время. Мы не претендуем на истину в последней инстанции. И объективный критический анализ изложенного материала будет воспринят нами с благодарностью. Он приблизит нас к истине, которой

владеет лишь природа. Дискуссии по затронутым вопросам, дополнительные материалы и аргументированная критика наших положений будут способствовать формированию более корректных представлений о возбудителе чумы *per se*.

Исследования возбудителя чумы в России и в странах ближнего зарубежья во многом согласуются по результатам и выводам, сделанным на их основе, касательно многих проблем, связанных с чумой. Специалисты на Западе основной акцент делают на отдельных проблемах. Перед ними стоит задача, связанная (1) с разработкой приёмов диагностики классической формы возбудителя чумы, (2) с изучением механизмов патогенеза при чуме и (3) с созданием препаратов для специфической профилактики. Вопросы variability, судя по публикациям, стали анализироваться недавно и в небольшом объёме. Это не удивительно, поскольку основные природные очаги чумы, в том числе те, где ярко выражена генетически определённая variability бактерий вида *Y. pestis*, расположены на территориях Азиатского материка.

В последней части книги представлен большой список публикаций по основным направлениям обсуждаемых исследований. Цитированные работы и имеющиеся при них перечни литературных ссылок помогут сориентироваться в значительном массиве литературы, посвящённой изучению возбудителя чумы и опубликованной не только в центральных изданиях, но и в тематических сборниках, зачастую содержащих в тезисном изложении очень ценные материалы, и не всегда получившие дальнейшее развитие.

В последние годы за рубежом появились весьма интересные работы по изучению обособленных групп чумного микроба азиатского происхождения. Некоторые из них выполнены совместными усилиями российских и зарубежных специалистов. Эти работы представляют удачный пример совмещения глубоких знаний по биологии, variability и эпизоотологии чумного микроба у специалистов бывшего СССР с теоретическими познаниями и методическими (экономическими) возможностями зарубежных научно-исследовательских лабораторий. Значительная часть этих результатов современных исследований не отражена и не проанализирована в перечисленных выше монографических изданиях. Объём работ, опубликованных в журналах, не позволяет в полной мере

обсудить проблемы variability и диагностики чумного микроба с использованием всего материала, накопленного за историю исследований, а сделать это в рамках представленной книги будет полезно. Мы очень надеемся, что изменчивость чумного микроба и неоднородность вида *Y. pestis*, вероятно, сопровождающаяся вариациями биологической активности, не останутся без внимания и у зарубежных специалистов. Ведь эти вопросы связаны напрямую с контролем над чумой, с вопросами о происхождении и эволюции возбудителя, в том числе и будущей, и непосредственно затрагивают перспективы сохранения несущих опасность заражения людей природных очагов чумы в условиях их преобразования и хозяйственной деятельности.

В заключение выражаем благодарность заведующему библиотекой РостНИПЧИ Е.В.Сухостат и старшему библиотекарю З.С.Талалаевой за помощь в обеспечении специальной литературой и оформлении её списка.

Глава 1. Общее представление о виде *Yersinia pestis*, как этиологическом факторе чумы, и подходах к его идентификации

С.А.Лебедева, О.П.Фецайлова

Чума зоонозное заболевание, эндемичное во всём мире Она высоко инфекционна для людей. Этиологическим агентом является грамотрицательная бактерия вида *Y.pestis*. Она инфицирует, прежде всего, широкий круг грызунов и передаётся блохами. Чума является природно-очаговым заболеванием; люди не играют роли в выживании патогена длительный период. Длительное выживание микроба и периодические эпизоотии животных происходят в природных очагах чумы.

По ходу истории чума разоряла человеческие популяции в трёх больших пандемических волнах и убила сотни тысяч людей. **Первая** описанная в хрониках пандемия, Юстинианова чума (541-767 гг.), по мнению многих исследователей, стартовала в Африке и распространилась через среднее Средиземноморье. **Вторая пандемия**, Чёрная смерть, длившаяся от 1346 г. до начала XIX столетия вышла из Средней Азии и через Каспий прошла в Европу. Чёрной смертью называют пандемию, во время которой погибла треть Европейской человеческой популяции между 1347 и 1352 годами [Matossian M., 1986; Havkins D.,1990; Сунцов В.В., Сунцова Н.И., 2006]. В течение следующих трёх столетий эта пандемия протекала с меньшей смертностью. Вопрос, было ли это исторически описанное заболевание соответственно бубонной чумой, вызывает противоречия. Недавно специфичная для *Y. pestis* ДНК была амплифицирована в материале из зубов умерших людей из древних захоронений, в которых, как считают, были жертвы чумы во Франции от Чёрной Смерти в XIV столетии и от чумы в XVI и XVIII столетии [Drancourt M. et al., 1998; Raoult D. et al., 2000]. Отсутствие специфической для *Y. pestis* ДНК в некоторых испытанных образцах из многих точек предполагаемых Европейских чумных захоронений не позволило утверждать, что *Y. pestis* является этиологическим агентом во всех случаях Чёрной Смерти [Gilbert M.T.P. et al., 2004]. В значительном числе проб были амплифицированы фрагменты ДНК других возбудителей и условно-патогенных бактерий, но ведущие авторы этих сообщений полагают, что рассмотрение причин Черной Смерти иных, чем *Y. pestis*, является в

настоящее время спекулятивным [Raoult D., Drancourt M, 2002]. Из всех эпидемий в Европе, предшествующих XVI столетию, бубонная чумная пандемия 1348-1350 была одна из более полно описанных современниками и, следовательно, одна являлась той, которая с наибольшей достоверностью может диагностироваться *post factum*. Несомненно, что чума подвержена сильному географическому регрессу. Во второй половине семнадцатого столетия она была в меньшей степени распространена в Восточной Европе, а после 1722 года вообще перестала быть серьёзной угрозой. В юго-восточной Европе, России и на Ближнем Востоке чума оставалась серьёзной проблемой, связанной со здоровьем людей до середины девятнадцатого столетия.

Современная чума началась в 1894г. в Гонконге, в южном Китае, и морским путём с кораблями распространилась по свету, включая Америку. «Недоступной» для чумного микроба сохранилась только Австралия. Причина этому пока не ясна. Трудно предположить, что морской путь миграции из Гонконга на кораблях был для заражённых чумой крыс недоступен, тем более что на некоторых соседних островах чума заявляла о себе. Обособленность фауны Австралии, отделившейся от первичной Гондваны, по всей вероятности, задолго до формирования сообщества древних грызунов, способных сохранять чумной микроб, и задолго до появления самого возбудителя чумы не обеспечила формирования природных очагов. Примеры же появления чисто синантропных крысиных очагов в Европе, Америке, Африке свидетельствуют об их неустойчивости и потребности в «подпитке» возбудителем из стабильных природных очагов, где распространены более надёжные носители [Сунцов В.В, Сунцова Н.И., 2006].

Штаммы *Y. pestis*, выделенные в разное время от больных, отличались по некоторым параметрам ферментативной активности и были первоначально классифицированы как три биовара (*Antiqua*, *Mediaevalis*, *Orientalis*) [Devignat R, 1961]. Долгое время считалось, что каждый из этих трёх биоваров доминирует соответственно, в Юстиниановой чуме, Чёрной Смерти и современной чуме [Perry R., Fetherston J., 1997]. Это не исключает возможной циркуляции в настоящее время штаммов всех трёх биоваров.

Ретроспективный анализ эпидемий и пандемий чумы с использованием молекулярно-биологических методов даёт неожиданные, а порой противоречащие известным, результаты. Так, по результатам секвенирования межгенных спейсеров и контроля уникальных их образцов у ДНК из зубов жертв трёх известных пандемий был сделан вывод, что во всех случаях выявлялась ДНК типа *orientalis*. Это позволяет предполагать, что вопреки прежним представлениям данный биовар мог быть этиологическим агентом всех трёх человеческих пандемий [Draucourt V. et al, 2004, 2007].

В другой работе, опубликованной в то же время, изложены результаты исследования микроэволюции штаммов чумного микроба тремя отличающимися молекулярными методами, выявляющими локализацию и число меток геномов различными нуклеотидными последовательностями (SNP, VNTR, IS). Авторы приходят к выводу о некоторых отличиях современных биоваров от тех, которые циркулировали в природе во времена древних пандемий. По этой причине они считают не совсем корректным бытующее в литературе положение о соответствии каждой чумной пандемии определённому современному биовару *Y. pestis*, хотя каждый из современных биоваров может быть потомком определённой древней группы, сформировавшей свою ветвь на эволюционном дереве иерсиний [Achtman M. et al., 2004].

В последнее время происходит общее возрождение интереса к *Y. pestis* в связи с появлением новых вспышек чумы, вызванных ею в Индии и Африке. Сохранение множества активных энзоотических очагов во всем мире (Азия, Африка и Америки), высокая смертность при заражении микробом чумы, короткий инкубационный период и возможность заражения при разбрызгивании бактериальных аэрозолей, делают чуму доступным и удобным инструментом для террористов. Всё это в сумме может объяснить возобновление интереса к возбудителю чумы вообще и к его молекулярной и клеточной биологии, в частности.

Современный уровень знаний генетики, молекулярной биологии, биохимии и биологии возбудителя чумы (*Yersinia pestis*), а также биологии и географии его носителей и переносчиков позволил сформулировать одно из допустимых положений [Ралль Ю.М., 1965; Слудский А.А., 1998, Сунцов В.В., Сунцова Н.И., 2007]

о поэтапном эволюционном процессе развития микроба и генезисе его очагов, где он постоянно циркулирует.

Пока нет единого мнения о путях и времени образования возбудителя чумы как вида. Возникновение чумы ранее часто относили к древним геологическим периодам и связывали с древним происхождением первичных носителей, которыми считают сурков-тарбаганов. [Туманский В.М., 1957; Ралль Ю.М., 1958, 1965; Devignat R., 1951; Домарадский И.В., 1998]. Эти предположения основываются на том, что в очагах Сибири и Средней Азии, где широко распространена древняя разновидность чумного микроба, основными носителями её являются сурки.

Новые фундаментальные знания о роде *Yersinia*, полученные молекулярными генетиками за последние годы, создали предпосылки для пересмотра положения о геологической древности возбудителя чумы. На основании результатов анализа генома бактерии чумы предполагают, что *Y. pestis* произошла от *Yersinia pseudotuberculosis* серовара O:1b 1500-20000 лет тому назад, незадолго до первой известной человеческой чумной пандемии [Achtman et al., 1999, 2004]. Сомнение в древнем происхождении чумного микроба высказывается и в других работах [Сунцов В.В., Сунцова Н.И., 2007].

Продолжающаяся изменчивость микроба и его селекция в организме специфически отличающихся носителей способствовали «совершенствованию» *Y. pestis* как возбудителя чумы грызунов и человека, а также формированию различающихся вариантов возбудителя.

Образование скрытых первичных очагов в Азии (Монголии, Тибете), где обитали дикоживущие древние сурки-носители и кровососущие-переносчики, в последующем привело к транслокации инфекции в Африку. Расширение зон персистенции возбудителя способствовало образованию локальных мезочагов и периодическому переходу возбудителя на новых хозяев, а затем и на человека. Многие авторы на основании летописных материалов считают, что именно из Африки началась первая «античная» Юстинианова пандемия чумы.

При анализе сведений, представленных в имеющихся обзорах, возникает ряд вопросов. Если античные штаммы возбудителя чумы характерны для азиатских сурков (второе название «античной» чумы – «сурчина») и разновидностей

африканских и индийских крыс, близких к суркам, то где впервые появилась *Y. pestis*? Если в Африке, то почему основной массив выделяемых там штаммов восточной разновидности характерен для синантропных крыс. Если зарождение возбудителя чумы имело место в Азии, где широко распространён античный тип, то почему Юстианова чума «пришла» из «молодых» природных очагов Африки, а не из древних тарбаганьих очагов монгольских степей через Индию. Молодость африканских очагов постулируют в связи с распространённостью в центральной и восточной Африке восточного «крысиного» варианта возбудителя чумы [Кучерук В.В., 1965]. В этом случае можно думать о «двойном» вторжении *Y. pestis* в Африку и рассматривать эти два события следует врозь со всеми вытекающими последствиями и новыми вопросами. Ещё один взгляд на эти и другие вопросы, касающиеся возбудителя чумы и очагов его распространения, представлен в недавно вышедшей содержательной книге академического плана [Сунцов В.В., Сунцова Н.И., 2007].

Различную систематическую принадлежность основного носителя возбудителя чумы считают одним из важных факторов, влияющих на формирование его свойств. Особенности обмена веществ у спящих и бодрствующих зимой животных-носителей (1), меняющийся температурный режим их организма в разные периоды года и в различных климатических поясах (2), специфика иммунной системы (3), резкое изменение свойств среды обитания микроба при переходе его из теплокровного микроорганизма во внешнюю среду (в блох и др. кровососущих, в почву, гнёзда и т.п.) и обратно (4) – всё это эффективные факторы, влияющие на фенотип микроба чумы. В результате этих воздействий на фоне различных генетических процессов в геноме возбудителя могли возникнуть популяции бактерий *Y. pestis*, определённым образом отличающиеся друг от друга, которые представляют известные на сегодняшний день разновидности.

Возбудитель чумы привлекает внимание исследователей в связи с его способностью вызывать у человека тяжелейшее эпидемически опасное заболевание, хотя сам человек для микроба является случайным носителем.

Микробиология возбудителя чумы началась в 1884 г в начале последней пандемии, когда *A.Yersin* и *Sh.Kitosato* сделали предположение о бактериальной

природе этиологического агента заболевания, а позже *A. Yersin* [1894] выделил от больных и умерших от чумы людей грамотрицательные биполярные палочковидные бактерии, не образующие споры. По мере дальнейшего накопления медико-биологических знаний становилось все более ясным, что источники многих инфекционных болезней находятся в дикой природе. И действительно, дальнейшие поиски микроба чумы в окружающей человека среде позволили обнаружить природные источники инфекции, носителей, переносчиков, пути распространения и очаги персистенции возбудителя. Выявление значительной вариабельности возбудителя по некоторым диагностическим признакам и факта существования разновидностей, связанных с различными видами грызунов, тоже исходило из характеристик штаммов, опасных для человека. Учитывалась идентичность этих штаммов тем вариантам, которые выделены от людей, тем, которые изолированы в зонах, где заболевания людей регистрируются неоднократно. Штаммы, выделенные от больных чумой людей, были отнесены в последующем к самостоятельному бактериальному виду, таксономические позиции которого за прошедшие годы менялись в мире неоднократно.

Многие годы основными признаками возбудителя чумы считали:

1. сочетание несколько замедленного роста бактерий на плотной питательной среде в виде колоний, находящихся в *R*-форме, и высокой их вирулентности для некоторых диких и лабораторных животных, а также людей;
2. чувствительность культур к диагностическим чумным фагам;
3. неспособность роста бактерий на голодных средах;
4. способность бактерий продуцировать специфический капсульный антиген (позже названный F1) и капсулу, которые индуцируют образование специфических антител у макроорганизма-носителя;
5. отсутствие подвижности и жгутиков у бактерий;
6. отсутствие ферментативной активности по отношению к рамнозе и мочеvine. [Туманский В.М., 1958]

Все эти признаки, а позже и другие, использовались не только при идентификации возбудителя чумы, но и для дифференциации его от

близкородственного предка - возбудителя псевдотуберкулёза. Эти бактериальные виды, а также ряд других бактерий, в настоящее время включены в род *Yersinia*, названный в честь первооткрывателя возбудителя чумы, и носят, соответственно, видовые названия *sp. pestis* и *sp. pseudotuberculosis*, *sp. enterocolitica* и др.

Генетическая организация чумного микроба принципиально не отличается от других бактерий. Возбудитель чумы имеет одну хромосому, на которой локализованы основные гены жизнеобеспечения и некоторые детерминанты, участвующие в его взаимодействии с его теплокровными и холоднокровными хозяевами-носителями. В дополнение к хромосомному репликону у бактерий типичных природных штаммов, как правило, содержится три определённые плазмиды (соответственно убыванию величины молекулярного веса - pFra, pCad, pPst), большинство генов которых участвуют в обеспечении приживаемости микроба в организме носителя и в проявлении патогенности возбудителя.

Возбудитель чумы веками сохраняется в диких природных очагах чумы. Наиболее известные очаги расположены в средней Азии, в пустынях Казахстана, в зоне Северо-Западного Прикаспия, в степях Калмыкии, в некоторых районах Северного Кавказа и в Закавказье, в горах Алтая, Киргизии, в Забайкалье, Монголии, Вьетнаме, Индии, Китае. Известны данные о функционировании очагов в Иране, центральной Африке, на о. Мадагаскар, в Бразилии, Соединенных штатах Америки. Постоянными носителями являются определённые виды грызунов, специфичные для каждого из очагов. Основными из них являются сурки, суслики, песчанки, крысы, полёвки. В процессе различных по интенсивности эпизоотий инфицируются также другие полевые грызуны. Высоко чувствительны верблюды. Человек является случайным носителем чумы. Однако, в силу высокой чувствительности значительной части людей к чуме, при заражении они могут стать источником инфекции, способной протекать не только как спорадические случаи, но и в виде вспышек, эпидемий и пандемий, как это описано выше, когда чума распространяясь по миру, была причиной смерти многих сотен тысяч людей. Интенсивность распространения чумы во многом зависит от переносчиков, способов передачи инфекции и форм заболевания. Блохи, специфические для грызунов-носителей и способные кормиться на человеке, как правило,

обеспечивают бубонные формы инфекции, летальность при которых и контагиозность с учётом современного развития медицины и при своевременной постановке диагноза и лечении не столь высоки. Для больного и окружающих чрезвычайно опасны формы инфекции, связанные с аэрозольным распространением возбудителя или обеспечивающие его. Велика опасность, когда имеет место инфицирование большими дозами: например, при разделке забитого больного чумой верблюда, тесном контакте с больными лёгочной или септической формой чумы. Чрезвычайно выраженная контагиозность инфекции, высокая скорость развития её тяжёлых форм делает исключительно актуальной своевременную диагностику заболевания. Это, соответственно, требует исключительно эффективных методов индикации возбудителя для предварительного ответа и столь же надёжных методов идентификации, разработка которых должна проходить с учётом вариабельности форм и диагностических свойств чумного микроба.

Исходя из принятых в практике утверждённых документов, диагностика проводится с учётом результатов исследования различного материала, взятого от больных или контактных людей, грызунов, блох, гнёзд, почвы и других объектов. Исследования проводятся, прежде всего, для получения предварительного заключения о возможном наличии заболевания этой инфекцией или возбудителя чумы и, наконец, для окончательного подтверждения с выделением культуры возбудителя и её идентификацией. Схемы исследования подробно изложены в соответствующих изданиях и документах [Туманский В.М., 1958; Особенности метод. приёмов..., 1989; Руководство. Саратов. 1992; Самойлова Л.В. и др., 1998; Методические указания М., 2002]. Здесь представляется уместным отметить, что в числе приёмов, используемых специалистами, имеют место, указанные ниже в схеме.

Окончательный ответ при проведении оперативного анализа может быть дан после получения культуры, подозрительной на принадлежность к *Y.pestis*, и подтверждения этой принадлежности с использованием методов предварительной идентификации. К основным тестам, согласно существующим инструкциям, относят следующие (рис. 1.1).

Точная идентификация бактерий вида *Yersinia pestis* важна не только при выделении культур от больных чумой и при эпидобследовании возникающих очагов. Потребность в ней возникает также (1) при анализе «сомнительных» штаммов, выделенных в природных очагах в периодах между эпизоотиями, (2) при определении параметров внутривидовой изменчивости для решения таксономических вопросов, (3) при изучении длительно хранившихся изменённых штаммов, а также (4) при определении параметров природной изменчивости внутри вида в процессе сохранения его во времени в различных природных условиях.

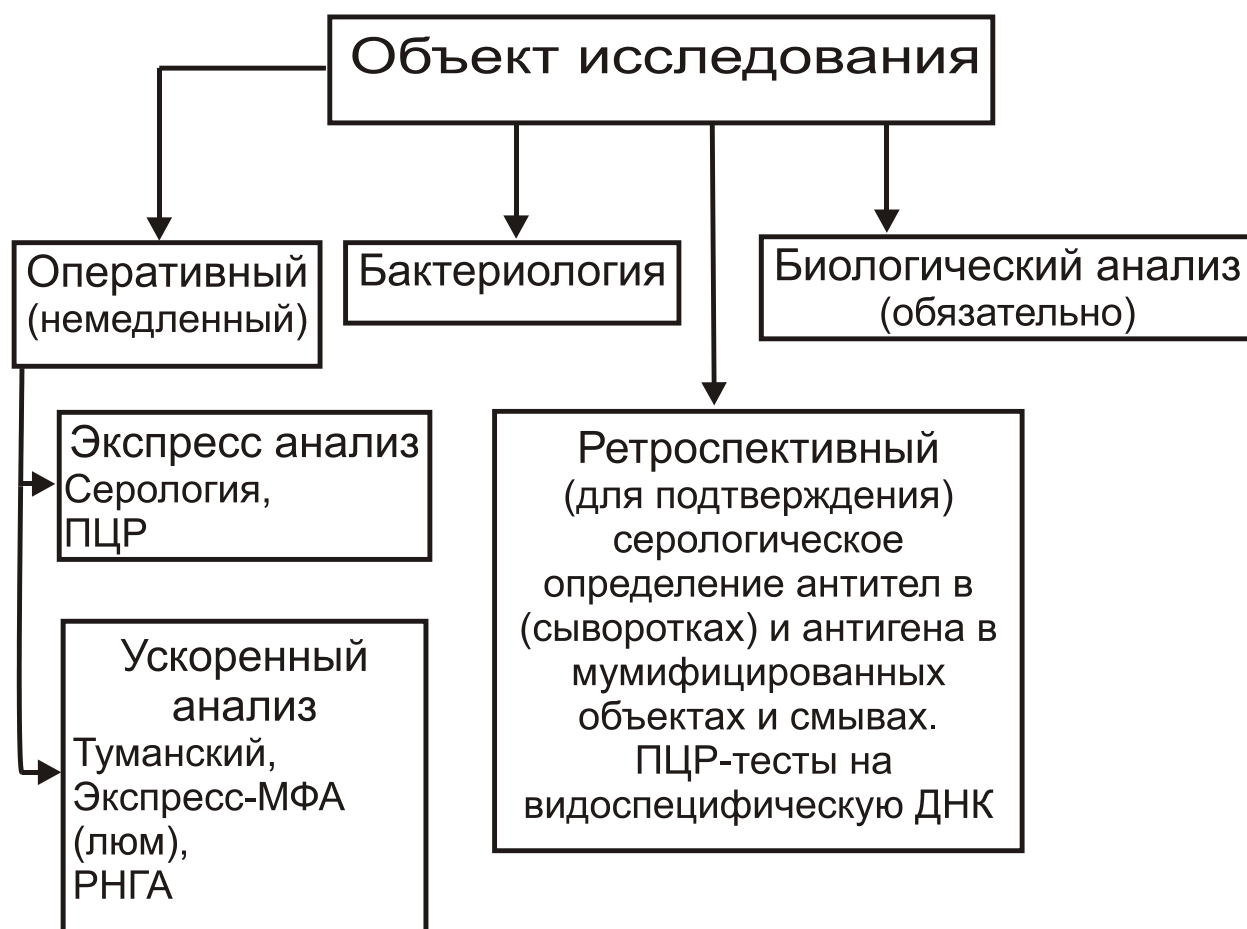


Рис.1.1 Схема анализа материала, подозрительного на заражённость возбудителем чумы.

При диагностике следует учитывать данные [Achtman M. et al., 1999] о том, что *Y. pestis* произошла от псевдотуберкулёзного микроба серовара O1b в результате внутригеномных перестроек с некоторым участием гетерогенного наследственного материала. В связи с этим дифференциальный анализ должен быть, прежде всего,

нацелен на установление различий между этими двумя иерсиниями. При сравнении их геномов оказалось, что около 13% процентов генов, активных у *Y.pseudotuberculosis*, не функционируют у *Y. pestis* из-за утраты или дефектности [Chain P.S.G. et al., 2004]. Однако часть дефектных генов *Y.pestis* сохранили способность к реверсии, и вне теплокровного носителя у бактерий под воздействием факторов среды обитания нередко происходят изменения части свойств, которые сближают фенотипы *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. Реверсирующие признаки могут существенно мешать идентификации и затруднять дифференциальную диагностику, приводя к ошибкам. Несмотря на это, данные виды необходимо чётко различать, в силу их различной патогенетической активности. Актуально это и для очагов, где распространены оба микроба. Но диапазон дифференциальных признаков, указанных в официальных инструкциях, весьма ограничен и включает, в основном, данные микробиологических и иммунологических тестов. Возможность обусловленных мутациями индивидуально-штаммовых отклонений от классического фенотипа может снижать надёжность дифференцировки и требует расширения спектра тестов, опознающих вид, за счёт наиболее надёжных, в том числе и выявляющих видовые особенности геномной структуры.

- **Морфологические свойства** (морфология клеток, колоний, характер роста в бульоне). Наличие в мазках грамтрицательных, в ряде случаев биполярно окрашенных, палочек, которые способны формировать в жидкой среде короткие цепочки, а на плотной среде типичные колонии в R-форме. У большинства штаммов, представляющих вид *Y.pestis*, R-форма колоний настолько типична, что бактерии чумы распознаются при анализе посевов сравнительно безошибочно. Столь же наглядны S-колонии *Y. pseudotuberculosis* и это помогает отличить их друг от друга. Однако известно, что некоторые штаммы чумного микроба иногда растут в виде сравнительно гладких колоний [Meka-Mechenko T., 2004]. Кроме того, бактерии обоих видов в состоянии диссоциации могут давать рост колоний, промежуточных между R и S формами. Эти промежуточные S↔R колоний не могут быть надёжным ориентиром при дифференциации. Нетипичными, более гладкими или лишёнными «кружевной» каймы могут быть колонии *Y. pestis*, выросшие на

питательных средах с гемолизированной кровью или на других специализированных средах.

- **Лизабельность чумными диагностическими бактериофагами (бактериофаги Покровской и Л-413 «С»).** Для дифференциации бактерий вида *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* в практике используют три отечественных диагностических бактериофага: чумной диагностический (Покровской), псевдотуберкулёзный диагностический (Д'Эрелля) и чумной диагностический Л-413С (Лариной). Первые два - менее специфичны, чем третий. Литическое действия их на обеих иерсиний отличается. Бактерии *Y. pseudotuberculosis* продуцируют специфическую рестриктазу, способную ограничивать развитие чумного фага Покровской [Rakin A.V. et al., 2006]. Поэтому все штаммы *Y. pseudotuberculosis*, продуцирующие эту рестриктазу (около 80%), устойчивы к фагу Покровской, а остальные (20%) чувствительны к нему так же, как чумной микроб. Кроме того, в природе и в лабораторных условиях обнаруживаются штаммы чумного микроба, устойчивые к фагу Покровской. Их резистентность связана с нарушением рецепторов для фага (см. гл.5). Всё это может значительно затруднить дифференциацию, так как проба с фагом одна из наиболее доступных при анализе штаммов. К фагу Л413С бактерии *Y. pseudotuberculosis* полностью устойчивы, поскольку не имеют соответствующих рецепторов [Garsia E. et al., 2008]. Большинство штаммов чумного микроба - чувствительны. И только диссоциирующие штаммы этого вида резистентны.
- **Ферментативная активность.** Среди субстратов, ферментация которых имеет диагностическое значение, ведущими являются лактоза, глюкоза, глицерин, рамноза, арабиноза, мелибиоза и мочевины. Прежде всего, ориентиром в этих исследованиях является факт усвоения окисления глюкозы без образования газа, как это свойственно некоторым кишечным бактериям. Возбудитель чумы, как правило, не ферментирует лактозу в ранние сроки. Известны редкие штаммы, разлагающие лактозу в поздние сроки (около 14-20 сут наблюдения). Глицерин не ферментирует только часть штаммов возбудителя чумы, разносчиками которых являются крысы. Способность к

ферментации рамнозы, мелибиозы и мочевины ранее считалась преимущественным свойством возбудителя псевдотуберкулёза. В настоящее время при межвидовой дифференциации она учитывается как второстепенный вспомогательный признак.

- Во-первых, способность к **ферментации рамнозы** встречается также у клонов и целых популяций некоторых диссоциирующих штаммов [Englesberg E., 1957; Арсеньева Т.Е. и др., 2006]. Во-вторых, открыты обособленные массивы штаммов чумного микроба, циркулирующих в высокогорных природных очагах чумы и в настоящее время отнесенные к дополнительным подвидам *Y.pestis* [Леви М.И. и др., 1963; Анарин Г.П., Голубинский Е.П., 1983]. Все они отличаются именно Rha⁺ фенотипом. Такая же ситуация и в случае ферментативной активности по отношению к мелибиозе. Способность к ферментации рамнозы долго считалась характерной только для *Y.pseudotuberculosis*. В настоящее время при межвидовой дифференциации она учитывается только как второстепенный вспомогательный признак. Во-первых, этот признак встречается также у клонов и целых популяций некоторых диссоциирующих штаммов основного подвида *Y. pestis* [Englesberg E., 1957; Арсеньева Т.Е. и др., 2006]. Во-вторых, штаммы полёвочьей разновидности *Y. pestis*, [Леви М.И. и др., 1963], позже отнесенные к пяти дополнительным подвидам [Анарин Г.П., Голубинский Е.П., 1983], отличаются именно Rha⁺ фенотипом.
- Такая же ситуация и в случае ферментативной активностью по отношению к **мелибиозе**.
- Большинство штаммов вида *Y. pseudotuberculosis* в отличие от *Y. pestis* способны **ферментировать мочевины**. Отсутствие уреазной активности у чумного микроба, как полагают, связано у классических штаммов чумного микроба с индуцирующей образование stop-кодона инсерционной мутацией в регуляторном гене Ure-оперона [de'Köning-Ward T.F., Robins-Braune R.M., 1996]. Однако известны реверсии и кратковременная экспрессия Ure⁺ фенотипа сразу после выделения природных штаммов. Уреазы может быть также обнаружена и после разрушения бактерий чумы [Mollaret H.H. et al.,

1964; Домарадский И.В., 1993; Полосмаков В.Э. и др., 2002]. Стабильные Ure⁺ клоны могут быть получены из популяций диссоциирующих штаммов *Y. pestis* [Арсеньева Т.Е. и др., 2007]. Более того, типичными Ure⁺ являются штаммы одного из подвигов *Y. pestis*.

- **Проба на экспериментальных животных.** Известно, что возбудитель чумы проявляет вирулентные свойства, находясь в R-форме диссоциации. Гибель белых мышей и морских свинок при заражающей дозе в пределах тысячи и миллиона микробных клеток, формирующих колонии R-формы, с последующим выделением соответствующей культуры – явное свидетельство в пользу принадлежности этих бактерий к виду *Y. pestis*.
- **Чувствительность к антибактериальным препаратам.** Чрезвычайно важно при наличии заболеваний, подозрительных на чуму, как можно раньше начать лечение, для которого нужны сведения о чувствительности бактерий к лекарствам ещё до окончательной идентификации выделенной культуры. Поэтому проводится проверка чувствительности к антибиотикам, в том числе к аминогликозидам, тетрациклинам, сульфамонетоксину/триметаприму, фторхинолонам, цефалоспорином. Наиболее распространённым среди применяемых является «метод дисков», однако он менее точен по сравнению с определением чувствительности на агаровых средах, содержащих антибиотики в градиенте, чему отдаётся предпочтение. Детально подходы к определению антибиотикочувствительности представлены в практическом руководстве [*Специфическая индикация ...*, 2006].

Окончательно идентификация культуры проводится в стационарных лабораториях противочумных станций или противочумных институтов, имеющих разрешение на экспериментальные работы с возбудителями I-II группы патогенности, соответственно оснащённых и имеющих специалистов необходимой квалификации для выполнения **дополнительных тестов**. Помимо более детальных исследований, по перечисленным выше тестам предварительной идентификации, выполняется следующее.

На первом месте это - **определение** наличия и титра специфического капсульного **антигена F1**, на основе которого или с использованием антител к которому разработаны основные иммунологические реакции. Осложняет ситуацию наличие штаммов чумного микроба (лабораторных, природных от людей, блох, грызунов), которые не продуцируют F1-антиген (Fra-), или вариантов с серологически изменённым капсульным антигеном, для которых тестирование диагностикумами на F1-антиген не эффективно и не позволит судить о видовой принадлежности.

Важным и довольно надёжным видовым признаком возбудителя чумы является отсутствие **подвижности** бактерий в полужидком агаре или в жидкой среде при наблюдении за висячей каплей. Известно, что возбудитель псевдотуберкулёза при температуре окружающей среды в пределах 18-22°C синтезирует жгутики перитрихального типа, которые обеспечивают эту подвижность. Возбудитель чумы к этому не способен, в силу повреждения генов, участвующих в синтезе жгутиков, хотя они имеются в наличии. Стабильность этой мутации могла бы обеспечить полную надёжность дифференциации двух иерсиний. Нет ни одного сообщения о том, что какой-либо из исследованных штаммов *Y.pestis*, типичный, диссоциирующий или изменённый по разным признакам, проявлял бы подвижность. Однако среди типовых штаммов *Y. pseudotuberculosis* имеются образцы, которые точно так же, как *Y.pestis*, не синтезируют перитрихальных жгутиков при комнатной температуре и не могут активно передвигаться. Следовательно, наличие подвижности чётко указывает на принадлежность дифференцируемых иерсиний к виду *Y. pseudotuberculosis*, в то время как её отсутствие может быть свойством и чумного микроба, и псевдотуберкулёзного.

Изучение плазмидного состава. В своё время в качестве признака, характерного для бактерий *Y.pestis* и отличающего их от *Y.pseudotuberculosis*, был предложен скрининг плазмид [Ракин А.В., Казаченко Л.К., 1984]. У последнего вида часто обнаруживают одну плазмиду pCad (45-50 МД), характерную для трёх патогенных для человека иерсиний, и дополнительную высокомолекулярную (80-83 МД) специфическую для этого вида, связанную с инвазивностью и не родственную с плазмидами чумного микроба. А у возбудителя чумы плазмиду

кальцийзависимости (pCad), дополняют две видоспецифические плазмиды (pFra и pPst), которые контролируют продукцию F1-антигена, Pst1 и Pla. Эта триада плазмид с определённой молекулярной массой характерна для большинства природных штаммов чумного микроба и действительно может быть одним из маркеров их видовой принадлежности.

Наиболее высокомолекулярная (60-100 МД pFra), видоспецифическая, отвечает за продукцию капсульного антигена *F1* и «мышинного» токсина, обладающего активностью фосфолипазы *D* [Проценко О.А. и др., 1983; Linder L.E. et al, 1998; Hinnebusch B.J. et al, 2002]. Утрата плазмиды или повреждение соответствующих генов приводит к формированию так называемых «бесфракционных» штаммов чумного микроба, которые обычно обладают в большей степени избирательной вирулентностью, чем полноценные штаммы. Среднюю по величине молекулярной массы (40-50МД, pCad) плазмиду считают специфичной для трёх иерсиний, которые патогенны для людей. Она детерминирует при 37°C полную зависимость роста бактерий от ионов Ca^{2+} и синтез бактериальных компонентов, которые обеспечивают систему секреции III типа и необходимы для проявления вирулентности у иерсиний [Cornellis G.R.,2002]. Вторая, специфичная только для чумного микроба, плаزمида (М.м. 6-8 МД, pPst) отвечает за способность чумного микроба к синтезу пестицина 1 (бактериоцин чумного микроба) [Кольцова Е.Г. и др., 1971; Ferber D.M.,Brubaker R.R., 1981]. Она обеспечивает устойчивость к нему бактерии-хозяина и продукцию *pla*-протеазы и фибринолизина, участвующих во взаимодействии микроба с макроорганизмом. Для некоторых групп штаммов характерно наличие дополнительных криптических плазмид, функциональная значимость которых до сих пор твёрдо не установлена. Это касается 4 МД мини-плазмиды у штаммов чумного микроба от горных сусликов из Кабардино-Балкарии, предположительно несущей маркер дефектности гена ауксотрофности по *pro* [Грамотина Л.И. и др., 1987], и 15 кД плазмиды, которую обнаруживают у штаммов чумного микроба из Монголии, Китая и Таласского очага в Киргизии и иногда связывают с синтезом F1-антигена [Butler T., 1983; Балахонов С.В., 1989; Балахонов С.В. и др., 1991]. Но существуют штаммы, утратившие плазмиды по отдельности или все вместе (бесплазмидные). Кроме того, *Y.pestis* подвида *caucasica* от природы

не содержит плазмиды пестициногенности, а её высокомолекулярная плазида по М.м. на гелеэлектрофореграммах довольно близка к мажорной плазмиде псевдотуберкулёзного микроба. Это осложняет дифференциацию по этому признаку.

Продукция пестицина 1 (Pst1) и Pla-протеазы, обладающей фибринолитической и плазмокоагулазной активностью, признак, не свойственный ни одному из известных штаммов псевдотуберкулёзного микроба. Он специфичен для чумного микроба. Исключением является один из подвидов *Y. pestis* (*ssp. caucasica*), который от природы не продуцирует Pst1 и Pla. Однако, в единичном числе среди штаммов *Y. pestis*, всех подвидов, выделенных в природных очагах Средней Азии, Вьетнама, Поволжья, Монголии, для которых характерен фенотип «Pst1⁺Pla⁺», встречаются штаммы, не продуцирующие эти белки. Отличить их и кавказские штаммы *Y. pestis* от полёвок только по этому признаку от штаммов *Y. pseudotuberculosis*, «от природы» Pst1⁻Pla⁻, нельзя.

Исследование способности к **нитрификации и денитрификации** использовалось ранее как тест дифференциальной диагностики и градации бактерий чумы на биовары. В настоящее время в силу того, что в пределах вида *Y. pestis* обнаружены штаммы, имеющие большое сходство с возбудителем псевдотуберкулёза, по всей видимости, представляющие промежуточное звено между этими видами иерсиний, значимость указанного теста может иметь ограниченное использование при градации чумного микроба на биовары и подвиды, данные о которых будут изложены ниже.

Таблица 1.1

Тип ауксотрофности штаммов чумного микроба, выделенных в различных очагах СНГ [по Апарину Г.П., Голубинскому Е.П., 1982]

Мезоочаг	Тип ауксотрофности									
	Phe	Met	Cys	Thr	Leu	Arg	Val	Pro	Tyr	Thi
Забайкальский	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Тувинский	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Приарало-Каракумский	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Урало-Эмбенский	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Зауральский	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Муонкумский	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Южно-Прибалхашский	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Кызылкумский	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Туркменский	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Заунгузский	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Каракумский	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Дагест, равн.предгорный	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Тянь-Шаньский	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Предустьуртский	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Устюртский	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Мангышлакский	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Равнинно-низкогорный Закавказский	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Горно Алтайский	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Гиссарский	+	+	+	+	+	±*/	-	-	-	-
Закавк. высокогорный	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
Приэльбрусье	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-

Примечание: */ данные в отношении ауксотрофности «Arg» противоречивые.

Определение питательных потребностей может помочь в идентификации штаммов чумного микроба. Поскольку известно, что представители этого вида являются строгими ауксотрофами с маркерами, которые могут в некоторой степени отличаться в зависимости от природного очага, из которого происходит штамм (табл. 1.1). Бактерии *Y. pseudotuberculosis*, как правило, прототрофы. Именно поэтому эмпирическое предложение о культивировании их на голодной среде с целью отличить от *Y. pestis*, оказалось успешным. Однако необходимо иметь в виду, что в популяциях чумного микроба имеются клоны полностью прототрофные, и в определённых условиях, которые способствуют изменчивости микроба, они могут доминировать. С другой стороны, известны штаммы псевдотуберкулёзного микроба с маркерами ауксотрофности, но эти маркеры отличаются от характерных для *Y. pestis*. Оба вида иерсиний при 37°C являются ауксотрофами. Причем, у возбудителя набор дополнительных маркеров значительно возрастает за счёт появления зависимости роста от нуклеиновых оснований, витаминов и гемина [Jackson S., Burrows T.W., 1956]. Следует отметить, что при повышенной температуре бактерии чумы обязательно проявляют зависимость от изолейцина, тогда как возбудитель псевдотуберкулёза в этой аминокислоте не нуждается. Это отличие предложено использовать в качестве одного из тестов, дифференцирующих два вида иерсиний [Арыкпаева У.Т. и др., 1980]

Вирулентность чумного микроба в значительной степени коррелирует с наличием у исследуемого штамма способности к сорбции гемина и некоторых пигментов (Psb+, Pgm+, Hms+), которая определяется хромосомными генами, и с экспрессией плазмидных генов, отвечающих за Ca^{2+} -зависимость. Рекомендуется в некоторых случаях тестировать эти свойства перед определением степени вирулентности для экспериментальных животных на среде с гемином [Jackson S., Burrows T.W., 1956] или с Конго-рот и на среде Хигучи-Смита, дефицитной по ионам Ca^{2+} [Higuchi K., Smith J.L., 1961].

Помимо официальных тестов, описанных выше, в литературе имеются сведения о высокой эффективности использования препаратов авторского антительного диагностикума, приготовленного на основе антигенного **комплекса «фракция V»** [Божко Н.В., 1972], специфически реагирующего с бактериями возбудителя чумы. Это позволяет использовать его как для идентификации *Y.pestis*, так и при дифференциации с *Y.pseudotuberculosis* (детально см. гл. 7).

Если каждый из перечисленных выше признаков может в той или иной степени вариировать, то естественно дифференциация окажется более эффективной при оценке суммарных результатов одновременного использования перечисленных выше тестов. Однако при изменении нескольких диагностических признаков могут возникнуть значительные трудности при диагностике. Конечно, параллельное изменение нескольких диагностических признаков - событие не столь частое (хотя и реальное), и результаты исследования по другим тестам позволят правильно сориентироваться в видовой принадлежности исследуемого штамма иерсиний. Однако встречаются штаммы обеих иерсиний с атипичными проявлениями одновременно по 3-5 и более диагностическим признакам. Среди них штаммы *Y. pseudotuberculosis* (например, одновременно Mob-, Ure-, ауксотрофные, чувствительные к чумному фагу) и *Y.pestis* (например, одновременно Fra-, без pFra и pPst плазмид, Rha+, Ure+, фагоустойчивые). Такие штаммы могут быть правильно идентифицированы только при более детальном тестировании. И необходимость такого широкого поиска тестов становится ясной после корректной оценки их

надёжности. Материалом для поиска таких тестов могут быть результаты сравнения структуры генома обсуждаемых двух иерсиний [Chain P.S.G. et al., 2004].

Молекулярно-биологическое тестирование ДНК с целью обнаружения видоспецифических особенностей хромосом и плазмид значительно расширило возможности диагностики (детально см. гл.6). Именно изучение особенностей структуры генома, с последующим секвенсом хромосомной и плазмидной ДНК *Y. pestis*, создало возможность использовать данные о нуклеотидных специфических последовательностях отдельных генов в диагностике чумы и идентификации возбудителя. Для этого наиболее часто применяется полимеразная цепная реакция (ПЦР) с помощью пар близко лежащих специфических для *Y. pestis* последовательностей (праймеров), способных направлять синтез фрагментов ДНК (ампликонов) с определённой М.м., локализованных между этими праймерами. Наличие таких специфических ампликонов в пробе свидетельствует о принадлежности исследуемого штамма к виду *Y. pestis*.

В результате всех этих исследований при показателях, характерных для типичных штаммов возбудителя чумы, имеет место корректная диагностика. Это позволяет в полной мере провести эффективные лечебные, профилактические и эпидемиологические мероприятия, способствующие выздоровлению больного и ликвидации угрозы распространения инфекции.

Сложности могут возникнуть при активации атипичных или уклоняющихся от идентификации штаммов возбудителя чумы. В первую очередь это штаммы *Y. pestis*, неспособные к синтезу капсульного антигена F1, но сохранившие вирулентность на достаточно высоком уровне. Преимущественная ориентация серологических и молекулярно-биологических тестов на этот антиген или гены, определяющие его синтез, способствует «ускользанию» Fra^- штаммов от идентификации или значительному затруднению её выполнения. В литературе описаны штаммы возбудителя чумы, (1) атипичные по ферментативной активности, уреазо-, рамнозо-, арабинозо- и мелибиозопозитивные, как возбудитель псевдотуберкулёза, (2) ферментирующие сахарозу и лактозу, как другие представители сем. *Enterobacteriaceae*, (3) устойчивые к диагностическим бактериофагам, (4) варианты с изменённой структурой плазмид и их составом, (5) атипичные по характеру

вирулентности вплоть до полной утраты её для некоторых видов чувствительных носителей, а также (б) штаммы, изменённые морфологически и существующие в виде L-форм и других атипичных бактериальных форм с изменённой клеточной стенкой, включая «некультивируемые». Более подробно характеристика основных диагностических признаков чумного микроба будет рассмотрена в других главах.

Глава 2. Гетерологичные и гомологичные бактериофаги, лизирующие бактерии *Y.pestis*. Их роль в диагностике чумы.

Ю.И.Арутюнов, С.А.Лебедева

2.1. Общая характеристика бактериофагов.

2.1.1. Введение

В 1915 г. *Twort* описал остекленение стафилококковых колоний и попытался дать объяснение этому явлению. До этого исследователи наблюдали феномен «исчезновения» бактериальных культур в бульоне, но не описывали или не придавали этому значения.

Выделение и описание свойств первых рас бактериофагов было сделано в 1917 г. канадским учёным Феликсом Д'Эреллем, который посвятил изучению бактериофагов свою жизнь. Несмотря на спорность ряда положений, выдвинутых им, монографические работы Д'Эрелля представляют интерес и до сегодняшнего дня. Многие гипотезы, выдвинутые им, нашли подтверждение позже, благодаря использованию современных методов исследования [Д'Эрель Ф., 1926, 1935].

Историю изучения бактериофагов и явления бактериофагии условно можно разделить на несколько этапов.

I этап – период разрозненных наблюдений феномена лизиса бактериальных штаммов различных видов, вплоть до 1940 г. Это время накопления фактов распространения в природе явления бактериофагии, разработки методов изучения феномена. В этот период предложен ряд основополагающих методических приёмов: (1) визуализация лизиса бактерий на плотных питательных средах, (2) посев единичных фаговых вирионов, (3) характеристика негативных колоний, (4) серологическая идентификация фагов, (5) одиночный цикл размножения в клетке (определение латентного периода размножения, среднего урожая на одну микробную клетку) и др., широко используемые до настоящего времени [Д'Эрель Ф., 1926, 1935; Burnet F., 1933, 1933a; Gratia A., 1936; Ellis E., Delbruck M., 1939 и др.].

II этап (1940-1960 гг.) – выделение фагов из различных бактерий и объектов и изучение их биологии. В этот период началось морфологическое исследование

фагов, благодаря внедрению электронно-микроскопических методов исследования [Ruska H., 1941].

III этап (1960-1980 гг.) – исследование фагов и процессов взаимодействия фага с микробной клеткой на молекулярном уровне. Выяснилось, что фаги являются подходящей моделью для изучения вопросов наследственности, мутагенеза, а также участвуют в генетической изменчивости микробной клетки (трансдукция, трансформация, лизогения и сопутствующая конверсия, селекция).

IV этап (с 1980 г. и по настоящее время) – использование фагов как инструмента генетического преобразования микробной клетки, на базе которых создаются векторы, выделение отдельных генов или групп генов и внедрение их в бактериальную клетку и пр.; исследование и расшифровка генома бактериофагов.

Такая условная этапность изучения и исследования относится, в основном, к фагам непатогенных видов бактерий. Бактериофаги патогенных видов, особенно наиболее опасных инфекций, в частности чумы, стали предметом изучения позже, что объясняется сложностью работы с возбудителями этих инфекций.

Бактериофаги – вирусы бактерий, которые вызывают «болезнь» микробной клетки, в результате которой микроб либо погибает (лизирован), либо становится «носителем инфекта» (лизогенизируется). Эти два типа фагов обозначаются, соответственно, вирулентными и умеренными.

Исследование фагов, названных умеренными, выявили своеобразный тип взаимодействия вируса с микробными клетками, при котором фаг не размножается и не разрушает инфицированные бактерии. Интегрируясь с бактериальным геномом, он становится составной его частью. Лизогенизированные бактерии, сохраняя, как правило, основные физиологические функции, приобретают и новые качества. Основные из них это устойчивость популяции к лизогенизирующему фагу и способность продуцировать в определённых условиях полноценные фаговые вирионы.

Это свойство умеренных фагов, а точнее лизогенизированных микробных клеток, используют для решения многих задач биологии и медицины. Умеренные фаги в некоторых случаях могут отщеплять мутанты: либо вирулентные, активно лизирующие бактерии, но утратившие способность к лизогенизации, либо

дефектные, способные к лизогенизации, но без последующего фагообразования. Микробные клетки, лизогенные по дефектному фагу, иногда сохраняют устойчивость к литическому действию гомологичного бактериофага, как это свойственно полноценным лизогенам.

2.1.2. Критерии биологической характеристики бактериофагов

Основоположник учения о бактериофагии Ф. Д'Эрелль. [1926, 1935] полагал, что «существует только один единственный вид бактериофага, обладающий свойствами приобретать вирулентность путём привыкания к различным, вероятно, ко всем штаммам бактерий». Мысль о наличии в природе такого числа бактериофагов, какое существует микробных видов, считалась совершенно невероятной.

Действительно, в ряде случаев, бактериофаг удаётся адаптировать к гетерологичному штамму [Шмурыгина А.А., 1953; Мацелюх Б.П., 1958; Тимаков В.Д., Гольдфарб Д.М., 1961; Маркова Н.С., 1962 и др.]. Об этом же свидетельствуют факты проявления неспецифического действия бактериофагов. Однако, накопленные материалы свидетельствуют, что возможность адаптации, а также проявления неспецифического действия фага, не универсальны [Крылова М.Д., 1954]. С подобным явлением пришлось столкнуться и самому Ф. Д'Эреллю.

В настоящее время факт существования бактериофагов специфических по отношению к каждому микробному виду не вызывает сомнения. Вместе с тем следует признать и тот факт, что фаг, «причисленный» к определённому виду бактерий, может лизировать бактерии близкородственного вида.

Разнообразие бактериофагов было отмечено давно [Bail O., 1923]. Для дифференциации бактериофагов в пределах лизируемого ими микробного вида, предложено использовать различия в морфологии негативных колоний, а для выяснения более глубоких различий – спектр литического действия, способность и скорость размножения в бульонной культуре, способность перекрёстно лизировать вторичные культуры, выросшие при действии каждого из изучаемых бактериофагов. Для идентификации бактериофагов рекомендовано также ориентироваться на особенности морфологии негативных колоний [Sertic V., Bulgakow N., 1931]. При этом рекомендовалось учитывать величину «негативной» колонии, характер её края,

интенсивность лизиса, наличие или отсутствие вторичного роста, величину зоны неполного лизиса. В качестве дополнительных критериев предлагалось определять вирулентность в отношении гомологичного и гетерологичного видов бактерий и терморезистентность.

Индийские исследователи [*Asheshor J. et al, 1933, 1933a*] отметили, что морфология «негативных» колоний может иметь значение лишь при сравнении различных бактериофагов, лизирующих один и тот же вид бактерий. Авторы разработали схему типизации на модели холерных фагов, основанную на определении: (1) чувствительности вторичных культур при перекрёстном воздействии фагов; (2) урожайности через определённый промежуток времени взаимодействия фага и бактериальной культуры в жидкой среде; (3) действию на штаммы, чувствительные и резистентные к определённому типу фага. Используя эти тесты, авторам удалось исследуемые холерные фаги разделить на пять типов.

Эффективность типизации бактериофагов значительно выше, если кроме морфологических особенностей «негативных» колоний учитывать их антигенное родство, а также устойчивость к действию некоторых химических агентов – фотодинамическому действию метиленовой сини, цитрату натрия, мочевины [*Burnet 1933, 1933a*]. С внедрением в практику некоторых дополнительных методов, увеличивалось число биологических и морфологических свойств фагов, предлагаемых в качестве дифференциальных тестов [*Ellis E., Delbruck M., 1939; Ruska H., 1941; Friedman M., Cowles Ph., 1953 и др.*].

Позже была предложена наиболее совершенная схема изучения биологических свойств бактериофагов [*Adams M., Wade E., 1954; Адамс, 1961*]. Она включает следующие критерии: (1) морфологию корпускул бактериофагов и их «негативных» колоний; (2) серологические свойства; (3) спектр литической активности; (4) взаимодействие фага с культурой-хозяином (степень адсорбции в единицу времени, латентный период внутриклеточного развития, урожайность на одну микробную клетку); (5) влияние различных химических факторов и физических воздействий; (6) опыты по смешанному заражению. Оценивая эти критерии по степени их важности для решения вопроса об идентичности изучаемых бактериофагов, авторы предлагают ориентироваться на результаты изучения серологического родства,

морфологического сходства, а также на сходство физиологических свойств и поведение в опытах со смешанной инфекцией. При этом считают, что для окончательного вывода достаточно совпадения двух из перечисленных выше признаков – первого и любого из последующих.

Предложена также расширенная схема характеристики бактериофагов, которая базируется на определении следующих свойств:

I. Изучение внеклеточного бактериофага: (а) морфология вириона; (б) морфология «негативных» колоний; (в) устойчивость к инактивирующим антителам (серологическая идентичность).

II. Изучение взаимодействия бактериофага с бактериальной клеткой: (а) диапазон действия; (б) зависимость от ионов Ca^{2+} , (в) чувствительность к цитрату натрия; (г) характеристика цикла размножения (величина адсорбции на клетке-хозяине за единицу времени, латентный 1й период внутриклеточного развития, урожайность фаговых корпускул); (д) зависимость литической активности от состава питательной среды; (е) определение показателя эффективной множественности заражения.

III. Взаимоотношение между бактериофагами в опытах смешанной инфекции [Гольдфарб Д.М., 1961].

Существует мнение, что для практических целей достаточно исследовать морфологию вириона и антигенную структуру (серологические свойства) [Кривисский А.С., 1960]. Однако характеристика вирусов на современном уровне включает также изучение их нуклеиновых кислот и особенностей структуры фагового генома. Это свойство у бактериофагов, как вирусов бактерий, также является предметом изучения.

Нам представляется, что, характеризуя фаг, следует рассматривать два аспекта:

1. Изучение фага как самостоятельный биологический объект, представляющий тип *Viridae*. Место изучаемого фага в иерархии вирусов. При этом необходимо изучение широкого диапазона свойств;
2. Фаг, как агент, лизирующий определённый вид микробов. При этом определяется его «видовая принадлежность» по спектру и диапазону действия на гомо- и гетерологичные виды бактерий. Литическая

активность фага позволяет оценивать расы фага с позиции возможности использования их в диагностике возбудителя, дифференциальной диагностике, фаготипировании бактерий.

Исходя из практической целесообразности, необходимо изучение минимального количества свойств фага. (1) Исследование характера негативных колоний - неизбежный и необходимый этап изучения фагов, независимо от того, играет этот признак какую-либо роль в определении «видовой» принадлежности фага или нет. Необходимо оценить характер взаимоотношения данной расы фага с индикаторной культурой (вирулентный или умеренный), получить его «чистые линии», пассируя из отдельной, изолированной колонии. (2) Изучить диапазон действия фага в пределах гомологичного вида бактерий и литическую активность в отношении гетерологичных видов, в т.ч. близкородственных. (3) Серологические свойства фагов позволяют оценивать степень сходства с другими фагами, лизирующими бактерии данного вида. Другие свойства играют вспомогательный характер, отражая особенности штаммов фага.

Знание биологических особенностей фагов особо опасных инфекций имеет не только теоретическое, но и важное практическое значение. Оно помогает созданию диагностических, лечебных и профилактических препаратов, изучению вопросов генетики возбудителей особо опасных инфекций и самих фагов, решению вопросов типизации фагов. Использование охарактеризованных бактериофагов позволяет осуществить типирование возбудителей инфекционных болезней. А фаготипирование бактерий, в свою очередь, применяют в эпидемиологии для выяснения источника и пути передачи инфекции.

2.2. Бактериофаги, лизирующие бактерии возбудителя чумы и их диагностическое значение

По имеющимся данным [Д'Эрель Ф., 1935], Хавкин, во время работы с возбудителем чумы в Индии, неоднократно отмечал, что бульонные культуры «кончали самоубийством», а именно, рост бактерий «исчезал», а среда становилась прозрачной. Вероятно, это первое наблюдение проявления фаголизиса у возбудителя чумы. Первые 12 рас фагов чумного микроба были выделены Д'Эреллем в бытность его работы в Индокитае (Вьетнам). Из них 11 рас получены

из экскрементов крыс и одна – из испражнений выздоравливающего от чумы человека. Одна из рас известна в настоящее время как бактериофаг Д'Эрелля.

В Советском Союзе чумной бактериофаг был выделен впервые из трупа суслика, погибшего от чумы в период интенсивной эпизоотии на территории Северо-Западного Прикаспия [*Покровская М.П., 1929, 1932*]. В последующем чумные бактериофаги выделяли из испражнений и крови выздоравливающих от чумы больных людей [*Advier M., 1932; Couvy L., 1932*], из органов грызунов [*Girard G., 1934; Соколова Н.М., 1959; Ромашова Е.А., 1961*], из сточных вод [*Flu P., 1929*], от блох [*Girard G., 1934*], из культур чумного микроба [*Марьина Ю.Н., 1939*] и других объектов.

Начало исследований чумных бактериофагов в нашей стране пришлось на 1932-1948 гг. [*Покровская М.П., 1932, 1933; Марьина Ю.Н., 1939, 1941, 1946, 1948*]. Затем внимание к проблеме стало снижаться. После некоторого перерыва в 1960-х начале 1970-х годов исследователи вновь проявили интерес к чумным бактериофагам [*Волосивец А.И., 1964; Быкова З.И., 1964; Шашаев М.А., 1965, 1972; Арутюнов Ю.И., 1967; Новосельцев Н.Н., 1973*].

История выделения и изучения псевдотуберкулёзного бактериофага менее богата событиями. Впервые псевдотуберкулёзный бактериофаг был выделен Ф. Д'Эреллем из культуры чумного микроба (вероятнее, это был фаг чумного микроба, но в силу особенностей его свойств, лизировавший также бактерии псевдотуберкулёза). В СССР первые два псевдотуберкулёзных бактериофага выделены из гомологичных штаммов [*Климова Т.К.*]. Кроме того, фаги возбудителя псевдотуберкулёза были выделены из органов грызунов, воды и блох [*Сомова Н.М. и др., 1955, 1959, 1960*]. Высокоактивный бактериофаг, помимо культуры возбудителя псевдотуберкулёза грызунов [*Р.И.Котлярова, 1956*], был сначала выделен из кишечной палочки [*Шашаев М.А., Осадчая Л.М., 1963*], а затем из вирулентного и авирулентного штаммов бактерий чумы [*Шашаев М.А., 1963а*]. Изучению биологических свойств псевдотуберкулёзных бактериофагов уделялось мало внимания. Как правило, интерес исследователей ограничивался специфичностью и диапазоном литической активности фагов. Более широко псевдотуберкулёзные фаги изучены лишь отдельными исследователями [*Шашаев*

М.А., 1963а; 1965; 1972; Арутюнов Ю.И. 1967, 1967а, 1969, 1970, 1970а]. В аспекте диагностики возбудителя чумы псевдотуберкулёзные фаги могут быть упомянуты как гетерологичные, но активные по отношению к *Y. pestis*.

У чумного микроба на сегодняшний день описаны четыре серотипа бактериофагов.

Первый серотип чумных фагов изучен и чаще выделяется из различных объектов. Начиная с первых работ [Д'Эрель Ф., 1935; Покровская М.П., 1932, 1933] все исследователи отмечают образование крупных негативных колоний фагами этого типа на газоне индикаторного штамма *Y. pestis* (d=2-12 мм) с прозрачным центром и тонкой периферической зоной неполного лизиса. Морфологически вирионы имеют гексагональную головку 48,5-52,4 мкм и небольшой отросток длиной 11,7-24,6 мкм. Все изученные бактериофаги первого серологического типа перекрёстно нейтрализуются в высоком проценте (91-99%) в течение 10 мин антифаговыми кроличьими сыворотками, разведенными в 100-500 раз. Изучение специфичности и диапазона действия чумных фагов имеет значение в плане использования их для диагностики возбудителя чумы. Наряду с широким диапазоном действия в пределах вида *Y. pestis*, исследователи указывают на неспецифическую активность в отношении других микробных видов: *Y. pseudotuberculosis* [Покровская М.П., 1932, 1933, 1935; Волосивец А.И., 1963, 1964; Gunisson J., Lazarus A., 1948; Smith D., Burrows T, 1962; Арутюнов Ю.И., 1968 и др.], брюшнотифозной палочки [Адаева Н.Ф., 1951; Дружинина Н.П., с соавт., 1960 и др.], возбудителя дизентерии [Дружинина Н.П. с соавт. 1960; Арутюнов Ю.И., 1967], кишечной палочки [Fiu P., 1929; Hertman J., 1964], *Micrococcus coronatus* [Гурлева Г.Г., 1959].

В основе механизма неспецифического действия фагов лежит общность некоторых антигенов у гетерологичных видов бактерий, на которых происходит адсорбция фага возбудителя чумы. Одновременно отмечен широкий спектр действия чумных бактериофагов в пределах гомологичного вида, независимо от того, находятся штаммы *Y. pestis* в R- или S-форме [Covvy L., 1932; Коробкова Е.И., 1937].

Изучение характера взаимодействия чумных фагов I серотипа с гомологичной культурой обнаружило близость параметров величины адсорбции и показателей внутриклеточного развития различных рас фагов. А именно, адсорбция 56,8-85,3% фаговых корпускул происходит в течение 5 мин. Продолжительность латентного периода внутриклеточного развития фага составляет 17-26 мин. Конец размножения приходится на 40-50 мин., период увеличения числа фаговых корпускул – 8-23 мин, а средний урожай на 1 м.к. – 24-117 вирионов [Волосивец А.И., 1964; Шашаев М.А., 1965; Быкова З.И., 1964; Арутюнов Ю.И., 1967]. Вместе с тем установлено, что помимо расовых различий эти характеристики зависят от штамма-хозяина, состава и качества используемых питательных сред и показатели могут значительно варьировать [Арутюнов Ю.И., 1967].

Исследования причин неспецифического действия чумных фагов I серотипа в отношении возбудителя псевдотуберкулёза показало, что в основе его лежит механизм модификации фага. Так, число негативных колоний фага Д'Эрелля, при посеве на бактерии вакцинных штаммов *Y. pestis* EV76 (линия НИИЭГ) и 17/1093, было на 3-4 порядка больше, чем при посеве на газон культуры *Y. pseudotuberculosis*. Возбудитель псевдотуберкулёза ограничивал развитие чумного фага. Фаг, выделенный из изолированной негативной колонии на газоне *Y. pseudotuberculosis*, в одинаковой мере хорошо лизировал бактерии и чумного, и псевдотуберкулёзного микробов. Следовательно, бактерии возбудителя псевдотуберкулёза оказывают модифицирующее, или селективное, воздействие на чумной вирулентный фаг I серотипа, которое приводит к появлению производных фага с повышенной активностью по отношению к этому возбудителю [Арутюнов Ю.И., Новосельцев Н.Н., 1971].

При сравнении эффективности идентификации вида *Y. pestis* с помощью разных фагов лучшую диагностическую активность проявлял фаг Покровской (I серотипа) и Лариной (Л-413С) (см. ниже). Родственный чумному фагу Покровской энтеробактериальный фаг T7, вёл себя по-разному на различных штаммах. При секвенировании полного генома бактериофага Покровской было установлено, что высокая диагностическая ценность определяется тем, что в ДНК фага Покровской, в отличие от фага T7, имеется мутация, связанная с отсутствием рамки считывания

ORF03. Эта мутация локализована в гене, гомологичном тому, который защищает ДНК фага *T7* от ограничения эндонуклеазой *I*. Данная эндонуклеаза есть только у возбудителя псевдотуберкулёза, но её нет у *Y. pestis*. В силу этого фаг лизирует штаммы, обладающие соответствующим рецептором для фагов, но не продуцирующие активных эндонуклеаз, чувствительность к которым определяется наличием соответствующего *att*-сайта. Фаг Покровской является примером модулирующей эволюции фагов группы *T7* с незначительным снижением размера его генома [*Rakin A. et al., 2007*]. Мутационная вариабельность структуры рецепторных компонентов, локализованных на поверхности бактерий, и *att* сайтов для эндонуклеаз во многом определяют специфичность фагов и их диагностическую ценность.

Тонкие механизмы взаимодействия бактерий и фаговых вирионов изучены для ряда фагов довольно подробно и описаны в соответствующих обзорах, монографиях и книгах. Этого нельзя сказать о фагах, которых относят к диагностическим при чуме.

Чтобы выяснить инициацию механизма взаимодействия фаг-бактерии, проанализировали транскриптомы полного геномного ответа *Y. pestis* на инфекцию фагов Покровской, *L-413C* и *T7*. Обнаружена интенсивная индукция или ингибция множества бактериальных генов. Инсерционные последовательности, транспорт мальтозы и гены метаболизма проявляли сверхактивность после воздействия на бактерии указанных фагов, тогда как экспрессия механизмов, обеспечивающих белковую трансляцию/транскрипцию, была супрессирована. Такому разнонаправленному воздействию были подвержены очень многие гены с неизвестной функцией и вовлечённые в экспрессию патогенности [*Rakin A. et al., 2007*].

Таким образом, фаги могут служить тонким инструментом для изучения организации поверхностных структур, участвующих в реализации бактериальной вирулентности, координировать генную регуляцию в ответ на внешний стресс в результате фаговой атаки и определять гены, способствующие выживанию фагоустойчивых культур. Более того, с помощью чумного диагностического фага Покровской можно выявить различные типы эндонуклеазной системы *I*.

Чумные фаги II серологического типа впервые были выделены из органов морской свинки, погибшей от экспериментальной чумы [Новосельцев Н.Н., 1967]. Параллельно, аналогичные фаги были получены из пересеваемой культуры штамма *Y. pestis* [Ларина В.С. 1969; Лешкович Н.Л., Ермилова В.П., 1974]. Фаги этого серовара на газоне культуры чумного штамма образовывали мутные негативные колонии, что позволяло предполагать их умеренность. С частотой 1-14% в популяциях этих фагов отщеплялись вирулентные мутанты, формирующие прозрачные колонии. Селектированный по прозрачности колоний вариант бактериофага Лариной Л-413 С был рекомендован как дополнительный диагностический фаг для идентификации чумного микроба. Его особенностью была высокая литическая активность по отношению к бактериям чумы, находящимся в типичной R-форме. Диссоциирующие в направлении S-форм бактерии чумы фагом Л-413 С не лизировались. Умеренные варианты этих фагов лизогенизировали штаммы чумного микроба, обладали широким диапазоном действия в пределах гомологичного вида, а также лизировали 15,1% испытанных штаммов возбудителя дизентерии и 3,7% - кишечной палочки. Однако, штаммы псевдотуберкулёзного микроба были не чувствительны ни к умеренным вариантам фагов, ни к их вирулентным мутантам. Полученные лизогенные варианты бактерий чумы были устойчивы к суперинфицированию тем же фагом, но вирулентные мутанты преодолевали этот иммунитет. Все фаги этой группы были серологически идентичными и не нейтрализовались антифаговыми сыворотками к фагам I серотипа. Морфологически фаги II серотипа отличались от фагов предыдущего серотипа. Они имели головку гексагональной формы (56,8-60,8 мкм) и отросток (128,2-138,5 мкм), состоящий из наружного чехла и внутреннего стержня. У интактных вирионов чехол покрывал почти весь стержень, кроме участка, расположенного у самой головки. Чехол фагов обладает сократительной способностью. Дистальный конец отростка заканчивался базальной пластинкой, от которой отходит несколько нитей [Новосельцев Н.Н., Арутюнов Ю.И., 1969; Ларина В.С., 1969; Новосельцев Н.Н. и др., 1971; Новосельцев Н.Н., Арутюнов Ю.И., 1971а; Новосельцев Н.Н. и др., 1973; Лешкович Н.Л. и др., 1975]. Согласно принятой

классификации [Тихоненко А.С. 1968], подобные фаги отнесены к V морфологическому типу [Новосельцев Н.Н. и др., 1973].

Проведенный анализ последовательности генома и структуры чумного диагностического фага *L-413C* показал, что фаг *L-413C* в значительной степени подобен кишечному бактериофагу *P2*, хотя были найдены и существенные отличия. С учётом способности этого фага дифференцировать *Y. pestis* от *Y. pseudotuberculosis*, особый интерес представил мозаичный характер белка *H* в концевых нитях хвоста *L-413C*, участвующих в адсорбции фага на поверхности бактерий. В то время как 207 *N*-концевых и 137 *C*-концевых аминокислот *L-413C* проявляли существенную гомологию с *H* белком фага *P2*, большая средняя часть его (465 аминокислот) выглядела как полученная из *H* белка фага *T4*. Самая высокая степень подобия дистальной части фимбрий отростка была с фагами *T6* и *RB32* кишечной палочки. Принимая во внимание эти факты и результаты других экспериментов, предполагается, (1) что уникальный *H* белок *L-413C* может быть ответственным за специфичность этого фага для возбудителя чумы и лизис некоторых штаммов *E. coli*, и (2) что рецепторы у *Y. pestis*, которые опознаются и связываются с *L-413C*, либо не существуют у *Y. pseudotuberculosis*, либо имеют другую структуру [Garsia E. et al, 2008].

Фаги II серотипа *H*-группы на бактериальных культурах штаммов *Y. pestis* *EV76* (линия НИИЭГ) и *E. coli* *C-87* имели идентичную или близкую эффективность посева. Лишь у вирулентных мутантов *H-2* и *H-3* она была несколько ниже. Наименьшая эффективность посева наблюдалась у фагов *H*-группы на культуре дизентерийной палочки (табл. 2.1). Константы скорости адсорбции *H*-фагов на кишечной палочке и на бактериях возбудителя дизентерии были выше, чем на бактериях использованного штамма чумного микроба. Начало размножения умеренного *H*-фага на чумном микробе отмечено на 136 минуте. Заканчивалось размножение фага через 157 мин. Период увеличения числа фаговых корпускул составлял 21 мин. Средняя урожайность фага - 3 корпускулы на 1 м.к. В тестах со штаммом возбудителя дизентерии этот же фаг имел показатели, соответственно: 86–136–49 мин и 34 вириона на 1 м.к., а на кишечной палочке – 86–132–46 мин при среднем урожае 35 вирионов на 1 м.к. [Новосельцев Н.Н., Арутюнов Ю.И., 1974].

Эффективность посева фага Н и его вирулентных мутантов на культурах бактерий разных видов

Вид бактерий	Титр различных фагов на газонах различных бактерий				
	Н	Н-1	Н-2	Н-3	Н-4
<i>Y. pestis</i> EV76 (линия НИИЭГ)	$1,4 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^3$	$2,1 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^6$
<i>Sh. dysenteriae</i> Sonne 1423	$6,3 \cdot 10^3$	$3,4 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^3$	$8,4 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^5$
<i>E. coli</i> C-87	$1,8 \cdot 10^4$	$8,2 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^3$	$2,1 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^6$

В 1990 г. появилось сообщение, что из штамма *Y. pestis* 2247, выделенного от блох в Приаральских Кара-Кумах, получен умеренный фаг «П»(III серотипа), который лизировал штаммы чумного микроба [Новосельцев Н.Н., Марченков В.И., 1990]. Фаг на газоне *Y. pestis* EV76 образовывал мутные с неровным нечётким краем негативные колонии, не превышающие 0,5 мм. В популяции фага с частотой 10^{-5} - 10^{-6} отщеплялись мутанты, дающие начало колониям с диаметром не более 1 мм с прозрачным центром и слабовыраженной полупрозрачной периферией. Серологически фаг «П» и его мутант были идентичны и отличались от фагов I и II серогрупп чумных фагов. Антифаговые сыворотки не давали перекрестной нейтрализации.

Латентный период умеренного фага «П» на штамме *Y. pestis* EV76 составлял 150 мин, период нарастания числа фаговых корпускул продолжался около 30 мин, а урожай на 1 м.к. был в пределах 9–74 вирионов.

Умеренный фаг лизогенизировал бактерии *Y. pestis*, которые становились устойчивыми к суперинфицированию гомологичным фагом, но сохраняли чувствительность к гетерологичному фагу Н, свидетельствуя, таким образом, о гетероиммунитете этих двух фагов. УФ-облучение и митомицин С индуцировали продукцию фага «П» из лизогенных бактерий *Y. pestis*, повышая титр фага по сравнению со спонтанным уровнем в 10-12 раз [Новосельцев Н.Н. и др., 1990а].

Изучение литической активности фага «П» на 760 штаммах *Y. pestis*, 262 – *Y. pseudotuberculosis*, 252 – *Y. enterocolitica* и 526 штаммах представителей других

видов и родов бактерий показало следующее. Фагом лизировалось 81,8% (622) штаммов чумного микроба. Следовательно, фаги имели широкий диапазон действия в пределах вида. Вместе с тем установлено, что устойчивые штаммы чумного микроба приурочены к определённым природным очагам чумы. Исследованные штаммы из Тувинского очага (4 штамма) и Ленинканского мезоочага (5 штаммов) были устойчивы к фагу «П», а из Гиссарского, Таласского и Зангезуро-Карабахского мезоочага (88 штаммов) доля резистентных штаммов находилась в пределах 91,1-94,7%. Среди 39 штаммов из Монголии и Горноалтайского очага 57,1 и 66,6% не лизировались этим фагом [Новосельцев Н.Н. и др., 1990 б].

В монгольских очагах циркулируют штаммы чумного микроба основного, алтайского и улэгейского подвидов. Причём, они обнаруживаются на одной территории. Установлено, что среди штаммов из Монголии резистентностью к фагу «П» обладали 9 из 10 штаммов улэгейского подвида (*ssp. ulegeica*) и лишь 1 из 9 – основного подвида (*ssp. pestis*), а также два штамма, не идентифицированных по подвидовой принадлежности. Данные об избирательной устойчивости к фагу «П» у штаммов с определённой географической приуроченностью позволяют предположить его практическую значимость в аспекте использования при внутривидовой дифференциации *Y. pestis*.

Умеренный фаг «П» и его вирулентный мутант лизировали по одному штамму возбудителя псевдотуберкулёза и кишечного иерсиниоза из числа исследованных. Представители других гетерологичных 19 видов были резистентны к нему. Различий в специфичности вариантов «П» фага не обнаружено. Однако сами по себе фаги нового серотипа оказались более специфичными, чем фаги II серотипа.

Сопоставление диапазона действия чумных фагов «П» (III серотипа) и М-1 (II серотипа) показало их различия в пределах вида *Y. pestis*. Фаг М-1 лизировал штаммы из Гиссарского очага и Зангезуро-Карабахского мезоочага в 94-96,2% случаев, тогда как фаг «П» - только в 7,3-8,9%. Штаммы из Горно-Алтайского очага – фагом М-1 лизировались в 98,2% случаев, тогда как «П» - в 23,4%. Такие различия, по мнению авторов работ, также могут использоваться с практической целью при дифференциации штаммов [Гольдфарб Л.М., 1985; Гольдфарб Л.М. и др., 1985; Новосельцев Н.Н. и др., 1990а].

Морфологическое изучение фага «П» показало, что он имеет многогранную головку размером 64,9-68,2X59,8-62,8 $\mu\text{мк}$ и отросток длиной 120,3-124,4 $\mu\text{мк}$. Таким образом, фаг III серотипа отнесен к V морфологической группе [Тихоненко А.С., 1968] и мало чем отличается по морфологии от фагов II серотипа [Новосельцев Н.Н. и др., 1982].

Бактериофаги IV серотипа были изолированы из бактерий чумы, выделенных от блох в Таласском очаге Киргизии. Представителями этой группы фагов были расы «Тал» и 513. Фаг «Тал» формировал мутные колонии величиной 0,5 мм. С частотой 10^{-4} - 10^{-5} они отщепляли мутанты, формирующие негативные колонии с прозрачным центром и периферической зоной неполного лизиса диаметром не более 1 мм.

По принятой у нас классификации [Тихоненко А.С., 1968] фаги IV серотипа так же, как фаги II и III серотипов, принадлежали к пятой морфологической группе, имели отросток, чехол которого способен к сокращению. Фаги «Тал» и 513 были серологически идентичны. Антифаговые сыворотки к ним не нейтрализовали фаги чумного микроба I, II и III серотипов. Литическая активность обоих фагов была идентичной. Они лизировали 96,4% штаммов чумного микроба, 1% - *Y. pseudotuberculosis* и 4,6% штаммов бактерий кишечной группы. При 20 мин экспозиции на бактериях *Y. pestis* EV76 адсорбировалось 42,1-48,1% фаговых корпускул. Латентный период составлял 140-155 мин. а средний урожай на 1 м.к. был в пределах 90-190 вирионов.

Бактерии *Y. pestis* лизогенизировались фагом «Тал» и приобретали устойчивость к суперинфицированию гомологичным фагом. Бактерии чумы, лизогенизированные фагом «П» (III серотипа), были чувствительны к фагам «Тал» и 513, что также подтверждает их гетерогенность. Однако, при лизогенизации фагом «Н» (II серотип), бактерии *Y. pestis* приобретали устойчивость к суперинфекции фагом «Тал» и 513, что свидетельствует о гомоиммунностью этих фагов [Новосельцев Н.Н. и др., 1994].

Ранее существовало мнение, что умеренные фаги у *Y. pestis* отсутствуют [Smith D. 1961]. Однако в 1960-70 гг. ряд экспериментаторов, работая с возбудителем чумы и заражёнными чумой животными, выделили фаги, отнесенные ко II серотипу чумных фагов. Все эти расы способны были лизогенизировать микроб чумы

[Новосельцев Н.Н., 1966; Ларина В.С., 1969; Лешкович Н.Л. и др., 1974; Сучков Ю.Г. и др., 1974].

Вызывало удивление редкость обнаружения лизогенных штаммов чумного микроба, составлявших менее 1%. Парадоксальным свойством фагов II серотипа является их способность лизогенизировать бактерии дизентерии и кишечную палочку [Новосельцев Н.Н., 1973]. Эффективность лизогенизации достигала 100%, тогда как у чумного микроба она была значительно ниже [Лешкович Н.Л., 1974a]. Цикл развития чумного умеренного фага в клетках возбудителя дизентерии и кишечной палочки был короче, а урожай корпускул выше, чем у чумного микроба [Новосельцев Н.Н., Арутюнов Ю.И., 1974].

Исследование испражнений здоровых и больных дизентерией людей в поисках новых бактериофагов позволило выделить 20 рас фагов, которые по своим серологическим свойствам, морфологии корпускул, специфичности и диапазону действия не отличались от фагов II серотипа. Это послужило основанием для пересмотра положения о строгой специфичности фагов и признания в качестве основного носителя фагов этого типа кишечную палочку. У чумного микроба вероятность «встречи» с кишечной палочкой носит эпизодический характер, отсюда редкость обнаружения лизогенных штаммов. Нельзя не упомянуть о фагах I серотипа, у которых до сих пор не обнаружены умеренные формы. В то же время вирулентные фаги этого типа достаточно часто выделяют при экспериментальных и производственных работах с чумным микробом в условиях, исключаящих экзогенное заражение [Новосельцев Н.Н. и др., 1977].

Касаясь видовой принадлежности чумных диагностических фагов различных серогрупп, следует напомнить, что первые расы чумного микроба, выделенные в 1920 г., были изолированы из испражнений выздоравливающего больного чумой и из экскрементов крыс [Д'Эрель Ф., 1926]. Однако, некоторые фаги, лизирующие микроб чумы, изолировали также из сточных вод в Голландии, т.е. на территории, где отсутствуют природные очаги чумы [Flu P., 1929]. Позже было установлено, что чумные фаги I серотипа и coli-фаги T3 и T7 серологически родственны и подобны [Hertman J., 1964].

В 1976 г. из сточных вод Ростова-на-Дону были выделены вирулентные фаги РД, РД-1, РД-2. Морфология негативных колоний на газоне культуры *Y. pestis* и фаговых корпускул были подобны чумному фагу Д'Эрелля. По скорости и степени нейтрализации чумными антифаговыми сыворотками фаги группы «РД» не отличались от чумных фагов I серотипа. Они лизировали, соответственно, 100%, 94,7% и 100% штаммов чумного микроба; 63%, 54% и 92% штаммов возбудителя псевдотуберкулёза; 47%, 63,8% и 62% штаммов кишечной палочки. Фаги «РД», в отличие от чумного диагностического фага, лизировали и атипичные штаммы чумного микроба ЖВР-19 и EV486. После многократных пассажей фага «РД» на бактериях штамма EV76 он продолжал лизировать 100% штаммов чумного микроба, но снизил свою активность по отношению к штаммам кишечной группы бактерий (11%) и штаммам возбудителя псевдотуберкулёза (10%). Перестали лизироваться и изменённые атипичные штаммы чумного микроба ЖВР-19 и EV486. Подобный спектр активности фага «РД» приблизил его к «традиционно чумным». Авторы предполагают, что изменение спектра литической активности фага «РД» в ходе многократных пассажей обусловлено ограничением его в штамме чумного микроба [Новосельцев Н.Н. и др., 1982; Новосельцев Н.Н., Курдеев В.К., 1987]. Однако не исключена селекция корпускул с изменёнными рецепторными белками, в большей степени специфичными для фаговых рецепторов бактерий чумы. С другой стороны, наличие определённых рестриктаз в «нечумных» и, особенно, псевдотуберкулёзных бактериях, может ограничивать развитие фага и, следовательно, чувствительность к нему. Это создаёт систему «бактериальные эндонуклеазы – фаговые специфические сайты для них». Отсутствие или наличие в геноме бактериофага сайтов для прикрепления конкретных эндонуклеаз определяет сохранность литической активности бактериофага. Появление в рестрикционных сайтах фага (конкретных для разных рестриктаз) различных мутаций будет обеспечивать резистентность фагов к эндонуклеазам бактерий и расширять спектр литической активности. Альтернативно, реверсия функциональной структуры соответствующего сайта в геноме фага приведёт к симуляции его моно- или олигогостальности для бактерий, не имеющих соответствующих эндонуклеаз. Генетические основы такой

изменчивости изучены на чумном диагностическом бактериофаге Покровской [Rakin A., 2007].

Выделенные расы бактериофагов, описанные выше, следовало бы отнести к чумным вирулентным фагам. Однако признать их чумную природу не представляется возможным из-за отсутствия эпизоотического и эпидемического обоснования, так же как этого нельзя сделать в отношении фага, выделенного в Голландии [Flu P., 1929]. Логичнее говорить о полигостальных фагах энтеробактерий.

В пользу «чумной» природы фагов I серотипа свидетельствует лишь два аргумента: (1) выделение из культур чумного микроба и (2) широкий диапазон литической активности в пределах вида *Y. pestis*. Контраргументов значительно больше: (1) выделение этих фагов из испражнений людей и грызунов, (2) выделение из сточных вод на благополучных по чуме территориях, (3) редкость и спорадичность обнаружения фагов в культурах чумного микроба, (4) полигостальность при исследовании литической активности к энтеробактериям, (5) серологическое и морфологическое сходство с колифагами T3 и T7, (6) отсутствие у *Y. pestis* умеренных форм, предшественников вирулентных фагов I серотипа, (7) чувствительность штаммов возбудителя чумы к некоторым кишечным фагам. Всё это свидетельствует в пользу кишечной природы «чумных» фагов I серотипа и ставит под сомнение факт существования истинно «чумных» фагов [Новосельцев Н.Н. и др., 1979; 1982].

Гетеродуплексный анализ ДНК фагов Д'Эрелля и «РД-1» установил 100% гомологию их геномов и 85% гомологию у фагов Д'Эрелля и «РД-2», что свидетельствует об их родстве [Кравцов А.Н. и др., 1984; Новосельцев Н.Н., Кирдеев В.К., 1987]. Более того, полная гомология свидетельствует в пользу идентичности фагов Д'Эрелля и «РД-1», а высокая, но не полная гомология фагов Д'Эрелля и «РД-2» указывает на наличие в ДНК бактериофагов «РД-1» и «РД-2» довольно протяжённых, отличающихся по составу нуклеиновых оснований фрагментов.

Из 100 проб сточных вод была выделена 51 раса различных фагов. У 48 - морфология вирионов была одинаковой и не отличалась от морфологии чумного фага II серотипа. По степени и скорости нейтрализации антифаговой сыворотки к

фагу Н (II серотип чумного фага) они практически не различались, что свидетельствует об их родстве [Новосельцев Н.Н., Курдеев В.К., 1987].

Таким образом, следует признать, что чумные фаги I и II серотипа являются полигостальными фагами кишечной палочки. Полученные данные свидетельствуют о том, что дифференциация бактериофагов и отнесение их к определённым бактериальным видам по их диапазону действия и литической активности недостаточно обоснована [Новосельцев Н.Н. и др., 1990]. Но в силу сложившейся традиции и, исходя из практической целесообразности, они продолжают именоваться «чумными».

. Ситуация, когда гетерологичные фаги оказываются литически высокоактивными, применительно к возбудителю чумы, не является чем-то исключительным. В принципе, чувствительность чумного микроба к полигостальным гетерологичным бактериофагам известна [Smith D.A., Burrows T.W., 1962; Мартиневский И.Л. и др., 1967; Амиров Э.Я., Домарадский И.В., 1981; Плотников О.П., 1982;]. Известно это пока о бактериофагах энтеробактерий. Доказана высокая, аналогичная описанной для *E. coli*, чувствительность возбудителя чумы к умеренному термочувствительному мутаторному коли-бактериофагу *Mu cts 61 (62)* [Ракин А.В. и др., 1985], который проявляет вирулентные свойства при повышенной температуре культивирования и широко используется в генетических исследованиях энтеробактерий. Высокая чувствительность чумного микроба к этому фагу, при резистентности бактерий *Y. pseudotuberculosis* позволила авторам рекомендовать его для целей дифференциальной диагностики двух видов иерсиний [Ракин А.В., 1984]. Более того, бактериофаг *Mu cts*, так же, как Л-413 «С», не лизирует штаммы чумного микроба, интенсивно диссоциирующие в направлении S-формы, которые, как правило, снижают свою патогенетическую активность и обладают резко ослабленной вирулентностью или вообще не вирулентны [Арсеньева Т.Е. и др., 2007].

Испытание чувствительности бактерий чумы к энтеро-бактериофагам *PI vir* (при 28°C) и *PI cml clr 100 ts* (при 37°C) показало, что оба фага в титре 10⁹-10⁷ БОЕ/мл при нанесении их капель на поверхность газона культуры *Y. pestis* на плотной питательной среде или в слое мягкого агара, проявляли литическую

активность: зарегистрирован сплошной лизис. Тогда как при меньших концентрациях фага прозрачность зоны лизиса была меньшей, при отсутствии негативных колоний. В результате титрования смывов из зон лизиса на индикаторном газоне *E. coli* при 37°C фаги выявляли в титре, не превышающем 10^2 - 10^3 БОЕ/мл, т.е. фактически размножения их не происходило, а имел место «лизис извне» [Стент Г., 1965], который сопровождался уменьшением исходного титра фага. После внесения фага в бульонную культуру чумного микроба, через час титр фага снижался на три порядка, а при электронной микроскопии на бактериях обнаруживали 3-10 адсорбированных фаговых частиц, но заметного лизиса не наблюдали [Гуревич Г.К. и др., 1983]. Бактериофаг *Mu cts 61(62)*, проявляющий при 37°C высокую литическую активность в отношении бактерий чумы, лизировал практически все исследованные типичные штаммы и размножался в них до титра 10^8 - 10^9 БОЕ/мл [Ракин А.В., 1984].

Подводя итоги этой главы, следует акцентировать внимание на следующем. Пробы на чувствительность к чумным диагностическим фагам Покровской и Д'Эрелля - тест широко и эффективно применяемый в практике. Он прост в исполнении и доступен в самых примитивных лабораторных условиях. Однако, для корректного ответа необходимы качественные препараты бактериофагов с достаточно высоким рабочим титром и точное выполнение инструкций по постановке проб. Позитивные результаты не всегда гарантируют точный ответ, поскольку известны случаи проявления литической активности чумных диагностических бактериофагов по отношению к бактериям других видов сем. *Enterobacteriaceae*. С другой стороны, известны механизмы (гл.5), которые иногда могут обуславливать формирование реверсильных или стойких популяций, обладающих нестабильностью фенотипа и фагоустойчивостью. Эти свойства существенно затрудняют выявление чумного микроба при обследовании природных очагов и требуют полного и более детального исследования материала с учётом всех имеющихся в практике тестов поиска и идентификации.

Диагностическую значимость при детекции возбудителя чумы могут иметь и бактериофаги, принадлежащие ко II серогруппе. Рекомендованный для этой цели бактериофаг *L413 «С»* широко известен специалистам. К сожалению, он также

имеет недостаток. И хотя в отличие от фага Покровской он обычно не лизирует бактерии псевдотуберкулёза, однако, некоторые штаммы *Y.pestis* с выраженной диссоциацией к нему тоже не чувствительны, но сохраняют лизабельность бактериофагом Покровской. Хотя, с другой точки зрения, это свойство может быть полезным. Штаммы чумного микроба, проявляющие склонность к $R \leftrightarrow S$ диссоциации, как правило, обладают пониженной вирулентностью, а иногда и вовсе авирулентны. Бактериофаг *L413 «С»* способствует их выявлению. Известно, что одним из признаков диссоциации бактерий является изменение формы колоний, отражающее степень изменения ЛПС. Крайняя степень такой диссоциации сопровождается появлением устойчивости к диагностическим фагам. Недавно были проведены исследования чувствительности к различным бактериофагам изогенных мутантов возбудителя чумы, выращенных при 25°C и отличающихся по структуре олигосахарида *cor*-ЛПС за счёт выраженной в различной степени его редукции (у чумного микроба ЛПС лишён полисахаридных боковых цепей). Лизирующая активность фагов Покровской, Лариной и *A1122* снижалась по мере укорочения олигосахарида, что проявлялось в повышении множественности инфекции, необходимой для тотального лизиса бактерий мутантов. Фаги *FP1* и *C21*, лизирующие бактерии сем. *Enterobacteriaceae*, находящиеся в *R*-форме, усиливали литическое воздействие на мутантные штаммы *Y.pestis* по мере укорочения олигосахарида [Шайхутдинова Р.З. и др., 2007]. В какой степени эти изменения связаны с вариациями в рецепции фагов, покажут будущие исследования.

Несмотря на определённый уровень специфичности описанных выше диагностических фагов в отношении возбудителя чумы, обнаружение их в природе, по-видимому, не является показателем сопутствующей циркуляции возбудителя. Причина этому, скорее всего, в том, что отдельные штаммы других видов сем. *Enterobacteriaceae*, распространённых повсеместно, всё-таки могут служить хозяевами этих фагов и обеспечивать их размножение и сохранение в биоценозе.

Изменения специфичности бактериофагов и появление клонов с более узким или более широким спектром действия в последующем адаптирующихся на новом хозяине, могут быть следствием обмена генетическим материалом с другими

фагами при смешанной инфекции одной бактерии или за счёт рекомбинации с ДНК профагов, встроенных в ДНК бактерии-хозяина.

Секвенс ДНК некоторых фагов выявил различную степень её гомологии у разных фагов, в том числе неидентичных серологически. Можно с уверенностью заключить, что данный метод очень перспективен для анализа фаговых геномов и поможет выяснить детали основных положений биологии фагов и их специфичности. Благодаря существованию нескольких серогрупп бактериофагов, отличающихся по литической активности в отношении штаммов чумного микроба из различных природных очагов и разных внутривидовых групп *Y. pestis*, возможно и является полезным развитие исследований по фаготипированию. Это направление может способствовать контролю над циркуляцией штаммов чумного микроба в природе и, соответственно, надзору за чумой. Кроме того, разная чувствительность к бактериофагам I-IV серогрупп у бактерий, принадлежащих к разным подвидам, позволит через выделение, идентификацию и молекулярно-биологический анализ фаговых рецепторов, а также выяснение механизмов резистентности к фагам, подойти к выявлению отличий их геномов и решению пока открытых таксономических вопросов.

Глава 3. Капсульный F1-антиген возбудителя чумы. Структура. Биологические свойства и практическое использование.

Лебедева С.А., Коссе Л.В.

3.1. Общая характеристика

Известно, что многие патогенные микроорганизмы образуют капсулу, которая необходима им для защиты от воздействия неблагоприятных факторов среды обитания и для патогенетического взаимодействия с чувствительным макроорганизмом.

Возбудитель чумы (*Yersinia pestis*) является капсулообразующим микроорганизмом. Впервые капсула у него была обнаружена при первоначальной идентификации бактерий, выделенных из органов умерших от чумы людей [Yersin A., 1894]. Позже она была описана как желатинообразное вещество [Rowland S., 1914; Schütze H., 1932, 1939] или как слизистое вещество, которое образует слой, иногда превышающий толщину клеточной стенки [Желтенков А.И., 1939]. Капсула плохо окрашивается анилиновыми красителями и синтезируется возбудителем *in vitro* при 37°C или в организме теплокровных. В некоторых случаях указанное слизистое вещество покрывает не только единичные бактерии, но и конгломераты бактерий, свидетельствуя об образовании капсулы из секретлируемого продукта.

В отношении структуры капсулы имеются различные мнения. Сканирующая электронная микроскопия [Chen T.H., Elberg S.S., 1977] показала, что капсула представлена грануляционным слоем, который постоянно диффундирует в среду обитания. В других экспериментах обнаружено, что она отделена от клеточной стенки пространством в 0,125 нм и имеет чёткие очертания. При интенсивном отмывании бактерий капсула истончается, и обнажаются участки клеточной стенки [Коннов Н.П., 1990; Кутырев В.В. и др., 2007]. В некоторых публикациях капсула описана, как аморфное вещество, и только при большом увеличении в ней просматриваются элементы ячеистой структуры и отдельные тяжи длиной 0,25-15 нм, расходящиеся в разные стороны от поверхности и напоминающие фимбрии [Сердобинцев Л.Н. и др., 1989; Кутырев В.В. и др., 2007]. С использованием иммуноферритинового метода и электронной микроскопии показано, что капсула представлена в виде обрывков фибриллярного материала с диаметром около 3 нм

[Кац Л.Н., 1966] или внеклеточного матрикса [Chen T.H. et al., 1975; Заренков М.И., 1984; Конов Н.П., 1990; Кутырев В.В. и др., 2007]. Кстати, в другой работе имеются данные, что гель капсулы является «обратимой неограниченно набухающей структурой с непрерывными фазами белка и растворителя, формирующей полупроницаемую мембрану» и может существовать в виде различных по форме образований. Некоторые патогенные штаммы кишечной палочки также образуют капсулу, упакованную в виде фибрилл [Сердобинцев Л.Н., 1984].

По мнению ряда исследователей, капсула *Y. pestis* в нативном состоянии представляет собой сложную надмолекулярную структуру, состоящую из целого ряда белков и ЛПС с молекулярной массой около 2 MD [Вейнблат В.И. и др., 1985; Сердобинцев Л.И., 1984; Vorontsov E.D. et al., 1990; Andrews G.P. et al., 1996]. Основным компонентом «классической» капсулы бактерий возбудителя чумы «дикого» типа, синтезируемой при 37°C и нейтральном значении pH, считают капсульный антиген [Baker E.E. et al., 1952; Bennet L.D., Tornabene T.G., 1974; Chen T.H. et al., 1975]. Впервые он был выделен в процессе осаждения отдельных фракций из экстракта дезинтегрированных бактерий чумы при насыщении различными концентрациями сульфата аммония [Baker E.E. et al., 1952]. Антиген был назван «фракция 1» (Бейкера) (в литературе: Ф1, Fra I, F1). Он индуцировал иммунитет к чуме и продукцию специфических антител. В последующем это позволило получить специфические серологические диагностикумы, совершенствовать иммунопрофилактику и интенсифицировать изучение не только капсульного антигена, но и самого возбудителя чумы.

Синтез антигена F1 так же, как и капсулы, оптимально индуцируется при повышении температуры среды обитания до 37°C. Но полагают, что он может обнаруживаться в небольшом количестве и в культурах *Y. pestis*, выращенных при 28°C. При повышении температуры культивирования его выход увеличивается почти в 1000 раз [Baker E.E. et al., 1952]. У эффективных штаммов-продуцентов выход F1-антигена может достигать 120 мкг на мг сухого веса бактериальной массы.

При 37°C, в зависимости от условий культивирования, за пределы клеточной стенки секретируется от 30 до 80% синтезированного F1-антигена. Остальная его часть и практически весь F1-антиген, синтезированный при 28°C, находятся в

связанном состоянии в виде комплекса с другими компонентами клетки и могут быть обнаружены и изолированы только после разрушения клеток. Выявление F1-антигена, связанного с клеточной стенкой бактерий, выращенных при 28°C, возможно только с помощью специальных методов. Несмотря на то, что при 37°C синтез антигена увеличивается, соотношение внутриклеточного и внеклеточного антигена остаётся таким же, как и при 28°C [Фёдорова В.А. и др., 1999].

В настоящее время F1-антиген признаётся видоспецифическим и широко используется в научных исследованиях и при конструировании диагностических и вакцинных препаратов. Его активное участие в создании иммунитета к чуме не вызывает сомнения и доказано на модели многих лабораторных животных, приматов и человека [Baker E.E. et al., 1952; Andrews G.P. et al., 1996; Филиппов А.Ф. и др., 1973; Дальвадянц С.М., 1991; Бывалов А.А. и др., 1984, 1997 и др.]. В связи с этим большое внимание уделяется генетическому детерминированию синтеза капсульной субстанции, селекции и генно-инженерному конструированию высокоэффективных штаммов-продуцентов, в том числе с гетерологичными геномами, а также оптимизации методов культивирования продуцентов, выделения F1-антигена и самой характеристике препаратов.

До последнего времени в большинстве случаев продуцентами F1 служили вакцинные штаммы, в частности штамм *Y. pestis* EV76 и его производные. Вирулентные штаммы использовали при сравнительном изучении особенностей антигена.

Диапазон pH, при котором происходит синтез F1-антигена, достаточно широкий. В зависимости от других условий культивирования указывается несколько отличающихся оптимальных величин: 6,3-7,3 [Pirt S.T. et al., 1961], 7,5 [Baker E.E. et al., 1952], 6,4-6,8 [Вейнблат В.И., Бахрах Е.Э., 1968]. Резко кислая среда неблагоприятно сказывается на синтезе F1-антигена. Согласно данным, полученным в последние годы, в условиях значительного закисления среды выращивания при 37°C *in vitro* вокруг бактерий образуется нетипичная капсулоподобная структура, состоящая из целого ряда не изученных пока белков, с доминированием не F1, а антигена, который некоторые исследователи связывают с вирулентностью чумного микроба. Это – адгезин «рН6» [Cherepanov P.A. et al., 1998], обладающий

антифагоцитарной активностью [Linder L.E., Tall B.D., 1993]. Полагают, что биофизические, серологические и протективные свойства таких изменённых капсул зависят от состава компонентов, а в отсутствие антигена F1, во многом определяются структурой ЛПС [Анисимов А.П., 1999].

Продукция F1, при переносе культуры-продуцента в условия 37°C и аэрации, начинается ещё до начала фазы интенсивного размножения бактерий чумы. Не всегда наблюдается корреляция между общим уровнем синтеза бактериального белка и накоплением F1 [Вейнблат В.И., Бахрах Е.Э., 1968]. Большое значение для уровня продукции F1 имеет состав и «питательность» среды культивирования бактерий-продуцентов. Высокая степень обогащения среды некоторыми аминокислотами, пуринами, витаминами, пептидами – необходимое условие для формирования полноценной капсулы у чумного микроба *in vitro*. Сообщается, что для высокого уровня выхода антигена F1 крайне необходимы аргинин, триптофан, α -аминомасляная кислота, тирозин, глицин, орнитин, гистидин, пантотенат кальция и витамин B₁. Отсутствие одного из них может резко снижать продукцию F1-антигена на 40-83% [Тюлембаев М.А. и др., 1984]. Сообщается также, что приемлемый уровень аминного азота для синтеза F1 находится в пределах 50-200 мг% [Вейнблат В.И., Бахрах Е.Э., 1968]. Однако имеются факторы ингибирующие этот синтез. Так, присутствие в среде культивирования 1% глюкозы, 0,4-0,8% гликокола, 0,6-1,5% фенилаланина, метионина, треонина, изолейцина, валина, лейцина, серина, т.е. фактически основных аминокислот, которые нужны большинству классических штаммов *Y. pestis* для роста при 37°C, тормозит синтез антигена F1. Одной из наиболее оптимальных для культивирования штаммов возбудителя чумы, продуцирующих F1-антиген, в ряду отечественных сред называют среду «ЛХАТ» [Пустовалов В.Л. и др., 1984a]. Среда приготовлена с использованием казеина, гидролизованного серной кислотой, которая обеспечивает необходимую глубину и полноту расщепления казеина на пептиды. Пептиды более необходимы возбудителю чумы, чем чистые аминокислоты, и в большей степени соответствуют факторам его питания и характеру метаболизма *in vivo* [Майский В.П., Куцемакина А.З., 1978].

Описанная зависимость уровня синтеза *F1* от степени питательности среды культивирования для чумного микроба не согласуется с данными исследований гетерологичных и гомологичных экспериментальных штаммов, которым с помощью методов генной инженерии были переданы детерминанты *F1*-антигена. В рекомбинантах-прототрофах на глюкозо-минеральной среде без аминокислот и витаминов уровень синтеза *F1* был иногда в несколько раз выше, чем у чумного микроба на полноценной питательной среде и не всегда был температурозависимым [Карлышев А.В. и др., 1989; Лебедева С.А. и др., 1991, 1992; Коссе Л.В. и др., 1993; Анисимов А.П., 1999]. Этот факт, а также ингибция синтеза антигена *F1* «ростовыми» для чумного микроба аминокислотами (см. выше), заслуживают особого внимания, поскольку являются отражением особенностей метаболизма и систем регуляции у *Y. pestis* в условиях повышенной температуры, приближённых к ситуации *in vivo*, а также отражают причастность к этому процессу генов, локализованных в хромосоме [Pierson V.L. et al., 1998].

Свойства препаратов *F1*-антигена в значительной степени зависят от модификаций исходного метода выделения.

На первых этапах поисков капсульного антигена, были осуществлены попытки выделить его при отмывании бактерий физраствором. Культуру прогревали 90 мин при 60°C и центрифугировали. Полученный препарат содержал капсульный антиген и некоторое количество соматического антигена [Schütze H., 1932, 1939]. Делались попытки получить капсульный антиген из бактерий, выращенных 36 час при 37°C на средах с *pH* 6,4-6,6, при смывании их капсул физраствором, содержащим *KOH* в процессе шутелирования [Жуков-Вережников Н.Н., Липатова Т.И., 1933]. Однако наиболее востребованным стал упомянутый выше метод Бейкера [Baker E.E. et al., 1947, 1952], который включает фракционирование при *pH* 7,5 и различных степенях насыщения сульфатом аммония солевого экстракта дважды высушенных ацетоном 37°-бактерий чумы. Препараты, преципитирующие при насыщении в пределах от 0,25 до 0,3%, в своё время были обозначены как *F1A*, а при насыщении от 0,3 до 0,33% - *F1B*. Указанные субстанции были серологически идентичны, но *F1A* помимо белка содержал доминирующий гликозилированный компонент, тогда как *F1B* был представлен преимущественно чистым белком [Baker E.E. et al., 1952;

Bennet L.D., Tornabene T.G., 1974]. Гликопротеиновый компонент *F1* из штамма *Y.pestis EV76* представляет собой, по некоторым данным, гликолипопротеиновый комплекс, содержащий галактозу и фукозу [*Vorontsov E.D. et al., 1990*]. Известно, что ковалентная связь с терминальной галактозой может контролироваться *Pho P*. Возможно, её активность или какой-либо другой из галактозилтрансфераз, обнаруженных при секвенировании генома *Y.pestis*, обеспечивает продукцию галактолипида, который может комплексоваться с *F1* [*Hitchen P.G. et al., 2002*]. В дальнейшем все эти компоненты были выявлены и другими исследователями [*Губарев Е.М. и др., 1963; Glosnicka R., Gruszkewicz E., 1980 Пустовалов В.Л., 1984; Титенко М.М. и др., 1989;*]. Установлено, что компонент *F1A* доминировал у вакцинных штаммов, а *F1B* – у вирулентных [*Губарев Е.М. и др., 1963*]. Но когда *F1*-выделяли из рекомбинантного штамма кишечной палочки, содержащей соответствующие гены чумного микроба [*Andrews G.P. et al., 1996*], то по данным масс-спектрометрии выделяли только мономер белка, не имеющего ковалентной связи с углеводами [*Tito M.A. et al., 2001*]. Мономер и полимер, не соединённые с гликолипопротеином удалось выделить в подобных опытах при изоэлектрическом фокусировании в точке 4,4-4,5 [*Zavialov A.V. et al., 2002*].

Помимо метода Бейкера [*Baker E.E. et al., 1952*], для выделения капсульного антигена разрабатывались и другие методы. Так, в качестве исходного материала использовали панкреатический перевар оболочек высушенных ацетоном клеток штамма *Y. pestis EV76*, выращенных 48 ч при 37°C [*Glosnicka R., Gruszkewicz E., 1980*]. Антигены экстрагировали 0,9% раствором хлористого натрия. В экспериментах использовали надосадочную жидкость. Неочищенный «экстракт капсульной оболочки» содержал 32% белка, 2% углеводов и значительное количество нуклеиновых кислот. После первичной хроматографии на колонках со смесью мембран эритроцитов человека с целлитом и вторичной хроматографии на сефадексе *G-200*, из первичного препарата капсульного антигена был выделен однородный препарат гликолипида: «АППО». Он был высоко специфичным в серологических реакциях с антителами к капсульному антигену и оказался способным адсорбировать чумной диагностический фаг. По химическим и физическим свойствам этот компонент капсульного антигена был идентифицирован

как ЛПС, который содержит галактозу и фукозу. Получены данные, что ЛПС-АППО отличался от классического ЛПС (эндотоксина) клеточной оболочки *Y. pestis*, так как не содержал глюкозы, гексозаминов, хотя в нём присутствовал этаноламин. В отличие от эндотоксина он был назван «галактолипидом». Предположили, что за высокую антигенную активность отвечает его полисахаридная часть [Glosnicka R., Gruszkewicz E., 1980]. Вполне вероятно, что галактолипид может действовать как гаптен и обладать адьювантными свойствами, способствуя синтезу антител к малоактивным белкам, с которыми он связан в бактериальной клетке, в том числе и к антигену F1. В пользу этого свидетельствует источник выделения галактолипида. О полисахаридно-липидном комплексе, который содержался в вводно-солевом экстракте бактерий чумы, выращенных при 37°C, в дополнение к F1-антигену и «мышинному» токсину сообщалось также и в другой работе [Домарадский И.В., 1998]. При этом сведения о химическом составе его были сходны с предыдущими данными. Указывалось, что полисахаридная часть этого компонента состояла из галактозы и фукозы, а в липидной - были обнаружены фосфатидилэтанолламин и фосфатидилсерин.

Исследования показали, что при многократном осаждении сульфатом аммония антигена F1 из бесклеточного экстракта происходит повышение однородности состава препаратов, однако нарастают потери F1-антигена [Леви М.И., Момот А.Г., 1961]. Поэтому позже для повышения выхода F1 в дополнение к методике Бейкера была предложена экстракция из диализатов и водно-солевого раствора с помощью ТХУ [Леви М.И., 1963; Вейнблат В.И., 1974]. Благодаря этому были получены дополнительные фракции F1C и F1D, которые, судя по результатам РНАт и РДИД, серологически идентичны F1А и F1В. Однако фракция F1D не выявлялась в РНГА, возможно, в связи с большей гаптенизацией препарата. По своей природе F1C и F1D - белково-нуклео-полисахаридные комплексы. В своём составе они содержат 60-69% белка, 28-31% полисахарида, 1-2% нуклеиновых кислот.

Причиной появляющихся несоответствий результатов исследований у различных экспериментаторов была неравнозначность препаратов F1 по составу и, зачастую, использование в качестве исходного материала не «чистой» капсулы, а смеси её с отдельными компонентами разрушенной ацетоном клеточной стенки,

которые *in vivo* составляют физиологически активный комплекс с F1-антигеном. Это послужило стимулом для поисков более эффективных методов получения и очистки препаратов капсульного антигена.

С учётом высокой секретирруемости F1-антигена его стали выделять также из среды культивирования [Andrews G.P. et al., 1996; Englesberg E., Levy J.B., 1954]. Этот препарат после фракционирования сульфатом аммония был выше по иммунохимической активности, чем F1-антиген, выделенный по Бейкеру (Baker) [Вейнблат В.И. и др., 1968; 1980; Reddin K.M. et al., 1995]. Был также предложен метод выделения F1-антигена из культуральной жидкости осаждением в изоэлектрической точке. Это сократило сроки и увеличило конечный выход продукта [Титенко М.М. и др., 1983]. Разработан метод выделения F1 из культуральной жидкости с использованием колоночной хроматографии на молекулярных ситах [Сердобинцев Л.Н., 1984]. Авторы, предложившие эти методы, считают, что F1 антиген из жидкой культуральной среды обладает более высокой иммунохимической активностью, не содержит полисахаридных компонентов и представляет белок [Вейнблат В.И. и др., 1980; Титенко М.М. и др., 1983; Сердобинцев Л.Н., 1984]. Это противоречит более ранним сведениям о преобладании иммунохимической активности у гликозилированного компонента F1A над белковым F1B [Baker E.E. et al., 1952]. Однако противоречие может быть устранено благодаря сведениям о том, что F1 даже из культуральной среды содержит липополисахаридный компонент [Степанишина В.Н., 1995; Andrews G.P. et al., 1996]. Наличие в F1-антигене гликолипидного компонента подтверждают и другие исследователи. Сообщается, в частности, что из препарата капсульного антигена, полученного осаждением сульфатом аммония [Baker E.E. et al., 1952] методом Вестфал-Людерица выделен ЛПС, обладающий значительной вязкостью и не способный вызывать летальный шок у мышей при внутрибрюшинном введении в дозах 1-2 мг, как это характерно для эндотоксина *Y. pestis* [Исин Ж.М., Тугамбаев Т.И., 1987].

В одном из исследований проводили сравнение F1, выделенной из агаровой и бульонной культуры. Ведущими этапами были гель-хроматография, фракционирование сульфатом аммония, преципитация в изоэлектрической точке. В

обоих случаях из высокоочищенной F1 смесью хлороформа и метанола были выделены липиды. Количество их определяли гравиметрически или титрометрически. Препараты липида анализировали тонкослойной хроматографией. F1 из жидкой содержала 97% белка, менее 0,1% полисахаридов и – около 2% липидов. С агаровой среды качественно состав был тот же, но полисахарида было 4%, а липидов – 3%. Состав липидов охарактеризован. [Вейнблат В.И. и др., 1989]. Результаты этих работ предполагают белково-липополисахаридную организацию фракции 1 чумного микроба. Однако в другой работе сообщается о доминировании серологической активности белкового компонента [Гремякова Т.А., Анисимов А.П., 1996]. Подобные расхождения, по всей вероятности, могут зависеть от ряда причин. Прежде всего, как уже было показано выше, состав препарата в значительной степени зависит от метода его выделения, а также от использования и степени его последующей «доочистки». Более того, из работ не всегда ясно, о каких гликолипидных компонентах идёт речь: имеется ли ввиду классический ЛПС, как примесь, или же это другой компонент подобного состава из комплекса с мажорным белком F1-антигена. Выше уже упоминался галактолипид (АППО), высокореактивный в специфических на чумной микроб серологических тестах, но отличающийся от классического ЛПС [Glosnicka R., Gruszkewicz E., 1980]. Видимо, этим можно объяснить отсутствие реакции ЛПС-специфических МКА с препаратами ЛПС, которые были выделены из антигена F1 (Baker) после экстракции горячим фенолом и осаждения 70% этанолом.

В последние годы была показана поликомпонентность препарата F1A, выделенного из бактерий вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 по Baker при насыщении сульфатом аммония до 0,25–0,3%. Ранее он описывался как препарат, содержащий в основном гликозилированную форму F1-антигена [Baker E.E. et al., 1947, 1952]. Однако в опытах иммунофореза с применением специфических анти-F1-моно- и поликлональных антител в условиях, способствующих SDS-диссоциации, в составе F1A были выявлены иммунологически активные F1-специфические компоненты с М.м. 43 кД, 32 кД, 18 кД, и около 10 кД [Коссе Л.В., 2006]. Позже они были изучены более детально. В результате с помощью гельэлектрофоретического метода в присутствии дезагреганта SDS компонент 18 кД

был разделён на 2 составляющие – 17 и 18 кД. Компоненты 17, 32, 43 кД представляли собой гидрофильные гликопротеины, не способные к дальнейшей диссоциации. Синтез их был конститутивным, не зависел от температуры и детерминировался хромосомой. При использовании метода Бейкера компонент 17 кД можно было выделить также из разрушенных бактерий не только бескапсульных вариантов чумного микроба, но и представителей некоторых других видов сем. *Enterobacteriaceae*, в том числе иерсиний, клебсиелл, цитробактеров, кишечной палочки, протей, у которых *a priori* в неповреждённом виде F1 не обнаруживали. Все эти неспецифические для вида *Y. pestis* антигенные компоненты, имеющие М.м. 17 кД, реагировали со специфическим на F1-антиген иммуно-диагностикумами, включая моноклональные. Препараты после введения их подкожно способствовали выработке у животных антител к неконформационным эпитопам F1 и в определённой степени защищали от последующей чумной инфекции [Коссе Л.В., 1992; Коссе Л.В. и др., 1987, 1997]. Компонент 18 кД представлял собой специфичный для *Y. pestis* гидрофобный белок и соответствовал по свойствам (М.м., индуцибельность, зависимость синтеза от температуры и плазмидных генов, серологическая идентичность) субъединице Caf1 капсульного белка. Компонент с М.м. около 10 кД проявлялся как при окраске на белки, так и на липиды и проявлял выраженную склонность связываться с другими компонентами [Коссе Л.В., 1998]. Впоследствии были опубликованы аналогичные данные о выделении из тотальных препаратов F1-антигена дополнительных компонентов: гликолипида и, по крайней мере, двух неспецифических детерминируемых хромосомой протеинов с М.м. около 30 и 43 кД. Однако галактолипид в отличие от выше описанных экспериментов был обнаружен и в штаммах *Y. pestis*, лишённых pFra плазмиды [Feodorova V.A., Devdariani Z.L., 2001].

При анализе литературы установлено, что полученные с помощью разных методов варианты капсульного антигена зачастую отличаются по химическому составу. Однако основу каждого из препаратов составляет специфичный белок, доминирующий в оригинальном антигене, выделенном по Бейкеру и названном «F1 (Baker)». Судя по результатам исследований, иммунологическая активность в значительной степени зависит от конформации этого белка. В классической

первичной работе по определению и характеристике F1-антигена [Baker E.E. et al., 1947] F1A и F1B компоненты, о которых упоминалось выше, теряли свою иммунохимическую активность после обработки трипсином. Позже было установлено [Baker E.E. et al., 1952], что обработка F1-антигена только протеиназой К приводила к снижению титров РНГА с 1:64000 до 1:128. Липаза, ДНК-аза и РНК-аза не влияли на уровень реакции. Чувствительность к «белковым» ферментам не всегда проявлялась на высоком уровне. Есть данные о выраженной устойчивости препарата F1A к специфическому действию трипсина, химотрипсина, протеазы V8, протеиназы К. Чувствительность к их действию обнаруживалась лишь после прогревания F1A в растворе при 95°C в течение 5 мин. В результате снижалась иммунохимическая активность антигена [Титенко М.М. и др., 1989].

При исследовании антигена F1 внимание специалистов было приковано именно к его доминантному белку. Со временем было установлено, что наличие этого белка, представленного на поверхности капсулы и секретируемого в среду обитания, коррелирует с самой крупной специфической для *Y.pestis* плазмидой (pFra, pYT, pMT, М.м. 60-120Мд) [Проценко О.А. и др., 1983 и др.].

Усилиями многих исследователей с помощью приёмов клонирования и секвенирования в составе этой плазмиды, помимо некоторых генов жизнеобеспечения и ответственных за продукцию «мышинного» токсина, был идентифицирован оперон, состоящий из структурного гена F1-специфического белка, названного Caf1, гена белка, регулирующего термозависимый синтез Caf1 и вспомогательных генов ашера и шаперона, обеспечивающих сборку субъединиц, продукцию их поверхность бактерии последующую агрегацию структурного белка (соответственно, *caf1*, *cafR*, *caf1A*, *caf1M*) [Черепанов П.А и др., 1990, 1990a; Galyov E.E. et al., 1990, 1991; Karlishev A.V. et al, 1992, 1992a, 1994; Hu P. et al., 1998; Chapman D.A.G., et al., 1999; MacIntyres S. et al., 2001]. Регуляторный ген имеет гомологию с регуляторами семейства AraC [Karlishev A.V. et al., 2002a]. А *caf1M* и *caf1A* имеют гомологию с локусом *papC* сборки Р-пилей уропатогенных *E.coli* [Thanassi D.G. et al., 1998a, 1998b]. Идентификация самого оперона и его генов в значительной степени продвинули наше понимание механизма капсулообразования. Однако исследования Fra⁻ мутантов чумного микроба, выделенных из организма

заражённых мышей, предварительно иммунизированных F1-антигеном, показало, что одного *caf*-оперона не достаточно. Имеется ряд других генов, которые специфически регулируют синтез F1 [*Pierson V.L. et al., 1998*]

По данным некоторых исследователей белок Caf1 состоит из большого количества субъединиц с М.м. 17,6 кД, которые включают 170 аминокислот. Зрелая субъединица белка образуется в результате удаления сигнального пептида из Caf1 [*Черепанов П.А. и др., 1991a; Galyov E.E. et al., 1990*]. При этом структура субъединиц у чумного микроба филогенетически близка структуре субъединиц капсульных фибрилл токсигенных штаммов кишечной палочки [*Bertin Y. et al., 1993*]. После выхода на поверхность бактерий происходит агрегация зрелых субъединиц F1-антигена путём предварительно образованных в периплазме ди- и тетрамеров. Диссоциация агрегированных субъединиц может происходить при нагревании образцов, содержащих 0,1% меркаптоэтанола и 0,25% SDS в течение 5 мин при 95°C [*Bennet L.D., Tornabe T.G., 1974*], или после воздействия мочевины. После элиминации факторов диссоциации имеет место поэтапная реассоциация в тетрамеры, а со временем, в более крупные олигомеры [*Сердобинцев Л.Н., 1984, Хлебцов Н.Г. и др., 1990*]. По результатам наблюдения тетрамеры являются оптимальными конформационными структурами, поскольку обеспечивают максимальный контакт комплементарных поверхностей субъединиц. Они формируются за счёт водородных связей между димерами, которые, как правило, образуются в результате гидрофобных взаимодействий [*Сердобинцев Л.Н., 1984*]. Судя по пространственному расположению субъединиц, Caf1-белок может быть отнесен к ассиметричным белкам с беспорядочно скрученными полипептидными цепями [*Вейнблат В.И. и др., 1985*]. Полагают, что конформационные изменения белка происходят без участия дисульфидных связей, так как в его составе не обнаружен цистеин и присутствие его не требуется при синтезе F1-антигена [*Вейнблат В.И., 1974; Тюлембаев М.А. и др., 1984; Черепанов П.А. и др. 1990a; Galyov E.E. et al., 1990*].

Ранее не было обнаружено различий в иммунохимической активности F1 между исходным агрегированным и диссоциированным препаратами. Позже, относительно детерминированности этой активности, появились противоречивые

сведения. Одни исследователи эту активность приписывают структурным субъединицам без участия конформационных эпитопов [Bennett L.G., Tornabene T.G., 1974]. Другие - на основании отсутствия выраженного влияния аминокрупп на иммунологическую активность, ведущую роль отводят конформационным эпитопам, которые формируются после полимеризации и структурирования антигена F1 [Титенко М.М. и др., 1989]. Именно поэтому, вероятно, в сыворотках имеются антитела как к диссоциированной, так и к агрегированной форме [Титенко М.М. и др., 1989a]. Доминантность конформационных эпитопов и слабая активность секвенционных показана при анализе гипериммунных сывороток к агрегированной и SDS-диссоциированной формам F1-антигена [Рудник М.П. и др., 1989]. Может быть, поэтому агрегированная форма F1-антигена оценивается как наиболее протективная [Пустовалов В.Л. и др., 1984; Титенко М.М. и др., 1989a; Ермакова Г.В. и др., 1990; Прокопьева Е.Д. и др., 1990]

По результатам компьютерного анализа аминокислотной структуры, субъединицы Caf1 состоят из двух β -структурных доменов, образующих незамкнутые β -бочонки, что препятствует сохранению субъединиц в диссоциированном состоянии [Kersley J.E. et al., 2002]. Домены соединены гидрофильной неструктурированной петлёй. На ней локализован основной эпитоп этого белка, который контактирует с В-лимфоцитами. На С-концевых последовательностях доменов обнаружены два Т-клеточных эпитопа [Galyov E.E. et al., 1990; Zav'yalov V.P. et al., 1995]. При анализе олигопептидов, составляющих Caf1 белок с помощью МКА, один из клонов IgG не реагировал ни с одним из олигопептидов, но вступал в реакцию с полной последовательностью, что говорит о наличии у F1-антигена ещё и конформационных эпитопов. Фрагменты С-концевых последовательностей субъединицы активируют IL10, в состоянии димера, но утрачивают это свойство при полимеризации Caf1. Объединение субъединиц в агрегированный антиген в основном определяется локализованными на поверхности комплементарными участками субъединиц, которые зависят от характера конформации белковой глобулы самой субъединицы.

Выяснение генетических основ продукции капсульного антигена и разработка методов обмена генетическим материалом обеспечили возможность

конструирования различных продуцентов как на основе гомологичного генома, так и гетерологичного. После передачи плазмиды, обеспечивающей продукцию капсульного антигена, получены продуценты на основе бактерий сальмонелл, клебсиеллы, цитробактер, возбудителя псевдотуберкулёза, кишечного иерсиниоза, кишечной палочки [Карлышев А.В. и др., 1989; Лебедева С.А. и др., 1991, 1992; Кузнецова Л.С. и др., 1992; Коссе Л.В. и др., 1993; Гремякова Т.А. и др., 1994; Анисимов А.П., 1999; Morton M. et al., 2004]. Большинство из этих продуцентов имеют преимущества перед возбудителем чумы. В силу прототрофности они не требуют специальных обогащённых питательных сред для выращивания при сродном, а иногда и более высоком уровне синтеза F1. Они продуцируют этот антиген уже при 28°C, а у некоторых из них F1 проявляет более высокую иммунохимическую и антигенную активность, что позволяет получать гипериммунные сыворотки.

Исследования «капсульного антигена» возбудителя чумы продолжают не только в аспекте его структуры, но, что более важно, и относительно его биологической роли при взаимодействии с чувствительным к чуме макроорганизмом, касательно патогенетической и иммуногенной активности микроба, диагностической ценности F1-антигена, а также его участия в регуляции эпизоотических процессов. Отправным моментом в этих исследованиях является сложившееся представление о капсульном антигене, как о высокоспецифичном для чумного микроба и о доминантном при индукции иммуногенеза.

3.2. Биологическая активность и механизм действия капсульного F1-антигена чумного микроба

Капсулы патогенных бактерий, в том числе капсула возбудителя чумы, обладают целым рядом свойств, обеспечивающих способность бактерий к персистенции в неблагоприятных условиях [Бухарин О.В., 1994; Finlay B.B., Falkow S., 1997]. Основу капсулы возбудителя чумы, как правило, составляет антиген F1, в котором, как упоминалось выше, доминирует протеин Caf1. Хотя в некоторых условиях обитания микроба, а также при дефекте соответствующих генов, в формировании капсулы может принимать участие другой антиген (pH6). Так, анализ первичной нуклеотидной последовательности *fra*-оперона показал, что существует

филогенетическое родство генов, определяющих пилевые и непилевые адгезины энтеробактерий и одновременное присутствие в бактериях чумы двух родственных кластеров, кодирующих антигены F1 и рН6 [Hultgren S.J., Jones C.H., 1995], которые в зависимости от условий внешней среды способны заменять друг друга в формировании капсулы. В этом аспекте интересна работа по изучению адгезивной активности антигена рН6 в связи с противоречивостью данных по этому вопросу [Linder L.E. et al, 1990; Huang X.-Z., Linder L.E., 2004; Liu F. et al., 2006]. Было показано на модели клеток человека (эндометрия *HeLa S3*, эпителия гортани *Hep2*), что в присутствии рН6 антигена (Psa+) адгезия была в 3-5 раз выше, чем у *psa*-мутанта. Тогда как адгезия к мышинным макрофагам *J774 A.1* была одинаковой у исходного штамма и мутанта, независимо от наличия рН6. Однако в отсутствие F1-антигена у *Fra*⁻, но Psa⁺ варианта адгезия к клеткам человека не происходила вообще [Бахтеева И.В. и др., 2007].

Антиген F1, влияющий на патогенез при чуме, до недавнего времени причисляли к важнейшим детерминантам вирулентности [Brubaker R.R., 1984]. Однако в последующем были выявлены природные штаммы чумного микроба, не продуцирующие антиген F1, но вирулентные. Они, и полученные в экспериментах мутанты по генам *fra*-оперона, неспособные к продукции Caf1-белка, но тоже вирулентные, вызвали сомнение в решающей значимости F1-антигена для вирулентности. Это переключило внимание исследователей в сторону иных активных детерминант, способных обеспечивать развитие инфекционного процесса при чуме и локализованных как на хромосоме, так и в других плазмидах.

При исследовании механизмов патогенеза нельзя сводить их к функциям какого-то одного фактора. Каждый антиген, взаимодействуя с другими аддитивно или конкурентно, определяет суммарный эффект [Петровская В.Г., 1967; Burrows T.W., 1963; Мишанькин Б.Н., 1987; Brubaker R.R., 1991 и др.]. Особенно если учесть, что на молекуле каждого антигена может быть локализованы несколько активностей, которые способны обеспечивать агрессию микроба и/или его защиту от различных неблагоприятных воздействий макроорганизма. Это позволяет более широкую адаптацию бактерий при экономном расходовании энергетических ресурсов и создаёт возможность для чумного микроба на различных этапах

распространения в природе преодолевать различные факторы иммунитета, персистировать в организме блох, в теплокровном организме и других нишах среды обитания.

Биологическую активность антигена F1 (мажорного компонента капсулы), анализировали многие специалисты. Исследовались препараты капсульного антигена, полученные различными методами, отличающиеся по степени очистки и составу компонентов в препаратах. Далеко не во всех исследованиях опытные препараты антигена были идентичны оригинальному антигену «фракция 1», выделенному впервые методом Бейкера [Baker E.E. et al., 1952]. Роль F1-антигена при взаимодействии микроба чумы с чувствительным макроорганизмом определяли в серологических тестах *in vitro*, при культивировании эукариотических клеток и непосредственно *in vivo* в организме носителей, отличающихся по чувствительности к инфекции. Наибольшее внимание привлекали вопросы значимости F1-антигена для приживляемости микроба, его инвазивности, цитотоксичности и летального эффекта, а также иммуногенности и алергизации организма носителя инфекции. В большей степени исследована и используется в практических целях антигенная и протективная активность капсульного антигена. В то же время сведения о роли его в патогенезе не однозначны [Burrows T.W., 1963; Brubaker R.R., 1972; Butler T., 1983; Анисимов А.П., 1993; Anisimov A.P., 1998].

В общей сложности характеристика биологической активности F1 антигена довольно разнопланова, а иногда и противоречива. Это, вероятно, определяется тем, что в экспериментах использовали препараты, выделенные разными методами и, в силу этого, имеющие различный компонентный состав. Сведения, полученные в ходе изучения капсульного антигена, свидетельствуют, что роль Caf1-белка в механизме патогенеза пока чётко не конкретизирована. Этому мешает не только недостаточная изученность проблемы, но и существующая путаница понятий. Капсульный антиген F1 по Бейкеру представляет собой фракцию бесклеточного экстракта, осаждённую при определённой степени насыщения раствора сульфатом аммония. Она содержит белковые, углеводные и липидные составляющие. Модификации метода выделения и дополнительные приёмы очистки не дают полной гарантии присутствия в чистом виде только мажорного Caf1 белка и

отсутствия других пептидов и мини-протеинов, функционально связывающихся с Caf1–белком при его синтезе, транспорте и формировании капсулы. Однако в научных публикациях, независимо от качества исследуемого препарата, используют как равнозначные обозначения препарата - F1, Caf1 или Ф1.

Капсула чумного микроба, основным компонентом которой в условиях макроорганизма, как правило, является F1-антиген при доминировании в нём белка Caf1, защищает бактерии чумы от вредных факторов, действующих при повышенной температуре, когда образование этой капсулы индуцируется. В частности, она может защищать от фагоцитоза за счёт снижения эффективности захвата бактерий или антифагоцитарной активности бактерий, которая позволяет им выжить и размножиться внутри макрофагов.

Повышение устойчивости к захвату макрофагами коррелирует с увеличением отрицательного заряда поверхности капсулы микробной клетки, способствующего электростатическому отталкиванию от одноименно заряженных фагоцитов и наоборот его снижение определяет их сближение [Van Oss C.J., 1978]. Однако эта способность не отражает степень вирулентности. Вирулентность коррелирует только со способностью выживать и размножаться в фагоцитарных клетках за счёт подавления антибактериальных функций фагоцитов [Коробков Г.Г., 1963; Куклева Л.М. и др., 1985; Куклева Л.М., Проценко О.А., 1985; Charnetzky W.T., Shuford W.W., 1985; Васильева Г.И. и др., 1987, 1987a].

Для повышения вирулентности и способности бактерий *Y. pestis* выживать в условиях макроорганизма в качестве необходимого этапа инфекции считают эффективную селективную модификацию и размножение внутри фагоцитирующих клеток, [Cavanaugh D.C., Randall R., 1959; Janssen W.A. et al., 1963]. Для этого необходим захват бактерий чумы макрофагами. К сожалению, данные об этом несколько противоречивы. Так, в одних работах сообщается о снижении у чумного микроба отрицательного заряда клеточной поверхности при синтезе капсулы, что способствует поглощению макрофагами [Самойлова Л.В. и др., 1974; Дятлов И.А., Кутырев В.В., 1992]. В другой - приводятся доказательства повышения абсолютных значений ξ -потенциала при образовании классической для чумного микроба капсулы у вирулентных штаммов *Y. pestis* и рекомбинантной *S. enteritidis* в отличие

от изогенных бескапсульных вариантов [Анисимов А.П., 1999]. Здесь же показано, что ξ -потенциал клеток *Y. pestis*, выращенных при 37°C, в наибольшей степени зависит от капсульного антигена F1. Образованная именно им типичная капсула чумного микроба способна экранировать заряды других поверхностных биомолекул и снижать ξ потенциал авирулентных штаммов энтеробактерий после получения фрагментов чумного микроба по сравнению с их бескапсульными вариантами. Хотя, возможно, при биологически целесообразной неоднородности популяций возбудителя уже на этом уровне идет селективная дифференциация бактериальных клеток на тех, которые не способны модифицироваться внутри фагоцитов и не захватываются ими, и тех, которые, попадая внутрь макрофагов, способны их погубить и повысить свою вирулентность. При этом каждая из ветвей выполняет свою особую роль в патогенезе, которую предстоит ещё детализировать.

Имеются данные о том, что капсула чумного микроба, в основном состоящая из F1 антигена, защищает клетки чумного микроба от захвата нейтральными интактными нейтрофилами [Cavanaugh D.C., Randall R., 1959; Burrows T.W., 1963; Janssen W.A. et al., 1963; Филимонова Ю.А., 1974;]. Она же препятствует инициации альтернативного пути активации комплемента [Müller-Eberhard H.J., 1975]. При первичном введении в очищенном виде F1 истощает систему комплемента за счёт избирательной активации C'2 и C'4 компонентов системы комплемента в сыворотке крови человека и, таким образом, препятствует комплемент-опосредованной опсонизации бактерий [Williams R.C. et al., 1972]. При наличии антител в высоких титрах секретируемый антиген F1 может адсорбировать на себе значительные количества иммуноглобулинов и также препятствовать опсонизации бактерий. В некоторых случаях возможно также и сливание фрагментов капсулы с уже прикрепившимися к ней антителами [Amies C.R., 1951].

Известно, что антиген F1, содержащийся в капсуле, препятствует завершению фагоцитоза бактерий чумы. Обладая свойством антигенности, F1 индуцирует образование не только полных, но и неполных специфических F1-антител, которые, сорбируясь на бактериях, могут затруднять доступ к ним макрофагов. С другой стороны, очищенные препараты F1 ингибируют завершение фагоцитоза чумных бактерий перитонеальными макрофагами [Пустовалов В.Л. и др., 1984; Куклева

Л.М., Проценко О.А., 1985; Титенко М.М. др., 1989]. Ингибирующая фагоцитоз активность F1-антигена подтверждена и при использовании рекомбинантных продуцентов. Причём уровень её был одинаковым у F1 из *Y. pestis* и из рекомбинантного штамма *E. coli* HB 101 (pFS2). Рекомбинантные *E. coli*, способные образовывать F1-содержащую капсулу, были устойчивы к фагоцитозу мышинными перитонеальными макрофагами [Анисимов А.П., 1999]. Клетки *S. typhimurium* SL3261, не способные выживать в организме животных, после приобретения рекомбинантной плазмиды с полным *fra*-опероном выделялись из селезёнки и печени в течение 7 сут, при этом только в виде клонов Fra+[Titball R.W. et al., 1997; Gremyakova T.A. et al., 1998;]. Воздействие F1-антигена на макрофаги более суток может вызывать цитопатический эффект [Степанишина В.Н. и др., 1991]. Изолированное выключение плазмидных *fra*-генов с помощью транспозонного мутагенеза и, как следствие, прекращение продукции F1 у некоторых штаммов *Y. pestis*, обуславливало снижение эффективности захвата бактерий макрофагами морских свинок, но не белых мышей [Гребцова Н.Н. и др., 1990]. Это свидетельствует об определённой стимуляции антигеном захвата бактерий *Y. pestis* и о повышении их адгезивности к макрофагам морских свинок, имеющих иной рецепторный потенциал, а также о биологической целесообразности существования этого этапа именно у морских свинок. Кроме того, показано, что F1 подавлял ферментативную активность лейкоцитов морских свинок, хотя усиливал окислительный взрыв перитонеальных лейкоцитов белых мышей [Асеева Л.Е. и др., 1995]. Эти факты согласуются с понижением вирулентности штаммов для морских свинок в результате потери способности синтезировать F1-антиген.

Помимо перечисленного выше, на модели лабораторных животных [Исин Ж.М., 1985] и диких грызунов [Милин В.М. и др., 1989] показано, что F1 неспецифически активизирует фагоциты. Активированные фагоциты являются короткоживущими, поэтому воздействие F1, особенно вместе с «мышинным» токсином чумного микроба (Тох), угнетающим дыхание митохондрий [Канчух А.А., Иванова В.С., 1971], может способствовать последующему истощению барьерной функции фагоцитов [Милин В.М. и др., 1989]. Антиген F1 является опознавательным сигналом, поскольку фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов иммунизированных морских

свинок возрастала в большей степени за счёт F1, чем в присутствии Tox [Куклева Л.М. и др., 1985].

Сообщается, что очищенный F1 подавлял в широком диапазоне доз (от 10 до 100 мкг/мл) хемилюминесценцию перитонеальных макрофагов мышей при фагоцитозе частиц латекса, зимозана или убитого формалином стафилококка. Чем более активны были макрофаги, тем в большей степени подавлялся их кислородный метаболизм. Такой же эффект F1 оказывал на нейтрофилы и моноциты человека [Воронцов Е.В. и др., 1986].

При иммунизации морских свинок имеет место аллергизация организма, и появляется гиперчувствительность к F1-антигену [Акимович В.В. и др., 1969]. При этом аллергизация и синтез антител отражают разные стороны противочумного иммунитета. Не у всех животных показатели кожно-аллергических реакций и РПГА, свидетельствующих об антителообразовании, полностью коррелируют. Сам антиген F1 индуцирует выработку интерлейкина-1 и фактора некроза опухоли. Считают, что лучший протективный эффект проявляет агрегированная форма капсульного антигена [Петрова Б.Ю., Шалаева А.Ф., 1964; Пустовалов В.Л. и др., 1984; Ермакова Г.В. и др., 1990; Прокопьева Е.Д. и др. 1990]. Но при изучении иммуногенности у морских свинок с использованием F1 в дозах, измеряемых миллиграммами, обнаружен иммунопаралич, а в микрограммах с адьювантом – протективный ответ. Аллергический ответ на введение F1-антигена наблюдали именно у морских свинок, но не у белых мышей. Именно, в повышенных дозах F1 угнетал активность рецепторного аппарата Т-хелперов [Spivak M.L. et al., 1958; Lawton W.D. et al., 1960; Walker R.V., 1962; Басова Н.Н., Герасюк Л.Г., 1963; Прядкина М.Д. и др., 1968]. Существует мнение, что угнетение активности рецепторного аппарата Т-хелперов, осуществляемое капсульным антигеном может иметь отношение к его иммунопаралитическому действию [Васильева Г.И. и др., 1987]. Известно [Тинкер И.С. и др., 1963; 1963a], что двукратная иммунизация малыми дозами как при коротком интервале между инъекциями, так и при длительном, приводит не только к поголовной гибели морских свинок после заражения вирулентным штаммом *Y. pestis*, но и к значительному сокращению продолжительности жизни, по сравнению с контрольными животными.

Установлено, что Т-клеточные линейные эпитопы, индуцирующие клеточное звено иммунного ответа, присутствуют и в собственной структуре субъединицы капсульного антигена [Денесюк А.И. и др., 1991].

Сравнительно недавно показано, что повышение ξ -потенциала капсулообразующих бактерий за счёт F1-антигена приводит к изменению характера взаимодействия бактерий чумы с различными клетками крови [Анисимов А.П., 1999]. Имеются данные об активации фагоцитов иммунных животных под действием F1, что может усиливать защиту организма иммунизированных носителей от возбудителя чумы. [Куклева Л.М. и др., 1985]. В других работах представлены свидетельства иного плана, а именно, данные о том, что очищенные препараты F1 препятствуют завершению фагоцитоза чумных бактерий макрофагами [Пустовалов В.Л. и др., 1984; Куклева Л.М., Проценко О.А., 1985; Титенко М.М. и др., 1989]. Однако они же подавляют хемолюминесценцию перитонеальных макрофагов, нейтрофилов и моноцитов человека при фагоцитозе латекса [Воронцов Е.Д. и др., 1987; Стукова Н.Ю. и др., 1989]. Сообщается о гемолитической активности F1-антигена [Кутырев В.В., 1992; Булгакова Е.Г., 1997; Домарадский И.В., 1998; и др.]. При длительном воздействии на макрофаги F1 антиген может производить цитопатический эффект [Степанишина В.Н. и др., 1991]. По результатам наблюдений высказано предположение о подобном эффекте F1-антигена на клетки гетерогенных бактерий, в силу чего некоторые гибридные бактерии, спустя определённые сроки, содержат преимущественно клетки с дефектами *fra*-оперона, не способные к продукции F1 [Дармов И.В. и др., 1992]. С этим согласуется заключение о том, что F1 способен образовывать в двуслойных фосфолипидных мембранах поры, проницаемые для воды и приводить к нарушению осмоса эукариотических, а возможно и прокариотических, клеток, а также к повышению проницаемости для разных молекул и гибели клеток [Kagan B.L. et al., 1990; Rodrigues C.G. et al., 1992].

Агрегированный высокомолекулярный капсульный антиген обладает гемагглютинирующей активностью за счёт способности связываться с D-галактозамином-НС1 и глюкуроновой кислотой [Сердобинцев Л.Н. и др., 1989]. Гемагглютинирующая и гемолитическая активности могут способствовать

склеиванию бактерий при образовании блока в преджелудке блох, который, как показано, напрямую зависит от наличия гемоглобина. Эти же факторы объясняют снижение интенсивности блокообразования у Fga± штаммов [Акимович В.В. и др., 1969; Кокушкин А.М. и др. 1991, 1993; Бейер А.П. и др., 1998].

В последние годы в нескольких работах опубликованы результаты исследования биологической активности протеиновых, гликопротеиновых и липидсодержащих компонентов капсульного антигена F1, выделённых в условиях диссоциации из его исходного очищенного агрегированного препарата (специфический для *Y.pestis* компонент F18, специфический F1р и неспецифические, общие с другими микроорганизмами компоненты F17, F43, и др.) [Коссе Л.В., 1992; Коссе Л.В. и др., 1997, 1999, 2006, 2006а; Лебедева С.А. и др., 2007].

Оказалось, что индивидуальный вклад компонентов F1 антигена в реализацию перечисленных выше активностей был различным. Все они отличались по биологической активности и модусу воздействия на клеточные факторы иммунитета. Естественно, что биологические свойства тотального образца капсульного антигена F1 во многом зависят от компонентного состава препарата и могут меняться в зависимости от метода его выделения.

Протеин F18, который был идентифицирован как Caf1-протеин, обладал лишь частью свойств, приписываемых в литературе тотальному препарату капсульного антигена «фракция 1 Бейкера». Он практически не обеспечивал агглютинации человеческих эритроцитов. Гемагглютинирующая и гемолитическая активность, описанные для тотальных препаратов капсульного антигена F1, с ним не были связаны. Действие F18 было зарегистрировано на уровне антифагоцитарной активности, индукции бласттрансформации лимфоцитов у иммунизированных белых мышей и интактных морских свинок.

Компоненты F17, F43, F1р и компонент, формирующий «F-пик 1», содержащий F1р, обеспечивали слипание эритроцитов человека, хотя характер агглютинации различался. Гликопротеин F43 обеспечивал формирование крупных хлопьев, а F17, липопротеин F1р и препарат «F-пик 1» индуцировали мелко-хлопьевидную агглютинацию эритроцитов, после которой под влиянием F1р и «F-пика 1» эритроциты разрушались, и наступал полный гемолиз. Эти данные позволили

предположить значительно бóльшую патогенетическую активность F1p по сравнению с другими компонентами.

Описанную в литературе гемолитическую активность чумного микроба одни авторы относят на счёт свободных и связанных ацетонрастворимых жирных кислот [Ткаченко В.В., Домарадский И.В., 1963], другие - связывают с аденилатциклазой или цАМФ-связывающим белком [Асеева Л.Е. и др., 1993]. Обсуждают также её связь с плазмидой пестициногенности, конкретно с *pla*-протеазой, синтезируемой при 37°C [Булгакова Е.Г., Кутырев В.В., 2002]. Однако синтез гемолизирующего F1p в описанных выше экспериментах, хотя и имел зависимость от той же температуры (37°C), но коррелировал именно с мажорной, плазмидой возбудителя чумы, несущей *fra*-оперон.

Агглютинацию и деструкцию эпителиальных клеток *HEP-2* вызывали компоненты F1p и «F-пик 1» подобно гемолизину холерного вибриона [Меньшикова Е.А. и др., 2002], сегмент которого имеет относительную гомологию с фрагментом мажорного белка *Saf1*, входящим в состав F1-антигена чумного микроба [Дятлов И.А. и др., 1991]. Компоненты F17 и F43 обеспечивали устойчивую агглютинацию эпителиальных клеток. Таким образом, они обладали гемагглютинирующей и цитоагглютинирующей активностями. F1p и «F-пик 1» были способны не только к гемагглютинации и гемолизу. Они же вызывали агглютинацию клеток *HEP-2* и их деструкцию, т.е. проявляли цитоагглютинирующую и цитотоксическую активности.

Специфичность взаимодействия компонентов F1p и «F-пик 1» с эпителиальными клетками, проверяли с использованием семи различных МКА, специфически реагирующих с тотальным препаратом F1 антигена [Бичуль О.К., 1993]. Все компоненты проявляли серологическую активность с этими МКА в ИФА в высоких титрах (не менее 1/10000). Один из препаратов МКА полностью нейтрализовал деструктивную активность F1p, а другой - частично нейтрализовал «F-пик 1». Это свидетельствовало о специфичности взаимодействия компонентов и клеток и позволяет предположить различие в структуре и механизме действия компонентов F1p и «F-пик 1». Более того, именно эти МКА, вступившие в реакцию нейтрализации, ранее были описаны как проявляющие протективные свойства [Бичуль О.К., 1993; Коссе Л.В. и др., 2006].

Протеин F18 и гликопротеин F17 были протективными только для белых мышей. Они не защищали морских свинок от заражения чумой и не оказывали на них патогенетического действия, хотя несколько удлиняли жизнь (до 16 сут). Только F1p проявлял токсичность в использованной дозе и индуцировал гибель 50% иммунизированных им морских свинок до контрольного заражения. У павших животных был слизистый отёк кишечника и геморрагический серозный выпот в брюшную полость. Зато выжившие остальные животные были устойчивы к последующему заражению 200 *DCL* вирулентного штамма чумного микроба и оставались живыми после месяца наблюдения. Эти данные наводят на мысль, что F1p может участвовать в реализации вирулентности штаммов чумного микроба в организме морских свинок.

В смеси перитонеальных макрофагов с бактериями чумной вакцины *Y. pestis EV76* при добавлении каждого из компонентов, входящих в состав F1-антигена, число активных макрофагов имело тенденцию к увеличению. Наибольший сдвиг вызывал гликопротеин F43. Эта тенденция была заметной также в пробах с F18, а в присутствии тотального препарата F1 она усиливалась только после извлечения из него F1p. На этапе переваривания фагоцитированные бактерии деградировали быстрее всего в присутствии F43, когда антибактериальная активность макрофагов была наибольшей. В то же время в присутствии F1p и «F-пик 1» бактерии сохранялись в макрофагах в состоянии стаза. Только F18 (Cafl) и секретируемая форма F1-антигена обеспечивали выраженный антимакрофагальный эффект и способствовали внутриклеточному размножению микроба (табл.3.1 и 3.2).

Таблица 3. 1

Характеристика действия различных компонентов и препаратов антигена F1 на взаимоотношение бактерий вакцины *Y.pestis EV*(линия НИИЭГ) с перитонеальными макрофагами морских свинок

Наименование компонента	Процент активированных макрофагов (АФ)	Индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ ₆)	Эффект на фагоцитированные бактерии в конце срока наблюдения.
F1 тотальная	33±6,6	-(2,0±0,2)	размножение бактерий
F17	41±7,4	+(0,1±0,04)	стаз бактерий
F18	41±7,4	-(2,4±0,21)	размножение

			бактерий
F43	49±8,0	+(2,4±0,21)	завершенный фагоцитоз бактерий
F1p	40±7,2	+(0,8±0,13)	завершенный фагоцитоз бактерий
F1 секретируемая	41±7,4	-(2,8±0,23)	интенсивное размножение бактерий
F1 тотальная без липидного компонента	35±7,0	-(3,6±0,27)	интенсивное размножение бактерий
Бактерии вакцины EV76	38±7,2	-(1,5±0,17)	размножение бактерий

Пояснение: АФ - % активированных макрофагов; ИЗФ₆ – индекс завершённости фагоцитоза через 6 ч контакта бактерий и макрофагов

Тенденция к увеличению числа активных клеток макрофагов была более выражена, при использовании вместо бактерий вакцинного штамма *Y.pestis* - эритроцитов. Эта активность была приблизительно одинакова в присутствие разных препаратов F1 и его компонентов. Но F43, F1p и, особенно, тотальный препарат F1 Бейкера тормозили деструкцию и переваривание эритроцитов в макрофагах. При этом F1p не проявлял гемолитической активности по отношению к эритроцитам морской свинки внутри макрофагов. Его действие скорее было цитотоксическим по отношению к самим макрофагам.

Представленные данные свидетельствуют о том, что при фракционировании тотального препарата F1-антигена в диссоциирующих условиях выделяются его серологически активные специфические составляющие, которые характеризуются разной биологической активностью.

Таблица 3. 2

Митогенная активность препаратов и компонентов антигена F1 чумного микроба по отношению к зрелым лимфоцитам различных экспериментальных животных

	Количество бластных форм лимфоцитов, %
--	--

Наименование антигенного компонента	интактные белые мыши (<i>in vitro</i>)	иммунизированные белые мыши (<i>in vivo</i>)	интактные морские свинки (<i>in vitro</i>)	интактные кролики (<i>in vitro</i>)	иммунизированные кролики (<i>in vivo</i>)
F1 (Baker) тотальная	не митогенен	30±6	40±7,1	35±6,8	38±7,1
F17	не митогенен	не митогенен	26±5,8	не иссл.	не иссл.
F18	не митогенен	75±10	45±7,7	18±4,9	78±10,1
F1p	не митогенен	20±5,1	28±6,1	не иссл.	не иссл.
F1 секреторуема	не митогенен	49±8,0	38±7,1	15±4,4	80±10,3
Контроль БТ с ФГА	15±4,4	15±4,4	16±4,6	15±4,4	15±4,4
Контроль спонтанной БТ	3±2	3±2	3±2	3±2	3±2

Пояснение: ФГА - фитогемагглютинин; БТ – бласттрансформация; Приведены средние показатели по трем опытам.

Эти различия проявляются также в характере влияния присутствующих F1-компонентов на взаимодействие бактерий противочумной вакцины и вирулентного штамма *Y. pestis* с организмом белых мышей и морских свинок (рис. 3.1. и 3.2.)

Так, «немедленную защиту» от чумы при одновременном подкожном введении иммунизирующего компонента F1 и вирулентного штамма [Будыка Д.А., 2001] регистрировали только у белых мышей и только после введения вирулентных бактерий с неспецифическим компонентом F17 самостоятельно и в комплексе со специфическим F18 (Caf1). Сам по себе F18 не проявлял активности. Но, в смеси с компонентом F17 протективность увеличивалась почти на 20%. Или имела место стимуляция протективной активности компонента F17 компонентом F18 (Caf1), или F17 выступал в роли адьюванта и активировал F18, обеспечивая больший суммарный эффект. Тотальный препарат F1-антигена, содержащий индуцирующий компонент F17, и компонент F1p подобного действия не оказывали. Это позволяло предполагать наличие в тотальном препарате и у F1p, иммунодепрессивной активности, негативно влияющей на иммуностимулирующий эффект F17. Интересно, что подобную защиту наблюдали только у мышей и, видимо, действие

компонентов было направлено на фактор возбудителя чумы, малосущественный для патогенеза инфекции у морских свинок. Быстрота проявления «немедленной защиты» в присутствии вирулентного штамма позволяет думать, что эта защита - результат активации неспецифического звена иммунитета [Лебедева С.А. и др., 2007].

Связь повышенной протективности бинарного препарата «F17+F18» с феноменом адьювантности может быть обоснована дополнительно. Выше упоминалось, что сам неспецифический 17 кД гликопротеин F1-антигена (или его близкие аналоги) обнаружен у ряда микроорганизмов сем. *Enterobacteriaceae* [Коссе Л.В. и др., 1994]. В частности, подобный F17 гликопротеиновый компонент с аналогичной F1-серологической активностью и молекулярной массой был выделен из бактерий *K. pneumoniae* тем же методом Бейкера. При его исследовании оказалось, что он обладает адьювантной способностью при введении слабоиммуногенных «мышинного» токсина (Tox) и некоторых мембранных белков чумного микроба [Коссе Л.В., 1992; Коссе Л.В. и др., 1995]. Об адьювантной способности неспецифического капсульного гликопротеина *K. pneumoniae* сообщалось ранее и в других работах [Курбатова Е.А. и др., 1988]. В тесте «немедленной защиты» от экспериментального заражения чумой комплексным препаратом «вакцина + один из компонентов» у белых мышей активным оказался только бинарный препарат «F17+F18». Он, вкуче с вакциной, защищал почти всех инфицированных мышей. Эти же компоненты врозь, так же, как F1-тотальный не усиливали защиту одной вакциной (протективность в контроле - 50%).

Статистически достоверная ингибция защитного эффекта вакцины проявлялась в присутствии компонента Flp, свидетельствуя об его иммунодепрессивной активности в организме мышей. Никакой «немедленной» защиты морских свинок от вирулентного штамма суммарными препаратами вакцины с F1-компонентами, в предыдущем (без вакцины) и в этом опыте не было.

Бинарный препарат «F17+F18» оказался хорошим стимулятором иммунитета и у мышей, и у свинок, а F18(Caf1) – только у мышей, при введении их совместно с вакциной за 14 сут до контрольного заражения вирулентным штаммом. А вот, действие только компонента Flp был диаметрально противоположным у разных

видов животных: у морских свинок он обеспечивал вместе с вакциной максимальный уровень защиты от чумы (86-100%), а у белых мышей он почти вдвое ингибировал протективность вакцины. Присутствие F1p-компонента сказывалось и на эффекте тотального препарата F1-антигена. При действии последнего проявлялась тенденция к ингибции защитного действия вакцины. Эти данные наводят на мысль о том, что для стимуляции иммуногенности вакцины нецелесообразно использовать тотальный препарат F1-антигена,

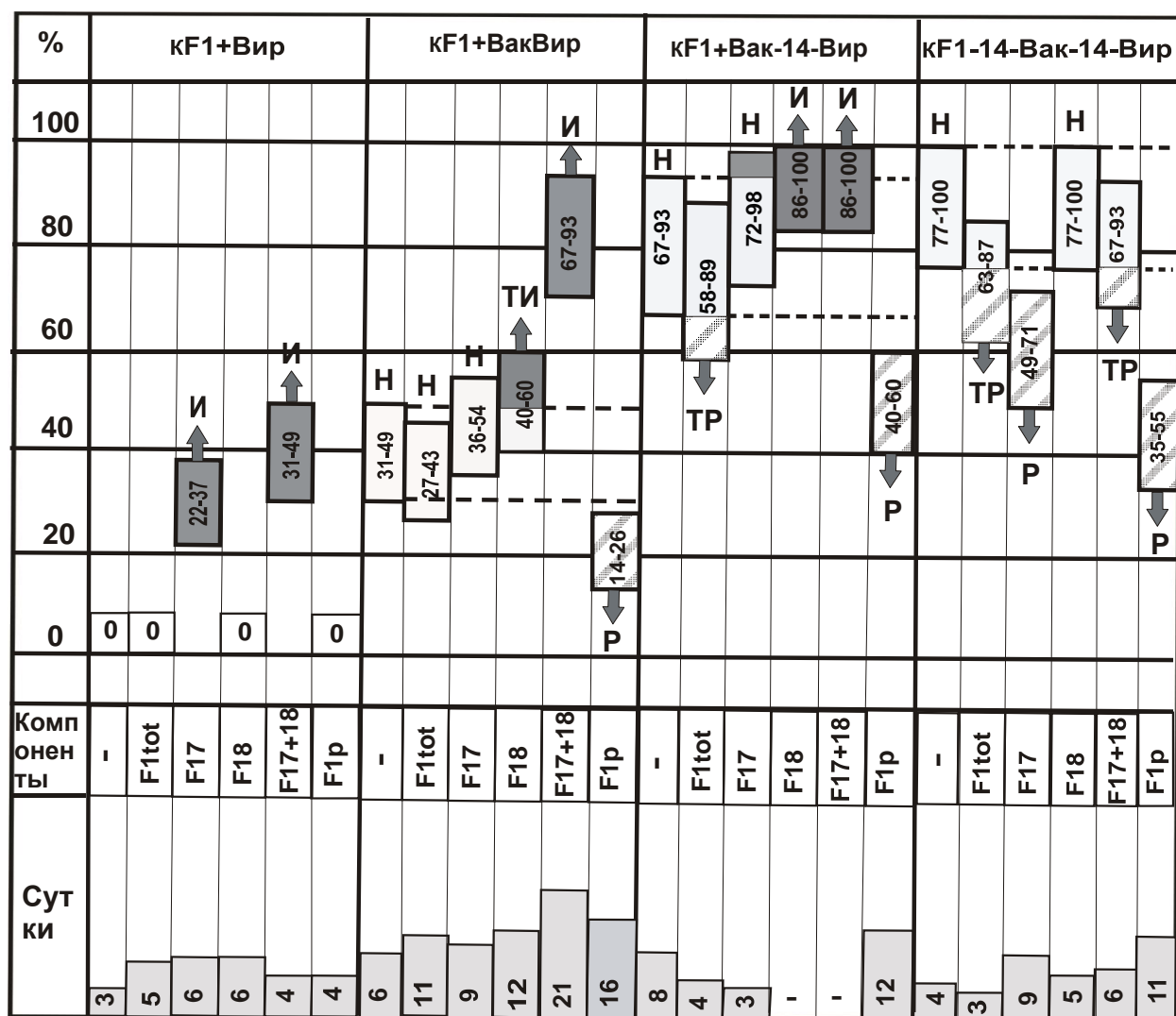


Рис. 3.1. Влияние на протективность вакцинного штамма *EV76* компонентов антигена *F1* при заражении белых мышей вирулентным штаммом *Y.pestis* 231/708 (200 DCL) Пояснения: кF1 – компонент F1-антигена; F1tot – тотальный препарат F1(Baker); F18 – температурозависимый гидрофобный видоспецифический протеин 18 кД (\approx Caf1); F17 – конститутивный гликопротеин 17 кД (неспецифический); F1p – температурозависимый видоспецифический липосодержащий компонент около 10кД. Вак – вакцинация; Вир – введение вирулентного штамма; цифры в промежутках – интервал в сут. Слева и в рамках - % выживших животных, в рамках - диапазон при P=90% И – индукция; Н – норма; Р – репрессия; ТР и ТИ –

тенденция к репрессии и индукции, соответственно Нижняя графа – средняя продолжительность жизни животных.

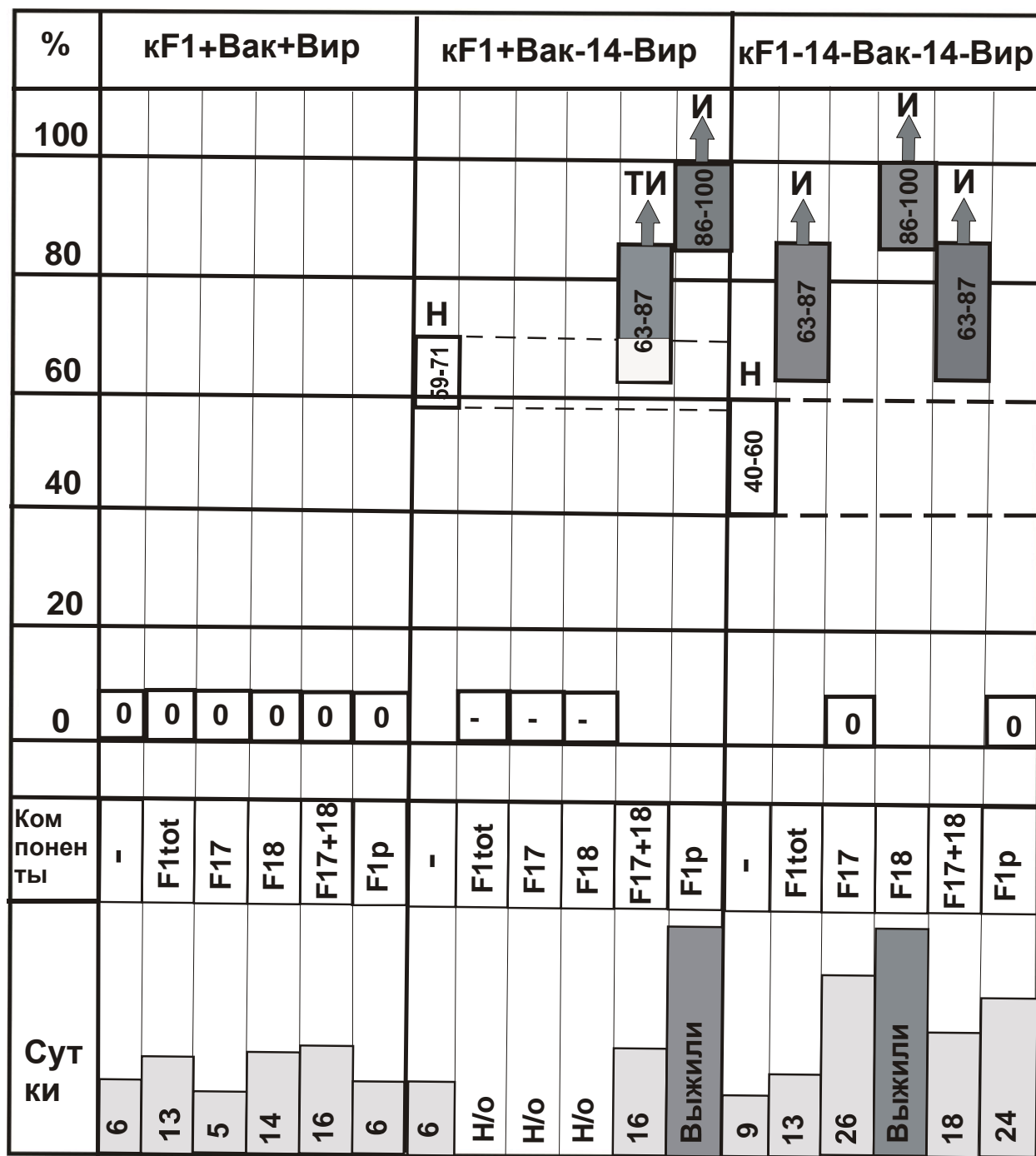


Рис. 3.2. Влияние на протективность вакцинного штамма *EV76* компонентов антигена *F1* при заражении морских свинок вирулентным штаммом *Y.pestis* 231/708 (200 DCL) - Пояснения: кF1 – компонент F1-антигена; F1tot – тотальный препарат F1(Baker); F18 – температурозависимый гидрофобный видоспецифический протеин 18 кД (\approx Caf1); F17 – конститутивный гликопротеин 17 кД (неспецифический); F1p – температурозависимый видоспецифический липосодержащий компонент около 10кД. Вак – вакцинация; Вир – введение вирулентного штамма; цифры в промежутках – интервал в сут. Слева и в рамках - % выживших животных, в рамках - диапазон при P=90% И – индукция; Н – норма; Р – репрессия; ТР и ТИ – тенденция к репрессии и индукции, соответственно Нижняя графа – средняя продолжительность жизни животных.

который содержит иммунодепрессант Flp, активный у белых мышей. Эти данные неизбежно ставят вопрос об особенностях влияния компонентов F1-антигена на иммуногенез у людей. Экстраполировать полученные результаты на иммуногенез у людей представляется не корректным. Следует лишь заметить, что авирулентность для морских свинок является свойством штаммов из очагов, где опасность заражения человека чумой ставится под сомнение (см. гл.4 и 6). Это даёт основание для рекомендации: обязательно обратить внимание на особенности биологической активности компонентов F1-антигена при решении вопросов иммунопрофилактики чумы у людей и провести допустимые исследования непосредственно на этой модели. Очень важно исключить неблагоприятные влияния иммуносупрессирующих компонентов антигена. Бинарный комплекс компонентов «видоспецифический F18 + адьювантный F17» наиболее соответствует этой задаче.

Совершенно иные данные были получены при введении F1-компонентов за 14 сут до вакцинации и за 28 сут до заражения вирулентным штаммом. В этом случае и у белых мышей, и у морских свинок чётко проявлялось подавляющее иммуногенез действие компонентов F17 и особенно Flp. Показатели выживаемости были в 2 и более раз ниже. Сам по себе использованный вариант вакцины для белых мышей был в достаточной степени протективным (86-100%), поэтому о стимуляции за счёт F18 на таком фоне что-либо сказать трудно, но у морских свинок максимальный уровень защиты вакциной наблюдали в случае предварительной сенсibilизации животных компонентом F18(Caf1). Препараты, содержащие, кроме него, указанные выше ингибирующие компоненты (F1-тотальный, Flp, F17+F18) проявляли тенденцию к подавлению иммуногенеза при последующей вакцинации.

Выше обсуждалась возможность неспецифической стимуляции клеточных иммунных реакций и проявления адьювантной активности компонентом F17. Вполне вероятно, что вызванная компонентом F17 значительная неспецифическая активация комплемента и макрофагального звена задолго до вакцинации морских свинок [*Williams R.C. et al., 1972; Мулин В.М и др., 1989*] приводит к истощению этих механизмов защиты и снижению ответа на вакцину. Ту же направленность имеет

цитотоксичность F1p для макрофагов и его способность в отсутствие противодействия других компонентов вакцины вызывать их гибель.

Продолжительность жизни павших животных, т.е. острота течения инфекции, также зависит от индивидуальных особенностей F1-специфических компонентов капсулы, их суммарных препаратов и периода воздействия (введение до вакцины, одновременно с ней или после вакцины). Хронизации инфекции способствовали компоненты F17 и F1p. Продолжительность жизни белых мышей увеличивалась после введения F1-компонентов одновременно с вирулентным и вакцинным штаммами чумного микроба. У морских свинок инфекция развивалась медленней при введении F1-компонентов перед вакцинацией и задолго до заражения вирулентным штаммом [Лебедева С.А. и др., 2007].

Отмеченная выше способность F1p участвовать в агрегации субъединиц мажорного белка F1-антигена (F18), позволяет предположить сходство этого минорного компонента с ашером Caf1A, который отвечает за конструирование капсульного антигена чумного микроба за счёт липидных связей [Karlisev A. et al., 1994]. Известно, что молекулярный ашер Caf1A проявляет высокий аффинитет к субъединице F1-антигена и к человеческому интерлейкину 1 β [Zav'yalov V.P. et al., 1995a] В связи с этим уместно напомнить предположение [Анисимов А.П., 1999a] о том, что F1-антиген, содержащий молекулы ашера, может вступать в конкуренцию с интерлейкинами «1 α ,» и «1 β ,» за связывание с сайтами их рецепторов, препятствуя таким образом адекватному иммунному ответу. Более того, показано, что интерлейкины связываются с ашером и теряют способность воздействовать на макрофаги и активировать их [Zav'yalov V.P. et al., 1995]. Перечисленное выше, относительно ашера CafA и компонента капсульного антигена F1p, позволяет предполагать активное участие последнего, как в построении капсулы чумного микроба, так и в патогенезе. При этом его действие может быть направлено и на белые, и на красные элементы крови (см. гемагглютинирующая, гемолитическая и цитопатическая активности), а также на другие клеточные системы, которые участвуют в защите от инфекции. Нельзя исключить также и участия в реализации патогенного потенциала капсульного антигена шаперона Caf1M, повреждение которого может в значительной степени снижать степень вирулентности [Welcos S.L.

et al., 2004]. В сумме, это вполне может служить отправным моментом и основой для первоочередного исследования в целях поиска соответствующих доказательств. Проведение таких исследований крайне необходимо и для выяснения механизмов, обеспечивающих особенности проявления вирулентности штаммов чумного микроба, дефектных по продукции F1-антигена. Повреждение структурного гена Caf1-белка не обязательно должно сопровождаться утратой ашера или шаперона, тогда как утрата рFga-плазмиды целиком к этому приводит. Именно эта ситуация теоретически может в некоторых случаях обуславливать появление «бесфракционных», но вирулентных штаммов и, как следствие, чумную инфекцию с характерными отклонениями в клинической картине. А отсутствие Caf1-белка (аналогия F18) обеспечивает условия для доминирования неспецифического компонента F17 с соответствующим эффектом снижения остроты инфекции.

Выявленные способности компонентов F1-антигена к цито- и гемагглютинации позволяют предположить их лектиновую активность. Так же, как F17 и F43, простые лектины относятся к классу гликопротеинов. Связываясь с гликопротеинами клеточной поверхности, они определяют агглютинацию клеток крови некоторых групп путём неспецифического взаимодействия. Лектины, относящиеся к классам, которым соответствуют конкавалин А и фитогемагглютинин (ФГА), в определённой степени взаимодействуют со всеми клетками периферической крови человека. Однако, судя по отсутствию аддитивного комитогенного эффекта F17 и F43 с ФГА и конкавалином А в реакции бласттрансформации лимфоцитов при совместном их действии, использованные «контрольные» митогены и опытные F1-компоненты принадлежат к разным классам лектинов [Коссе Л.В. и др., 2006].

Итак, исследованные компоненты капсульного F1-антигена (по Бейкеру) обладают различающейся индивидуальной биологической активностью по отношению к макроорганизму и его клеткам. В зависимости от индивидуальных свойств они проявляют цито- и гемагглютинирующую, гемолитическую, цитопатическую или цитолитическую активности. На разных этапах инфекции они выступают каждый в своей роли и в различной степени стимулируют иммуногенез, подавляют его или остаются нейтральными. Полученные характеристики компонентов позволяют говорить также о наличии у возбудителя чумы лектиноподобных структур. Дальнейшее исследование их перспективно для понимания патогенеза чумы, выяснения механизмов, обеспечивающих циркуляцию

возбудителя в макроорганизме и его приживаемость в различных тканях ретикуло-эндотелиальной системы, а также для оптимизации подходов к иммунопрофилактике этой инфекции.

Одним из факторов, способствующих заражению млекопитающих чумой через блох, является образование блока их преджелудка после кровососания при наличии в крови бактерий чумы. Детальные исследования опровергли ранее бытующее мнение, что блок образуется за счёт фибрина, а эритроциты в сгусток попадают механически [Cavanaugh D.C., Randall R. 1959; Wasserburger H.J., 1961]. В опытах кормления через мембрану разной кровью, обогащённой бактериями штамма *Y. pestis*, блок у блох формировался в присутствии эритроцитов, даже если они были в виде взвеси в физиологическом растворе. Сыворотка крови и белые клетки на этот процесс не влияли. Следовательно, блок образуется при активном взаимодействии эритроцитов и бактерий, и эффект этого взаимодействия, по всей вероятности, может зависеть от особенностей углеводного метаболизма эритроцитов. Так, после выдерживания эритроцитов при 37°C, когда, как установлено, снижается синтез глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФД) и фосфорилирование аденозиндифосфата (АДФ), эффективность блокообразования уменьшалась в 2 раза. Предполагается, что чумной микроб не имеет Г6ФД, поэтому, чтобы синтезировать собственные рибозофосфаты для дыхания и энергетического обмена, он использует НАДФ (никотинамид-адениндинуклеотидфосфат) и углеводы эритроцитов. Отсутствие пентозного пути в желудке блохи не может компенсироваться гликолизом по пути Эмбдена и Мейергофа в кислой среде при низком значении *pH* (6,5). Нужны эритроциты, но с соответствующим метаболизмом. Такие «эффективные» эритроциты в опытах были у морской свинки и суслика: кормление этой кровью обеспечивало блок. При использовании крови нечувствительных животных с эритроцитами, имеющими другой обмен (овца, коза, курица), блока не было, и блохи быстро освобождались от бактерий чумы [Козлов М.П. и др., 1975; Козлов М.П., Розанова Г.Н., 1976]. Гемоглобин может также содействовать образованию конгломератов клеток *Y. pestis* в жидкой среде [Бейер А.П. и др., 1998], а гемин - формированию биоплёнки, которая способствует блокообразованию [Li Tan, Creg Darby, 2004]. Участие специфичности углеводного метаболизма в реализации блокообразования позволяет предполагать участие в процессе взаимодействия компонентов бактерий с лектиновыми свойствами. Не удивительно, что процесс блокообразования у блох усиливается при повышении сахара в крови

прокормителей [Классовский Л.Н., Бибикова В.А., 1970] или при увеличении дозы бактерий [Бибикова В.А., Алексеев А.Н., 1969].

Несмотря на то, что в организме блох антиген F1, как правило, не синтезируется [Cavanaugh D.C., Randall R., 1959], всё же предполагается его участие в образовании агрегатов бактерий в преджелудке блох и последующего образования блока [Kartman I., Quan S.F., 1964], поскольку высокомолекулярный F1-антиген, обладает гемагглютинирующей активностью [Сердобинцев Л.Н. и др., 1989]. Тем более что синтез F1 в организме блохи прекращается не сразу. Люм-диагностика показала, что F1 в блохах может сохраняться в течение 5-10 дней. Срок - достаточный для прикрепления бактерий в преджелудке [Дертева И.В. и др., 1970; Hudson B.W. et al., 1966]. Кстати, при понижении температуры окружающей среды и в зависимости от подвидовых особенностей штамма длительность сохранения антигена F1 могла возрастать до 35 сут [Бейер А.П., 1979].

Вместе с тем отмечена низкая способность к блокообразованию у блох, заражённых штаммами с Fra^{\pm} и Fra^{-} фенотипами, утратившими плазмиду $rFra$ или имеющими мутации во fra -опероне [Акимович В.В. и др., 1969; Кокушкин А.М. и др., 1991, 1993]. Отсутствие трансмиссивной передачи бескапсульных вариантов вирулентного штамма может находиться в связи с необходимостью обеспечения большей LD_{50} для эффективного заражения. Вероятно, блохи не способны передать Fra^{-} бактерии в количестве, соответствующем их возросшей LD_{50} , которая для крыс, например, у таких штаммов может быть в 100 больше, чем у исходного Fra^{+} штамма [Williams J.E., Cavanaugh D.C., 1984; Ларионов Г.М., Погасий Н.И., 1989]. Есть сведения, что вирулентные Fra^{-} [Кочкарёва А.В., Голковский Г.М., 1977] или Fra^{\pm} штаммы [Ларионов Г.М., Пейсахис Л.А., 1972] с малым значением LD_{50} успешно переносились блохами.

В этой связи интересно отметить, что в организме блох *a priori* Fra^{+} и Fra^{-} штаммы через несколько дней приобретают один фенотип. Они становятся Fra^{-} . Их способность служить заражающим агентом зависит от длительности сохранения в преджелудке блох и от особенностей Fra -фенотипа. Длительность сохранения во многом зависит от способности бактерий образовывать в организме блох конгломераты, блокирующие просвет. Способствовать этому в отсутствие F1, как полагают, может антиген рН6, который индуцибельно синтезируется в кислой среде желудка и, как известно, обладает адгезивной [Коннов Н.П., 1990; Hultgren S.J., Jones C.H., 1995] и гемагглютинирующей активностью [Bichovsky-Slomnicki L., Ben-

Efraim S., 1963]. Имеются также противоречивые данные об участии в этом феномене «мышинного» токсина, способствующей образованию биоплёнки [*Акимович В.В. и др., 1969; Кондрашкина К.И. и др., 1971; Кочкарёва А.В., Голковский Г.М., 1977; Кокушкин А.М., 1983; Ларионов Г.М., Погасий Н.И., 1989; Hinnebusch B.J., 2004, Hinnebusch B.J. et al., 2000, 2006; Oyston P.C.F., Isherwood K.E., 2005*]. Сведения о возможном участии других антигенов в блокообразовании и противоречивость данных о влиянии и участии F1 в этом феномене требуют дополнительных исследований.

Формирование блока возбудителем чумы в организме блох и зависимость этого процесса от гемоглобина напрямую связаны с другим очень важным свойством микроба чумы, а именно, со способностью F1-антигена формировать в двухслойных фосфолипидных мембранах водонепроницаемые поры [*Rodrigues C.G et al., 1992*], нарушать осмотическую регуляцию и вызывать гибель клетки-мишени теплокровного животного. В этом процессе мишенью цитопатического действия F1 антигена могут быть различные фагоциты и, вполне вероятно, - эритроциты. Известно, что канал-формирующие токсины делают мембраны клеток проницаемыми для целого ряда молекул [*Kagan B.L. et al., 1990*]. Не исключено, что каналы, сформированные F1-антигеном в оболочках эритроцитов, приобретают такую же проницаемость, и через них может проникать гемоглобин, так необходимый для формирования блока в преджелудке блох. Именно последняя ситуация, определяющая возможность освобождения гемоглобина, как отмечено выше, способствует блокообразованию. Порообразование в клетках-мишенях характерно также для перфорина лимфоцитов, а также пептидов-дефензинов, продуцируемых нейтрофилами и макрофагами, с широким спектром антимикробной активности [*Kagan B.L. et al., 1990*]. С такой активностью F1-антиген вполне может оказывать токсический эффект также на клетки гетерогенного штамма при конструировании Fga⁺ рекомбинантов [*Дармов И.В. и др., 1992*].

Разностороннее действие F1-антигена, вероятно, выходит за пределы свойств, описанных выше. Компьютерный структурный анализ F1-антигена по сравнению с другими известными белками обнаружил гомологию отдельных его участков с фрагментами константных доменов рецептора T-лимфоцитов, с сегментом гемолизина холерного вибриона и предшественником аденилатциклазы возбудителя коклюша а также с β -структурными оболочечным белком вируса иммунодефицита обезьян. Предполагается, что найденные гомологичные фрагменты соответствуют

белкам, имеющим сходные структурные и функциональные свойства [Денесюк А.И. и др., 1991].

Исходя из современных данных, роль F1(Baker) и Caf1 в патогенезе чумы неоднозначна, и вопрос о значении *каждого из них* в вирулентности *Y. pestis* нуждается в дальнейшем исследовании при обязательной конкретизации терминов и при соответствии исследуемых факторов содержанию соответствующего термина. Особенно после того, как было доказано, что избирательное «выключение» синтеза Caf1-белка *per se* за счёт инактивации структурного гена при интактных генах регулятора, ашера и шаперона не приводит к снижению вирулентности полученных Fga⁻ штаммов *Y. pestis* для белых мышей и морских свинок [Анисимов А.П., 1999]. Актуальность исследований капсульного антигена F1 убедительно подтверждается и сведениями, представленными в сравнительно недавно опубликованном обзоре, где представлена более детально его молекулярная структура [MacIntyre S. et al., 2005].

Глава 4. Ферментативная активность возбудителя чумы. Проблемы дифференциальной диагностики и таксономии

С.А. Лебедева, А.Л. Трухачев, В.С. Иванова

4.1. Краткие сведения об особенностях ферментативной активности возбудителя чумы и его разнородность по критериям её оценки

Одним из микробиологических тестов идентификации культур возбудителя чумы является ферментативная активность. Её изучают по отношению к разным субстратам: сахарам, спиртам, нитратам и нитритам, мочеvine и др. Ферментативная активность по отношению к углеводам - тест, который начали использовать ещё на ранних стадиях изучения чумного микроба. Отмечено, что из сахаров, используемых наиболее часто, *Y. pestis* практически всегда разлагает глюкозу, мальтозу, маннит. Ферментация проходит с разной интенсивностью, но всегда без выделения углекислоты. Позитивные по отношению к лактозе и, особенно, к сахарозе штаммы обнаруживаются чрезвычайно редко, фактически на уровне единичных, и ферментация этих сахаров происходит медленно. Часто такие штаммы имеют признаки генетической нестабильности и склонности к диссоциативной изменчивости. При идентификации бактерий чумы и дифференциации их от возбудителя псевдотуберкулёза ферментативная активность – признак весьма вариабельный в силу неоднородности вида *Y. pestis*. Поэтому при оценке по критериям часто используют обозначение «иногда - / +», «чаще - » и т.п. По этой причине следует более чётко определить значимость результатов тестирования. Первоначально к основным признакам, различающим два вида, относили способность к ферментации рамнозы, мелибиозы, мочеvine. Однако в последующем значимость этих свойств была оценена иначе в связи с обнаружением среди штаммов возбудителя чумы вариантов, подобных бактериям псевдотуберкулёза. За первые 50 лет после открытия бактерий чумы усилиями исследователей во всём мире были накоплены сведения о свойствах выделенных из разных источников штаммов возбудителя, которые свидетельствовали о вариабельности некоторых диагностических и различных биологических признаков. Эти данные послужили основанием для условного разделения *Y. pestis* на разновидности [Туманский В.М., 1968] и биовары [Devignat R., 1951], исходя из способности штаммов к ферментации глицерина и денитрификации,

приуроченности к определённому виду основных носителей и географической обособленности природных очагов.

Ферментация глицерина (Glp). К ферментации глицерина способны штаммы возбудителя псевдотуберкулёза и часть штаммов чумного микроба. Факт этот давно известен. Отличия по способности ферментировать глицерин определили возможность эколого-географической градации чумного микроба на глицеринпозитивные штаммы (они же континентальные) и глицериннегативные штаммы (они же океанические или крысиные) [Безсонова А.А., 1928]. Чума, вызванная глицериннегативными штаммами этого микроба, циркулирующими среди крыс и в основном в городах, портах, одно время называлась «городской», а чума, обусловленная возбудителем, персистирующим в глубине континентов среди диких степных грызунов – «дикой» [Берлин А.Л., Борзенков А.К., 1938]. Способность ферментировать глицерин у чумного микроба обеспечивает фермент глицерол-3-фосфат дегидрогеназа (*glpD*) [Motin, V. L. et al., 2002]. Основными носителями Glp⁺ штаммов чумного микроба являются зимоспящие грызуны. Неспособность ферментировать глицерин (Glp⁻) отличает только штаммы, персистирующие среди крыс. Утрату этого свойства обеспечивает делеция размером в 93 пары оснований (п.о.) в рамке считывания *glpD* гена [Parkhill J.B. et al., 2001]. Потеря 93 п.о. приводит к удалению 31 аминокислоты в пределах N-концевой последовательности GlpD белка, что и объясняет негативный глицериновый фенотип штаммов [Motin V.L. et al., 2002]. Если в очаге циркулируют смесь различных по ферментативной активности штаммов, то тип ферментации глицерина может использоваться как дифференциальная метка, а в некоторых случаях и как маркер для эпидемиологического анализа.

Способность **метаболизировать нитраты и нитриты** является ещё одним признаком, с помощью которого характеризуют штаммы двух обсуждаемых видов иерсиний. И если нитрификация является индивидуальным штаммовым признаком, не зависящим от видовой принадлежности этих бактерий, то признак денитрификации используется для внутривидовой дифференциации с давних времён [Коновалова С.Ф., 1930]. Денитрифицирующая активность (в литературе: dNt⁺, Nap⁺) присуща виду *Y. pseudotuberculosis*, штаммам чумного микроба, выделенным

от сурков, крыс и только от тех полёвок, которые обитают в Закавказье. Для других штаммов признак денитрификации не характерен (dNt-, Nap-). Это позволяет разделить вид *Y. pestis* на две группы: способные к денитрификации и не способные.

Редуктазы нитрата широко распространены в бактериях и играют очень важную роль в ассимиляции и диссимиляции азота [Dias J.M. et al., 1999]. В бактериях были найдены три типа систем, редуцирующих нитрат, а именно, (1) цитоплазматическая ассимиляторная редуктаза нитрата, (2) связанная с мембраной дыхательная редуктаза нитрата и (3) периплазматическая редуктаза нитрата (Nap), отличающиеся по конституции сайтов активности, структуре субъединицы, локализации в клетке и т.д. [Richardson D.J. et al., 2001]. Многим патогенным бактериям приходится нейтрализовать нитрат до низкого уровня путём его восстановления. У них для этого имеется соответствующая генетическая информация. У чумного микроба Nap является единственной редуктазой нитрата. Структурный ген для Nap белка обозначается *napA*. Данные секвенирования и PCR продемонстрировали, что все отрицательные по редукции нитрата штаммы обладают двумя типами видоизмененных *napA* генов [Parkhill J.B. et al., 2001; Zhou D. et al., 2004]. Способные к денитрификации Nap⁺ штаммы содержат интактный *napA* ген и продуцируют активную Nap. Классические Nap⁻ штаммы основного подвида имеют точковую мутацию в 205-ом кодоне *napA* гена: там вместо триплета GAA расположен триплет TAA. Эта нулевая мутация инактивирует выражение NapA белка. У атипичных Nap⁻ штаммов, выделенных в некоторых полёвочьих очагах, имеет место мутационная замена GCC на ACC, которая происходит в 341-ом кодоне в пределах *napA* гена. Эта мутация ведет к замене гидрофобного **аланина** на гидрофильный **треонин** и фермент теряет свою активность [Zhou D. et al., 2004].

Задолго до расшифровки мутаций на молекулярном уровне с учётом достаточной стабильности Glp и Nap(dNf) признаков было предложено делить вид *Y. pestis* на биовары по особенностям ферментативной активности по отношению к глицерину и нитрату [Devignat R., 1951] и на разновидности по основному носителю [Туманский В.М., 1958]:

1. биовар *antiqua* - разновидность сурчиная (Glp+, dNf+);

2. биовар *mediaevalis* - разновидность сусликовая/песчаночья (Glp+,dNf-);
3. биовар *orientalis* - разновидность крысиная (Glp-, dNf+).

Исследования на молекулярном уровне структуры ДНК современных штаммов показало, что все штаммы биовара *orientalis* эволюционно тесно связаны и практически редко отличаются. Штаммы, составляющие биовар *mediaevalis*, имеют некоторую групповую вариабельность, а представители биовара *antiqua* в значительной степени разнородны [Леву М.И. и др., 1961; Achtman M., 2004; Zhou D. et al., 2004; Prentice M.B., Rahalison L., 2007]. Это свидетельствует о несовершенстве существующих подходов к внутривидовой градации вида и необходимости введения новых подразделений, а также привлечения дополнительных дифференцирующих признаков, затрагивающих как особенности структуры геномов, так и фенотипические особенности штаммов, более доступные для первоначального лабораторного исследования.

4.2. Общая характеристика «полёвочьей» (рамнозопозитивной) разновидности возбудителя чумы и проблемы, связанные с ней

Первые штаммы, выделенные от больных и умерших людей, характеризовались, как неспособные **ферментировать рамнозу** (Rha-). Этот признак (см. выше) предлагался для дифференциации от близкородственного, позитивного по этому признаку возбудителя псевдотуберкулёза [Бессонова А.А., 1929]. Включение в круг исследования большего числа штаммов чумного микроба от грызунов и их блох, позволило обнаружить значительное число рамнозопозитивных штаммов, по ряду признаков отличающихся от классических рамнозонегативных образцов. Основными носителями этих штаммов зарегистрированы различные полевки, а в некоторых природных очагах пищухи, а также их эктопаразиты.

Заболевание полевок чумой впервые было обнаружено почти 80 лет назад [Скородумов А.М., 1928]. Позже [Клец Э.И., 1934] обратили внимание на необычную способность ферментировать рамнозу у штаммов, выделенных от различных видов полевок и мелких мышевидных грызунов,. Затем были обнаружены эпизоотии, проходившие в 1945-1958 гг. среди этих грызунов на локализованной территории в Забайкалье и Монголии [Ковалёва Р.В., 1958; Леву с соавт., 1961; Шамова А.М.,

1961; Некителов Н.В., 1962; Козлов М.П., 1979]. Осенью 1958 г. чумная эпизоотия среди полёвок зарегистрирована на территории высокогорья Армении [Абгарян Г.П., 1966].

Штаммы чумного микроба от полёвок, описанные различными исследователями, обладали как типичными, так и оригинальными свойствами. Сумма сведений о сходстве штаммов *Y. pestis*, выделенных от разных видов полевок, позволила в дополнение к предложенной ранее [Леви М.И., 1959; Алиев М.Н. 1969] «песчаночьей» разновидности доказать и самостоятельность «полёвочьей» разновидности [Леви М.И. с соавт., 1961]. Таким образом, вид *Y. pestis* был разделён на сурочью, сусликовую/песчаночью, крысиную и «полевочью» разновидности, которые с учётом их индивидуального отношения к глицерину и способности к денитрификации соответствуют предложенным за рубежом биоварам *antiqua*, *mediaevalis*, *orientalis* [Devignat R., 1951].

Критериями принадлежности бактерий чумы к «полевочьей» разновидности первоначально было наличие признаков, ранее не использованных для внутривидовой дифференциации чумного микроба: (1) способность ферментировать рамнозу (признак характерный для близкородственного возбудителя псевдотуберкулёза) и (2) снижение или отсутствие вирулентности для морских свинок (избирательная вирулентность). В последующем было обнаружено, что штаммы, аналогичные «полёвочьим», выделяются также и от пищух в очагах их обитания в ходе эпизоотий [Тимофеева Л.А., Логачёв А.И., 1978].

Долгие годы исследование «полёвочьих» штаммов проводилось спорадически отдельными авторами. Однако в последнее время, в связи с расширением возможностей для анализа ДНК, интерес к ним у нас в стране и за рубежом резко возрос. Пока окончательно согласованного решения о таксономическом положении этих обособленных штаммов не принято, но исследования проводятся всё более интенсивно. У нас они направлены на детализацию характеристик штаммов с целью доказательства правомерности разделения рамнозопозитивных штаммов чумного микроба, выделенных от полёвок и пищух, на дополнительные подвиды. За рубежом задачи изучения особенностей тех же бактерий несколько иные. Ранее у нас в стране было высказано предложение [Мартиневский И.Л., 1969] выделить эти бактерии из

вида *Yersinia pestis* и отнести к отдельному виду *Yersinia pestoides*. С учётом этого за рубежом «полёвочки» штаммы условно сейчас отнесены к группе «*Pestoides*». Изучается их принадлежность к виду *Y. pestis* и позиции по ходу эволюционного развития этого вида. После сравнительного анализа геномных секвенсов классических штаммов KIM и CO92 с геномом «атипичного» штамма 91001 от полёвок в Центральной Азии было сделано заключение, что «полёвочки» штаммы, представителем которых он является, составляют ветвь, отщепившуюся от возбудителя псевдотуберкулёза раньше других [Roumadnac P. et al., 2006]. Недавно опубликовано предложение китайских специалистов, выделить штаммы, изолированные от полёвок во внутренней Монголии в Китае, в число которых входит 91001, в отдельный четвёртый биовар «*microtus*» (полёвочий) [Zhou D. et al., 2004]. Это предложение является повторением и подтверждением заключения М.И. Леви и его учеников, сделанного почти 50 лет назад, об обособленности «полёвочьей» разновидности и возможности её разделения на «монгольскую» арабинозонегативную и «закавказскую» арабинозопозитивную [Леви М.И., 1961; Касаткин Н.Ф., 1963]. Однако признаки для введения биовара «*microtus*» должны быть чётко определены с учётом существования в других очагах тоже «полёвочьих» штаммов, которые отличаются от исследованных «*microtus*» по многим свойствам, включая структуру генома. Проводимый в объёме данного обзора анализ является одним из необходимых шагов для последующего корректного решения вопроса о таксономической позиции «полёвочьих» штаммов и их причастности к возникновению чумных эпидемий. Здесь мы попытались обобщить основные данные литературы, касающиеся особенностей «полёвочьей» разновидности чумного микроба.

К настоящему времени известно, что некоторые виды полёвок в отдельных ареалах играют роль основных носителей *Y. pestis*. Вместе со своими блохами при благоприятных условиях они способны поддерживать размножение бактерий чумы и сохранять локальные очаги инфекции в длинном ряду поколений грызунов.

Из 109 современных видов полёвок, обитающих в Евразии и в Северной Америке (Калифорния), более чем у 13 в естественных условиях обнаружена чума [Кучерук В.В., 1965]. Наименее чувствительны к ней - полёвки Брандта и афганские

полёвки, наиболее чувствительны – обыкновенные и общественные, а остальные занимают промежуточное положение [Петров П.А. и др., 1966]. В большинстве известных очагов полёвочьего типа ведущую роль в эпизоотии чумной инфекции играют полёвки рода *Microtus*: обыкновенная, узкочерепная, кустарниковая, арчëвая, Брандта, серебристая, калифорнийская. Вовлекаются и плоскочерепные полёвки [Соловьева В.Е., 1955]. Полёвочки природные очаги чумы занимают особые районы в пределах высокогорья, а именно, среднегорье. Они локализованы на небольших территориях обитания полевок, пищух и других мелких и мышевидных грызунов [Слуцкий А.А., 1998]. В них сложились особые закономерности эпизоотий, которые протекают вяло и длительно [Леви М.И. и др., 1961; Петров П.А. и др., 1966]. Наиболее известные автономные природные очаги чумы, где основными носителями бактерий чумы являются полёвки, пищухи и другие мелкие грызуны, перечислены в таблице 4.1. Считают, что здесь сформировался свой вариант возбудителя чумы, во многом отличающийся от классического [Ковалёва Р.В., 1958; Тимофеева Л.Ф. и др., 1966; Тимофеева Л.А., Логачёв А.И., 1978; Суңцов В.В., 1997].

4.2.1. Фенотипические особенности «полёвочьих» штаммов *Y. pestis* из разных высокогорных очагов Закавказья и Центральной Азии

В процессе длительного наблюдения за «полёвочьими» очагами были выявлены основные признаки, которые в сумме могут отличать штаммы «полёвочьей» разновидности от классических штаммов *Y. pestis*, выделяемых от других грызунов, верблюдов и людей. Кроме рамнозопозитивности и избирательной вирулентности, включающей авирулентность для большей части основных носителей возбудителя чумы (серых сурков, малых и малоазийских сусликов, больших песчанок и крыс) [Ананян Е.Л., Юндин Е.В., 1966; Темиралиева Г.А. и др., 1979; Шаймердинова А.К. и др., 1989], а также для некоторых лабораторных животных (морских свинок) [Леви М.И. и др., 1961; Логачёв А.И., Михайлов Е.П., 1984] обнаружены и другие отличительные свойства. **Стабильность рамнозопозитивности** при гомогенности популяций по этому признаку у «полёвочьих» штаммов коррелирует со способностью **утилизировать мелибиозу**. В связи с чем, отношение к мелибиозе рассматривается как их генетическая метка. [Тимофеева Л.Ф. и др., 1966; Мартиневский И.Л., 1969; Пейсахис Л.А., Степанов В.М., 1975 и др.].

Число этих отличительных признаков увеличивается по мере изучения штаммов. Установлено, что **питательные потребности** «полёвочьих» штаммов, как правило, превышают те, которые имеются у классических рамнозонегативных штаммов за счёт добавочной ауксотрофности по аргинину, лейцину или витамину В₁ [Сучков Ю.Г. и др., 1980; Розанова Г.Н. и др., 1988; Апарин Г.П., Голубинский Е.П., 1989]. Соответствующие типам ауксотрофности гены у «полёвочьих» штаммов, видимо, в значительной степени дефектны, поскольку, судя по данным литературы, получить «гипотрофные» варианты по отдельным аминокислотам у штаммов «полевочьей» разновидности не просто. В то время как из популяций классических штаммов *Y. pestis* удается селекция даже полных прототрофов, хотя и с очень низкой частотой [Мартиневский И.Л., 1969]. Правда, отдельные Rha-штаммы с оригинальной повышенной питательной потребностью описаны и вне полёвочьих очагов [Мартиневский И.Л., 1969].

В некоторых исследованиях у «полёвочьих» штаммов выявлены способность к **дезаминированию аспартата** [Меринов С.П. и др., 1980; Bearden S.W. et al, 2009], активность **оксидазы фенилаланина и триптофана**, а также дефектность по **изоцитратлиазе** [Куклева Л.М. и др., 2001]. У некоторых из полёвочьих штаммов обнаружена **глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа** [Bearden S.W. et al, 2009]. Этим они отличались от классических рамнозонегативных штаммов чумного микроба, имеющих миссенс-мутации в соответствующих генах, и были похожи на бактерии возбудителя псевдотуберкулёза. Конкретный очаг выделения этих штаммов в работах не указан, поскольку главной задачей были поиски отличий исследуемых «полёвочьих» штаммов от классических рамнозонегативных штаммов чумного микроба, а не решались вопросы относительно вариабельности самой рамнозопозитивной «полёвочьей» разновидности и её дифференциации на дополнительные подвиды.

Кавказские «полёвочьи» штаммы по аналогии с возбудителем псевдотуберкулёза способны усваивать в качестве источников углерода формальдегид, бензальдегид, уксусный, масляный, изомасляный, изовалериановый и кротоновый альдегиды и не усваивают *p*-диметил-аминобензальдегид. И согласно тем же наблюдениям классические штаммы *Y. pestis* не усваивали ни один из

указанных **альдегидов**. Это, с одной стороны, сближает исследованные «полёвочки» штаммы с возбудителем псевдотуберкулёза, с другой - позволяет рассчитывать на эффективность применения этого теста в случаях идентификации иерсиний [Коровкин С.А., Адамов А.К., 1980].

Интересным отличием «полёвочьих» штаммов, которое может иметь значение при внутривидовой градации чумного микроба, является их устойчивость к **триметоприму**. Показано, что только закавказские и монгольские штаммы чумного микроба устойчивы к нему в присутствии тимина или тимидина в среде культивирования [Кравченко А.Н. и др., 1989]. Позже была установлена повышенная чувствительность кавказских «полёвочьих» штаммов к бактерицидному действию нормальной сыворотки человека [Гвозденко Н.А. и др., 1992] и, в частности, к её комплементу, которая, судя по данным одной из работ, может быть связана с дефицитом N-ацетилглюкозамина в ЛПС [Anisimov A.P. et al., 2005].

Способность микробов к восстановлению нитратов в нитриты (**реакция денитрификации**) среди «полёвочьих» штаммов *Y. pestis* отмечена лишь у циркулирующих в Закавказье [Касаткин Н.Ф., 1963а; Анапин Г.П., Голубинский Е.П., 1989]. Тогда как многие «монгольские» штаммы не способны восстанавливать нитрит, что с учётом глицеринпозитивности позволяет эти две группы штаммов по Devignat отнести к биоварам *antiqua* и *mediaevalis*, соответственно. Из четырёх разновидностей (крысиная, песчаночья, субликовая, сурчиная) только сурчиная (по свойствам соответствующая *var. antiqua*) обладает этим свойством. Это свидетельствует в пользу её близкой генеалогической связи с кавказскими «полёвочьими» штаммами и, в свою очередь, с бактериями псевдотуберкулёза [Мартиневский И.Л., 1969].

Большинство вариантов чумного микроба могут конститутивно продуцировать собственный специфический **бактериоцин (пестицин 1)**, подавляющий жизнедеятельность родственных бактерий псевдотуберкулёзного микроба серовара O:1 и отдельных штаммов энтеробактерий. Все бактерии чумы синтезируют рецептор пестицина, который обеспечивает контакт бактериоцина с клеткой. Однако классические штаммы *Y. pestis* синтезируют специфический белок иммунитета, благодаря чему они устойчивы к действию собственного и гетерологического

пестицина. Рамнозопозитивные «полёвочки» штаммы *Y. pestis*, циркулирующие в природных очагах Кавказа, Горного Алтая, Гиссарского хребта, в пустыне Гоби и на Северо-Западе Монголии, как правило, отличаются от классических. Штаммы, основными носителями которых являются обыкновенные полёвки из закавказских Армянского, Грузинского, Азербайджанского и Дагестанского очагов, лишены пестициновой, коагулазной и фибринолитической активностей. Они полностью чувствительны к пестицину I, если их ген рецептора не повреждён. Часть «монгольских» штаммов чумного микроба от полёвок из алтайского и гиссарского мезоочагов продуцируют пестицин I и чувствительны к нему, независимо от того, собственный он для этого штамма или гетерологичный [Мартиневский И.Л., Кусакин А.А., 1967; Зундуй Чимит и др., 1966; Кольцова Е.Г., 1971; Гольдфарб Л.М., Шанина Л.Н., 1967; Грамотина Л.И., 1987]. В то же время подобные штаммы таласского и улэгейского очагов, устойчивы к действию собственного пестицина I, но чувствительны к пестицину I классических штаммов неполёвочьих разновидностей *Y. pestis*.

Одним из существенных видоспецифических признаков *Y. pestis* является плазмидный состав, размер плазмид и особенности структуры. [Апарин Г.П. и др., 1988; Балахонов С.В., 1989; Гончарова Н.А. и др., 1989; Иванова В.С. и др., 1990; Филиппов А.А. и др., 1992; Кутырев В.В., Проценко О.А., 1998], Продукция пестицина I и сопряженный с ней синтез фибринолизина, плазмокоагулазы и белка иммунитета закодированы на **плазмиде pPst** (6 МД). Кавказские «полёвочки» штаммы в отличие от других лишены этой плазмиды. Напротив, эта плаزمида присутствует и даже может иметь увеличенную до 8 МД молекулярную массу (М.м.) у штаммов, выделенных от полевок Брандта и монгольских пищух в Монголии и в Горном Алтае [Апарин Г.П. и др., 1988; Балахонов С.В., 1989; Иванова В.С. и др., 1990; Филиппов А.А. и др., 1992; Zhou D. et al., 2004]. Имеется сообщение о частой утрате ими pPst-плазмиды, что делает эти дефектные варианты в некотором отношении похожими на закавказские «полёвочки» штаммы [Апарин Г.П., 1978].

Специфическая для *Y. pestis* высокомолекулярная плаزمида pFra/Tox отвечает за продукцию специфичного для *Y. pestis* F1-антигена и «мышинного» токсина (фосфолипазы D). У большинства, а в некоторых группах у всех

«полёвочьих» штаммов она может иметь увеличенную М.м., достигающую 75-90 МД в зависимости от географического очага персистенции микроба (вместо 65 МД у классического) [Балахонов С.В., 1989; Иванова В.С. и др., 1990; Балахонов С.В. и др., 1991]. На электрофореграммах с увеличенной плазмидной ДНК «полёвочьи» штаммы чётко отличаются от классических. На этом основании показатель величины М.м. плазмиды предлагается в качестве дифференциального, так же, как вариабельность плазмиды пестициногенности (её отсутствие или увеличенная М.м.) [Кутырев В.В., Проценко О.А., 1998]. Показано, что, невзирая на изменение структуры и увеличение плазмиды pFra/Tox, у штаммов *Y.pestis*, выделенных от полёвок, не нарушен синтез F1-антигена [Гончарова Н.А. и др., 1989]. Напротив, титр его чаще оказывался выше, чем у штаммов классического типа, выделенных в «неполёвочьих» очагах [Абгарян Г.П., 1966]. Более того, в денситограммах белковых препаратов, приготовленных из бактерий *Y. pestis* «полёвочьей» разновидности из кавказского и гиссарского мезоочагов, отмечено значительное увеличение количества «мышинного» токсина [Калмыкова Л.И., 1983]. В исследованиях «полёвочьего» штамма из Закавказья обнаружена повышенная активность «мышинного» токсина [Ананян Е.Л., Юндин Е.В., 1966]. Рестрикционный анализ ДНК, обсуждаемой высокомолекулярной плазмиды pFra/Tox «полёвочьих» штаммов выявил её отличие от плазмиды классического подвида по числу и расположению содержащихся в ней IS-элементов. Характер отличий зависел от принадлежности штамма к конкретному географическому очагу [Бобров А.Г., Филиппов А.А., 1997]. При исследовании высокомолекулярной плазмиды pFra/Tox из «полёвочьего» закавказского штамма (*Pestoides F*) выявлена вставка фрагмента ДНК около 30 кб (тыс. нуклеотидов) с неидентифицированными функциями вне оперонов синтеза Саf1 белка и «мышинного» токсина [Филиппов А.А., Бобров А.Г. цит. по Кутырев В.В.Проценко О.А, 1998.]. Позже при исследовании аналогичной плазмиды из штамма *Pestoides F* (Грузия) в ней были обнаружены фрагменты ДНК энтеробактерий, содержащие в том числе и гены *tra*-оперона [Prentice M.B. et al, 2001; Golubov A. et al., 2004]. Наличие фрагментов *tra*-оперона может быть причиной устойчивости многих закавказских «полёвочьих» штаммов к колифагу T7,

не лизирующему бактерии кишечной палочки, содержащие F-плазмиды фертильности.

Особенности структуры обнаружены и у **pCad –плазмиды** при секвенировании её ДНК [Бобров А.Г., Филиппов Ф.Ф., 1998; Zhou D. et al., 2004; Anisimov A.P. et al., 2007]. Так, у «полевочьего» закавказского штамма *Pestoides F* детерминируемый этой плазмидой V-антиген представлен вариантом, характерным для *Y. enterocolitica* O:3 серовара [Worsham P.L., Hunter M., 1998]. Эти же отличия в *lcrV* гене при секвенировании описаны и в другой работе [Garsia E. et al., 2007]. В некоторых мезоочагах Алтая встречаются варианты, у которых эта плаزمида достигает М.м.50 МД, как у *Y. pseudotuberculosis*, вместо классической типичной для *Y. pestis* - 47 МД. В процессе белкового секвенса обнаружены отличия аминокислотной последовательности в Vag-белке у Rha⁺ «полевочьих» и классических эпидемически опасных штаммов *Y. pestis*.

Несовершенство внутривидовой градации вида *Y. pestis* и отсутствие общепризнанных в мире позиций в отношении различных групп «полевочьих» штаммов не позволяют иногда чётко определить таксономическую значимость особенностей видоспецифических плазмид чумного микроба. Изменения в плазмидах чётко характеризуют «полевочьи» штаммы, но не всегда принимаются во внимание систематиками при их дифференциации от классической разновидности чумного микроба, для которой подобные вариации М.м. всех плазмид не характерны. В связи с этим на первом этапе обсуждения проблемы градации внутри вида было внесено предложение: если измененная М.м. плазмиды регистрируется у подавляющего большинства штаммов в определенном мезоочаге, она может быть его маркером [Балахонов С.В. и др., 1991; Ян Гуйжун, 1999]. Мы согласны с данным заключением, но большую заинтересованность у нас вызывает мнение о том, что стабильные особенности видовых плазмид у групп штаммов *Y. pestis*, должны расцениваться как дополнительные критерии внутривидовой таксономической дифференциации [Кутырев В.В., Проценко О.А., 1994; и др.]. То же отношение у нас к закономерному выявлению у групп штаммов одинаковых криптоических плазмид. Эти показатели должны быть включены как один из дополнительных таксономических признаков подвидов. Особенности плазмидного состава

некоторых подвидов «полёвочьей» разновидности *Y. pestis* – чёткий маркер, он оказывается полезным при дифференциации их от Rha⁺ мутантов основного подвида, имеющих другой патогенетический потенциал [Трухачёв А.Л. и др., 2007].

Штаммы «полёвочьей» разновидности оригинальны и **по чувствительности** к некоторым **бактериофагам**. Они лизируются бактериофагом M1, тогда как штаммы сурчиной, сусликовой, песчаночьей и крысиной разновидностей к нему устойчивы [Гольдфарб Л.М. и др., 1984]. В пробах с R-специфическими полигостальными фагами FP1 и FP3 при 26°C Rha- «классические» штаммы *Y. pestis* лизируются обоими фагами, а при 37°C только фагом FP3, и лизис был выражен слабее. Иначе характеризуются штаммы «полёвочьей» разновидности. [Балахонов С.В. и др., 2001; Гремякова Т.А. и др., 1997]. Описаны бактериофаги II, III и IV серотипов, специфические для отдельных групп «полёвочьих» штаммов [Гольдфарб Л.М. и др., 1984; Ковалёва Р.В., 1958; Новосельцев Н.Н. и др., 1990; Плотников О.П. и др., 1990; Кудрякова Т.А. и др., 2000] (см.гл.2).

Опубликованы данные о группах «полёвочьих» штаммов *Y. pestis*, которые по типу пигментсорбции и мутаций соответствующих генов, имеют сходство с близкородственным возбудителем псевдотуберкулёза [Kutirev V.V. et al., 1992; Зудина И.В. и др., 1997; Подладчикова О.Н. и др., 2002; 2003].

В связи с рамнозо-ферментативной активностью проблемным является вопрос идентификации атипичных неполёвочьих штаммов *Y. pestis*, способных ферментировать этот углевод. Учитывая существование рамнозопозитивной «полёвочьей» разновидности чумного микроба с избирательной вирулентностью или полностью авирулентных, в том числе и для людей, внимание к Rha⁺ штаммам классической *Y. pestis* и их дифференциации от «полёвочьих» штаммов должно быть повышенным. Сам по себе Rha- фенотип, наиболее часто используемый специалистами при идентификации, может реверсировать у отдельных клонов в Rha⁺. Свидетельство этому – данные экспериментальных селекционных работ и отдельные находки способных к ферментации рамнозы «классических» штаммов возбудителя чумы. Факт селекции Rha⁺ клонов из Rha⁻ популяций *Y. pestis*, в том числе из вакцинного штамма EV76, известен давно [Свиридова Л.С., 1970; Логачёв А.И., Жамьянсурен П., 1980], но идентичность этих штаммов с представителями

«полёвочьей» разновидности не доказана. Как правило, рамнозопозитивные клоны у основного подвида появляются в популяциях диссоциирующих штаммов. Это часто сопровождается изменением формы колоний, утратой чувствительности к диагностическим бактериофагам, общим снижением вирулентности, питательными потребностями и появлением ферментативной активности по отношению не только к рамнозе, но к мелибиозе и даже к мочеvine. Иными словами, имеет место изменение фенотипа в сторону *Y. pseudotuberculosis* [Арсеньева Т.Е. и др., 2007].

Нами из музейной коллекции Ростовского противочумного института были отобраны Rha⁺ штаммы, ранее выделенные в сурочьих, сусликовых, песчаночьих природных очагах, и несколько штаммов от больных людей, заразившихся в этих очагах. Специальные исследования с привлечением дополнительных критериев дифференциации, включая молекулярно-биологические, показали их таксономическую принадлежность к классическому типу *Y. pestis* [Иванова В.С. и др., 2007]. Изучение возможности их реверсий к полноценной типичной форме чрезвычайно важно, также, как определение критериев их идентификации.

Известно, например, что в Прикаспийском степном очаге Терско-Сунжинского междуречья от группы малых сусликов были выделены штаммы *Y. pestis* с Rha⁺ и Pst^s фенотипом, характерным для кавказских штаммов «полёвочьей» разновидности [Тарасова В.Е. и др., 1983]. Известен случай выделения Rha⁺ и Rha⁻ культур из организма одного сурка [Апарин Г.П., 1978]. Обнаружены Rha⁻ культуры среди штаммов, выделенных в «полёвочьем» Гиссарском очаге [Дерлятко К.И. и др., 1992] и в зоне Закавказского высокогорья [Розанова Г.Н. и др., 1988]. Подобные факты известны и в отношении штаммов, циркулирующих в улэгейских очагах Северо-Западной Монголии и в южно-гобийском её аймаке, где персистируют «полёвочьи» штаммы [Тимофеева Л.А., Логачёв А.И., 1978]. Выделение от одного грызуна культуры, содержащей рамнозопозитивные и негативные клоны [Апарин Г.П., 1978], а также существование Rha⁺ и Rha⁻ вариантов чумного микроба в одной норе грызунов [Алиев М.Н., 1969] может быть следствием смешанной инфекции бактериями классического микроба чумы и «полёвочьего». Или же оно обусловлено сменой хозяев нор при сохранении их эктопаразитов. Это вполне возможно, если учесть, что ареалы распространения тех и других носителей оригинальных штаммов

бывают близки друг к другу или перекрываются. Близость в этих случаях очагов с персистенцией классических Rha⁻ штаммов и недостаточная дифференциальная характеристика этих штаммов не позволяют сделать заключение о существовании рамнозо-ферментативной variability у «полёвочьих» вариантов чумного микроба. Следует лишь подчеркнуть, что у свежесделанных штаммов способность (или неспособность) ферментировать рамнозу проявляется четко и как весьма стабильный признак. При этом состав популяций штаммов по этому признаку, как правило, однородный. Тогда как у длительно сохраняемых образцов он может изменяться в ту или другую сторону и снижать степень своей выраженности. Ясность в этом отношении может внести лишь исследование генетических основ, как самой ферментативной активности, так и её variability.

За ферментацию рамнозы у *Y. pestis* отвечают три структурных гена и три вспомогательных [Englesberg E., 1957], повреждение любого из них может приводить к рамнозонегативности. При существовании возможности полной или частичной реверсии признака реально появление у Rha⁻ бактерий выраженной в разной степени способности к ферментации рамнозы, независимо от принадлежности. Частота возникновения редких рамнозопозитивных мутантов в старых культурах чумного микроба при неселективных условиях культивирования по имеющимся данным довольно низкая (около 10^{-11}), а максимум приходится на 6-8 день культивирования, когда основная масса популяции уже начинает на питательной среде погибать. Появление у бактерий чумы способности ферментировать рамнозу не связано с переходом в бактерии псевдотуберкулёза [Englesberg E., 1957a]. Это положение позволяет лишь условно ориентироваться на ферментацию рамнозы при межвидовой дифференциации иерсиний. Секвенирование фрагментов хромосом штаммов чумного микроба различных классических биоваров чумного микроба и вновь предложенного Rha⁺ биовара «*microtus*» позволило не только определить общую структуру их хромосом, но выяснить также механизмы и локализацию мутационных изменений конкретных генов.

При сравнении геномной последовательности *rha*-оперона с помощью ПЦР-анализа получены сведения, представленные в базе данных GenBank. Они

подтверждают раннее представление о конкретной генной структуре этого оперона [Englesberg E., 1957, 1957a] и свидетельствуют об отсутствии у возбудителей чумы и псевдотуберкулёза различий в генном составе *rha*-локуса, который включает три структурных *rha* гена (*A*, *B*, *D*), два регуляторных - *rhaR*, *rhaS* и ген транспортного белка *rhaT*. Данные одной из экспериментальных работ свидетельствуют о том, что гены *rhaB*, *rhaD* и *rhaT* у этих иерсиний не отличаются, а в структурном *rhaA* и регуляторных *rhaR* и *rhaS* обнаружены различия в нуклеотидной последовательности. У исследованных классических Rha- штаммов *Y. pestis* в гене *rhaS* при сравнении с генами возбудителя псевдотуберкулёза обнаружены те же 5 нуклеотидных замен, которые приведены для Rha- штаммов в базе данных GenBank. При сравнении Rha- классических и Rha+ «полёвочьих» штаммов *Y. pestis* структура генов *rhaA* и *rhaR* у всех была одинакова. Отличительным признаком, а следовательно, возможным маркером классических Rha- штаммов было наличие **гуанина** в положении 671 п.н. в гене *rhaS* вместо **аденина** у «полёвочьих» штаммов и псевдотуберкулёзного микроба. Оригинальные «метки» обнаружены у гиссарских и улэгейских «полёвочьих» штаммов. У них же вместо **цитозина** в положении 494 н.п., характерного для возбудителя псевдотуберкулёза, был обнаружен **тимин**, а у гиссарских была ещё одна замена: в положении 482 н.п. находился **аденин**, тогда как у остальных «полёвочьих» штаммов в этом сайте был **гуанин**. Отличия в единичных заменах нуклеотидов в *rhaS* гене у штаммов разного происхождения может быть, по мнению определивших их исследователей, использованы при внутривидовом делении *Y. pestis* на подвиды [Куклева Л.М. и др., 2007, 2008].

В заключение следует отметить, что установить рамнозопозитивность штамма не достаточно для представления его в качестве представителя «полёвочьей» разновидности или *a priori* считать его избирательно и недостаточно вирулентным и не опасным для людей. Рамнозопозитивные варианты *Y. pestis*, с учетом возможности появления реверсирующих рамнозопозитивных мутантов классических штаммов возбудителя чумы, нуждаются в изучении по другим признакам, характерным для «полёвочьих» штаммов, чтобы их таксономическая позиция, а соответственно, эпизоотическая и эпидемическая значимость были определены более точно.

4.3. Ферментация арабинозы (ara) и уреазная активность (ura)

Выше мы отмечали, что штаммы трех ранее известных классических биоваров возбудителя чумы (*antiqua*, *mediaevalis*, *orientalis*), обладают способностью **ферментировать арабинозу** подобно возбудителю псевдотуберкулёза за счёт арабинозоизомеразной активности. Однако на отдельных территориях среди существующих в природе рамнозопозитивных «полёвочьих» штаммов *Y. pestis*, персистирующих в эндемичных высокогорных очагах, где основными носителями являются полёвки и пищухи (см. выше), выделяются штаммы, отличительным признаком которых является **неспособность ферментировать арабинозу**. Это качество характерно только для части рамнозопозитивных «полёвочьих» штаммов, а именно для тех, которые выделяются в мезоочагах, локализованных в Монголии и высокогорных очагах Центральной Азии, находящихся в относительной близости к ней. Данный факт ставит свойство ферментировать арабинозу в разряд важных диагностических признаков. С учётом этого признака первоначально было предложено разделить «полёвочью» разновидность чумного микроба на закавказскую арабинозопозитивную (Ara+) и на монгольскую арабинозонегативную (Ara-) [Касаткин Н.Ф., 1963a]. Хотя при поколонийном анализе среди «полёвочьих» монгольских штаммов обнаружены единичные изоляты, популяции которых содержали до 15% и более Ara+ клеток. Их присутствие могло обеспечивать позитивные результаты при тестировании этих штаммов в жидкой среде Гисса с арабинозой [Касаткин Н.Ф., 1963, 1965].

Таблица 4.1

Характеристика очагов распространения штаммов *Y. pestis* «полёвочьей» разновидности.

№ п/п	Наименование очага	Основной носитель	Второстепенные носители	Ссылка
1.	Закавказский высокогорный (Ленинканский, Присеванский, Зангезурокарабахский, Джавахатский хребет)	полёвка обыкновенная	мышь лесная	[Абгарян Г.П., 1966; Бабёнышев В.П и др., 1960; Петров П.А. и др., 1966]
2.	Закавказский горный (Дагестан, Кокмадатский участок)	полёвка обыкновенная	мышь лесная, полёвка водяная	[Абдурахманов Г.А. и др., 1978]
3.	Забайкальский (граница с Монголией)	пищуха даурская, полёвка Брандта	полёвка стадная	[Апарин Г.П., Солодка А.Д. 1966; Ковалёва Р.А., 1958]
4.	Горно-Алтайский (сев. окраина Салюгемского хребта, Южно-Чуйский хребет)	пищуха монгольская	пищуха даурская, пищуха алтайская, хомячок джунгарский	[Тимофеева Л.Ф. и др., 1966; Шамова А.М., 1961]
5.	Горно-Алтайский (Таджикистан Дарвазо-Гиссарский хребет)	полёвка арчовая	мышь лесная, соня лесная	[Головко Э.Н. и др., 1973]
6.	Северо-Восточная Монголия, пустыня Гоби, Баян-Улэгей	пищуха монгольская	не указаны	[Тимофеева Л.А., Логачёв А.И., 1978]
7.	Тянь-Шаньский. Таласский хребет Беш-Ташский участок	полёвка серебристая	сурок красный	[Тюлембаев М.Х. и др., 1982]
8.	Северная Америка, Зап. Калифорния горный район Сан-Бруно	полёвка калифорнийская	не указаны	[Козлов М.П., 1979; Мартиневский И.Л., 1969]

В других работах также указывается, что все «полёвочки» штаммы, циркулирующие в алтайском, гиссарском, таласском, улэгейском мезоочагах и названные ранее «монгольскими» могут оцениваться как Ara- [Головко Э.Н. и др., 1973; Меринов С.П. и др., 1980; Тюлембаев М.А и др., 1982; Султанов Г.В., Козлов М.П., 1995 и др.]. Этим данным противоречат сообщение о том, что арабинозу ферментируют все штаммы чумного микроба кроме выделенных от полёвок в зоне Гиссарского хребта Тянь-Шаня [Пейсахис Л.А., Классовский Л.Н., 1974]. Подтверждение арабинозопозитивности улэгейских Rha⁺ штаммов *Y. pestis*, выделенных от пищух Гобийского очага в Монголии можно найти и в другой работе [Кутырев В.В., Проценко О.А., 1998]. Китайские специалисты выделили штаммы чумного микроба с фенотипом Rha⁺, Ara⁻, от полёвок во Внутренней Монголии в Китае. Они предложили эти штаммы отнести к отдельному биовару «*microtus*» [Zhou D. et al., 2004]. Неспособность ферментировать арабинозу использована ими в качестве критерия, дополняющего признаки биоваров по Devignat. При сравнении свойств этих штаммов со свойствами дополнительных подвидов, Ara⁻ штаммы *Y. pestis*, выделенные во Внутренней Монголии Китая и причисленные к вновь предложенному биовару «*microtus*», можно, скорее всего, соотнести с гиссарскими или некоторыми алтайскими штаммами чумного микроба. Что касается разногласий по поводу характеристики Ara⁻ фенотипа у «монгольских полёвочьих» штаммов, то ключ к этому дают исследования популяционного состава (Касаткин Н.Ф., 1963). В смешанных популяциях, если дефекты генов реверсильные, возможно смещение их в сторону Ara⁺ при хранении.

Генетическая информация относительно этого свойства у *Y. pestis* закодирована на шести генах *araABFGHC*, которые составляют *ara* оперон [Sheppard D., Englesberg. E., 1966]. К настоящему времени определен и механизм утраты этой ферментативной активности. Показано, что мутация в гене *araC* приводит к Ara⁻ фенотипу этих необычных штаммов. Ген *araC* детерминирует синтез регуляторного репрессорного белка. Этот белок в отсутствие арабинозы замыкает оперон в петлю и таким образом препятствует считыванию информации. В присутствии арабинозы репрессор связывается с ней, что приводит к размыканию петли и активации *ara*-оперона. Штаммы арабинозо-отрицательные имеют две мутации в *araC* со сдвигом

рамки считывания: делецию, протяжённостью 122 п.о. от 27-го до 138-го нуклеинового основания, и вставку G (гуанин) у основания 773, в результате чего репрессор не может связываться с арабинозой и прекращать, таким образом, репрессию *ara* оперона [Zhou D. et al., 2004]. О наличии вставки нуклеотида со сдвигом рамки считывания сообщается и в другой работе [Ерошенко Г.А. и др., 2008].

Ещё одним дифференциальным признаком является способность **ферментировать мочевины**. Этот вопрос долгое время обсуждался в литературе. Как правило, возбудитель чумы *Ure⁻*. но у некоторых штаммов чумного микроба уреазы выявляется при разрушении бактериальных клеток [Mollaret H.H. et al., 1964; Полосмаков В.Э. и др., 2002]. Иногда она определяется у свежевыделенных штаммов чумного микроба в период острой эпизоотии [Пунский Е.Е., 1966; *цит. по* Домарадский И.В., 1976], но, при затухании процесса и при хранении культур без дополнительной селекции на питательных средах признак уреазопозитивности, как правило, утрачивается. И эта характеристика стойко сохраняется в последующем. Однако *Ure⁺* фенотип может восстанавливаться у клонов культур диссоциирующих штаммов, которые часто параллельно уреазной активности восстанавливают не свойственную классическому возбудителю чумы способность ферментировать рамнозу, мелибиозу и проявлять резистентность к диагностическому бактериофагу [Арсеньева Т.Е. и др., 2007].

Геном *Y. pestis* содержит полный *ure*-оперон, состоящий из трёх структурных генов (*ureA*, *ureB*, *ureC*) и четырёх вспомогательных (*ureD*, *ureE*, *ureF*, *ureG*) [De Köning-Ward T.F., Robins-Browne R.M., 1996]. Причиной ингибиции синтеза уреазы, как полагают, является видоспецифическая вставка добавочного гуанинового остатка в поли-G-участке ДНК в гене *ureD*. Это приводит к образованию стоп-кодона, препятствующего экспрессии оперона и синтезу активной уреазы [Sebbane F. et al., 2001]. Согласно наблюдениям, иногда может происходить делеция этого «лишнего» нуклеотида, в связи с чем, в популяции можно обнаружить *Ure⁺* клоны. Однако индуцирующие эту реверсию агенты и условия, в которых *Ure⁺* клоны *Y. pestis* могли бы иметь жизненное преимущество, пока не определены. А для размножения и сохранения на обычных питательных средах уреазная активность

очевидно не нужна. Это отличает чумной микроб от возбудителя псевдотуберкулёза, уреазная активность для которого является важным фактором жизнеобеспечения и проявляется, по всей видимости, конститутивно.

Невзирая на возможность мутантного появления Ure⁺ клонов особенно на фоне диссоциативной нестабильности генома, общий фенотип популяции *Y. pestis* при идентификации определяется, как правило, как уреазонегативный. Уреазонегативность или позитивность оцениваются как дополнительный диагностический признак, который учитывается в комплексе с другими. Если исключить единичные мутантные Ure⁺ штаммы, которые редко появляются в природных очагах, где циркулирует классический возбудитель чумы, то в «полёвочьих» очагах способность ферментировать уреазу является диагностической. Поскольку этот признак является одним из отличительных для «полёвочьих» штаммов, циркулирующих в зоне Таласского хребта в Киргизии [Тюлембаев М.Х. и др., 1982; Пак Г.Ю. и др., 1983].

Перечисленные выше отличия рамнозопозитивных штаммов могут быть привлечены для установления таксономических позиций возбудителя чумы и его вариантов. Проблема таксономического положения *Y. pestis* очень актуальна. В ней много нерешённых вопросов. С одной стороны, они связаны с несовершенством оценки критериев идентификации, с другой - с продолжающейся наследуемой изменчивостью, которая создаёт возможность появления атипичных клонов чумного микроба, которые сохраняются в природе в виде стойких внутривидовых групп, называемых биоварами, протеиноварами, плазмидоварами, разновидностями и т.п. Решение вопросов таксономии и эволюционной изменчивости чумного микроба, с привлечением современных данных и методов молекулярной биологии, позволит более чётко представить таксономию вида *Y. pestis*. Обсуждение этого вопроса будет приведено ниже.

4.4. Вопросы таксономии и внутривидовой дифференциации *Yersinia pestis*

С момента открытия и выделения возбудителя чумы А.Иерсенем в 1894 г. таксономическое название его и, следовательно, принадлежность к различным родам менялась. Этот микроорганизм в ходе своего изучения обозначался как *Bacillus pestis*, *Bacterium pestis*, *Pasteurella pestis* и, наконец, был отнесен к роду

Yersinia, названному в честь его первооткрывателя, сохранив видовое название - *pestis*. Обнаруженная со временем неоднородность представителей вида по некоторым диагностическим свойствам индуцировала ряд предложений по дополнительному разграничению вида.

Наличие штаммов чумного микроба с фенотипом, почти идентичным фенотипу возбудителя псевдотуберкулёза, неудавшиеся попытки показать существенные отличия микробов при изучении степени гомологии их геномов с помощью ДНК гибридизации и определения пропорций содержания парных нуклеотидов позволили выступить с заявлением о принадлежности этих двух бактерий к одному виду, но к разным подвидам [Bercovier H. et al., 1980]. Однако после острой и длительной дискуссии, с учётом различий клинических проявлений болезни и, следовательно, функциональных основ генома, *status quo* был восстановлен и эти два микроорганизма рассматриваются как близко родственные, но принадлежащие к разным видам одного рода.

Сравнительный анализ структуры ДНК хромосом двух иерсиний привёл к предположению об относительно недавнем в историческом плане формировании чумного микроба из бактерий псевдотуберкулёза серовара *O:1b* [Achtman M. et al., 2004]. После долгих дебатов в настоящее время возбудитель чумы принадлежит сем. *Enterobacteriaceae*, роду *Yersinia* и представляет собой вид «*pestis*». Многие годы высокая вирулентность *Y.pestis* для некоторых видов диких и лабораторных животных, а также для людей, в сочетании с замедленным ростом бактерий на плотной питательной среде в виде колоний в *R*-форме, с чувствительностью к диагностическим чумным фагам, неспособностью роста на голодных средах и способностью продуцировать специфический капсульный антиген, с отсутствием подвижности и жгутиков, а также с отсутствием ферментативной активности по отношению к рамнозе и мочеvine, считались надёжными признаками при идентификации возбудителя чумы и дифференциации его от близкородственного предка, входящего в тот же род *Yersinia* - *Y. pseudotuberculosis*.

4.4.1. Рамнозопозитивные варианты чумного микроба

Выявление рамнозопозитивной разновидности чумного микроба, основным носителем которой являются полёвки и пищухи, обитающие в высокогорных очагах, с момента обнаружения разрушило стройную систему взглядов на вид *Y. pestis* и привлекло особое внимание к «полёвочьим» штаммам. Обособленность этой разновидности от других, представляющих классический вариант возбудителя чумы, и сходство с возбудителем псевдотуберкулёза, впервые установленные М.И. Леви [1961] стимулировали интерес исследователей. Позже эту разновидность дополнительно разделили на две части: (1) «полёвочью» **арабинозопозитивную кавказскую** и (2) «полёвочью» **арабинозонегативную монгольскую разновидности** [Касаткин Н.Ф., 1963; 1963a]. Многократно подтверждённая в последующем оригинальность штаммов, выделенных от полёвок, а позже и от пищух, определило обоснованное стремление исследователей доказать целесообразность подвидовой градации *Y. pestis* [Апарин Г.П., Голубинский Е.П., 1989].

Именно в связи с этим, было предложено рамнозопозитивные «полёвочьи» штаммы включить в подвид *Y. pestis semiplenus*, который, считают, занимает промежуточное положение между возбудителями чумы и псевдотуберкулёза [Михайлова Р.С., 1964]. В Подкомитет по номенклатуре Международной ассоциации микробиологических обществ была направлена рекомендация, выделить из вида *Y. pestis* самостоятельный вид *Y. pestoides* [Мартиневский И.Л., 1969]. К этому виду были отнесены штаммы с характеристикой, присущей «полёвочьей» разновидности. При этом новый вид дополнительно подразделялся на **три разновидности**: *parvocaucasica*, *altaica* и *transbaicalica*. Первая из них соответствовала разновидности «полёвочья кавказская», а две другие - «полёвочья монгольская» [Леви М.И. и др., 1961; Касаткин Н.Ф., 1961, 1963]. У нас в стране эти наименования не «прижились», хотя за рубежом, судя по публикациям, вышеуказанные штаммы, предложенные как *Yersinia pestoides*, обозначают именно как группа «*Pestoides*», не выводя за пределы вида «*pestis*» и обозначая штаммы в соответствии с особенностями свойств и очагом выделения индексами *A*, *G*, *F* и т.п. [Worsham P.L., Hunter M., 1998; Radnedge L. et al., 2002; и др.].

Анализ признаков штаммов *Y. pestis* с помощью числовой таксономии позволил разделить рамнозопозитивные «полёвочки» штаммы на два подвида, дополнительные к основному: *altaica* и *caucasica* [Тимофеева Л.А., 1972], что практически согласуется с более ранним предложением [Касаткин Н.Ф., 1963]. Основными дифференциальными признаками при этом были способность ферментировать арабинозу и пестициногенность, включая связанную с ней плазмокоагулазную и фибринолитическую активности. Позже, с учетом ферментации мелибиозы, питательных потребностей и географической приуроченности, из числа рамнозопозитивных штаммов были выделены пять подвидов: *Y. pestis* ssp.: *plana*, *montanahissarica*, *montanatienschanica*, *montanacaucasica*, *montanaaltaica* [Пейсахус Л.А., Степанов В.М., 1975]. Предлагалось также и несколько иное деление на подвиды. Все «полёвочки» штаммы считалось возможным обозначить как подвид *Y. pestis* ssp. *microti*, включающий три биовара: *altaica*, *caucasica*, *hissarica* [Козлов М.П., 1979]. Затем был предложен ещё один подвид – *ulegeica* [Тимофеева Л.А., Логачев А.И., 1978]. Вопросы таксономии возбудителя чумы, в частности рамнозопозитивных штаммов, выделенных от полевок, обсуждались и другими авторами [Апарин Г.П. и Голубинский Е.П., 1989] с привлечением методов числовой таксономии, с помощью которых продемонстрирована отдалённость «полёвочьих» штаммов от классических. В 1980 г. в горных очагах Тянь-Шаня в лесном поясе Таласского Алатау в ходе эпизоотии в автономном очаге от серебристых полевок, красных сурков и лесных мышей впервые были выделены штаммы, первоначально уреазонегативные. Позже – было установлено, что они разлагают мочевины в течение 3 суток подобно возбудителю псевдотуберкулеза [Тюлембаев М.А. и др., 1982]. Результаты исследования штаммов послужили основанием для выделения ещё одного подвида “*talassica*”. Однако этот подвид ещё слабо изучен и не нашел пока полного признания в пределах России.

В настоящее время у нас в стране для рамнозопозитивных «полёвочьих» штаммов используют номенклатуру «подвидов», принятую на Всесоюзном совещании специалистов противочумной системы в 1985 г. (г. Саратов, РосНИПЧИ «Микроб»), но не утверждённую в Международном таксономическом Комитете.

Согласно этой номенклатуре вид *Y. pestis* разделён на основной классический подвид и четыре дополнительных подвида, хотя фактически он разделен на две части. Сурчиная, сусликовая, песчаночья и крысиная разновидности составляют относительно однородный основной классический подвид *Y. pestis - ssp. pestis*, а гетерогенная «полевочья» [Леви М.И. и др., 1961] разновидность представлена у нас в стране в настоящее время пятью **дополнительными подвидами**: *caucasica*, *altaica*, *hissarica*, *ulegeica* и предложенным позднее *talassica* (табл. 4.2.).

Таблица 4.2

Используемая внутривидовая дифференциация *Y. pestis*

№ п/п	Разновидность	Биовар (var.)	Подвиды ⁾
1.	сурчиная [Туманский В.М., 1968]	<i>antiqua</i> [Devignat R., 1951]	<i>Y. pestis ssp. pestis</i>
2.	сусликовая [Туманский В.М., 1968]	<i>mediaevalis</i> [Devignat R., 1951]	
3.	песчаночья ⁾ [Леви М.И., 1959]	<i>mediaevalis</i> [Devignat R., 1951]	
4.	крысиная [Туманский В.М., 1968]	<i>orientalis</i> [Devignat R., 1951]	
5.	полёвочья [Леви М.И. др., 1961; Касаткин Н.Ф., 1963] а) монгольская б) кавказская	<i>microtus</i> [Zhou et al., 2004] <i>зрyнна Pestoides</i> [Worsham P., Hunter M., 1998]	<i>Y. pestis ssp. caucasica</i> <i>Y. pestis ssp. altaica</i> <i>Y. pestis ssp. hissarica</i> <i>Y. pestis ssp. ulegeica</i> <i>Y. pestis ssp. talassica</i> [Тюлембаев М.А. и др., 1982]

Пояснения: ⁾ - «Песчаночья» разновидность выделена из «сусликовой» на основании оригинальной способности группы штаммов в отличие от остальных «сусликовых» вызывать бактериемию у «левобережных» больших песчанок. По критериям биоваров обе разновидности относятся к *var. mediaevalis*.

⁾ - Подвиды представлены под названиями, рекомендованными на Всесоюзном совещании специалистов противочумной системы в г. Саратове РосНИПЧИ «Микроб» в 1985 г. [Апарин Г.П., Голубинский Е.П., 1989]. Такое предложение было направлено в Международный таксономический Комитет, г. Париж.

Уже сама по себе такая дифференциация вида привлекает внимание и свидетельствует о разнородности бактерий основного подвида *Y. pestis ssp. pestis* и бактерий, причисляемых к «полёвочьей» (рамнозопозитивной) разновидности, которая составляет 5 дополнительных подвидов *Y. pestis*.

В таблицах 4.3 и 4.4 приведены основные отличительные признаки фенотипов штаммов *Y. pestis* дополнительных подвидов, классифицированных с учётом свойств и в соответствии с географическим расположением природных «полёвочьих» и «пищуховых» очагов. Чёткие отличия по нескольким свойствам характерны для подвида *caucasica* (оригинальная ауксотрофность, отсутствие минорной из плазмид и связанных с ней свойств, атипичность структуры двух других плазмид, ферментативная активность по отношению к арабинозе и нитритам и др.). Различия штаммов других подвидов на данный момент можно увязать только с особым географическим расположением очагов их персистенции и оригинальными питательными потребностями. Для выявления других отличий требуются дополнительные специальные исследования.

Потребность в определённых факторах роста при 28°C является одним из признаков внутривидового различия (табл. 4.3). У дополнительных подвидов она, как правило, превышает потребность, характерную для классических штаммов основного подвида. Хотя этот факт не совсем понятен, если принять во внимание мнение ряда исследователей о промежуточном положении этих штаммов между прототрофным микробом псевдотуберкулёза и умеренными ауксотрофными бактериями классического возбудителя чумы. Исключение составляет подвид *ulegeica*, который не отличается в этом отношении от основного подвида *pestis*. Среди других признаков, дифференциальных для подвидов предлагается учитывать ферментацию нитратов, мочевины, арабинозы, продукцию пестицина 1 и чувствительность к нему, особенности плазмидного состава, географическую локализацию очагов персистенции этих штаммов. В таблице 4.4 указаны особенности ферментативной активности различных биоваров и разновидностей *Y. pestis*.

С нашей точки зрения, многие проблемы, связанные с таксономическим положением, эволюцией, этиологической ролью и эпидемиологической

значимостью дополнительных подвидов *Y. pestis*, требуют особого внимания, более глубоких исследований и новых решений. Расширенная характеристика «полёвочьих» штаммов необходима уже потому, что используемый специалистами признак рамнозонегативности, как указано выше может восстанавливаться у отдельных клонов популяций штаммов, принадлежащих к основному подвиду. Это требует подбора эффективных приёмов идентификации таких *Rha+* мутантов, а также решения вопроса об эпизоотической и эпидемической значимости, дистанцируя их от «полёвочьих» штаммов чумного микроба.

Таблица 4.3

Маркеры ауксотрофности «полёвочьих» штаммов *Y. pestis* в зависимости от их подвидовой принадлежности

Подвид	Наличие маркера ауксотрофности						
	Phe/ (Tyr ⁻)	Cys ⁻	Met ⁻	Thr ⁻	Leu ⁻	Arg ⁻	B ₁ ⁻
основной (рамнозонегативный)- <i>pestis</i>	#	#	#	#			
дополнительные (рамнозопозитивные):	#	#	#	#		#	#
<i>caucasica</i> (Арм.)	/						
<i>caucasica</i> (Даг-1)	(#)		#	#		#	#
<i>caucasica</i> (Даг-2)	#		#	#	#	#	#
<i>hissarica</i>	#	#	#	#	#		
<i>altaica</i>	#	#		#	#	#	
<i>ulegeica</i>	#	#		#			
<i>talassica</i>	#	#		#	#	#	
	/						
	(#)						

Пояснение:

/ (#)– есть зависимость от фенилаланина / (тирозина), Зависимость от Phe- фенилаланина, Tyr – тирозина, Cys –цистеина, Met – метионина, Thr –треонина, Leu – лейцина, Arg – аргинина, B₁ – тиамина (витамина B₁); Арм – Армения, Даг-1, Даг-2 – различные зоны кавказского нагорья в

Дагестане [*Апарин Г.П., Голубинский Е.П., 1989; Пейсахис Л.А., Степанов В.М., 1975; Султанов
Г.В., Козлов М.П., 1995*]

Штаммы монгольской и кавказской «полёвочьей» разновидностей (обозначенные у разных авторов как «не основные» или «дополнительные» подвиды *Y. pestis*, «*var. microtus*» (монгольские) и «*Pestoides*» (кавказские и монгольские)), судя по данным литературы, в последнее время привлекают большое внимание [Klevytska A.M. et al., 2001; Pourcel M.B. et al., 2004; Radnedge L. et al., 2001; Zhenya F. et al., 1998; Worsham P.L., Hunter M., 1998; Zhou D. et al., 2004]. За рубежом в основном решаются вопросы особенностей структуры их геномов. Однако, с нашей точки зрения, аспекты микробиологии, биологии, и эпидемической значимости не меньше нуждаются в дополнительных исследованиях.

По ряду вопросов в литературе накоплены существенные данные. Но эти исследования, на наш взгляд, не всегда систематизированы, недостаточно полные и часто касаются только отдельных подвидов и групп штаммов, и даже отдельных штаммов. Их трудно экстраполировать на все подвиды или «полёвочью» разновидность (биовар) в целом. Ниже (табл. 4.4) приведены сведения об отличиях, так называемых подвидов, принятые на сегодняшний день в нашей стране в качестве признаков для внутривидовой дифференциации. Не все свойства представляют собой узаконенные критерии для определения таксономических позиций, поскольку большинство из них должно основываться на общих стойких различиях в структуре геномов, а не на фенотипических проявлениях, подверженных индивидуальным вариациям. Наиболее рациональным для корректного таксономического деления вида *Y. pestis* является детальное исследование молекулярной структуры геномов и выявление общих стабильных особенностей, специфических для биоваров и разновидностей. Только это позволит на законных основаниях ввести единую градацию вида *Y. pestis*. Вопрос об особой таксономической позиции штаммов «полёвочьей» разновидности относительно тех представителей вида *Y. pestis*, которые способны вызывать классическую чуму, поднимался уже во время первоначальных дискуссий по их поводу. Ещё в 1963-1964 г. до внедрения методов анализа структуры ДНК отечественными исследователями высказывались предположения о промежуточной позиции «полевоочьих» штаммов между возбудителями чумы и псевдотуберкулёза.

Таблица 4.4

**Характеристика ферментативной активности бактерий различных групп
вида *Y. pestis***

Группа штаммов	ФЕРМЕНТАЦИЯ						Пестицин (Pst1)	
	дени триф икац ия <i>Nap</i>	глиц ерин <i>Glp</i>	Араб и- ноза <i>Ara</i>	Рам- ноза <i>Rha</i>	Мел ибио за <i>Mel</i>	Моч евин а <i>Ure</i>	Проду кция <i>Pst1</i>	Чувст витель ность к <i>Pst1</i>
<u>биовар <i>mediaevalis</i> «<i>ssp.pestis</i>»</u> (сусликовая /песчаночья разновидность)	-	+	+	-	-	-	+	-
<u>биовар <i>orientalis</i>, «<i>ssp.pestis</i>»</u> (крысиная разновидность)	-	-	+	-	-	-	+	-
<u>биовар <i>antiqua</i> ,«<i>ssp.pestis</i>»</u> (сурчинная разновидность)	+	+	+	-	-	-	+	-
<u>штамм <i>Angola</i> (<i>antiqua</i>)</u>	+	+	нет дан- ных	+	+	нет дан- ных	+	-
<u>Полёвочья разновидность:</u>								
биовар <i>microtus</i>	-	+	-	+	+	-	+	?
<i>ssp.hissarica</i>	-	+	-	+	+	-	+	+/-
<i>ssp.altaica</i>	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>ssp.talassica</i>	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>ssp.ulegeica</i>	-	+	-	+	+	-	+	+/-
<i>ssp.caucasica</i> (<i>Pestoides</i>)	+	+	+	+	+	-	-	+
«полёвочьи» разновидности (кавказская / монгольская)	+	+	+/-	+	+	-	+/ \pm	?
<i>Y.pseudotuberculosis</i> O1b	+	+	+	+	+	+	-	-/+

Примечание: по данным литературы [Devignat R.,1951; Леви М.И.и др., 1961; Касаткин Н.Ф., 1963; Туманский В.М., 1968; Мартинеский И.Л., 1969; Тюлембаев М.Х. и др., 1982; Анарин Г.П., Тимофеева Л.А., 1980; Анарин Г.П., Голубинский Е.П., 1989; Zhou D. et al., 2004]

В последующие десятилетия специалисты пытались решить этот вопрос при анализе структуры генома бактерий разными методами. Известно, что по нуклеотидному

составу ДНК штаммы «полёвочьей» разновидности и классических Rha- штаммов *Y. pestis* являются в высокой степени близкими [Балахонов С.М., 1987]. Однако в микробиологических тестах, по отдельным признакам, выраженное сходство «полёвочьих» штаммов установлено с возбудителем псевдотуберкулеза. Это подтверждает близкое родство двух видов, но свидетельствует о гораздо меньшей таксономической «дистанции» от «полёвочьих» штаммов до классических представителей вида *Y. pestis*, чем до *Y. pseudotuberculosis*. В то же время по данным числовой таксономии «полёвочьи» штаммы, в частности, выделенные в Закавказье, имеют лишь 75% подобия с типичными штаммами других разновидностей, вызывающих классическую чуму людей [Мартиневский И.Л., 1969]. Отличия «полёвочьих» штаммов *Y. pestis* от представителей других разновидностей установлены по результатам генодактилоскопического анализа ДНК различных штаммов с помощью ВХ зонда (повторяющиеся фрагменты IS элемента) [Горшков О.В., 2000]. Использование мультилокусного VNTR- анализа (MLVA) штаммов различного происхождения [Klevitska A.M. et al., 2001] дало возможность исследователям предположить, что изученные ими штаммы *Pestoides* возникли компактно непосредственно после возникновения штаммов биовара *antiqua*. Изучение VNTR-генотипа по (CAAA)*n*-локусу показало, что кавказские «полёвочьи» штаммы имеют в среднем в 2 раза меньше повторов, чем классические штаммы *Y. pestis*: сурчинные (биовар. *antiqua*), песчаночьи и сусликовые (биовар. *mediaevalis*) [Сучков И.Ю. и др., 2002].

Схему взаиморасположения различных групп «полёвочьих» штаммов чумного микроба на эволюционном «дереве» пытались определить, используя данные о расположении и кратности повторов IS285, IS100 и тандемных повторов [Бобров А.Г. , Филиппов А.А., 1997; Pourcel M.V. et al., 2004]. По результатам ПЦР с соответствующими праймерами авторы заключили, что «полёвочьи» штаммы, выделенные в зоне Закавказского высокогорья, более древние и являются промежуточным звеном между возбудителями классической чумы и псевдотуберкулёза.

Подтверждение групповой неоднородности «полёвочьей» разновидности и целесообразности введения дополнительной градации *Y.pestis* на подвиды получено

при изучении структуры генома штаммов с помощью ПЦР, при использовании в качестве праймеров DFR-фрагментов и VNTR-повторов [Radnedge L. et al., 2001; Pourcel M.B. et al., 2004]. Установлено наличие среди *Pestoides* штаммов («полёвочьих»), представителей биоваров *antiqua* и *mediaevalis* (соответственно, «кавказские» и «монгольские» штаммы по Н.Ф.Касаткину [1963]). Это, с одной стороны, свидетельствует в пользу генетической разнородности штаммов чумного микроба, отнесенных к группе *Pestoides* (к «полёвочьим» штаммам), с другой – позволяет допустить, что различные подгруппы *Pestoides* (они же дополнительные подвиды) возникли в дискретные промежутки исторического времени. Здесь же [Pourcel M.V. et al., 2004], по результатам мультилокусного VNTR-анализа, было сделано предположение о локализации «полёвочьего» штамма *Pestoides G8687* (изолирован в зоне высокогорья Грузии) между биоварами *antiqua* и *mediaevalis*. Однако по данным анализа DFR-локусов, от возбудителя псевдотуберкулёза сначала отщепился клон *pra-antiqua*, который дал начало клонам-родоначальникам классических форм чумного микроба и первых групп «полёвочьей» разновидности (в оригинальной работе «группам *Pestoides A, B и D*») и только после этого из них появились другие группы «полёвочьих» штаммов (*Pestoides E, G, F*) и другие разновидности [Radnedge L. et al., 2001, 2002].

Эти исследования усиливают позиции сторонников дополнительного деления вида *Y. pestis*, а сама проблема в глобальном аспекте требует согласованности между специалистами всего мира. Убедительные доказательства в пользу этого мнения представлены также в многоплановом обзоре по внутривидовой дивергенции *Y. pestis* [Anisimov A.P. et al., 2004].

Интересные и значительные по информативности данные представлены в работах по сравнительному анализу последовательности нуклеотидов в хромосомах типовых штаммов биоваров *orientalis*, *mediaevalis* и предлагаемого «полёвочьего» биовара *microtus* [Zhou D. et al., 2004]. Выявлена укороченная форма хромосомы у «полёвочьего» штамма и обнаружены некоторые фрагменты ДНК, похоже, обладающие биовар-специфичностью. Анализ особенностей структуры хромосом исследованных штаммов позволил высказать предположение об отдалённости

биовара «*microtus*» от классических штаммов и о том, что биовар *orientalis*, по всей видимости, является производным биовара *antiqua*, а не *mediaevalis*.

К решению таксономических и эволюционных вопросов подходили также с помощью анализа секвенсов ДНК специфических для *Y. pestis* плазмид. Основанием для такого решения были свидетельства большей эволюционной лабильности плазмид, а также известная большая лёгкость приобретения новых фрагментов ДНК, их перестроек и утраты и, соответственно, большая доступность выявления временных параметров всех изменений и тех доноров ДНК, которые участвовали в горизонтальном переносе. По данным этих работ биовары *antiqua* и *mediaevalis* существовали ранее *orientalis*, но и здесь были получены характеристики, существенно отличающиеся от полученных позже для плазмид «полёвочьего» штамма биовара *mediaevalis* [Prentice M.B. et al., 2001]. Несмотря на некоторый разнобой в данных, уже на этом этапе совершенно очевидна неоднородность вида *Y. pestis* и обособленность штаммов, выделенных от полёвок и пищух. Как нам представляется, отличия эти не временны и не случайны.

4.5. Патогенетическая активность «полёвочьих» штаммов *Y. pestis*

Избирательная вирулентность штаммов «полёвочьей» разновидности привлекает внимание специалистов уже давно. Для их характеристики и оценки возможности сохранения таких штаммов в природе важно знание чувствительности к ним различных животных в природных очагах. Интересно отметить, что сами полёвки известных на сегодняшний день видов принадлежат к относительно резистентным к чуме грызунам [Власьянц О.В. и др., 1966; Дятлов А.И., 1974]. Чтобы вызвать инфекционный процесс у них требуются большие заражающие дозы бактерий чумы. При заражении обыкновенных полёвок чумным микробом различных разновидностей бактериемия отмечается лишь у части особей, независимо от дозы инфекта, а интенсивная регистрируется чаще у взрослых полёвок, а не у молодых [Ананян Е.Л. и др., 1966; Давтян Г.Г., Акопян А.К., 1966]. У полёвок она протекает кратко, а блохи быстро освобождаются от возбудителя [Вержущкий Д.Б. и др., 2001]. В связи с этим, для сохранения возбудителя в очаге необходимо вовлечение в эпизоотический процесс других, более чувствительных,

носителей. Ими, в частности, могут быть пищухи, очень восприимчивые к чуме вообще [Маевский М.П. и др., 1980], лесные мыши, красные сурки, которые обитают в тех же природных очагах и, в отличие от других грызунов, чувствительны к штаммам «полёвочьей» разновидности.

При подкожном заражении штаммами сусликовой разновидности (основной подвид, биовар *mediaevalis*) в дозах от $5 \cdot 10^3$ – 10^9 м.к. погибает только около 37% зараженных общественных полёвок. Более устойчивыми оказываются афганские полёвки (5-7%) и чуть меньше (не более 17%) полёвки Брандта, а наиболее чувствительными - высокогорная серебристая и плоскочерепная полёвки. Однако имеются данные [Степанов В.М. и др., 1979], что к некоторым штаммам из «полёвочьего» закавказского очага (штаммы полностью не охарактеризованы по принадлежности к конкретному подвиду) большие песчанки оказались чувствительны в той же степени, как и к сусликовым – бактериемия у них была выражена в одинаковой мере. Подобную чувствительность проявляли в некоторых случаях и песчанки Виноградова. Описаны случаи выделения от агонирующих красных сурков культур чумного микроба со свойствами, близкими к характерным для «полёвочьей» разновидности [Сагимбеков У.А. и др., 1980]. Изучение других грызунов [Ананян Е.Л., Юндин Е.В., 1966; Темиралиева Г.А. и др., 1979; Шаймердинова А.К. и др., 1989] показало, что серые сурки, малые и малоазиатские суслики, большие песчанки практически не чувствительны к штаммам «полёвочьей» разновидности *Y. pestis* из Закавказского, Гиссарского, Горно-Алтайского природных очагов, т.е. к тем, которые представляют дополнительные подвиды *Y. pestis*.

Избирательная вирулентность выявляется и при исследовании на лабораторных животных. В частности, регистрируют высокий уровень вирулентности штаммов при подкожном заражении белых мышей, но при этом они авирулентны или слабо вирулентны для морских свинок [Алиев М.Н., 1969; Логачёв А.И., Михайлов Е.П., 1984; Анарин Г.П., Голубинский Е.П., 1989 и др.]. Причины этого до конца не ясны. Исследования ведутся в разных направлениях. Так, у морских свинок, зараженных бактериями таких штаммов, отмечают слабо выраженные патологические изменения и наличие продуктивных реакций в органах, аналогичные тем, которые

наблюдают при заражении возбудителем псевдотуберкулеза [Акопян А.К., 1966]. В тесте с макрофагами морских свинок имеет место завершённый фагоцитоз [Абгарян Г.П., Самойлова Л.В., 1966]. Установлена слабая выраженность инфекции у заражённых морских свинок в опытах с бактериями *ssp. altaica* [Шамова А.М., 1961]. Наблюдаются изменения в виде гиперплазии подкожной клетчатки и увеличение паховых узлов, но при отсутствии гибели животных. Культуры от забитых морских свинок иногда выделяют на 23 –27 сутки, что свидетельствует о длительном «скрытом» течении инфекции. Сюда же можно отнести случай, когда иммунизированная в эксперименте песчанка была заражена чумой. Она погибла через 252 дня. Из лёгкого выделили вирулентную культуру, а из околопочечного абсцесса – слабо вирулентную [Хрущелевская В.П., Хрущелеская Н.М., 1968].

Среди причин, определяющих избирательную вирулентность, можно назвать, отмеченную выше, атипичность «чумной» рСad плазмиды у штаммов подвида *caucasica*. По причине сходства структуры генов Vag с генами аналогичной плазмиды возбудителя кишечного иерсиниоза нельзя исключить, что атипичная рСad способна вносить изменения в процесс взаимодействия бактерий подвида *caucasica* с организмом морских свинок, влиять на остроту и форму проявления инфекции, приближая их к характерным для энтерогенных иерсиниозов.

Как известно, с вирулентностью возбудителя чумы и некоторых других тяжелых инфекционных заболеваний связывают способность выживать в нормальной сыворотке крови животных и человека [Кравцов А.Н. и др., 1992; Павлович Н.В. и др., 1996; Sorokin V.M. et al., 1995; и др.]. Этот феномен обуславливается как способностью к размножению в условиях дефицита ионов железа, так и резистентностью к воздействию сывороточного комплемента. Штаммы «полевочьей» разновидности, высоковирулентные для белых мышей, чувствительны к действию указанных видов нормальной сыворотки крови в отличие от типичных вирулентных штаммов, принадлежащих к основному подвиду *Y. pestis ssp. pestis* [Гвозденко Н.А. и др., 1992].

Способность сорбировать пигменты (Pgm), согласно формуле [Burrows, 1963], относят к детерминантам вирулентности возбудителя чумы. Мутации к Pgm⁻ у чумного микроба могут быть двоякого качества. Одни штаммы, утрачивая

полностью Pgm-локус и способность к пигментсорбции (Hms^-), становятся устойчивыми к пестицину 1 (Pst^R), если были до того чувствительны. Другие, претерпевая частичные перестройки в Pgm-локусе, теряют только пигментсорбирующую активность и остаются чувствительными к этому бактериоцину. При этом выявляются разные типы структурных изменений. «Полёвочьим» штаммам разных подвидов, в отличие от основного, присущ только второй тип мутаций, поскольку все редко обнаруживаемые Hms^- мутанты, возникающие с частотой 10^{-8} - 10^{-6} , проявляют или сохраняют чувствительность к пестицину 1. Фенотип $Hms^- Pst^R$ у них не обнаружен в отличие от штаммов, принадлежащих к основному подвиду, включая сурчиную, сусликовую, песчаночью и крысиную разновидности [Kutyrev V.V. et al., 1992; Зудина И.В. и др., 1997]. У представителей подвидов, составляющих «полёвочью» разновидность, отмечены также особенности проявления пигментсорбции на среде с геминном или красителем «конго-рот». Так, вирулентные штаммы основного подвида растут на средах с красителями в виде тёмно окрашенных колоний средних размеров (Hms^+ фенотип). Их Hms^- клоны представлены неокрашенными более крупными влажными колониями, а промежуточные формы (Hms^\pm), имеющие темный центр и бледную периферию, встречаются крайне редко. В то же время штаммы кавказского подвида полёвочьей разновидности формируют мелкие, очень плотные интенсивно окрашенные колонии и исключительно редко- Hms^- клоны (с частотой 10^{-8}). Клоны Hms^\pm типа у них не обнаружены. Для штаммов алтайского подвида характерна гетерогенность популяций: в одном посеве регистрируются как интенсивно, так и бледно окрашенные колонии большая часть имеет промежуточный тип окраски Hms^\pm . В основном в виде колоний Hms^\pm типа растут штаммы улэгейского подвида, выделенные от полевок в пустыне Гоби. В генетических исследованиях механизма возникновения Hms^- клонов у «полёвочьих» штаммов не обнаружено мутантов с делецией всего Pgm-сегмента. Описаны два типа мутантов, один из которых реверсировал при $12^\circ C$, другой - при $28^\circ C$. Соответственно, они не продуцировали (или продуцировали) сидерофор и, так же соответственно, выживали или погибали на железodefицитной среде с хелатором железа хромазуолом S [Подладчикова О.Н. и др., 2003]. Эти данные свидетельствуют об особенностях структуры и

функционирования *Pgm*-области и механизма пигментсорбции у штаммов «полёвочьей» разновидности и необходимости более детального исследования этого свойства.

В числе детерминант вирулентности возбудителя чумы упоминают некоторые типы ауксотрофности [Brubaker R.R., 1972]. Так, описано совпадение дефектности *argF* гена со сниженной вирулентностью. Обнаружена близкая к *arg*-генам локализация гена рецептора пестицина, функции которого через метаболизм железа связывают предположительно с реализацией свойства вирулентности *Y. pestis* [Rakin A.A. et al., 1994; Гуревич Г.К. и др., 1991, 1996]. Непосредственно сам рецептор вряд ли участвует в снижении вирулентности для морских свинок, так как практически все «полёвочки» штаммы чувствительны к пестицину 1 других штаммов, а определённые группы их, зачастую, и к собственному, возможно за счёт вариаций в структуре белка иммунности или изменения самого рецептора в сайте, ответственном за взаимодействие с белком иммунности. Однако нельзя исключить, что снижение вирулентности при нарушении целостности *argF* гена связано с одновременным повреждением другого, пока не известного детерминанта вирулентности, специфически активного в организме морских свинок и только структурно сцепленного с *argF* геном. «Полёвочки» штаммы имеют оригинальные питательные потребности, а по типу и множественности ауксотрофности превосходят основной классический подвид чумного микроба. Можно допустить, что дополнительные ауксотрофности по маркерам *tyr*, *arg*, *leu*, *thi* являются результатом перестроек хромосомной ДНК, которые затрагивают соседние гены, связанные с вирулентностью для морских свинок. Показано, что совместная передача маркеров Arg^+ и Thi^+ дефектным по ним «полёвочьим» кавказским штаммам повышала в 28 раз вирулентность рекомбинантов для морских свинок [Кутырев В.В., 1989]. Мутации *aroA*, затрагивающие синтез фенилаланина и тирозина (Tyr^- - одна из ауксотрофностей полёвочьих штаммов подвида *caucasica*), снижает до полной утраты вирулентность полноценного штамма чумного микроба для морских свинок [Oyson P. et al., 1996]. Происходит ли это за счет (1) ко-мутации близлежащих генов, (2) нарушения метаболических цепей или (3) причиной тому происходящие при синтезе белков модификации продуктов, участвующих в

реализации вирулентности, в связи с некорректной заменой дефицитной аминокислоты на другую, ответ на этот вопрос дадут дальнейшие исследования. На сегодняшний день известен лишь факт сочетания избирательной вирулентности и дополнительной повышенной ауксотрофности у «полевочьих» штаммов. Однако большую степень ауксотрофности и зависимость от фенилаланина и тирозина имеют не все «полевочьи» штаммы, а сниженная вирулентность для свинок или её отсутствие - характерный признак для всех дополнительных подвидов, которые объединяет «полевочья» разновидность. Вполне вероятно, что дефекты соответствующих генов синтеза аминокислот не причастны к изменениям вирулентности, это совпадение случайно, или же локализация блока на пути метаболизма фенилаланина и тирозина у «полевочьих» штаммов иная, чем у других «полевочьих» штаммов и штаммов основного подвида *Y. pestis*.

На основании перечня детерминант вирулентности [Brubaker R.R., 1972], причиной избирательной вирулентности закавказских «полевочьих» штаммов одновременно считали дефектность по пестициногенности (Pst⁻), включающей в себя способность продуцировать пестицин 1, плазмокоагулазу и фибринолизин. Попытки ликвидировать эту дефектность и восстановить вирулентность для морских свинок за счет передачи закавказским «полевочьим» штаммам pPst-плазмиды чётких результатов не дали, хотя отмечено некоторое повышение вирулентности отдельных рекомбинантов.

Относительно причин избирательной вирулентности привлекает работа [Fan Zhenya et al., 1998], в которой обнаружили, что у штаммов *Y. pestis*, выделенных от полевок Брандта в Монголии, отсутствует или находится в дефиците один из белков внешней мембраны с молекулярной массой 32 кД, тогда как он полностью экспрессируется у штаммов, вирулентных для людей и морских свинок. Исследования этого белка и соответствующего структурного гена в перспективе может помочь не только совершенствованию средств диагностики, но и идентификации механизмов патогенеза избирательной вирулентности и вирулентности при чуме вообще. Здесь же следует упомянуть, что подобные факты, по всей вероятности, не единичны, поскольку сравнение секвенсов хромосом

классических и «полёвочьих» штаммов свидетельствует об ущербности у последних многих хромосомных генов, а не только связанных с этим мембранным белком.

При исследовании препаратов капсульного антигена F1 чумного микроба, выделенного с помощью фракционирования сульфатом аммония по общепринятому методу [Baker E.E. et al., 1947], в его составе был обнаружен низкомолекулярный липидсодержащий компонент (Flp), обладающий гемагглютинирующей, гемолитической, цитотоксической активностью в отношении эритроцитов II группы крови человека и культуры клеток *HeLa*. Этот же компонент проявлял токсичность и иммуносупрессивность при введении морским свинкам, но не белым мышам [Коссе Л.В. и др., 2002, 2007]. Предварительные данные поиска его у бактерий закавказских «полёвочьих» штаммов позволяют оценить эти эксперименты как перспективные.

В связи с избирательной вирулентностью интересен и другой вопрос, а именно, **вирулентность** «полёвочьих» рамнозопозитивных штаммов для людей, а также оценка их роли как этиологического агента чумы людей и их эпидемиологической значимости. Данные литературы в этом плане разнообразны. Сообщается, что в XVIII–XIX веках на территории Армении были вспышки чумы, которые носили, возможно, аутохтонный характер [Ефременко В.И. и др., 1992]. Известны случаи заболевания бубонной чумой в Закавказском высокогорном очаге и в наше время [Овасапян О.В., Шехикян М.Т., 1989]. Аутохтонный характер предполагают и у Анзобской вспышки в зоне Гиссарского хребта (Таджикистан) [Козлов М.П., 1979]. Но во всех этих случаях отсутствуют подробные данные о штаммах, выделенных от заболевших людей, для точного суждения о подвиговой принадлежности возбудителя или хотя бы о принадлежности их к «полёвочьей» разновидности. Известно, например, что в Закавказье функционирует большое количество мезоочагов. Там циркулируют наряду с «полёвочьими» штаммами и представители основного подвида чумного микроба. С другой стороны, по имеющимся сведениям [Мартиневский И.Л., 1969] в Закавказье не зарегистрировано ни одного антропогенного заболевания у людей, вызванного штаммами, выделенными от полёвок. Аналогичное заключение сделано по алтайским «полёвочьим» мезоочагам

[Тарасова В.Е., 1980]. Об отсутствии заболевания людей в «полёвочьих» очагах имеется также сообщение из Китая [Dongzheng Yu. et al., 1998].

Переносчиками чумы в основном являются блохи, обитающие на носителях-грызунах. Способность микроба стимулировать образование блока из сгустка крови в преджелудке блох и обеспечивать обратный ток в ранку засасываемой и инфицированной крови повышает вероятность заражения очередного донора крови. Показано, что образование блока напрямую связано со способностью бактерий формировать биоплёнку, что происходит в диапазоне температур 26-34°C и в значительной мере способствует эффективной передаче возбудителя чумы от блох к млекопитающим. Шесть Pgm-белков вовлечены в процесс формирования биоплёнки. В HmsF, HmsP, HmsR и HmsT белках опознаны каталитические домены (полисахарид-деацетилазой, EAL-фосфодиэстеразой, гликозил трансферазой и дигуанелат-циклазой, соответственно), а HmsH, и HmsS белки тоже содержат высоко консервативные домены, но функция их неизвестна. Идентифицировано 3 существенных аминокислотных остатка в HmsF белке, 4 - в HmsR, 2 - в HmsS и 4 - в HmsT. Любые мутации в них приводят к неспособности образовывать биоплёнку [Forman S. et al., D-063]. Показано, что у блох, обычно обитающих на полёвках, зараженных «полёвочьими» штаммами, блок не формируется, что возможно связано с наличием дефектов в перечисленных выше белках группы Hms. Учитывая особенности экспрессии Pgm-локуса у полёвочьих штаммов, такую ситуацию нельзя исключить. Эти факты используют в некоторых случаях для объяснения отсутствия вспышек и спорадических заболеваний людей «полёвочьей» чумой. Следует учитывать также, что очаги, где распространены её носители, расположены в гористых малонаселенных районах. Однако установлено, в том числе и на полёвках, что формирование блока не обязательно для заражения чумой через блох [Suleimenov B.M., Atshabar B.B., 1998]. Да и места расположения очагов не настолько безлюдны, чтобы в них не произошло заражение хотя бы одного человека с последующим выделением от него культуры, принадлежащей к подвидам, составляющим «полевочью» разновидность. Проблема эта мало исследована.

В процессе исследования 50 вирулентных штаммов *Y. pestis*, выделенных от людей в разное время в различных очагах мира, не было обнаружено штаммов,

имеющих плазмидный состав, биологические свойства и генетическую характеристику, которые свойственны «полёвочьей» разновидности чумного микроба [Иванова В.С. и др., 1990; Лебедева С.А. и др., 2002]. В литературе нам не удалось обнаружить ни одного сообщения о факте выделения «рамнозопозитивных» штаммов чумного микроба от верблюдов (больных или павших), организм которых высокочувствителен к классическим Rha- бактериям *Y. pestis*.

При обсуждении вопроса о вирулентности Rha⁺ штаммов чумного микроба, следует отметить [Тарасова В.Е. и др., 1984], что в Африке от больных чумой людей выделены глицеринпозитивные штаммы *Y. pestis*, авирулентные для морских свинок. Однако отсутствие детальной характеристики не позволяет судить об их принадлежности к «полёвочьей» разновидности. Данных об авирулентности штаммов для морских свинок для этого недостаточно. Тем более что имеются предположения о возможной циркуляции в Африке самых древних штаммов чумного микроба, более близких по родству к возбудителю псевдотуберкулёза, чем современный биовар *antiqua* [Сунцов В.В., Сунцова Н.И., 2006]

Сравнительно недавно были представлены интересные результаты исследования на добровольцах вирулентности двух штаммов, выделенных от полевок Брандта из Внутренней Монголии (Китай) [Fan Zhenya. et al., 1998a]. Показано, что эти штаммы, вирулентные для мышей, не способны при подкожном заражении вызывать чуму у людей. На основании этих данных авторы сделали вывод об эпидемической безопасности «полёвочьих» штаммов и нецелесообразности проведения противоэпидемических мероприятий и истребительных работ в зонах, где обнаруживаются или распространены подобные штаммы. Нецелесообразность истребительских работ обосновывают также тем, что передача возбудителя чумы у полевок, пищух и мелких мышевидных грызунов осуществляется преимущественно блохами и алиментарно. Контагиозность за счёт аэрозольного пути распространения инфекции не обнаружена [Тарасова В.Е. и др., 1984]. Это существенно отличает инфекцию, вызванную «полёвочьими» штаммами *Y. pestis* монгольского региона от классической чумы. В противоположность этому, имеются данные, что штаммы, выделенные от полевок в Закавказье (в том числе

Pestoides), невирулентны для морских свинок при подкожном заражении, но могут индуцировать заболевание при введении через нос [Ленская Г.Н. и др., 1968].

Такая неопределённость суждений доказывает, что вопрос о вирулентности для людей обсуждаемых штаммов нуждается в тщательной и детальной проработке. На данном этапе изучения «полёвочьих» штаммов пока нет фактических данных и, соответственно, достаточных оснований вообще отрицать какую-либо их патогенетическую активность в отношении людей. Не исключено, что она проявляется в иных формах, чем у классического подвида *Y. pestis*, более близких по характеру патогенеза к проявлениям псевдотуберкулеза, включая кишечную, ангинозную, или, спорадически возникающую, абортивную слабо контагиозную форму инфекции. Однако для суждения об этом нужны дополнительные исследования. Хотя здесь уместно отметить, что у грызунов, инфицированных «полёвочьими» штаммами чумного микроба, как упоминалось выше, патологоанатомическая картина ближе к характерной для псевдотуберкулеза и отличается от типичной для классической чумы.

При экспериментальном исследовании на модели 160 диких полуденных песчанок, после заражения «полёвочьим» штаммом *Y. pestis* у 6 была обнаружена чума с выделением культур возбудителя. Только у трёх песчанок были обнаружены патолого-анатомические изменения в селезёнке. Из них у одной песчанки бактерий чумы в селезёнке было очень мало, а в мазке из зева - много, что наводило на мысль об ангинозном синдроме [Журавлёв И.Я. и др., 1979]. Об ангинозной форме, переходящей в носительство сообщали и ранее. Причём эти сведения касались классических вариантов чумного микроба. Установлено, что при конъюнктивальном и фарингеальном заражении у больших песчанок чумной микроб можно обнаружить в материале из глотки в течение 24 сут с момента заражения. Максимальная продолжительность непрерывного выделения из глотки – 8 сут, хотя иногда бактерии возбудителя удавалось выделить через 25 сут. При этом лихорадочное состояние было в течение 7 сут, после чего, даже при выделении культуры, по общему состоянию и поведению животные выглядели здоровыми. При сохранении микроба в глотке у части животных на 14 сут определялись антитела к F1-антигену. Иными словами, при так называемом носительстве, параллельно развивались

иммунные процессы, которые были недостаточны, для элиминации микроба из глотки. Через 1 мес у носителей средние геометрические титры антител были в 4 раза выше, чем у забитых песчанок. Заболевания в подчелюстных и глубоких шейных лимфоузлах обязательно сопровождалось воспалительными проявлениями в подчелюстных слюнных железах: наличием инфильтратов и некротических инфицированных микробами чумы очагов с некротическим поражением протоков, где имелись скопления этих микробов, выходящих в глотку. Слизистые глотки, гортани, трахеи, пищевода при этом не повреждались. У длительно выживающих (до 30 сут) песчанок наблюдали очаговые или диффузные инфильтраты с признаками рубцевания. Судя по результатам гистологических исследований, размножение возбудителя в этом случае происходило в слюнных железах, а микроб выделялся со слюной. Роль таких носителей в распространении инфекции требует изучения.

Дальнейшее исследование феномена фарингеального носительства чумного микроба в эксперименте на грызунах позволит изучить некоторые аспекты этого состояния и расширить представление о возможной роли зверьков-бактерионосителей в эпизоотологии чумы [Дорожко О.В., 1975; Дорожко О.В. и др., 1976]. Судя по всему, такие формы инфекции могут иметь место и при заражении грызунов «полёвочьими» штаммами *Y. pestis*. [Тимофеева Л.А., Головачёва В.Я., 1975]

Что касается заболевания чумой людей в природных очагах, то по данным литературы, приблизительно у 10% заболевших бубонной чумой поражаются шейные и подчелюстные лимфоузлы, наблюдаются гиперемированный зев, увеличение миндалин, конъюнктивит, герпес, обложенный язык и другие признаки чумы. При глотании появляются боли в горле. У половины больных заболевание протекает легко и кончается выздоровлением. У остальных тяжело и даже со смертельным исходом. Из смывов зева и пунктата шейных бубонов можно выделить возбудителя чумы [Руднев М.М., 1977]. Такая форма свидетельствует об алиментарном пути заражения при употреблении заражённых продуктов или воды. Многие специалисты считают недооцененным путь заражения через рот и носоглотку. Ранее такие заражения оценивались как ангины, в том числе

дифтерийного происхождения [Клодницкий Н.Н., 1922]. Возможно, что именно таким путем происходит заражение при первичных чумных пневмониях [Кулеша Г.С., 1915]. Кстати, ангинозно-железистая форма туляремии также начинается с ангины, когда возбудитель проникает в миндалины, а потом в региональные лимфоузлы. Это характерно для водных и пищевых вспышек туляремии, которые требуют дифференциации от чумы в смешанных природных очагах инфекции. Подобная форма чумы, со слабо выраженными клиническими симптомами, иногда оценивается как носительство [Дорожко О.В., 1975], что подтвердилось в описанных выше экспериментах на песчанках [Дорожко О.В. и др., 1976]. Относительно фарингеальных форм чумы можно с большой долей вероятности предполагать алиментарный путь заражения. В этом случае не исключена вероятность довольно лёгкого течения болезни, проходящего, как правило, малозаметно или нетипично на фоне применения высокоактивных лекарственных препаратов широкого спектра действия, которые часто используют при сильных ангинах неясной этиологии.

Такая ситуация может иметь место на территории Армянского нагорья, где широко распространены «полёвочки» штаммы *Y. pestis* с избирательной вирулентностью. Показано, что рамнозопозитивные полёвочки штаммы из высокогорного Зангезуро-Карабахского мезоочага в Закавказье при подкожном, внутрикожном и внутрибрюшинном заражении морских свинок были авирулентными, свидетельствуя о низкой инфекциозности блох, а при интраназальном – вызывали генерализованную форму заболевания и были вирулентны [Ленская Г.Н. и др., 1968]. Эта особенность «полёвочьей» разновидности чумного микроба была подтверждена и на модели штаммов, выделенных в горно-алтайском природном очаге [Анарин Г.П., 1969].

Патогенетическая активность при разных методах заражения белых мышей сравнивалась у классического штамма *Y. pestis* CO92 и *Pestoides B* (аналог *ssp. altaica*). При подкожном заражении белых мышей инвазивность была значительно ниже у *Pestoides B*, чем у CO92, тогда как при аэрозольном заражении вирулентность была одинакова [Worsham P.L., et al., 2006]. Возможность проявлений лёгочной чумы, вызванной кавказскими «полёвочьими» штаммами *Y.*

pestis предполагается в одной из работ [Samoilova S.V. et al., 1996]. С этим предположением трудно согласиться, поскольку основанием служат данные сравнительных экспериментов по уровню вирулентности при аэрозольном заражении бактериями классического штамма чумного микроба и его же мутантов, утративших плазмиду пестициногенности. Кроме дефектности по этой плазмиде кавказские «полёвочки» штаммы, имеют целый ряд других отличий, обнаруженных различными методами, в том числе и при секвенсе хромосомы, который при сравнении с классическими штаммами чумного микроба выявил делеции и перестройки ряда геномных фрагментов и структурные отличия имеющихся плазмид.

Вполне вероятно, что особенность течения инфекции, обусловленной Rha+ «полёвочными» штаммами, которые способны проявлять патогенность при попадании на слизистую носоглотки, имеет место и у человека. В этом случае вполне можно предполагать преимущественное развитие ангинозной и ангинозно-бубонной форм, при которых затрагиваются слизистая зева, миндалины и подчелюстные лимфоузлы. Течение заболевания может быть лёгким и заканчиваться выздоровлением. Источником инфекции при этом могут быть продукты питания или вода из природных источников, контаминирование которых возможно через больных и погибших от чумы полёвок, особенно водных видов [Руднев М.М. 1977]. Имеются данные, что чумной микроб способен многие месяцы сохраняться, без изменения свойств и вирулентности, в воде при низкой температуре [Гармазова А.Д. и др., 1961; Гармазова А.Д., 1971; Клец Э.И., Щелкунова З.И., 1961]. Следует отметить, что в высокогорье Закавказья существуют смешанные природные очаги инфекций – чума, туляремия – к которым полёвки чувствительны. Более того, когда зверьки заражаются двумя возбудителями, заболевания проходят более остро, чем при заражении каждой инфекцией порознь. При этом инфицирование может происходить как при укусе блох, так и алиментарным путём. Таким образом, вполне возможны заболевания животных и человека «водной» туляремией, которая по клинике аналогична лёгкой форме чумы, вызванной возбудителем с пониженной вирулентностью и контагиозностью. В этих

случаях вполне вероятны сопутствующие ошибки при первичной диагностике [Розанова Г.Н., и др., 1977].

Справедливости ради, обсуждая проблему вирулентности «полёвочьих» штаммов чумного микроба, важно отметить, что в зонах их распространения выделяют единичные варианты *Y. pestis*, **вирулентные для морских свинок**. Такие штаммы описаны в Гиссарском очаге [Дерлятко К.И и др., 1992; Козлов М.П., 2000], в горном Дагестане [Сучков Ю.Г. и др., 1980] и в зоне Армянского высокогорья [Абгарян Г.П., 1966; Розанова Г.Н. и др., 1988]. Однако и в этих работах одной рамнозопозитивности для причисления штаммов возбудителя чумы к «полёвочьей» разновидности недостаточно. Известно, например, что в закавказском очаге на одной территории и даже в одной норе могут персистировать штаммы *Y. pestis*, принадлежащие к двум и даже трем разновидностям, включая «полёвочью» [Алиев М.Н., 1969], что не исключает инфицирования животных смешанными культурами.

Неопределённость суждения по вопросу вирулентности - ещё одно свидетельство **недостаточной изученности** дополнительных подвидов *Y. pestis*, составляющих «полёвочью» разновидность. Поэтому определение степени опасности «полёвочьих» штаммов для человека и выяснение их роли в этиологии классических форм чумы у людей требуют дополнительных исследований. При имеющемся уровне знаний о предмете дискуссии делать заключение о невысоком эпидемическом потенциале «полёвочьих» штаммов следует с большой осторожностью, тем более что дополнительные подвиды *Y. pestis* внутри «полёвочьей» разновидности чрезвычайно разнообразны. Вариации свойств наблюдают даже внутри отдельных подвидов, а в отношении морских свинок регистрируется иногда лишь снижение вирулентности, а не только её полная утрата. Разобраться в этом будет возможно после выяснения различий в механизмах, обеспечивающих вирулентность именно для морских свинок, а не белых мышей. Мы склонны отдать ведущую роль в этиологии классической эпидемически опасной чумы людей основному подвиду *Y. pestis ssp. pestis*. Нам импонирует мнение о меньшей опасности для людей многих штаммов «полёвочьей» разновидности. Но на данном этапе их изучения мы не рискнём исключить возможность, при которой определенные «полёвочьи» штаммы могут вызывать спорадические или групповые

заболевания с оригинальной клинической картиной и хроническим течением, пусть и не сопровождающиеся эпидемическим распространением инфекции. Не исключено и скрытое носительство инфекции, которое может обостриться при неблагоприятных условиях обитания организмов-носителей. Наше предположение согласуется с ранее высказанным мнением [Сагимбеков У.А., 1997]. Однако считают, что при попадании в высокочувствительный организм дефектный штамм может восстановить полностью свою вирулентность. Происходит ли это с «полёвочьими» рамнозопозитивными штаммами пока определенно сказать трудно. Тем более что число дефектных хромосомных генов у полёвочьих штаммов довольно значительно. В настоящее время не ясна связь избирательной вирулентности и других свойств, характерных для «полёвочьих» штаммов. Мало известно о Rha⁺ мутантах основного подвида, отдельные признаки, которых делают их похожими на «полёвочьи» штаммы. Нет систематизированных данных, которые позволили бы сделать выводы о характере изменчивости типичных «полёвочьих» штаммов при их пассажах через природных носителей основного классического подвида *Y. pestis ssp. pestis* (сурков, сусликов, песчанок, крыс), хотя данные о более коротком геноме у этих штаммов по сравнению с классическим подвидом не позволяют считать возможным простую селективную реверсию. Для окончательного вывода по этому вопросу необходимы время достаточной протяжённости и специальные глубокие исследования «полёвочьих» штаммов во всём их многообразии и на большем, чем единичные, числе штаммов.

Перечисленные выше свидетельства оригинальной патогенетической активности «полёвочьих» штаммов заслуживают самого пристального внимания. Однако опубликованные по каждому разделу заключения не могут экстраполироваться на всю «полёвочью» разновидность *Y. pestis*. Во-первых, даже закавказские «полёвочьи» штаммы не совсем одинаковы по фенотипу в разных мезоочагах и являются наиболее близкими к *Y. pseudotuberculosis* по сравнению с «полёвочьими» штаммами из других природных очагов. Они значительно и стабильно отличаются по ряду свойств от штаммов чумного микроба, в своё время названных «монгольскими» [Касаткин Н.Ф., 1963]. Во-вторых, доказательства авирулентности для людей получены только в отношении биовара «*microtus*» и

всего на двух штаммах из Внутренней Монголии Китая [Zhou D. et al., 2004]. Эти штаммы явно не идентичны закавказским «полёвочьим» штаммам, и пока не совсем ясно, к какому дополнительному подвиду (по отечественной классификации) соответствуют. Эти несоответствия не позволяют считать авирулентность для людей установленным свойством всех «полёвочьих» штаммов. Необходимо ещё большой объём экспериментальных работ по сравнительному изучению механизмов и форм патогенетической активности различных групп (подвидов) «полёвочьих» штаммов *Y. pestis* из разных мезоочагов с использованием различных традиционных и оригинальных методов, моделей и способов заражения. На данный момент можно лишь заключить, что:

- 1) в природных очагах персистенции «полёвочьих» штаммов не имеется прямых доказательств заражения этими штаммами людей при последующем антропогенном распространении чумы на фоне протекающих эпизоотий.
- 2) Rha⁺ штаммы, выделенные от больных людей, согласно паспортным данным глубоко не изучены, что не позволяет гарантировать их принадлежность к «полёвочьей» разновидности.
- 3) авирулентность «полёвочьей» разновидности в экспериментах на людях-добровольцах при подкожном заражении показана лишь на двух штаммах из одного природного очага чумы во Внутренней Монголии Китая.

Подводя итог вышеизложенному, представляется важным выделить несколько позиций во взгляде на «полёвочьи» (рамнозопозитивные) штаммы *Y. pestis* дополнительных подвидов. Штаммы, выделенные от полёвок, не всегда являются «полёвочьими» в смысле, определённом М.И. Леви с соавт. [1961], поскольку в некоторых случаях полёвки могут инфицироваться бактериями классического подвида *Y. pestis*. Точно также не все рамнозопозитивные штаммы могут быть отнесены к дополнительным подвидам *Y. pestis* без детального изучения их по совокупности всех признаков, характерных для «полёвочьих» штаммов. Доказанная неоднородность «полёвочьей» разновидности обуславливает необходимость разделить её на группы, имеющие чёткие дифференцирующие свойства, специфические для каждой из них. Эти группы, определённые в нашей стране как подвиды, а за рубежом как группы *Pestoides* с различным буквенным обозначением

или как оригинальный биовар «*microtus*», не позволяют сопоставлять данные исследований в разных лабораториях мира и делать общие выводы. Необходимо профессиональное унифицированное мнение на этот счёт. Выделение всех «полёвочьих» штаммов в объёме одного биовара «*microtus*» [Zhou D. et al., 2004] не корректно. Ещё не установлена их общность по способности (или неспособности) вызывать чуму у людей, но уже известны данные, свидетельствующие об их биологическом разнообразии. Установлены отличия по признакам, характерным для биовара *microtus*, не только у так называемых «закавказских» и «монгольских» штаммов *Y. pestis*, но также и внутри этих групп. Подводя итог по этому вопросу, можно отметить, что по данным литературы недостаточно внимания уделяется «полёвочьей» разновидности *Y. pestis*, а отсюда слабая систематизированность проведенных исследований и, как следствие, недостаточная изученность штаммов по многим свойствам, которые могут быть использованы для разных целей. А именно, способствовать корректной дифференциации дополнительных подвигов друг от друга и от основного подвида, совершенствованию диагностических приёмов и более точной оценке эпидемиологической значимости разных вариантов чумного микроба и, соответственно, более эффективному надзору за чумой.

Всё изложенное выше определяет необходимость дифференциального подхода к виду *Y. pestis* и продолжения углублённых исследований в этом плане для решения вопроса о правомерности причисления оригинальных рамнозопозитивных штаммов, циркулирующих в полёвочьих и пищуховых очагах, к виду бактерий, вызывающих классическую чуму людей, способную к эпидемическому распространению.

Глава 5. Виды изменчивости *Y.pestis*, затрудняющие детекцию и идентификацию

Лебедева С.А., Трухачёв А.Л.

5.1. Введение

Веками сохраняются природные очаги чумы. Эпизоотии в них чередуются с благополучными межэпизоотическими периодами, когда возбудителя чумы (*Yersinia pestis*) не выявляют, а у носителей-грызунов не регистрируют заболеваний [Фёдоров В.Н., 1944; Бибииков Д.И., Бибиикова В.А., 1958; Калабухов Н.И., 1969; Акиев А.К., 1970; Солдаткин И.С., Руденчик Е.В., 1995]. На спаде эпизоотий при обследовании грызунов, их блох и клещей, чаще, чем обычно, выделяют атипичные по идентификационным признакам варианты возбудителя чумы. Одним из первых свойств утрачивается или снижается их патогенетическая активность, а также трансмиссивность. Механизмы перехода *Y.pestis* из типичной формы в атипичную и обратно мало изучены, так же как детали взаимодействия указанных форм возбудителя с чувствительным хозяином. К тому же специфические для чумы патогенетические факторы ещё не все идентифицированы.

Остаётся загадкой и предметом периодически вспыхивающих дискуссий вопрос, как и в какой форме существует возбудитель чумы в очаге в течение нескольких, а иногда и десятков лет без проявлений заболевания чумой у обитателей очага. Полное исчезновение возбудителя чумы в природном очаге и последующий его занос сюда с других территорий в большей части случаев не зарегистрированы. Это подтверждается сохранением от одной эпизоотии до другой фенотипа штаммов чумного микроба, которые во многих случаях имеют стабильные маркеры, характерные именно для данного конкретного очага [Классовский Л.Н. и др., 1976; Розанова Г.Н. и др., 1982]. Маркеры эти, так же, как и привязанность возбудителя к основному носителю являются стабильными.

Сохранение чумного микроба в зонах эпизоотий, без какого-либо специфического для этой инфекции патогенетического проявления у грызунов и без выделения культур возбудителя при массовых обследованиях, позволяют предполагать: сапрофитизацию возбудителя и изменение формы существования, пребывание его в состоянии стаза в биологических объектах или, подобно

возбудителям вяло текущих хронических инфекций, в скрытой форме при трудно диагностируемых заболеваниях.

В литературе представлены разные гипотезы. Согласно одним - возбудитель чумы обитает только в типичной форме. В других –его «переживание» в природе связывают с переходом в атипичные и слабовирулентные формы [Ленская Г.Н., 1959; Иванов С.И., Лисицина А.А. 1964; Хрущелевская Н.М., Бибикова В.А., 1965; Хрущелевский В.П., Хрущелевская Н.М., 1968; Williams et al., 1978; Розанова Г.Н. и др., 1982].

Типичная вирулентная форма *Y. pestis*, как предполагают, может длительно циркулировать в мелких очажках, не индуцируя разлитую эпизоотию [Фёдоров В.Н., 1944; Акиев А.К., 1970; Солдаткин И.С., Руденчик Е.В., 1995; Иофф И.Г. и др., 1951; Тинкер И.С., 1957]. В зависимости от состояния индивидуальной, видовой и гелиозависимой чувствительности грызунов возбудитель способен вызывать острое или хроническое заболевание [Иофф И.Г., Каганова Л.С., 1949]. Благодаря инфицированным эктопаразитам [Евсеева В.Е., Фирсов И.П., 1932; Шарец А.С. и др., 1958; Дмитриевская М.Е., 1961], он может также сохраняться в заражённых норах [Клец Э.И., Щелкунова З.И., 1961; Леви М.И., 1997], особенно замурованных [Акиев А.К., 1970; Дятлов А.И., 1995]. Предполагают также сохранение в почве [Клец Э.И., Щелкунова З.И., 1961; Baltazard M., 1964], в том числе в тесном симбиозе с почвенными бактериями [Ларина В.С. и др., 1992].

Атипичные варианты *Y. pestis* за счёт их сниженной вирулентности могут вызывать хронические формы заболевания без выраженной бактериемии [Николаев Н.И. и др., 1969]. В литературе обсуждается возможность их существования вне макроорганизма в виде L-форм [Ларина В.С. и др., 1992; Степанов В.М. и др., 1980; Дунаев Г.С. и др., 1982], в симбиозе с простейшими [Никульшин С.В. и др., 1992], а также в некультивируемом [Емельяненко Е.Н. и др., 1997; Леви М.И., Сучков Ю.Г., 1997] и нетипируемом [Баканурская Т.Л. и др., 1992] состояниях. Нельзя исключить и другие, пока не известные, формы. Хотя этот раздел науки о чуме разработан слабо. В любом случае, чтобы разобраться в данной ситуации, необходимо детальное изучение механизмов и характера адаптивной изменчивости бактерий *Y. pestis*. Она способствует выживанию и сохранению их в очаге, особенно на этапе

формирования атипичных форм *Y. pestis*, меняющих модус обитания и отношения с чувствительными макроорганизмами [Ларина В.С. и др., 1992; Баканурская Т.Л. и др., 1992].

Прежде всего, необходимо решить вопрос об адекватности используемых в практике диагностических приёмов и используемых питательных сред, выявить те вариации фенотипа возбудителя чумы, которые могут «вывести» микроб из-под контроля и обеспечить ложные «отрицательные» результаты исследования на обсеменённость первичного материала, а следовательно, и очага.

Из числа известных причин отрицательные результаты исследования, в частности, могут быть обусловлены тем, что основные серологические препараты для диагностики чумы, включая экспрессную, сконструированы на основе капсульного антигена возбудителя чумы «фракция 1» (F1) и антител к нему. Однако в числе атипичных штаммов *Y. pestis* известны так называемые «бесфракционные» штаммы чумного микроба, которые обнаруживают в природе и получают в экспериментах [Левина А.А., 1960; Burrows T.W., 1962; Кудинова Т.П., 1963; Осадчая Л.М. и др., 1965; Николаев Н.И. и др., 1969; Пунский Е.Е. и др., 1972; Ларионов Г.М., Пейсахис Л.А., 1972; Коссе Л.В., 1992; Коссе Л.В. и др., 1997 и др.]. Обсуждение этих вопросов и связанных с ними проблем содержится в соответствующем разделе.

5.2. Штаммы *Y.pestis*, дефектные по синтезу антигена F1

Многие годы свойство штаммов возбудителя чумы продуцировать капсульный антиген F1 относили к основным детерминантам его вирулентности [Burrows T.W., Bacon G.A., 1958a]. Выявление его служило подтверждением принадлежности исследуемых бактерий к виду *Y. pestis* (Fra⁺ фенотип). Именно поэтому и ещё в силу высокой иммуногенности F1-антиген использовали и используют как основной иммуноген и диагностический компонент бактерий чумы. Однако со временем многим специалистам в мире среди лабораторных и выделяемых в природных условиях штаммов удалось обнаружить такие, которые были лишены капсульного антигена (Fra⁻ штаммы). В природе эти штаммы чаще выделялись на исходе эпизоотий, но иногда и в начале. Они избирательно утрачивали или резко снижали вирулентность по отношению к некоторым видам носителей, высоко чувствительных к классической форме возбудителя чумы. Это касалось также

морских свинок, но не белых мышей [Burrows T.W., Bacon G.A., 1958; Burrows T.W., 1957, 1963; Surgalla M.J., 1960; Погасий Н.И., Ларионов Г.М., 1980; Сагимбеков У.А., Пошевина Г.О., 1981; Сагимбеков У.А., Рампопорт Л.П., 1983; Топорков В.П. и др., 1987; Кутырев В.В. и др., 1989; Welcos S.L., Andrews G., 1995]. Однако в некоторых природных очагах обнаружены Fra^- штаммы *Y. pestis*, авирулентные и для морских свинок, и для белых мышей. Они же были только слабо вирулентны и для природных носителей таких, как краснохвостые и гребенщиковые песчанки, но высоко вирулентными для больших песчанок [Кудинова Т.П., 1968]. В то же время известны Fra^- штаммы, обладающие универсальной вирулентностью для лабораторных животных [Акимович В.В., Шанина Л.Н., 1969; Кутырев В.В., 1992].

Обнаружены также Fra^\pm штаммы, у которых синтез F1 можно выявить в препаратах разрушенных клеток, что позволяет данный фенотип связать с нарушением секреции антигена, но не синтеза [Проценко О.А. и др., 1983; Burrows T.W., Bacon G.A., 1958]. Сообщается, например, что штаммы *Y. pestis* подвида *ulegeica* после выделения от носителей в природном очаге и при хранении на питательных средах резко снижают уровень продукции антигена F1 и переходят в Fra^\pm форму [Вершинина Т.М., 1986]. Имеются сведения о том, что изменение свойств бактерий чумы из Алтайского природного очага происходит перманентно и в организме переносчиков в стадии имаго. При этом возбудитель сохранялся в организме самок блох в течение 21-22 мес [Базанова Л.П. и др., 2007]

Штаммы с нарушенной продукцией F1-антигена вызывают у чувствительных к ним организмов не острое заболевание чумой, а её «подострую» форму, которая отличается затяжным инфекционным процессом, в том числе длительным инкубационным периодом или даже вялым скрытым течением. У лабораторных животных, после заражения исследуемыми Fra^- штаммами, происходила и достоверная задержка сроков гибели. Частота и степень таких отклонений клиники инфекции в сторону подострой формы зависит от вида, индивидуальных особенностей организма-носителя и состояния его иммунной системы, а также от свойств штамма чумного микроба, вызвавшего инфекцию.

Штаммы с Fra^\pm фенотипом, которые синтезируют, но не секретизируют капсульный антиген, выделены и от больных людей, что, с одной стороны,

подтверждает их опасность, а с другой – затрудняет их детекцию и идентификацию, поскольку основные усилия и приёмы диагностики направлены в основном на выявление F1-антигена. [Burrows T.W., Bacon G.A., 1958; Winter C. Cherry W., Moody M., 1960].

Как аргумент, противоречащий первостепенной значимости для вирулентности Caf1 белка, доминирующего в F1 антигене, в дискуссиях иногда приводят факт авирулентности для морских свинок Fra⁺ «полёвочьих» штаммов чумного микроба из Закавказья. Уровень продукции F1-антигена у них, по данным литературы, зачастую значительно выше, чем у классических вариантов *Y.pestis* [Абгарян Г.П. 1966]. Однако у этих штаммов может быть другая структурная организация F1-антигена. Так, сравнительно недавно сообщалось, что у закавказских «полёвочьих» штаммов из Грузии в отличие от типичных F1-антиген обнаруживается в димерной форме [Kekelidze M.G. et al., 2006]. Димерная форма, как известно, отвечает за активацию интерлейкина IL10 и может быть показателем нарушения процесса сборки полимеризованных молекул, участвующих в формировании капсулы. Не исключено также, что у этих штаммов функционирует и другой механизм утраты вирулентности для морских свинок, не связанный с F1-антигеном. Такая ситуация описана для похожих «полёвочьих» штаммов *Y. pestis* из Монголии [Zhenya F. et al., 1998].

Некоторая противоречивость сведений о связи вирулентности с F1-антигеном во многом связана с тем, что заключение о значимости антигена F1 и описание фактов вариаций вирулентности делались, как правило, без исчерпывающего анализа причин, нарушающих продукцию F1-антигена.

С учётом данных о генетических детерминантах можно предположить в этих случаях несколько вариантов событий.

Прежде всего, появление Fra⁻ фенотипа может быть обусловлено не только делециями фрагментов специфической для чумного микроба плазмиды pFra, но и полной её утратой. А она, помимо детерминантов синтеза, «созревания», а также секреции F1-антигена и продукции «мышинного» токсина [Проценко О.Н. и др., 1983] содержит целый ряд других мало изученных оригинальных генов жизнеобеспечения [Prentice M.B. et al., 2001], среди которых могут быть гены,

участвующие в экспрессии вирулентность для морских свинок. Для этих генов признак продукции F1 является просто маркером, свидетельствующим о наличии плазмиды rFra. Утрата одновременно с плазмидой любого из этих генов может привести к независимой от F1-антигена полной утрате вирулентности. С другой стороны, при нарушениях протяжённых фрагментов плазмиды, включающих структурный *fra* ген (*caf1*) и неизученные близлежащие гены, ответственные за вирулентность, происходит видимость корреляции вирулентности именно с F1-антигеном.

Что касается генов, составляющих только *fra*-оперон, то определённую ясность в этом вопросе внесли исследования по направленному мутагенезу. Изучали процесс синтеза, сборки и секреции Caf1 белка. Известно, что образование первичных димеров или тетрамеров субъединиц Caf1 белка происходит при участии шаперона Caf1M, ген которого входит в состав *fra*-оперона (Caf1:Caf1M и Caf1₂:Caf1M). Шаперон стабилизирует мономер субъединицы Caf1 за счёт дисульфидной связи с ней и с участием гидрофобных остатков [MacIntyre *et al.*, 2001]. Стабилизированный мономер объединяется в димеры и тетрамеры и секретируется клеткой, полимеризуясь за счёт активности Caf1A ашера.

При исследовании оказалось, что направленное мутационное выключение синтеза Caf1 белка *per se* не влияет на уровень вирулентности таких мутантных штаммов для белых мышей и морских свинок. Более того, эти штаммы сохраняли вирулентность и способность преодолевать специфический иммунитет у морских свинок, выживших после первичного заражения Fra⁺ штаммами «дикого» типа *Y. pestis* [Анисимов А.П., 1999].

При исследовании роли шаперона Caf1M показано, что нестабилизированный им белок Caf1 образует неустойчивые агрегаты, которые быстро распадаются и на поверхности имеются только в количестве около 13% от суммарного выхода антигена, определяемого в полноценных штаммах «дикого» типа [MacIntyre *et al.*, 2001]. Эти агрегаты накапливаются в цитоплазме и обладают очень слабой иммуногенностью [Titball R.W., Williamson E.D., 2001]. Эти факты совпадают с полученными ранее данными о слабой иммуногенности и сложности получения

антител к дезагрегированной субъединичной форме F1 и её линейным эпитопам, которые, как известно, менее активны, чем конфигурационные [Коссе Л.В., 1992].

При нарушении синтеза ашера Caf1A прекращается полимеризация стабилизированных шапероном Caf1M димерных и тетрамерных, сохраняющих активность, субъединиц, но из-за неспособности к образованию полимеров F1-антигена они накапливаются в неполимеризованном состоянии и не образуют капсулу [Chapman D.A.G. et al., 1999; Zavialov A.V. et al., 2002; Xiaodi Yu, et al., 2008]. Похоже, что для вирулентности важен Caf1-оперон, но не конкретно Caf1 белок, доминирующий в F1-антигене. Специфический линейный эпитоп в отличие от конформационных, важен для опознавания микроба, а не для его вирулентности.

Степень участия шаперона и ашера в реализации вирулентных свойств *Y. pestis* пока не ясна. Хотя уместно отметить, что при изучении состава F1-антигена, выделенного по методу Бейкера [Baker E.E et al., 1952] и гомогенного по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC-анализ), в условиях, обеспечивающих дезагрегацию антигена, выявлен один низкомолекулярный гидрофобный липидсодержащий компонент (F1p), необходимый для образования полимеризованной агрегированной формы F1-антигена [Коссе Л.В., 1992]. Синтез его связан с rFga плазмидой. Учитывая некоторое функциональное сходство с ашером (Caf1A) и в свете обсуждения роли последнего в экспрессии вирулентности, важно напомнить, что компонент F1p помимо полимеризующей активности обладал способностью к гемо- и цитоагглютинации, а также к гемолизу, включая эритроциты кролика и II группы крови человека, на которых проводилось исследование. Он проявлял также цитотоксичность по отношению к клеткам *HeLa* и перитонеальным макрофагам морских свинок, был умеренно токсичен для морских свинок, и в значительной степени именно для них, а не для белых мышей, был иммуносупрессором [Коссе Л.В. и др., 2006; 2006а; Лебедева С.А и др., 2007]. Можно предположить, что при потере способности к синтезу F1p-компонента, микроб будет продуцировать неполноценный капсульный антиген и будет проявлять сниженную патогенетическую активность в организме морских свинок.

В других исследованиях «бесфракционных» штаммов *Y. pestis* были получены данные, которые авторы интерпретировали как свидетельство синтеза атипичных

капсул, содержащих серологически атипичный капсульный антиген. Такие штаммы практически не создавали иммунитета к аналогичным атипичным штаммам и были способны преодолевать иммунитет, индуцированный классическими штаммами *Y. pestis* [Анисимов А.П., Захарова Н.М., 1992]. Патоморфологические изменения внутренних органов у предварительно иммунизированных и интактных белых мышей, павших после заражения штаммами *Y. pestis* с серологически атипичной капсулой, соответствовали признакам острого инфекционного процесса, подобным тем, которые регистрируют при классической чуме [Анисимов А.П., 1999]. Если согласиться с мнением автора о том, что подобные штаммы играют роль в эпизоотиях, то можно поддержать его заключение относительно необходимости целенаправленного поиска подобных вариантов *Y. pestis* в природных очагах. Нам представляется, что такие, не улавливаемые антителами к F1-антигену, штаммы могут долго циркулировать среди грызунов после окончания острой эпизоотии, вызывая вялотекущие заболевания, а в случае реверсий к полноценному фенотипу, индуцировать новую вспышку инфекции. Важно, чтобы механизм утраты способности к продукции F1 не был бы связан с сегрегацией всей rFra плазмиды или с крупной делецией в *caf*-опероне.

По имеющимся наблюдениям, некоторые экспериментальные Fra⁻ варианты штаммов чумного микроба, полученные с помощью встройки транспозонов Tn5, Tn7, Tn10 в гены, связанные с продукцией F1-антигена, после их хранения на Ca²⁺-дефицитном агаре в условиях холодильника утрачивали транспозон, и у них появлялся серологически определяемый F1-антиген [Заренков М.И. 1983; Заренков М.И. и др., 1984]. Доказано наличие собственных природных инсерционных элементов в геноме возбудителя чумы. То же можно сказать о возможности их транслокации и эксцизии [Carniel E. et al., 1987; Филиппов А.А. и др., 1997; Prentice M.B. et al., 2001]. Вполне вероятны флюктуации фенотипов (Fra⁺)↔(Fra⁻), осуществляемые таким путём. Можно даже предположить, что подобные вариации имеют биологическую целесообразность в определённых условиях. В частности, установлено, что после попадания бактерий чумы в преджелудок блох синтез фракции 1 прекращается в течение 2-10 сут, обратно пропорционально повышению

температуры обитания насекомых [*Cavanaugh D.C., Randall R., 1959; Суворова А.Е. и др., 1977*].

Обследование очагов в межэпизоотический период, как правило, направлено или на обнаружение антигена F1, который у «бесфракционных» штаммов не выявляется, или на выделение культуры, первыми признаками которой являются форма колоний, чувствительность к чумному диагностическому фагу и наличие антигена F1. Ситуация с выявлением F1-антигена описана выше. Что касается формы колоний и чувствительности к фагу, то довольно часто атипичные по некоторым свойствам штаммы *Y. pestis* формируют изменённую «сглаженную» форму колоний и хуже лизируются фагом или даже утрачивают чувствительность к нему [*Гребцова Н.Н. и др., 1998; Арсеньева Т.Е. и др., 2007*]. Какова доля таких изменённых вариантов в природе пока не ясно в связи с трудностью их идентификации. Поэтому, обследуя очаги «как принято», мы, видимо, обнаруживаем только верхушку айсберга существующих изменённых штаммов, доступную для выявления с помощью указанных критериев. Более глубокое исследование требует применения других методов детекции и плановых исследований в этом направлении, которые могут оказаться полезными не только для выяснения механизмов variability и сохранения в природе, но и для решения вопросов, связанных с эволюцией возбудителя. В значительной степени может помочь использование не эмпирических мультилокусных ПЦР, а применение высокоспецифичных для вида *Y. pestis* праймеров, выбранных с учётом накопленных оригинальных данных секвенирования геномов у штаммов *Y. pestis*, принадлежащих к разным таксономическим группам. Однако, на наш взгляд, предверием к этому должны быть систематизированные исследования микробиологии атипичных вариантов *Y. pestis* для выяснения наиболее показательных особенностей, а также отбор праймеров, способных контролировать целостность как можно большего числа генов, определяющих видовую специфичность.

Таким образом, «бесфракционные» штаммы *Y. pestis* нуждаются в планомерном исследовании их патогенетической активности, фенотипической и генотипической variability и в совершенствовании подходов для их детекции и идентификации. Особо нужно упомянуть закавказские «полёвочки» штаммы *Y.*

pestis. Утрата ими pFga-плазмиды, зачастую одновременно с проявлениями устойчивости к диагностическим бактериофагам [Гребцова Н.Н. с соавт., 1998], ещё больше усложняет возможность идентификации таких штаммов. Особенно, если учесть, что по ряду свойств сами по себе «полёвочки» штаммы из закавказских высокогорных очагов имеют много общего с возбудителем псевдотуберкулёза. Использовать для идентификации признак пестициногенности также не представляется возможным. Описанные выше «полёвочки» штаммы подвида *caucasica* лишены плазмиды пестициногенности, на которую специалисты ориентируются при детекции *Y. pestis*. Ошибки в диагностике в этом случае были бы не столь опасны, если бы мнение об авирулентности всех «полёвочьих» подвигов для людей было доказано. Однако этот вопрос ещё далеко не решён, и пока нет уверенности в его положительном решении. Это сохраняет закавказские штаммы *Y. pestis* в ранге умеренно опасных для человека и требует пристального к ним внимания и точной идентификации.

Остаётся не решённым ещё один аспект, а именно, способность плазмиды, ответственной за продукцию антигена F1, интегрировать с хромосомой [Проценко О.А. и др., 1992; Lowell J.L., et al., 2007], когда она не выявляется в автономном состоянии, а титр F1-антигена крайне низок. Биологическая роль таких, на первый взгляд, бесплазмидных бактерий чумы мало изучена. В литературе практически отсутствуют сведения о стабильности интегрированного состояния плазмиды, об уровне продукции и свойствах F1-антигена. Далеко не единичные случаи выявления таких штаммов позволяют предполагать некую биологическую целесообразность подобных флюктуаций состояния плазмиды, а также существование определённых механизмов их регуляции. Более детальное исследование феномена и выяснение условий, в которых он закономерен, будет способствовать лучшему пониманию некоторых сторон взаимодействия бактерий чумы с переносчиками и носителями на разных этапах развития эпизоотий и инфекционного процесса.

5.3. Краткие сведения о бактериальной L-трансформации и L-формах возбудителя чумы

С момента открытия и до настоящего времени L-формы бактерий являются предметом внимания широкого круга исследователей и объектом их изучения. В

России впервые эти формы были описаны более 100 лет назад у холерного вибриона, когда их обнаружили после воздействия ионов лития. Позже интерес исследователей привлекли фильтрующиеся формы бактерий и гетероморфный рост бактерий, а затем и L-формы. Первые и последующие чрезвычайно важные этапы их детального изучения у нас в стране связаны с именем академика В.Д.Тимакова, его учеников и последователей [Тимаков В.Д. Каган Г.Я., 1961]. В результате, усилиями многих исследователей были определены основные положения, касающиеся механизмов образования, свойств и биологической роли L-форм. Сформировалось мнение, что L-формы бактерий отражают функциональную мобильность и пластичность бактериальных клеток, которые способствуют адаптации к изменившимся условиям среды обитания [Прозоровский С.В. и др., 1981]. При этом индукторами L-форм могут быть антибиотики, детергенты, ферменты, глицин, а наиболее часто, пенициллин и лизоцим, т.е. агенты, препятствующие формированию нормальной клеточной стенки [Метод. рекомендации..., 1986].

В настоящее время известно, что появление L-форм возможно не только в условиях *in vitro* на питательных средах, но и в культурах клеток млекопитающих [Шмит-Сломска Ж., 1969; Прозоровский С.В. и др., 1976]. Образование L-форм достаточно часто происходит также в макроорганизме при длительном и хроническом заболевании и, особенно, при длительном неполноценном медикаментозном лечении [Цыбина Б.П. и др., 1979; Каган Г.Я. и др. 1971] или в иммунном макроорганизме [Graset E., 1955; Левина Г.А. и др., 1981; Земскова З.С., Дорожкова И.Р., 1978]. L-формы играют существенную роль в иммуногенезе и патогенезе некоторых рецидивирующих и скрытых инфекций, сохраняясь в организме носителя без явных внешних проявлений. Так, бактерии туберкулёза, на фоне специфической вакцинации, уже через 5 мес. переходят полностью в L-формы и могут сохраняться в них, с проявлениями частичных реверсий, около 11 лет [Земскова З.С., Дорожкова И.Р., 1978]. Существует мнение, что в организме млекопитающих могут возникать лишь предварительные формы L-трансформации или нестабильные L-формы, которые способны формировать микроколонии в органах инфицированных животных и быстро восстанавливаться в полноценные

бактерии [Каган Г.Я., 1961; Прозоровский С.В., 1975; Прозоровский С.В. и др., 1981].

Можно считать доказанной возможность существования бактерий большинства видов в двух противоположных формах, которые имеют разную структурную организацию, а именно, бактерии с клеточной стенкой и без неё (L-формы), между которыми имеется несколько промежуточных форм. Это позволяет считать L-трансформацию общебиологической закономерностью для всех бактерий [Тимаков В.Д., Каган Г.Я., 1973; Кац Л.Н., 1980; Константинова Н.Д., Прозоровский С.В., 1981; Fass R.I., Prior R.B., 1974; Madoff S., 1981].

Разрушение клеточной стенки при L-трансформации в основном связано с дефектами синтеза пептидогликана, который является основой клеточной стенки бактерий и у грамнегативных вариантов прочно связан с матричным белком и липопротеином наружной мембраны, а у грампозитивных – с тейхоевыми кислотами. Нарушения на различных этапах синтеза пептидогликана определяют формирование L-форм. При этом происходят структурные изменения клеточной стенки бактерий, и её функции начинает выполнять цитоплазматическая мембрана, которая играет исключительно важную роль в процессе L-трансформации. Помимо того, мембрана выполняет ещё собственные функции: отвечает за проницаемость клетки, процессы активного транспорта и окислительного фосфорилирования, причастна к биосинтезу фосфолипидов, пептидогликана и капсульных полисахаридов.

Способность к формированию L-форм свойственна практически всем изученным видам гетеротрофных бактерий, большинство из которых являются патогенами [Dienes L., 1951, 1953; Смит-Сломска Ж., 1969; Земскова З.С., Дорожкова И.Р., 1978; Прозоровский С.В. с соавт., 1981; Косицина Л.А. и др., 1972; Чеснокова А.А., 1975; Kotega K., Asurin I., Ogonuki H. et al., 1972; Ломов Ю.М., 1987]. Этот процесс зависит, в основном, от трёх факторов: свойства популяций микробов, особенности питательной среды и условий культивирования микроорганизма и наличие агрессивных химических, физических и биологических факторов, способных включать механизмы образования L-форм [Прозоровский С.В. с соавт., 1981]. Конечный результат проявления всех этих факторов во многом

зависит от механизма их действия и видовой принадлежности бактерий. Одни воздействуют на клеточную стенку, разрушая не только её, но и промежуточные продукты её синтеза. Другие - индуцируют мутации генов, детерминирующих отдельные этапы синтеза пептидогликана.

Существует мнение [Тимаков В.Д., Каган Г.Я., 1973; Кац Л.Н., 1980; Прозоровский С.В. и др., 1981; Метод. рекомендации, 1986; Ломов Ю.М., 1987], что изменение фенотипа бактерий в процессе образования и стабилизации L-форм происходит поэтапно с образованием промежуточных форм, но одновременно во всей популяции:

1. наиболее часто имеет место появление способных к репродукции гетеро- и плейоморфных форм несбалансированного роста (нити, вздутия, шары), которые в несколько раз превышают размер исходной бактериальной клетки, имеют неправильную форму и изменённую клеточную стенку, могут быть в колониях в виде чистых культур или вместе с нормальными бактериями;
2. в последующем происходит переход в быстро реверсирующие, после удаления индуцирующего фактора, сферопластные формы, представляющие собой шаровидные образования, также превышающие размер исходных бактерий;
3. затем формируются переживающие формы исходных бактерий, протопласты, которые, в зависимости от продолжительности воздействия индуцирующих факторов, либо гибнут, либо реверсируют в бактериальные формы, однако в определённых условиях могут переходить в L-формы;
4. далее появляются незавершённые L-формы, образования разной величины, шаровидные, вакуолизированные сферопластного и протопластного типа, которые по своей морфологии близки к L-формам;
5. после чего имеет место переход к нестабильным L-формам, которые могут выделяться из организма людей при хронических инфекционных заболеваниях; эти L-формы размножаются почкованием, отделением элементарных телец, удвоением и представляют собой полиморфную культуру из элементарных, шаровидных и крупных тел, нитевидных структур

и неструктурированных масс, у которых выявляется сотовидная система внутренних мембран и миэлиноподобных структур;

6. и ещё один этап - выявление условно стабильных L-форм, имеющих сходство с нестабильными L-формами, но в отличие от них не способных к реверсии на средах культивирования без соответствующего стимулирующего фактора;
7. и, наконец, формирование, как правило, в условиях эксперимента, стабильных L-форм, которые имеют основные характеристики нестабильных, но даже при создании благоприятных условий не могут реверсировать в бактериальные формы; это детерминировано генетически и связано со стабильными мутациями ряда генов, которые не поддаются супрессиям и в природе являются биологическим тупиком.

Основой колоний L-форм, растущих в толщу агарового слоя, является сложный конгломерат нитевидных структур, элементарных телец, шаровидных форм и бесклеточной недифференцированной массы. Минимальные репродуктивные единицы, элементарные тельца размером не более 1 мкм образуются внутри или на поверхности более крупных тел, заключены в мембрану, содержат рибосомы, а часть из них - нуклеоид. Хотя имеются сообщения о наличии у элементарных телец всех органоидов [Кац Л.Н. и др., 1981]. Этим элементарным телам некоторые исследователи отводят основную роль в персистенции L-форм [Green M.T. et al., 1974; Каган Г.Я. и др., 1976]. Наиболее часто L-формы имеют шаровидную форму размером около 5 мкм. При делении они удваиваются или отпочковываются, содержат внешние и внутренние мембранные структуры и нуклеоид. Нити сохраняются в виде одиночных форм или многократно скрученных жгутов. Бесклеточный материал состоит из остатков разрушенных клеток, включающих обломки мембран, рибосомы, нуклеиновые кислоты, содержимое распавшихся клеток. По сравнению с полноценными исходными бактериями L-формы размножаются с низкой эффективностью. Однако имеющаяся у них система внутренних мембран обеспечивает определённую приспособляемость к выживанию некоторое время в условиях иммунизированного или естественно невосприимчивого макроорганизма и в неблагоприятных природных условиях. Поскольку L-трансформация приводит к стиранию отдельных важных различий

между грамотрицательными и грампозитивными бактериями [Тимаков В.Д., Каган Г.Я., 1973; Прозоровский С.В. и др., 1981], то большинство характеристик, описанных для L-форм, может быть экстраполировано на обе группы микробов.

Формы несбалансированного роста способствуют выживанию и сохранению вида в условиях кратковременного действия неблагоприятных химических, физических и биологических факторов. Под их воздействием существенно меняются размеры и форма клеток, однако структура и способ размножения обычно остаются прежними. После прекращения действия неблагоприятных факторов нормальный сбалансированный рост восстанавливается. Сферопласты и протопласты образуются лишь при действии определённых факторов, способных блокировать синтез клеточной стенки в условиях жидкой среды обитания и при нарушении в механизме осмотической защиты [Тимаков В.Д., Каган Г.Я., 1973]. Будучи в протопластной и сферопластной форме, бактерии способны увеличиваться в размерах и делиться. Очень важной и, вероятно, биологически целесообразной, является способность протопластов к слипанию и даже слиянию, образуя конгломераты [Прозоровский С.В. с соавт., 1981]. Предполагают, что эти три начальные формы L-трансформации и нестабильные L-формы являются приспособлением бактерий к переживанию в изменённых условиях среды обитания при ограниченном времени воздействия агрессивных факторов. Эти факторы приводят к изменениям в субмикроскопической организации бактерий, сводящимся, в основном, к нарушению структуры клеточной стенки, ослаблению развития системы внутренних мембран, атипичному делению и супрессии некоторых фенотипических свойств, часть которых может быть отнесена к диагностическим. Известно, что L-формы не растут на обычных питательных средах, не окрашиваются по Граму, не проявляют серологической специфичности и устойчивы к диагностическим фагам [Тимаков В.Д., Каган Г.Я., 1961, 1973; Ломов Ю.М., Голубкова Л.А., 1979, 1980; Степанов В.М., Узбеков Б.К., 1983; Зыкин Л.Ф. и др., 1986].

Интерес исследователей к L-формам чумного микроба проявляется периодически в связи с обсуждением ряда проблем: (1) существование возбудителя чумы в почве природных очагов, органах павших животных и трупах людей; (2) персистенция слабовирулентных бактерий в организме носителей, длительно

болеющих атипичной затяжной формой чумы; (3) вопросы скрытого носительства у естественно и специфически иммунных носителей; (4) сохранение бактерий чумы длительное время в организме блох и клещей; (5) внезапные вспышки эпизоотий во внешне благополучных очагах.

Описаны случаи выделения «неузнаваемых» форм возбудителя чумы, которые появляются в конце эпизоотий и характеризуются изменением формы колоний, формы бактерий, снижением продукции *F1*-антигена, чувствительности к диагностическим фагам, отсутствием характерной ферментативной активности [Баканурская Т.Л. и др, 1992]. Подобные варианты были получены при пассажах бактерий чумы в организме иммунизированных морских свинок [Сонин Г.Г., 1959]. Опубликованы результаты исследования таких измененных форм, которые помимо перечисленных выше характеристик обладали выраженной устойчивостью к повышенной (до 56°C) температуре и к высушиванию на агаровой поверхности. Пассажи через организм животных приводили к постепенной реверсии в направлении классических вариантов чумного микроба. Однако на промежуточных этапах сохранялись формы в виде нитей, которые могли распадаться на кокковидные, диплококковые и гантелевидные образования с сохранением капсульных структур и при хронических проявлениях инфекции с признаками токсинемии. На этой стадии в посевах органов на обычные питательные среды бактериального роста возбудителя не было. Если и появлялись атипичные карликовые колонии, они не пересеивались на тех же средах или на средах, предназначенных для L-форм. Изменённые формы бактерий частично поглощались макрофагами. В некоторых из них имела место реверсия в палочковидные формы. Те кокковидные образования, которые не поглощались клетками ретикулоэндотелиальной системы, превращались в сферические образования со свойствами L-форм [Баканурская Т.Л., 1992].

Исследования L-форм чумного микроба показали, что закономерности их формирования и свойства, в основном, не отличаются от известного для других грамотрицательных гетеротрофов. Отмечено, что популяции бактерий *Y. pestis* на начальных этапах L-трансформации в выраженной степени гетероморфны. Аналогичные изменения наблюдали у многих исследованных штаммов. Однако

скорость появления тех или других форм варьировала в зависимости от индивидуальных особенностей штаммов [Узбеков Б.К., 1984]. Судя по результатам, исследователи имели дело с различными формами, возникающими в процессе L-трансформации. Подобные формы чумного микроба были выделены в эксперименте после выращивания на средах с пенициллином и лошадиной сывороткой, мочой, мочевиной и DL-метионином [Канатарбаева Ж.К., 1976; Степанов В.М., Кондратьева О.В., 1980; Дунаев Г.С. и др., 1980; Ларина В.С. и др., 1992], непосредственно из абсцессов чумного происхождения и органов у грызунов-носителей в природных очагах чумы [Костюковский В.М., 1989; Дунаев Г.С. и др., 1984] и от больного после антибиотикотерапии [Куница Н.К., 1998]. Отмечено, что во всех случаях не обнаруживали роста на обычных питательных средах. Он был зарегистрирован только в присутствии лошадиной сыворотки, а для поддержания L-состояния требовался пенициллин. Сохраняющиеся стабильно и в отсутствие пенициллина L-формы были получены в экспериментах после 12 и более пересевов на среде с антибиотиком. Тогда как первые значительные сдвиги в составе популяции наблюдали уже через 4-5 пассажей на пенициллиново-сывороточной среде. Число полученных стабильных вариантов в исследуемой выборке L-форм обычно не превышало 40% [Канатарбаева Ж.К., 1976; Степанов В.М., Кондратьева О.В., 1980]. В процессе роста на питательной среде L-колонии чумного микроба имели характерные отличия. Они были в различной степени вросшими в поверхность питательного агара, округлыми, вакуолизированными, мелкозернистыми, иногда беловатыми с коричневатым центром и неправильной формы. Во всех случаях отсутствовала характерная для типичных колоний «кружевная» кайма. В составе колоний отмечались в смеси крупные шаровидные вакуолизированные, сферопластоподобные, изогнутые нитевидные и мелкозернистые образования, подобные описанным выше [Канатарбаева Ж.К., 1976; Дунаев Г.С. и др., 1980, 1982; Степанов В.М., Кондратьева О.В., 1980; Зыкин Л.Ф., 1994]. При исследовании других свойств отмечено сохранение ферментативной активности по отношению к диагностическим субстратам, но на более низком уровне, появление способности утилизировать сахарозу, а иногда и лактозу. Обнаруживалось ослабление плазмокоагуляционной активности и

фибринолитической, вплоть до полной утраты последней. В популяциях L-форм преобладали независимые при 37°C от ионов Ca²⁺ и неспособные к пигментсорбции клетки, которые при введении экспериментальным животным проявляли себя как значительно снизившие вирулентность, но способные сохраняться *in vivo* без реверсии в течение 45 сут наблюдения.

В опытах на диких грызунах (сусликах) показано, что только единичные животные после заражения L-формами чумного микрба заболели остро. У других, забитых в сроки 13-21 сут, отчётливо были выражены пролиферативные изменения. Это свидетельствовало о слабой вирулентности L-форм для этого вида грызунов.

Характер взаимодействия возбудителя с макроорганизм в значительной степени зависит от процесса фагоцитоза. Показано, что L-формы в значительно меньшей степени фагоцитируются перитонеальными макрофагами и полинуклеарными лейкоцитами, чем полноценные бактерии, возможно за счёт снижения адгезивности их клеточной стенки. При взаимодействии с фагоцитирующими клетками возможна реверсия L-форм в полноценные клетки. Интересно, что лизосомальные ферменты при фагоцитозе L-форм снижают свою активность, тогда как кислород-зависимые метаболические процессы усиливаются. Фагоциты иммунизированных животных более активны, но, несмотря на это во всех опытах фагоцитоз оставался незавершённым, что, по всей вероятности, связано с дефицитом антигена F1 и нарушением функций, связанных с плазмидой кальцийзависимости у L-форм [Golubinsky E.P. et al., 1998; Куница Н.К., 1999].

Важной характеристикой L-форм с точки зрения диагностики является снижение или утрата продукции специфического для *Y. pestis* капсульного антигена F1, основного при серологическом тестировании возбудителя чумы. Диапазон вариаций итогов выявления L-форм с использованием различных иммунологических реакций на основе антител к F1 колеблется в пределах от «негативные – слабо позитивные» [Дунаев Г.С. и др., 1982; Степанов В.М., Узбеков Б.К., 1983, 1985; Соколов Б.Н., Дунаев Г.С., 1984; Соколов Б.Н. и др., 1984, 1985; Куница Н.К., 1998]. Возможно, слабо позитивные результаты обусловлены наличием в некоторых колониях L-форм отдельных полноценных клеток, которые иногда обнаруживаются. Важно отметить, что в большинстве своём L-формы чумного микроба проявляют

сниженную чувствительность к чумному диагностическому фагу, а чаще бывают к нему устойчивы [Степанов В.М., Кондратьева О.В., 1980; Дунаев Г.С. и др., 1982; Степанов В.М., Узбеков Б.К., 1983; Соколов Б.Н., Дунаев Г.С., 1984; Куница Н.К., 1998].

Выше уже сообщалось, что L-трансформация может происходить также *in vivo* под действием антитело-комплементарных факторов в организме естественно или специфически невосприимчивых млекопитающих [Сонин Г.Г., 1959]. Это в равной степени относится и к возбудителю чумы. Показано, что уровень эффективности воздействия индуцирующих гуморальных факторов на бактерии *Y. pestis* находится в обратной зависимости от вирулентности инфицирующего штамма, которой сопутствует способность бактерии формировать на своей поверхности грануляционный слой защиты. Иными словами, слабовирулентные штаммы наиболее склонны к L-образованию при сохранении способности к размножению и длительной персистенции в организме переболевшего или иммунного носителя. В этом случае антиген F1, как правило, не выявляют, хотя, вероятно, создаются условия для более длительного поддержания специфического иммунитета за счет других антигенов, которые имеются в L-формах. Ещё один интересный факт. L-формы, образовавшиеся под действием антибиотика *in vitro*, быстро разрушаются в организме чувствительного носителя, а спонтанно образовавшиеся в организме иммунных животных, сохраняются дольше *in vivo* и дольше персистируют в макрофагах [Саямов С.Р., 1985].

В определённых условиях, и при обязательном ослаблении действия L-индуцирующего фактора, формы (от «несбалансированного роста» до «нестабильных L-форм») способны с частотой до 80% реверсировать в бактерии с формированием нормальной клеточной стенки. Однако без особых селектирующих факторов и в зависимости от глубины изменений в L-формах, в каждом конкретном случае, восстановление исходных свойств обычно не бывает полным. Так, отмечено, что при отсутствии у ревертантов полноценного Pgm-локуса, при ослаблении или отсутствии продукции F1-антигена и при снижении вирулентности, а в некоторых случаях и фагочувствительности, у них обнаруживается «мышинный токсин» (Тох), V-антиген и основной соматический антиген (ОСА). Некоторые варианты L-форм

приобретают фенотипические характеристики псевдотуберкулёзного микроба [Дунаев Г.С. и др., 1980; Стручкова Э.Н. и др., 1992, 1992a]. Имеются данные о реверсии L-форм чумного микроба при содействии почвенных бактерий [Ларина В.С. и др., 1992].

Для планомерного и глубокого изучения механизмов L-трансформации у чумного микроба, выяснения конкретной роли L-форм в выживании вида *Y. pestis* в природных очагах и в организме чувствительного носителя необходимо использовать специальные методические приёмы, которые приведены в «Методических рекомендациях» [Зыкин Л.Ф. и др., 1986]. Авторы рассматривают методологические подходы, способствующие выделению и обеспечивающие культивирование, идентификацию и сохранение L-форм на различных стадиях формирования при исследовании диких грызунов и эктопаразитов в природных очагах. Эти подходы применимы в экспериментальных исследованиях процесса L-трансформации. В частности, рекомендуется использовать плотные, но лучше, полуплотные и мягкие (полужидкие) полноценные питательные среды, способствующие сохранению, репродукции и реверсии нестабильных L-форм и их предшественников. Среда должна содержать 15% сахарозы, для поддержания осмотического равновесия, 10% инактивированной при 56°C лошадиной сыворотки без консерванта, для поддержания L-состояния за счёт обеспечения липидами и ингибиции токсических компонентов питательной среды, и 1% гемолизированной крови, для повышения питательности. В специальных образцах сред используют также антибиотики: пенициллин, для контроля L-состояния, эритромицин, для подавления роста кокков, и актидион или нистатин, для ингибиции грибковой флоры.

При оценке характера роста авторы рекомендуют использовать электронную микроскопию для поисков элементарных телец, шаровидных протопластных и сферопластных форм, а также развитых внутренних мембран и их выбросов.

При идентификации выделенных L-подобных культур считается эффективным использование реакции непрямой агглютинации (РНГА), с подтверждением её в реакции торможения (РТНГА), применять флюоресцирующие антитела (МФА) и твёрдофазный иммуноферментный метод (ТИФМ). Полученные в исследованиях

результаты рекомендуется оценивать с учётом особенностей различных этапов образования L-форм (таблица 5.1).

Таблица 5.1

Критерии оценки результатов скрининга L-форм в пробах с *Y. pestis*
[Метод. рекомендации, 1986]

Варианты	Агар Хоттингера	Полужидкий агар	Полужидкий агар с пенициллином	Оценка
I	Рост типичных колоний чумного микроба	Обнаружены палочковидные формы	Роста нет	В пробе бактериальные формы возбудителя чумы
II	Рост типичных колоний чумного микроба	Обнаружены формы палочковидные и несбалансированного роста	Роста нет	В пробе бактериальные формы возбудителя чумы и несбалансированного роста
III	Роста нет	Обнаружены формы несбалансированного роста	Роста нет.	В пробе формы несбалансированного роста возбудителя чумы
IV	Рост чумного микроба	Обнаружены палочки и элементы L-форм	Рост L-форм	В пробе бактерии и L-формы
V	Роста нет	Обнаружен рост L-форм	Рост L-форм	В пробе только L-формы чумного микроба

Сложности выявления L-форм в органах животных, в пробах от больных и в материале из природных очагов могут быть в значительной степени уменьшены с помощью молекулярно-биологических методов диагностики. Однако деструктивные процессы, имеющие место на различных стадиях L-трансформации, зачастую касающиеся структуры и целостности ДНК, могут снижать разрешающую способность этих методов. В связи с этим более результативными могут быть приемы детекции, направленные на индукцию ревертантов L-форм.

Таким образом, можно сделать следующее заключение. Процесс образования L-форм у *Y. pestis* изучен явно недостаточно, а выяснение его особенностей даст много сведений, полезных для понимания биологии возбудителя чумы. Судя по плейотропности изменений фенотипа и строго определённого набору свойств, изменяющихся в процессе L-трансформации, её механизм близок или перекрещивается с процессом формирования фагоустойчивых спонтанных вариантов чумного микроба [Гребцова Н.Н. и др., 1998; Лебедева С.А., 2000]. В частности, это касается состояния, называемого «псевдолизогенией». Судя по данным литературы [Мишанькин Б.Н., Сучков Ю.Г., 1973], «псевдолизогенные» штаммы можно получить после воздействия бактериофага при высокой множественности инфекции. В этих условиях нельзя исключить возможность воздействия на некоторые бактерии популяции фагового лизоцима, которое может приближать их, по сути, к первичным переходным L-формам, индуцировать реверсibelное изменение клеточной поверхности и, соответственно, ряда свойств. Этот факт и всё вышеизложенное не может не привлекать интереса исследователей к микробиологии, генетике и молекулярной биологии L-форм и механизмам адаптационной изменчивости возбудителя чумы, загадки которого, связанные с его сохранением в природе в течение многих веков истории человечества не решены до сих пор.

5.4. Вопрос о «некультивируемых» формах возбудителя чумы

5.4.1. Общее представление о феномене «некультивируемости»

Бактерии по-разному защищаются от неблагоприятных факторов среды обитания. Одни - образуют споры и переходят в состояние стаза; другие, не способные к такой трансформации переходят в «покоящееся» состояние и сохраняются в виде некультивируемых форм (НФ), не способных расти на питательных средах. Эти формы снижают свой метаболизм и не способны размножаться на полноценных питательных средах. При определённых условиях такие НФ, могут восстанавливать способность размножаться и переходят в полноценную вегетирующую форму [Roszak D.B., Colwell R.R., 1987; Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., 1997; Литвин В.Ю. и др. 2000; Романова Ю.М., Гинцбург А.Л., 1993]. У ряда патогенных бактерий «некультивируемость» представляет собой один

из способов «консервирования» в очаге сохранения инфекции, а вместе со способностью реверсировать к вегетирующей форме она, по всей вероятности, поддерживает флюктуации возбудителя в скрытой и активной форме довольно длительное время, что и является адаптацией к неблагоприятным условиям. Для патогенных микроорганизмов такие неблагоприятные условия создаются чаще, поскольку чаще имеет место «челночная» смена среды обитания: внутренняя среда макроорганизма ↔ внешняя среда (почва, воздух, вода), которые по многим параметрам резко отличаются. Кроме того, во всех случаях бактерии попадают в различное по составу биологическое сообщество, члены которого могут быть как симбионтами, так и антагонистами, подвержены действию различных по активности абиотических факторов. Такие резкие перепады условий являются стрессорными для бактерий, что приводит к включению защитных механизмов. Временный переход в «некультивируемое» состояние является одним из них. Бактерии, находясь в «покоящемся» состоянии не утрачивая способности к реверсии и проявлению вирулентности, не только поддерживают инфицированность очага, но и сохраняются как вид.

Возможность существования в НФ известна для многих патогенных и условно патогенных бактерий [Colwell R.R., 1993; Cellini L. et al., 1994; Rachman L. et al., 1994; Аксёнов М.Ю. и др., 1995; Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., 1997; Stainert M. et al., 1997; Четина Е.В., 1997; Эпидемиол. аспекты...1998; Литвин В.Ю. и др., , 2000; Forsman M. et al., 2000 и др.]. В природных очагах в естественных экосистемах почвы, нор грызунов, в их кишечнике широко распространены эшерихии, псевдомонады, листерии, клебсиеллы, иерсинии. Представители родов *Salmonella*, *Citrobacter*, *Yersinia* и др., обладающие способностью размножаться в различных частях растений [Гордейко В.А., 1990, 1991; Литвин В.Ю., 1991, 1992; Литвин В.Ю. и др., 1991; Шустова Н.М. и др., 1991; Ривкус Ю.З., Бочкарёв В.М., 2000], лишаясь необычных для них хозяев, попадают непосредственно в почву и претерпевают стрессовые воздействия агрессивных для бактерий факторов. Причём все факторы внешней среды (биотические и абиотические), каковы бы они ни были, действуют селективно на микроорганизмы, осуществляя жёсткий контроль по фенотипу. Для того чтобы выжить в таких условиях микроорганизмы должны обладать высокой

экологической пластичностью, которая позволяла бы им, модифицируясь в определённых пределах, выживать, но сохранять специфику вида [Шварц С.С., 1980; Бухарин О.В., Грищенко В.А., 2000].

Среди абиотических факторов, такие как влажность, рН, температура, субстратный состав среды обитания определяют не только численность бактерий, но и особенности их биологии и форму обитания [Сомов Г.П., 1985; Сомов Г.П., Литвин В.Ю., 1988].

В составе сложных природных экосистем микробам приходится взаимодействовать не только с организмом человека и животного, но и простейшими, личинками насекомых, червями, другими бактериями [Петрунина О.М., 1951; Пушкарёва В.И. и др., 1989; Меркулов А.Э., 1990; Дубровский Ю.А. и др., 1990; Пушкарёва В.И., Литвин В.Ю., 1991; Меркулов Ф.Э., Тартаковский И.С., 1991; Погорелов В.И. и др., 1994, 1995; Li Tan, Greg Darby, 2000]. При этом часто возникают симбиотические отношения, при которых эти организмы для сосуществующих бактерий могут выполнять либо роль прокормителя, либо защитного барьера. Проявление агрессивных свойств микробов на уровне вирулентности в этом случае биологически не целесообразно. Более подходящей может быть форма, при которой с наименьшими затратами для симбионта микробы могут сохранять свой генофонд, периодически его репродуцируя. Не исключено, что «некультивируемые» бактерии могут оказаться удобными «сожителями». Хотя сосуществование с менее изменёнными «сапрофитизированными» формами возбудителя, которые просто не проявляют агрессивных свойств [Forsman M. et al., 2000] тоже нельзя исключить. Такие симбиотические отношения описаны не только для вибрионов, псевдомонад, легионелл, франциселл, эшерихий, но и для иерсиний, включая чумной и псевдотуберкулёзный микробы, а также возбудитель кишечного иерсиниоза [Никульшин С.Н. и др., 1992; Пушкарёва В.И. и др., 1993].

О существовании неспособных к размножению, но живых бактерий сообщили после изучения патогенных вариантов *E. coli* и *Vibrio cholerae* [Xu H.Sh., 1982]. Затем были представлены другие данные, доказывающие способность *E. coli*, *Salmonella*, *V. cholerae* длительно находиться в полностью покоящемся состоянии, из которого вывести их можно было лишь после определённых воздействий. Посевы

на обычные питательные среды сразу после наступления «стаза» были не эффективны [Colwell R.R., 1985].

Стрессовые воздействия, приводящие к образованию «некультивируемых» форм, включают ряд факторов, к которым относятся: а) повышенная аэрация культуры; б) воздействие световой энергии; в) бедность питательного субстрата, неспособная обеспечить полноценный синтез органических составляющих клетки; г) дефицит в нём не только органических соединений, но и различных ионов, включая металлы, которые участвуют в регуляции метаболизма; д) слишком высокая концентрация солей; е) нарушение осмоса клетки; ж) резкое повышение температуры до запредельных уровней или её резкое снижение до уровня 10°C и ниже, что приводит к нарушению терморегуляции метаболизма; з) критический уровень рН среды обитания и, как следствие, сдвиг его в бактериях. Среди факторов, индуцирующих НФ, могут быть, токсические вещества, в том числе перекиси. Эффективность факторов, индуцирующих «некультивируемое» состояние, разная и зависит от вида бактерий, их возраста и условий пребывания во внешней среде [Oliver J.D. et al., 1991; Roszak D.B., Colwell R.R., 1987; Xu H.Sh. et al., 1982; Whitesides M.D., Oliver J.D., 1997; Kragelund L., Nibroe O., 1994; Arana J. et al., 1992; Kaprelyants A.S. et al., 1993; Roth W. et al., 1988]. При экспериментальном изучении феномена «некультивируемости» чаще используют в качестве индуктора «голодный», осмотический и температурные стрессы.

При общем дефиците питательных веществ и при неспособности клетки обеспечить нормальное течение метаболических процессов вступает в силу режим экономии и переключения на минимальные затраты для сохранения генофонда. Это обеспечивается специальными механизмами по регуляции и переключению на особые генные системы, «стимулоны», «спасающие» клетки в неблагоприятных условиях [Spector M.P., Foster J.W., 1993; O'Neal C.R. et al., 1994]. Естественно длительность пребывания в стрессовой ситуации зависит от степени воздействия того или иного фактора, индивидуальных особенностей возбудителя, состава его популяции и других факторов среды обитания. В том случае, если защитные модификации метаболизма не могут обеспечить жизнеспособность бактерий в связи с её истощением, они постепенно и в соответствии с размером внутриклеточного

пула запасов и возрастом у каждой бактерии переходят в состояние покоя. Клетки в состоянии стаза не могут размножаться и, следовательно, расти на питательных средах, хотя сохраняют некоторый уровень метаболизма [*Lleo del M.M. et al., 1998*]

Воздействие пары или комплекса факторов, действующих в природе, ускоряет процесс НФ-трансформации [*Романова Ю.М., 1997, 1998*]. Возможность и скорость перехода в «некультивируемое» состояние могут отличаться не только у разных видов бактерий, но и быть индивидуальными для отдельных штаммов [*Kragelund L., Nibroe O., 1994*]. Клетки с «устоявшимся» более низким уровнем обмена веществ менее чувствительны к НФ-индукторам, чем молодые экспоненциально размножающиеся [*Oliver J.D., 1995*].

Переход вегетирующих форм бактерий в «некультивируемые» происходит поэтапно. Описание такого перехода и характеристика этапов даны в ряде работ [*Головлёв Е.Л., 1990; Colwell R.R., 1993; Романова Ю.М., Гинцбург А.Л., 1993; Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., 1997, 1997а; Гинцбург А.Л. и др., 1999; Диденко Л.В. и др., 2000 и др.*]. Прежде всего, приобретая кокковидную форму и уменьшаясь в размерах при сохранении нуклеоида, бактерии приближаются к сферопластам [*Пушкарёва В.И. и др., 1997; Макаров А.А. и др., 1998; Диденко Л.В. и др., 2000*]. В клетках сохраняются частично метаболические процессы поддержания жизни, в том числе на более низком уровне продолжается синтез белка и нуклеиновых кислот [*Garcia-Lara et al., 1993; Gribbon L.T., Barer M.R., 1995*]. При электронной микроскопии видно, что сокращается количество рибосом. Область нуклеоида становится нечёткой, цитоплазма более плотной. Снижается проницаемость цитоплазматической мембраны за счёт увеличения содержания насыщенных жирных кислот [*Gribbon L.T., Barer M.R., 1995*]. При продолжительности воздействия неблагоприятных факторов выше критического уровня бактерии погибают.

При восстановлении перmissive условий и наличии стимулирующих факторов «некультивируемые» бактерии, если их изменения не зашли очень далеко, могут реверсировать в вегетирующее состояние. Реверсия не всегда имеет место после прекращения действия на НФ индуцирующего фактора. Для их «пробуждения» нужно воздействие специальных факторов и приемлемых для вида

бактерий питательных сред [Colwell R.R. et al., 1985; Roszak D.B., Colwell R.R., 1987; Colwell R.R., 1993; Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., 1997, 1997a, 1998; Эпидемиол. аспекты..., 1998; Литвин В.Ю. и др., 2000]. Анализ «некультивируемого» состояния для каждого конкретного возбудителя может помочь в решении вопросов, связанных с его экологией и резервацией в период между вспышками.

Для эффективного воздействия «факторов реверсии» требуется довольно продолжительное время [Oliver J.D., Brockian R., 1995; Романова Ю.М., 1997, 1997a]. В качестве таких факторов, предлагают восстановление питания, оптимальный температурный режим или тепловой (холодовой) шок, обогащение среды культивирования фетальной сывороткой [Nilsson L. et al., 1991; Oliver J.D., Brockian R., 1995; Ravel J. et al., 1995; Whitesides M.D., Oliver J.D., 1997]. Необходимо отметить, что резкое обогащение питательной среды для получения ревертантов может иметь неблагоприятные последствия, приводящие к гибели бактерий [Whitesides M.D., Oliver J.D., 1997]. Вообще, процесс реверсии НФ в культивируемые формы очень сложный, и не всегда его удаётся наблюдать *in vitro*. При пассажах через организм чувствительных к возбудителю животных это наблюдается гораздо чаще [Colwell R.R. et al., 1985; Hussong D. et al., 1987; Stainert M. et al., 1997; Эпидемиол. аспекты..., 1998]. Вероятно, здесь действует комплекс естественных индуцирующих факторов, в том числе пока не идентифицированных, которые для вегетации единичных ревертантов обеспечивают более естественные условия, недоступные в опытах *in vitro*.

Процесс формирования НФ обусловлен функциями определённых генов. Считают, что в нём участвуют гены, индуцируемые нарушением осмоса клетки, голоданием, критическим изменением температуры среды обитания. Активируются гены окислительно-восстановительной системы *sodA*, *katE*, *katG*, а также *fnr*, регулятор анаэробно-нитратного дыхательного пути. Активируется ген *glgC* из кластера генов, обеспечивающих клетку запасами гликогена [Oliver J.D., 1995; Munro P.M. et al., 1995; Романова Ю.М. и др., 1996; Головлёв Е.Л., 1998, 1998a]. Повреждение одного из РНК-полимеразных генов (*rpoS*) и гена, участвующего в превращениях гуанозинмонофосфата, снижает вероятность реверсий [Taylor R. et al., 1981; Nicaido H., Vaara M., 1985 Hengge-Aronis R., 1993; Munro P.M. et al., 1995].

Исследование НФ-трансформации на модели *S. typhimurium* [Романова Ю.М., Гинцбург А.Л., 1993; Романова Ю.М. и др., 1995, 1996; Гинцбург А.Л. и др., 1999] показало её зависимость от функций оперонов *sox RS*, активирующегося в стрессовых ситуациях *in vitro* и на первых этапах взаимодействия бактерий с макрофагами [Colwell R.R. et al., 1985], а также *lpf*, детерминирующего синтез фимбрий [Baumler A. J., Heffron F., 1995]. Эти сведения далеко не исчерпывающие. Как НФ-индукция, так и регуляция реверсии нуждаются в дальнейшем исследовании их генетической детерминированности. При этом эксперименты проводить желательно приближённо к естественным условиям обитания бактерий патогенов.

В силу неспособности НФ расти в прямых посевах на питательных средах, для их выявления используют специальные приёмы. К ним, в частности, относят прямой подсчёт жизнеспособных клеток, эффективность которого можно повысить при окраске мазков акридиновым оранжевым или стимуляцией увеличения бактерии при их росте под воздействием налидиксовой кислоты и дрожжевого экстракта *per se* и использовать обработку специфическими люминесцирующими моноклональными антителами к поверхностным антигенам.

В связи с развитием и успехами молекулярной биологии для выявления возбудителей в пробах при отсутствии визуального роста в прямых посевах на первых этапах применялось ДНК-зондирование с помощью зондов, содержащих фрагменты, специфические для определённых видов бактерий. В силу ряда недостатков этот приём очень быстро был заменён полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Она основана на комплементации специфических для вида бактерий коротких фрагментов ДНК (праймеров) с матричной ДНК из пробы и последующей амплификацией фрагментов, ограниченных двумя парными праймерами. Ампликоны не выявляются при отсутствии комплементарности [Vej A.K., Mahbubani M.H., 1992; Четина Е.В. и др., 1993; Аксёнов М.Ю., Гинцбург А.Л., 1993; Аксёнов М.Ю. и др., 1994; Емельяненко Е.Н. и др., 1994; Белохвостов А.С., 1995; Yamamoto H. et al., 1996; Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., 1998; Романова Ю.М., 2000]. Наличие ампликонов в пробе, не дающей роста на качественной питательной среде, оценивается как свидетельство присутствия НФ соответствующего вида

микроорганизма. Метод доступен для многих исследователей и признан высокоинформативным. К его недостаткам можно отнести отдельные ошибки, которые могут появиться в экспериментах при наличии в пробе ДНК бактерий, погибших при критических уровнях действия факторов, когда «покоящиеся» клетки уже теряют полностью жизнеспособность и начинают распадаться. Выходом из положения может быть метод обратной транскрипции с ПЦР, которую проводят с *m*-РНК микроорганизмов. Существование *m*-РНК непродолжительно, поэтому наличие комплементарности праймерам свидетельствует о присутствии практически только живых «покоящихся» клеток [Bej A.K. et al., 1996].

5.4.2. Поиски некультивируемых форм *Yersinia pestis*

О том, что способность переходить в НФ обеспечивает переживание бактерий псевдотуберкулёза, листерий, легионелл и некоторых других возбудителей болезней в окружающей среде в межэпидемический и межэпизоотический периоды выше уже упоминалось [Пушкарёва В.И. и др., 1989; Емельяненко Е.Н. и др., 1994; Аксёнов М.Ю. и др., 1995; Троицкая В.В. и др., 1996 и др.].

Активно обсуждается проблема сохранения чумного микроба в природе в течение десятилетий межэпизоотического благополучия. Предлагаются различные гипотезы поддержания бактерий чумы в природе [Baltazard M. et al., 1963; Mollare H.H., 1963; Калабухов Н.И., 1969; Дятлов А.И., 1988; Сагимбеков У.А. и др., 1988 Солдаткин И.С., Руденчик Ю.В., 1988, 1995; Ларина В.С. и др., 1992; Домарадский И.В., 1993; Леви М.И., 1997; Литвин В.Ю., 1997; Султанов Г.В., Козлов М.П., 1998]. С учётом результатов длительных наблюдений и специальных экспериментов среди других положений допускается длительное сохранение бактерий чумы в почве и на различных субстратах в норах грызунов [Baltazard M. et al., 1963; Тимофеева Л.А. и др., 1966]. При прямых бактериологических исследованиях проб почвы и материала из нор на территории природного очага чумы в период между эпизоотиями выделить возбудителя чумы удаётся чрезвычайно редко. Полагают, что это может быть связано с сохранением микроба в «нетипируемой» [Баканурская Т.Л., 1992], в скрытой форме, локализующейся в цистах простейших [Никульшин С.В. и др., 1992], или, предположительно, в НФ, обнаружить которую обычными микробиологическими методами не удаётся. Свидетельством в пользу

существования последней является наблюдение в эксперименте случая перехода в «некультивируемое» состояние бактерий вакцинного штамма *Y.pestis EV* (линия НИИЭГ) при нахождении их в вытяжках из стерильной почвы, содержащих инфузории и зелёные водоросли. В этих неблагоприятных условиях часть популяции погибла, другая, как полагают исследователи, – переходила в «покоящееся» состояние и была не способна к вегетации на питательных средах [Сучков Ю.Г., Леви М.И., 1997]. Размножение этих форм восстанавливалось после обогащения пробы фетальной сывороткой крупного рогатого скота так же, как это происходило у сальмонелл [Романова Ю.М., 1997]. Параллельно, с помощью ПЦР, исследовали 72 пробы почвы нор грызунов, взятой в межэпизоотический период из природного очага чумы в Гурьевской области. Праймерами были фрагменты ДНК, комплементарные участкам *fra*-оперона. В четырёх пробах реакция была положительной, что оценено как присутствие ДНК чумного микроба. Однако в посевах на питательную среду роста не было. На этом основании авторы сделали вывод о содержании в пробах почвы «некультивируемых» форм *Y. pestis* [Сучков Ю.Г. и др., 1997].

В последующем исследовании проводили на двух высоковирулентных штаммах *Y. pestis* и одном слабовирулентном. НФ пытались получить после суммарного воздействия на бактерии голодания и разных температур (4°C, 28°C, 37°C). Высевы через определённые промежутки времени делали в жидкие и на плотные полноценные среды, которые обогащали средой 199, гемолизированной кровью и фетальной сывороткой крупного рогатого скота, а для детекции ДНК чумного микроба использовали ПЦР. Комплементарными праймерами были фрагменты структурного гена капсульного белка Caf1, который локализован в специфической для возбудителя чумы высокомолекулярной плазмиде.

При 37°C длительность позитивных результатов посева культур была наименьшей и у каждого штамма разной. Вирулентные штаммы сохраняли вегетирующую форму в течение недели, а слабовирулентный - оказался очень чувствительным к неблагоприятным воздействиям и не определялся уже через 2 суток. Температура 28°C была более благоприятной для сохранения вегетирующих форм бактерий чумы в ходе эксперимента. Рост в посевах различных вирулентных

штаммов регистрировали в течение 14-56 сут наблюдения, При 4°С длительность сохранения культивируемых форм у вирулентных штаммов была максимальной: от 108 до 702 сут. После прекращения роста на средах пробы ставили в холодильник. Образцы проб обогащали 5% фетальной сыворотки, 2% гемолизированной крови и другими компонентами, подвергали действию разных температур культивирования. Поиски ревертантов проводили в течение 180 сут. Роста ревертантов не было. Хотя в пробах, с помощью ПЦР, определялась специфическая плазмидная ДНК.

Культуры, полученные при последнем «положительном» высеве не вызывали гибели ни интактных мышей, ни обработанных кортизоном или желтком с целью иммуносупрессии. ПЦР, поставленная с материалом из селезёнок забитых животных, в единичных случаях показывала наличие плазмидной ДНК чумного микроба, что позволяло предполагать определённую степень приживания «некультивируемых» бактерий и их циркуляцию в организме. Однако при последующем перезаражении этим материалом животных чумного микроба не обнаружили.

Взвесь почвы из нор разных видов грызунов, взятой в трёх различных природных очагах, тестировали в ПЦР и посевами на питательные среды. Результаты тестов были отрицательны [*Мишанькин Б.Н., и Сучков И.Ю., 1997; Сучков Ю.Г. и др., 1997; Сучков Ю.Г. и др., 2000*]

Состояние «некультивируемости», когда бактерии не могут размножаться и, следовательно, быть обнаруженными при посевах, но сохраняют минимальную метаболическую активность и потенциал патогенности и способны реверсировать в вегетирующую форму с частичным или полным восстановлением исходных свойств, может быть очень важным для выживания вида в неблагоприятных условиях. Для выявления, а главное, для доказательства существования чумного микроба применяют целый ряд методов. В их числе – электронная микроскопия и контроль наличия метаболизма; доказательство поглощения меченых аминокислот и сахаров, сохранение синтеза белка и дыхания; выявление нативной ДНК живых клеток. Эти приёмы позволяют отличить переходные формы бактерий от живых к погибшим. Длительность такого перехода разная. Одни виды погибают в конкретных условиях быстро, другие, более приспособленные, существуют в них

дольше. К какому типу бактерий принадлежит возбудитель чумы, существуют разные мнения. Во всяком случае, исследования его способности пребывать в виде классических НФ пока не очень убедительны и ещё далеки от завершения. Самым сложным на этом пути будет определение условий и факторов, которые способны обеспечивать реверсию к вегетирующим формам. Определение их во многом будет способствовать оценке места НФ в процессе естественного сохранения вида *Y.pestis* в природе. Основной ли это путь или нет, покажет будущее. На наш взгляд, истина находится посредине, где пересекаются механизмы, действующие при образовании «некультивируемых», «нетипируемых», фагоустойчивых, бесфракционных и L-форм, а также форм, подобные описанным для возбудителя псевдотуберкулёза, которые имея пониженную вирулентность могут более года (срок наблюдения) сохраняться в скрытом состоянии внутри Т и В клеток лимфоидной ткани [Balada-Liasat J.-M., Mecsas J., 2006]. Истина станет очевидной, когда будут ясны генетические механизмы формирования таких разных, но частично схожих форм фенотипической изменчивости. Именно они позволяют микробу выжить, вопреки агрессивным факторам среды обитания, за счёт аутомодификаций, селективного отбора, способности противостоять неблагоприятным факторам, сосуществовать с другими обитателями почвы, а также превращать организм носителя из тупика в место приемлемое для обитания с помощью снижения собственной вирулентности, хронизации инфекции и продления жизни хозяина, который служит теперь для возбудителя нишей, где он, «худо ли, бедно ли», размножается и периодически выделяется вовне. На основании перечисленного можно заключить, что проблема НФ для возбудителя чумы стоит очень остро и является крайне актуальной, как с точки зрения возможности передачи инфекции потомкам носителей и соседствующих особей, так и относительно приёмов гарантированной детекции таких форм, таящих в себе угрозу внезапного появления бактерий чумы в вирулентной ипостаси.

5.5. Устойчивые к диагностическому фагу варианты *Yersinia pestis* и проблемы, связанные с ними

При первичной идентификации штаммов помимо их иммунологического изучения и постановки биопроб на животных используют тест на чувствительность

к чумным диагностическим бактериофагам. Этот тест приобретает большее значение при отсутствии чётких результатов на специфический капсульный антиген. Устойчивые к фагам варианты *Y. pestis* входят в число атипичных форм возбудителя чумы, значительно осложняющих диагностику. В природе их выявляют в период спада чумных эпизоотий. Они вызывают медленно развивающееся или abortивное заболевание чумой и часто поражены бактериофагом. В связи с этим бактериофаги, литически активные по отношению к возбудителю чумы, рассматриваются [Пак Г.Ю. и др., 1990] как один из компонентов саморегулирующейся системы в ходе развития чумной эпизоотии (грызун – возбудитель – эктопаразиты - фаги и др.). Фаги способны трансмиссивно передаваться в системе «грызун-блоха» вместе с бактериями чумы и при размножении в желудке блох влиять на свойства возбудителя, способствовать формированию популяций возбудителя с иными свойствами и, возможно, вмешиваться в течение эпизоотий [Хрущевская Н.М., Сержанов О.С., 1978]. Этот аспект изменчивости *Y. pestis* исследован в наименьшей степени.

Нечувствительность бактерий к воздействию бактериофагов возможна либо за счёт ограничения его размножения внутри клетки-хозяина, либо в связи с нарушением адсорбции, из-за дефектности или повреждения рецепторов на поверхности бактерии. Зависимость взаимодействия бактериальных рецепторов с бактериофагами от ионного состава среды может вызывать условную фагорезистентность, связанную с невозможностью специфической адсорбции фага на бактериях [Миллер Дж., 1976]. Эта «резистентность» не характеризует собственно исследуемые бактерии, а отражает особенности бактериофага и дефектность среды культивирования.

Ограничение внутри бактерии-хозяина, как правило, обусловлено различными репрессорами функции фаговых генов или наличием специфических бактериальных нуклеаз. Причём оба признака обусловлены функцией специализированных генов, передающихся по наследству. Поиски таких генов у возбудителя чумы не дали положительных результатов [Демидова Г.В., Зюзина В.П., 1983]. Хотя в одной работе способность к ограничению размножения фага за счёт невыясненного механизма была засвидетельствована у одного атипичного штамма *Y. pestis* Harbin

[Фурсева Н.К., 1982]. По этой причине устойчивость к диагностическим фагам чумного микроба обычно связывают с нарушением адсорбции фаговых корпускул. Если исключить неадекватность физических и биохимических условий для эффективного прикрепления вирионов к бактериальной поверхности, то определяющим для адсорбции является наличие специфических рецепторов и их функциональное состояние. Изменение структурной композиции рецептора, ингибция его синтеза или «перекрывание» другими компонентами клеточной стенки могут вызвать существенное снижение чувствительности бактерий к бактериофагам, в том числе и диагностическим, (или группе фагов) вплоть до её полной утраты. Специфическая адсорбция фага на характерном для него уровне отражает функциональную полноценность рецепторов, которые у микробов являются, прежде всего, структурами жизнеобеспечения при взаимодействии с внешней средой и, в частности, с макроорганизмом. Функция рецепции фагов для них вторична. Структура и биологическая функция этих рецепторов в жизни бактерий различна.

Так, у *K. pneumoniae* колифаги T3 и T7 сорбируются на маннозочувствительных адгезинах [Pruzzo C. et al., 1980]. Фаг T7 лизирует также бактерии *Y. pestis*, что свидетельствует о наличии аналогичных рецепторов и у бактерий этого вида. У других бактериофагов рецепторами могут служить определённые комплексы ЛПС с поверхностными белками, а также белки поверхностных мембран и их отдельные фрагменты [Pruzzo C. et al., 1980; Mutoh N., 1978; Гремякова Т.А. и др., 1997; Di Rienso J.M. et al., 1978; Datta D.B. et al., 1987]. У кишечной палочки рецептором фага λ является белок JamB, отсутствующий у возбудителя чумы. Рецептором фагов T1, T5 и ϕ 80 – белок TonA. Оба белка расположены на наружной мембране. Фагорецепторные белки могут быть одновременно рецепторами различных биологических веществ и выполнять в клетке определённые физиологические функции, являясь компонентами транспортных систем для витаминов, сахаров, железа и других веществ [Bradbeer C.M. et al., 1976; Braun V., Hantke K., 1977; Hancock R.E.W., Braun V., 1976]. Предполагается, что существуют фаги, специфичные к большинству белков наружной мембраны. Такие фаги могут быть средством маркировки мутантов по белкам наружной мембраны [Datta D.B. et al.,

1987]. Так, например повышение температуры культивирования иерсиний с 26°C до 37°C приводит к синтезу новых белков, кодируемых, в основном, плазмидами [Bölin J. et al., 1982, 1985; Martinez R.J., 1983]. Представляется вероятным, что при смене температуры культивирования и изменении структуры поверхностных слоёв клеточной стенки меняется чувствительность к бактериофагам. Известны фаги, которые лизируют бактерии кишечного иерсиниоза при 25°C, но не при 37°C [Mollaret H.H., Nicolle P., 1965]. Рецептором одного из фагов *Y. enterocolitica* (фаг XI) является белково-сахаридный комплекс. При смене температуры культивирования происходят изменения в синтезе фагового рецептора. В результате рецептор, экстрагированный из клеток, выращенных при 25°C, инактивировал бактериофаг, а полученный из аналогичных бактерий при 37°C – не взаимодействовал с ним и не инактивировал его [Kawaoka Y. et al., 1982].

Рецептором бактериофага Mu cts (термочувствительный фаг-мутатор, обнаруженный у *E. coli*) является один из участков *cor*-ЛПС [Müller K.N. et al., 1988]. Этот участок имеется у возбудителя чумы, поскольку *Y. pestis* к фагу Mu чувствительна. В качестве рецептора чумного диагностического бактериофага I серотипа (Покровской, Д'Эрелля) в одной из работ описывается «галактолипид», входящий в состав капсульного антигена F1 и отличающийся от классического ЛПС [Glosnicka R., Gruszkewicz E., 1980]. В другой работе отмечено, что одновременно с приобретением резистентности к бактериофагу Покровской бактерии чумы утрачивают низкомолекулярный липидсодержащий компонент F1 [Гребцова Н.Н. и др., 1998]. Рецепторная активность в отношении чумного бактериофага II серотипа (Л-413 «С») в одной из работ приписывают фактору аутоагглютинации *Y. pestis* [Подладчикова О.Н., Рыкова В.А., 2007].

Имеется сообщение об исследовании температурозависимых изменений в структуре наружной мембраны у бактерий возбудителя чумы и псевдотуберкулёза, выращенных при 28°C и 37°C. В экспериментах использовали штаммы обоих видов, содержащих плазмиду, обеспечивающую зависимость роста от ионов Ca^{2+} при 37°C и их бесплазмидные варианты. Работу проводили с псевдотуберкулёзным фагом Котляровой, фагом кишечной палочки Т7 и чумным – Д'Эрелля. Установлено, что незначительные различия чувствительности к фагам у обоих исследованных видов

связаны с присутствием в клетке плазмиды кальций-зависимости, но определяемые ею термоиндуцибельные белки не являются рецепторами исследованных фагов [В.И. Марченков и др., 1990].

Литическая активность полигостальных фагов, свидетельствует о наличии на поверхности одинаковых рецепторов у разных видов бактерий. Чем специфичнее бактериофаг, тем уникальнее рецепторные структуры, или же они, в соответствии со спецификой вида, находятся не на поверхности клеточной стенки, и доступ к ним «перекрыт» другими составляющими бактерии.

Среди перечисленных компонентов, могут быть такие, которые, так или иначе, оказываются причастными к экспрессии патогенности бактерий [Pruzzo C. et al., 1980; Bölin I. et al., 1985; Сибиряк С.В. и др., 1997 и др.]. Так, имеются данные о том, что для тестирования вирулентности холерного вибриона использовали определённые бактериофаги [Караваева Т.В. и др., 1992; Подосинникова Л.С. и др., 1992.]. Чувствительность к ним, т.е. интактность клеточных структур, играющих роль рецепторов для данных фагов, коррелировала с проявлением специфической патогенетической активности холерного вибриона. Упомянутые выше маннозочувствительные адгезины клебсиелл, адсорбирующие на себе некоторые колифаги, также участвуют в реализации вирулентных свойств этих бактерий [Pruzzo C. et al., 1980]. В литературе можно найти и другие примеры.

Фагоустойчивые варианты бактерий с нарушенной рецепторной способностью обычно характеризуются значительной изменчивостью свойств, которые делают проблематичным использование традиционных специфических диагностических препаратов, дифференциальных тестов и биологических проб. Всё это, в совокупности уменьшает эффективность диагностических приёмов. В связи с перечисленным, феномен фагоустойчивости бактерий вообще, и у *Y. pestis*, в частности, заслуживает детального изучения. Вызывает сожаление, что в последние годы интерес к этой проблеме почти угас. Возврат к нему и развитие исследований с привлечением современных знаний и методов диагностики, генетики и молекулярной биологии может оказаться очень результативным для решения актуальных проблем, связанных с чумой.

Ранее предметом изучения были устойчивые к диагностическим фагам I серогруппы варианты *Y.pestis*, которые селектированы в экспериментах или выделены в природных очагах от грызунов и эктопаразитов (блох и клещей) [Коробкова Е.И., 1937; Фаворисова Б.Ю., 1950; Хрущелевская Н.М., Сержанов О.С., 1978; Пак Г.Ю., 1992]. Сведения по этому вопросу указывают на то, что они по целому ряду признаков отличаются от типичных штаммов чумного микроба из того же очага. Имеющихся в литературе сведений не достаточно, чтобы с полной определённой судить о механизмах возникновения фагоустойчивых форм и о влиянии их на ход эпизоотий чумы. Однако, судя по имеющимся сведениям, мы полагаем, что фагоустойчивые формы чумного микроба занимают определённое место в схеме циркуляции его в условиях природных очагов чумы (рис. 5.1)

Мы проанализировали также данные литературы и результаты собственных исследований [Гребцова Н.Н. и др., 1998] с целью оценки глубины и характера изменчивости фагоустойчивых мутантов и для определения перспективных направлений совершенствования методов детекции фагоустойчивых мутантов и их идентификации. В частности, нами установлено, что устойчивость к чумному диагностическому фагу Покровской не сопровождается изменением продукции пестицина 1 или чувствительности к нему. Не меняется ферментативная активность по отношению к принятым в диагностике сахарам и спиртам. Сохраняются питательные потребности штаммов. Не обнаружены различия в результатах гелеэлектрофоретического анализа тотального препарата конститутивных белков (LB агар, 28°C). Сохраняется агглютинабельность бактерий чумной диагностической сывороткой. Вместе с тем установлено, что более 20 признаков могут подвергаться изменению (табл.5.1.). Проверка этих свойств в одном опыте на одних и тех же штаммах показала плеiotропность изменения свойств [Гребцова Н.Н. и др., 1998].

Выявлены также изменения, не описанные ранее, но весьма важные для биологии возбудителя чумы:

- 1) появление чувствительности к бактерицидному действию нормальной сыворотки;

- 2) возможность утраты Caf1-плазмиды или увеличение её молекулярной массы, при появлении тенденции к снижению титра капсульного антигена F1;
- 3) утрата антимacroфагальной активности и низкомолекулярного компонента ЛПС;
- 4) снижение числа КОЕ при 37°C.

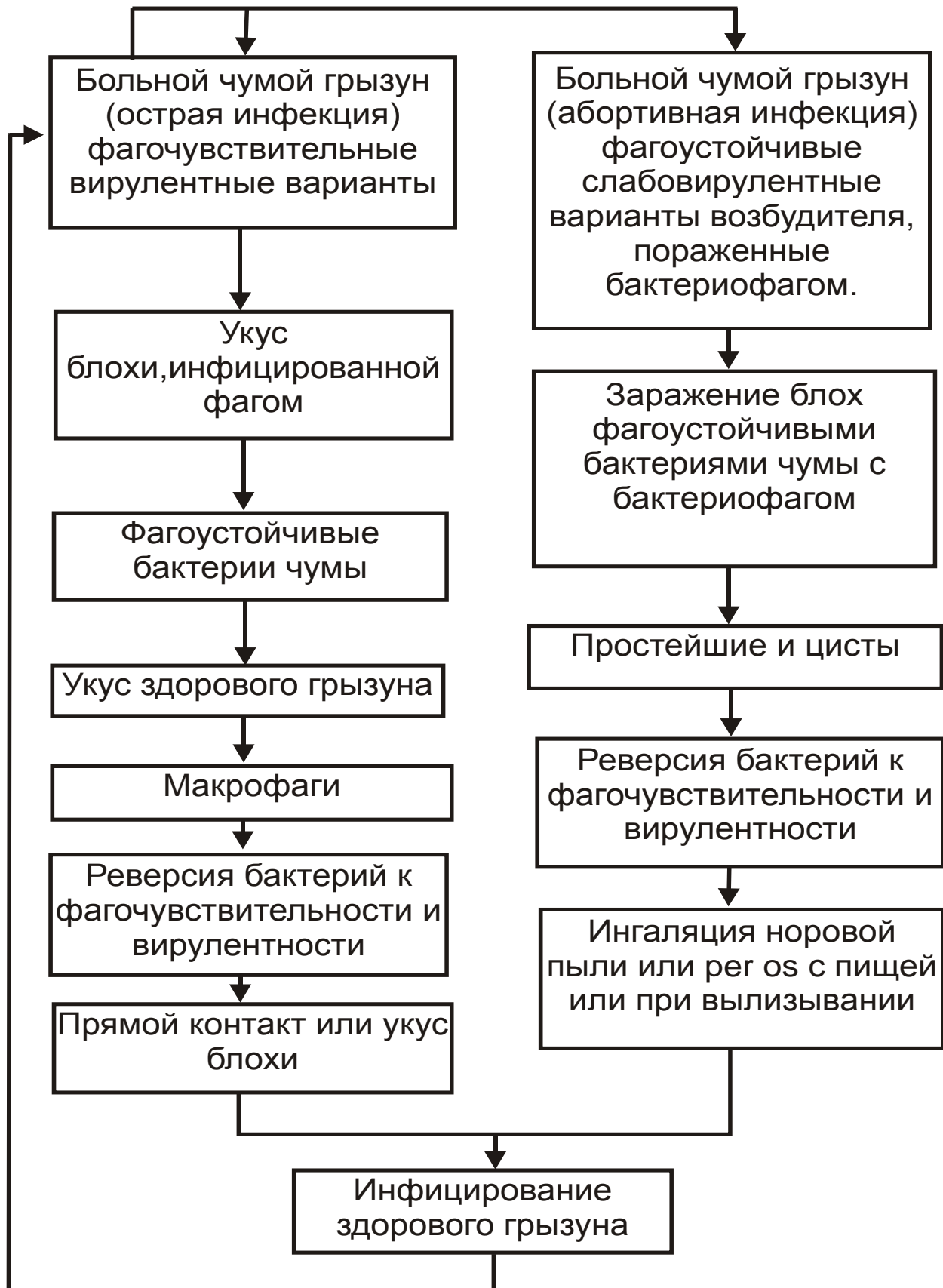


Рис. 5.1. Фрагмент схемы циркуляции фагоустойчивых вариантов чумного микроба в природном очаге чумы.

Большинство этих изменённых признаков, так или иначе, влияют на характер взаимоотношений микроба чумы с чувствительным носителем [Гребцова Н.Н. и др., 1998].

Плейотропность изменений свойств у фагоустойчивых вариантов вряд ли связана с единичной мутацией. Скорее это отражение неоднородности популяций штаммов, где предсуществуют клоны, содержащие ряд регуляторно отключённых, функционально связанных детерминант. При этом биологический смысл таких вариаций не столько в том, чтобы противостоять бактериофагам, с которыми возбудитель чумы может встречаться в природе. Скорее это одна из форм существования микроба в определённых условиях окружающей среды, которая позволяет ему выжить. При анализе фагоустойчивых вариантов чумного микроба, прежде всего, обращает на себя внимание выраженная нестабильность свойства фагоустойчивости и высокая частота реверсий к исходной фагочувствительности. Именно они наводят на мысль о том, что описанная фагоустойчивость определяется не множественной мутационной изменчивостью генома, а скорее она обусловлена регуляторными механизмами, связанными с IS-зависимыми рекомбинационными событиями, которые опосредуют каскад изменений фенотипа, способных к реверсии при соответствующем селективном давлении. Негативной в этом каскаде для бактерий чумы является утрата, или реже, значительное снижение вирулентности фагоустойчивых бактерий *Y. pestis* при их взаимодействии с макроорганизмом.

Особое место в ряду вариантов *Y. pestis* устойчивых к диагностическим фагам I серогруппы занимают «псевдолизогены». Их можно селективировать после воздействия вирулентным диагностическим фага на чувствительные к нему бактерии чумы. Культуры подобных вариантов *Y. pestis* становятся устойчивыми к бактериофагу и содержат гомологичный фаг, литически активный к исходному штамму. Многократные пассажи на питательных средах со специфической антифаговой сывороткой приводят, как правило, к утрате фагоустойчивости и способности к фагопродукции. То же происходит и при пассажах через организм чувствительных к чуме млекопитающих. И это притом, что сами «псевдолизогены», как показано, [Мишанькин Б.Н., Сучков Ю.Г., 1973] авирулентны.

Одной из причин этого снижения вирулентности может быть ослабление приживаемости бактерий в организме носителя. Свидетельство тому – одновременная утрата вирулентности, способности противостоять бактерицидному действию нормальной сыворотки и резкое снижение антифагоцитарной активности. В результате подавляющее большинство бактерий гибнет. Оставшаяся часть переходит в состояние стаза при попадании в макрофаг или сыворотку (плазму) крови носителей, к бактерицидному или бактериостатическому действию которых фагоустойчивые варианты чувствительны. Негативный эффект анализируемого типа фагоустойчивости на вирулентность может дополнительно усиливаться за счёт общего снижения скорости роста фагоустойчивых бактерий и повышения их термочувствительности, которая проявляется вне зависимости от ионов Ca^{2+} и приводит к резкому снижению КОЕ на среде LB при $37^{\circ}C$ по сравнению с $28^{\circ}C$ и показателями исходного штамма в контроле. С этим согласуется тот факт, что ни в одном опыте, из числа описанных, в органах забитых или павших животных, инфицированных фагоустойчивыми вариантами, не удалось обнаружить бактерии *Y. pestis*, устойчивые к бактериофагу [Гребцова Н.Н. и др., 1998; Лебедева С.А., 2000].

Известно, что гибель бактерий в сыворотке крови может обуславливаться наряду с другими факторами активностью комплемента [Кишиневский А.М., 1970] и дефицитом железа [Кравцов А.Н. и др., 1987; Bülen et al., 1992]. Дефицит железа индуцирует, в свою очередь, у *Y. pestis* синтез специфических поверхностных белков [Carniel E et al., 1987; Тихонов С.Н., 1996]. Уровень этого синтеза в значительной степени прямо коррелирует с признаком пигментсорбции (Pgm), который связан с вирулентностью [Burrous T.W., 1962] или трансмиссивностью возбудителя чумы [Hinnebush et al., 1996]. Частота не способных к сорбции пигмента мутантов в популяции микроба при повреждении генов утилизации железа (*fur*) и сорбции гема (*hms*) [Staggs T.M. et al., 1994] зависит от IS-рекомбинационных событий по-соседству с этими генами [Lucier T.S., Brubaker R.R., 1992]. Фагоустойчивые варианты [Волосивец С.И., 1979; Степанов В.М. и др., 1994; Гребцова Н.Н. и др., 1998] характеризуются наряду с чувствительностью к нормальной сыворотке крови увеличением числа Pgm⁻ клонов в популяции, по сравнению с исходными штаммами. Возможно, что к такому увеличению могут

быть причастны нарушения Fug- системы, важной для вирулентности иерсиний и/или активация IS-элементов, способных влиять на экспрессию соседних с ними генов. Это определяет целесообразность более детальных исследований в данном направлении.

Причина снижения антимакрофагальной активности фагоустойчивых вариантов чумного микроба может быть связана с рядом факторов, среди которых, в частности, F1 антиген, компоненты Pgm-системы, продукты плазмиды кальцийзависимости (pLcr, pCad, pYV) и ЛПС [Burrows T.W., Bakon G.A., 1956; Brubaker R.R., 1972; Williams R.C. et al., 1972; Charnetzky W.T., Shufford W.W., 1985; Pollack C. et al., 1986; Straley A., Gibull M., 1989; Pavlovich N.V., Sorokin V.M., 1995]. Экспрессия Pgm-признака, с одной стороны, коррелирует с продукцией упомянутых выше белков железodefицита, причастных к нейтрализации кислород-зависимых бактерицидных систем макрофагов [Тихонов С.Н., 1996], с другой, может быть связана с pCad плазмидой [Burrows T.W., 1973], детерминирующей общие для иерсиний антифагоцитарные компоненты.

Пока не ясна причина отсутствия у мутантов коагулазной и фибринолитической активности (*pla*), при сохранении способности продуцировать пестицин 1 (продукты минорной 6 МД pPst плазмиды чумного микроба). Имеются данные о функциональной связи pPst и Lcr-плазмид *Y. pestis* [Sodeinde O.A. et al., 1988]. Эта связь выражается в физиологически оправданной частичной фрагментации некоторых детерминированных плазмидой pLcr YOP-белков за счёт *pla*-протеазы. Если это необходимо для экспрессии вирулентности возбудителя чумы, то одновременная утрата вирулентности и *pla*-протеазы у фагоустойчивых вариантов *Y. pestis* может быть понятной. Противоречит этому предположению высокая вирулентность штаммов чумного микроба для белых мышей, выделенных в Закавказском высокогорном природном очаге, характерной особенностью которых является отсутствие pPst плазмиды и, следовательно, пестицина 1 и плазмокоагулазы. Однако в данном случае речь идёт о проявлении избирательной вирулентности, т.е. о вирулентности по отношению только к отдельным видам грызунов [Леви М.И. и др., 1961]. Возможно, у них продукт деградации YOP не настолько важен для экспрессии патогенных свойств, или же деградацию

обеспечивает другой протеин, что делает корреляцию этой функции с вирулентностью скрытой.

Свойства бактерий чумы, устойчивых к диагностическим бактериофагам I серогруппы, указывают на то, что изменяется их клеточная стенка. Резкое снижение сорбции фаговых корпускул является следствием нарушения композиции или синтеза рецепторов для фага. Они пока полностью не идентифицированы у *Y. pestis*, но чувствительность к фагу бесплазмидных штаммов этого микроба позволяет, прежде всего, полагать хромосомную детерминированность рецепторов и не связывать их напрямую с «плазмидными» антигенами. По аналогии с другими микроорганизмами, с учётом перекрестной устойчивости исследованных фагорезистентных вариантов к известным коли-фагам фII и T7, активным в отношении *Y. pestis*, а также, судя по нарушению адсорбции фагов после обработки бактерий чумы хлороформом [Пак Г.Ю. и др., 1981; Кутырев В.В. и др., 1987], на роль рецепторов диагностического чумного фага Покровской наиболее подходят связанные с ЛПС структуры или адгезины [Pruzzo C. et al., 1980]. Именно на них следует обратить внимание при дальнейших исследованиях.

От свойств наружного слоя бактериальной клетки и от особенностей ЛПС, F1-антигена и других, связанных с ним компонентов зависит её поверхностный заряд. Этот заряд во многом определяет форму колоний при росте на плотных питательных средах, а также способность к агломерации бактерий в организме носителя и в его эктопаразитах. Склонность к аутоагглютинации бактерий чумы, как полагают, связана с вирулентностью [Laird W.J., Cavanaugh D.C., 1980]. Следовательно, изменение формы колоний фагоустойчивых вариантов *Y. pestis* отражает вариации упомянутых характеристик поверхностного слоя фагорезистентных бактерий. Об изменении их клеточной стенки свидетельствует обнаруженный дефицит низкомолекулярного липидсодержащего компонента [Гребцова Н.Н. и др., 1998], по всей видимости, участвующего в агломерации субъединиц F1 антигена [Kocse L.B. и др., 2002], а также возрастание чувствительности к полимиксину [Butler T., Moller G., 1977] и генцианвиолету [Salamach A.A., Charnetzky W., 1986]. Повышенная чувствительность к генцианвиолету является показателем увеличения проницаемости клеточной стенки

бактерий при изменении её структуры [*Salamach A.A., Charnetzky W., 1986*]. Это обуславливает интенсивное внутриклеточное накопление красителя-ингибитора. Полноценные клетки *Y. pestis*, тем более имеющие капсулу, в значительной мере защищены от генцианвиолета при культивировании на питательных средах с его содержанием и более устойчивы к нему, чем другие бактерии и в первую очередь кишечная палочка. Мишенью действия полимиксина являются компоненты ЛПС [*Butler T., Moller G., 1977*]. Повышенная чувствительность к этому антибиотику – свидетельство изменений в ЛПС, которые увеличивают доступность соответствующих сайтов для препарата и обеспечивают его эффект при значительно меньших дозах. Кстати, бактерицидное действие сыворотки крови тоже во многом зависит от структуры ЛПС бактерий и нарастает по мере перехода её от S-формы к R [*Sorokin V.M., Pavlovich N.V., 1995*]. Следствием структурных вариаций наружного слоя их клеточной стенки может быть и тенденция к снижению титра антигена F1 у фагорезистентных вариантов чумного микроба [*Гребцова Н.Н. и др., 1998*]. Отмечено резкое снижение титра F1 у сферопластов *Y. pestis*, у которых этот антиген представлен, в основном, цитоплазматической формой [*Кишиневский А.М., 1962*]. Фракция 1 является основной частью капсулы *Y. pestis*, включающей также и ЛПС. Изменение ЛПС у фагоустойчивых вариантов не может не отразиться на представлении фракции 1 на поверхности клетки и на её накоплении в капсульной субстанции бактерий чумы. Штаммы, дефектные по продукции F1 [*Анисимов А.П. и др., 1992*], так же, как ранее упомянутые *fur*-мутанты, отличаются повышенной частотой появления Pgm⁻ клонов, которая характерна для фагоустойчивых бактерий чумы. Возвращаясь к возможному участию IS-элементов в изменчивости, сопровождающей фагоустойчивость, следует напомнить, что появление Fra⁻ и Pgm⁻ клонов может быть опосредовано IS285 и IS100 элементами, соответственно [*Carniel E et al., 1987; Филиппов А.А. и др., 1997*]. Пока не укладываются в эти предположения факты утраты автономной rFra-плазмиды, связанной с продукцией F1-антигена, или увеличение её молекулярной массы у некоторых резистентных к фагам вариантов. Такая ситуация возможна при интеграции плазмиды в хромосому или при перестройках её генома, опосредованных IS-элементами, что не может не сказаться на интенсивности экспрессии плазмидных генов. Если в процессе

формирования фагоустойчивых форм имеет место активация IS-перестроек, то эффект её на упомянутую плазмиду вполне возможен. Однако тогда возникает вопрос, в чём исключительность именно этой плазмиды?

Известно, что реверсия бактерий чумы к фагочувствительности наблюдается при пересевах на питательных средах и в органах животных, заражённых такими бактериями. Сравнительно недавно было установлено, что такая реверсия может происходить *in vitro* в перитонеальных макрофагах.

Таблица 5.2.

Перечень изменяющихся свойств у природных и экспериментальных фагоустойчивых вариантов *Y. pestis*

№ п/п	Характеристика свойства	Ссылки
1	2	3
1.	Устойчивость только к гомологичному фагу	[Гребцова Н.Н. и др., 1998; Сатыбалдиев Н.А., Алимходжанов Е.А., 1984]
2.	Устойчивость к одному или нескольким гомо- и гетерологичным фагам (включая диагностический Л-413С)	[Гребцова Н.Н. и др., 1998; Сатыбалдиев Н.А., Алимходжанов Е.А., 1984; Лешкович Н.Л., 1978; Волосивец С.И., 1979; Пак Г.Ю., Сатыбалдиев Н.А., 1979]
3.	Утрата фибринолитической, утрата или снижение плазмокоагулирующей активностей	[Гребцова Н.Н. и др., 1998; Лешкович Н.Л., 1978; Волосивец С.И., 1979; Пак Г.Ю. и др., 1981; Кутырев В.В. и др., 1987]
4.	Повышение чувствительности к полимиксину	[Гребцова Н.Н. и др., 1998; Лешкович Н.Л., 1978]
5.	Высокая чувствительность к генцианвиолету	[Гребцова Н.Н. и др., 1998; Сатыбалдиев Н.А., Алимходжанов Е.А., 1984, Пак Г.Ю. и др., 1981, Кутырев В.В. и др., 1987]
6.	Снижение скорости роста	[Пак Г.Ю. и др., 1990; Гребцова Н.Н. и др., 1998, Мишанькин Б.Н, Сучков Ю.Г., 1973]
7.	Снижение адсорбции гомологичного фага	[Гребцова Н.Н. и др., 1998; Лешкович Н.Л., 1979]
8.	Изменение формы бактерий (увеличенные и нитевидные клетки)	[Гребцова Н.Н. и др., 1998]
9.	Изменение формы колоний	[Пак Г.Ю. и др., 1990, Гребцова Н.Н. и др., 1998,

		<i>Сатыбалдиев Н.А., Алимходжанов Е.А., 1984, Степанов В.М. и др., 1994]</i>
10.	Снижение степени зависимости от ионов Ca^{2+} при 37°C	<i>[Гребцова Н.Н. и др., 1998; Волосивец С.И., 1979, Степанов В.М. и др., 1994]</i>
11.	Отсутствие роста на среде Хигучи-Смита	<i>[Пак Г.Ю. и др., 1990; Гребцова Н.Н. и др., 1998; Пак Г.Ю. и др., 1981]</i>
12.	Снижение в популяции числа клеток, сорбирующих пигменты	<i>[Гребцова Н.Н. и др., 1998; Волосивец С.И., 1979; Степанов В.М. и др., 1994]</i>
13.	Отсутствие роста на среде Джексона - Берроуза	<i>[Пак Г.Ю. и др., 1981; Пак Г.Ю. и др., 1990]</i>
14.	Снижение вирулентности (или утрата) для белых мышей и авирулентность для морских свинок	<i>[Пак Г.Ю. и др., 1990; Гребцова Н.Н. и др., 1998; Волосивец С.И., 1979; Мишанькин Б.Н., Сучков Ю.Г., 1973; Степанов В.М. и др., 1994]</i>
15.	Снижение вирулентности для песчанок, длительное течение инфекции	<i>[Пак Г.Ю. и др., 1990; Степанов В.М. и др., 1994]</i>
16.	Снижение иммуногенности для лабораторных животных и диких грызунов	<i>[Пак Г.Ю. и др., 1990; Гребцова Н.Н. и др., 1998; Лешкович Н.Л., 1978; Волосивец С.И., 1979]</i>
17.	Устойчивые к фагу культуры <i>Y.pestis</i> от инфицированных ими павших или забитых животных не выделяются	<i>[Гребцова Н.Н. и др., 1998; Пак Г.Ю. и др., 1981; Мишанькин Б.Н., Сучков Ю.Г., 1973]</i>
18.	Способность реверсировать к фагочувствительности с восстановлением вирулентности и при хранении на питательных средах и пассажах через организм чувствительных к чуме животных	<i>[Гребцова Н.Н. и др., 1998; Волосивец С.И., 1979; Пак Г.Ю. и др., 1981; Мишанькин Б.Н., Сучков Ю.Г., 1973]</i>
19.	Появление рамнозопозитивности в поздние сроки у фагоустойчивых вариантов рамнозонегативных штаммов	<i>[Гребцова Н.Н. и др., 1998; Лешкович Н.Л., 1978]</i>
20.	Появление способности к денитрификации и нитрификации у исходно негативных штаммов	<i>[Пак Г.Ю. и др., 1990]</i>
21.	Появление способности к синтезу жёлтых пигментов	<i>[Стручкова Э.Н. и др., 1992]</i>
22.	Повышение чувствительности к ионам Mg^{2+}	<i>[Кутырев В.В. и др., 1987]</i>
23.	Появление ионнезависимой термочувствительности (снижение КОЕ при 37°C)	<i>[Гребцова Н.Н. и др., 1998]</i>
24.	Появление повышенной чувствительности к ингибирующему действию нормальной	<i>[Гребцова Н.Н. и др., 1998]</i>

	сыворотки крови человека (или свиньи)	
25.	Тенденция к снижению титра капсульного антигена F1 в бактериальных культурах	[Гребцова Н.Н. и др., 1998; Волосивец С.И., 1979]
26.	Склонность к сокращению характерного плазмидного состава	[Гребцова Н.Н. и др., 1998]
27.	Утрата низкомолекулярного липидсодержащего компонента клеточной стенки	[Гребцова Н.Н. и др., 1998]
28.	Утрата способности вирулентных штаммов <i>Y. pestis</i> противостоять завершению фагоцитоза и размножаться в макрофагах морской свинки	[Гребцова Н.Н. и др., 1998]
29.	Выделение фагочувствительных вирулентных культур <i>Y. pestis</i> из инфицированных фагоустойчивыми бактериями этого вида перитонеальных макрофагов, искусственно разрушенных через 1 час контакта	[Гребцова Н.Н. и др., 1998]

Примечание: изменение свойств, указанных в п.1-12, 14, 16-18, 23-28, наблюдали одновременно у одних и тех же фагоустойчивых вариантов *Y. pestis* [Гребцова Н.Н. и др., 1998].

Через час контакта бактерий с макрофагами, после искусственного разрушения последних, из лизата макрофагов выделены культуры чумного микроба, полностью восстановившие чувствительность к использованному в экспериментах фагу Покровской [Гребцова Н.Н. и др., 1998]. В связи с этим возникает ряд вопросов. Не связаны ли эти модификации бактерий с воздействием ионов Mg^{2+} , которые ингибируют рост фагоустойчивых вариантов [Кутырев В.В. и др., 1987] и влияют на активность IS-зависимых перестроек в бактериях чумы [Заренков М.И. и др., 1989]. Может ли подобное происходить в клетках простейших, с которыми чумной микроб контактирует в природных очагах? Не включаются ли простейшие в известную цепочку «грызун, инфицированный возбудителем чумы, → блохи, заражённые фагами, → селектированные в блохах формы возбудителя со свойствами, сопутствующими резистентности к фагам» [Гребцова Н.Н. и др. 1998]? Вполне возможно, что, утилизируя фекалии блох, содержащих изменённые фагоустойчивые бактерии возбудителя чумы, простейшие обеспечивают условия для их реверсии в

вирулентную фагочувствительную форму, а затем сохраняют её разное по длительности время в цистах [Петрунина О.М., 1951]. Это обеспечивает в последующем возможность интратрахеального или перорального заражения восприимчивых к чуме теплокровных обитателей нор грызунов. Допуская подобную ситуацию, представляется, что роль простейших в циркуляции возбудителя чумы в природе может быть значительно шире и многогранней.

Изучение резистентных к диагностическим фагам вариантов чумного микроба крайне важно не только для определения их места и роли в природных очагах чумы или выяснения механизма патогенеза этой инфекции. Оно необходимо ещё и потому, что изменчивость фенотипа, в связи с фагоустойчивостью, может помешать выявлению чумного микроба при обследовании очагов, и это потому, что в число изменяющихся признаков входят те, от которых во многом зависит эффективность ускоренных и классических приёмов диагностики: (1) утрата чувствительности к диагностическим бактериофагам; (2) возможность утраты автономной рF₁ плазмиды и связанного с ней капсульного антигена F1 (3) снижение синтеза F1-антигена до уровня, вызывающего сомнения в специфичности результатов его анализа. К этому же типу признаков относятся (4) замедленная скорость роста на питательных средах вообще; (5) отсутствие (чаще) или (реже) крайне низкая, эффективность роста фагоустойчивых вариантов *Y.pestis* на общепринятых питательных средах с генцианвиолетом; и (6) недоступность выделения на полноценных питательных средах культур чумного микроба от павших или забитых животных, инфицированных фагоустойчивыми бактериями чумы, что свидетельствует об их гибели или модификация формы существования под действием факторов организма лабораторных животных

Всё это создаёт предпосылки для ложно-отрицательных результатов анализа полевого материала на чуму. Подобная гиподиагностика была бы не столь страшна, если бы фагоустойчивые варианты были «сапрофитным» тупиком в процессе приспособительной изменчивости возбудителя чумы. Однако способность таких форм чумного микроба уклоняться в определённой степени от диагностики, а в дальнейшем реверсировать к вирулентному состоянию, создаёт опасную ситуацию, при которой на фоне ложных «отрицательных» результатов обследования очага

возможна вспышка классической чумы. В связи с этим проблема выявления и идентификации резистентных к бактериофагам вариантов возбудителя чумы требует детальной и глубокой разработки, прежде всего, из-за возможности их упущения при посеве полевого материала на среду с генцианвиолетом и при постановке биопроб. Следовательно, можно предположить, что частота встречаемости измененных форм возбудителя чумы с фагоустойчивостью выше той, которая отражена в литературе.

Активизация природного очага чумы после межэпизоотического благополучия подразумевает, помимо повышения восприимчивости чувствительных носителей, также трансформацию возбудителя из скрытой формы в биологически активную, вирулентную, трансмиссибельную. Если согласиться с возможностью существования и размножения чумного микроба в природе вне чувствительного макроорганизма, то для фагоустойчивых вариантов чумного микроба можно найти нишу в нашем представлении о межэпизоотическом периоде различной продолжительности. Это подтверждают результаты лабораторных экспериментов, включая данные о взаимоотношениях возбудителя чумы с одноклеточными простейшими и блохами. Однако для локализации этой ниши необходимо доказательно ответить на ряд вопросов. Где, под влиянием каких факторов, с помощью каких механизмов появляются изменённые фагоустойчивые клоны и их популяции в природе? Как долго они могут циркулировать среди носителей инфекции при своей незначительной патогенности? Где они могут обитать вне хозяина носителя и как долго сохраняются в активном или некультивируемом состоянии? Каковы их взаимоотношения с обитателями нор грызунов-носителей: с блохами, клещами, простейшими, другими микроорганизмами, фагами? Как они попадают в организм чувствительного хозяина? Где чаще происходит реверсия: в макроорганизме или вне его, и какая из этих ситуаций наиболее существенна для сохранения возбудителя как вида в природном очаге чумы?

В общей сложности, поднятые в связи с фагоустойчивостью вопросы, нуждаются в специальных исследованиях, без которых решение проблем природных эпизоотических очагов чумы весьма затруднительно. Возврат интереса специалистов к ним с использованием современных высокоинформативных методов

исследования и с привлечением более глубоких знаний по физиологии, генетике и молекулярной биологии возбудителя чумы весьма целесообразен.

Многие аспекты обсуждаемой проблемы представляют общебиологический интерес, поскольку актуальны и для других микробов.

Фагоустойчивость и сопутствующие ей вариации гено- и фенотипа являются модусом изменчивости бактерий разных видов, в том числе и патогенных. Широкое распространение среди диких и экспериментальных штаммов явления фагоустойчивости на фоне высокой частоты встречаемости литически активных фагов отражает один из механизмов сохранения бактерий в природе. Разработка доступных эффективных приёмов их выявления, культивирования, идентификации и повышения результативности бактериологического анализа при обследовании очагов – вопрос крайне актуальный. Рекомендации использовать иммуноферментный анализ для выявления бактерий чумы, посев материала на плотную среду с фибриногеном [Кутырев В.В. и др., 1987], несомненно, полезны, но не решают всей проблемы в целом. Детальное изучение фагоустойчивых вариантов чумного микроба, с учётом их изменённых свойств и сопутствующей дефектности по вирулентности и иммуногенности, позволит разобраться в деталях механизма этого типа изменчивости и индуцирующих её факторах, но также уяснить этапы взаимодействия возбудителя чумы с чувствительными к его патогенетическому действию макроорганизмами. И, наконец, это создаст предпосылки для получения данных, полезных для понимания механизмов зарождения и затухания эпизоотий, корректной оценки очагов и более точного прогнозирования угрожающих ситуаций.

5.6. Роль бактериофагов в генетической изменчивости возбудителя чумы

Среди бактериофагов, литически активных в отношении возбудителя чумы, некоторые способны обеспечивать истинную лизогенизацию и трансдукцию. При этом наибольшая активность установлена для гетерологичных полигостальных фагов. Доказательств подобной активности в отношении чумных диагностических бактериофагов I серогруппы (Покровской и Д'Эрелля) в литературе нет в силу того, что они являются вирулентными вариантами, а потому вероятность их участия в обмене генетическим материалом у чувствительных к ним бактерий мала. В дискуссиях высказываются предположения о возможном существовании умеренных

«предков» этих фагов, но данные, свидетельствующие в пользу этого, отсутствуют. Иная ситуация с фагами II серогруппы - Л-413, Н и другими. Существующие в виде умеренных фагов и вирулентных мутантов, они могут переходить в состояние профага, осуществляя лизогенизацию бактерии и конверсию по некоторым свойствам, и быть переносчиками генетического материала при трансдукции в пределах вида *Y. pestis*, между видами и даже между родами бактерий, имеющих подходящие рецепторы.

Лизогенизация это состояние бактерий, у которых проникшая в них фаговая ДНК сохраняется в виде профага во встроенном в геном или внехромосомном «плазмидном состоянии и обеспечивает устойчивость лизогена к лизогенизовавшему и гомологичному умеренному бактериофагу. При отсутствии дефектности ДНК профага у части бактерий популяции лизогена под воздействием неидентифицированного природного или определённого экспериментального индуцирующих факторов профаг активируется к репликации и литической реакции, обеспечивая образование полноценных вирионов, способных к последующей лизогенизации.

Лизогенная конверсия – изменение свойств бактерий после лизогенизации за счёт некоторых фаговых и других функциональных генов стабильно, сохраняющихся в профаге и попавших в него при некорректной эксцизии из хромосомы предыдущего хозяина или за счёт встройки фрагментов хромосомы хозяина путём IS-зависимой рекомбинации. Изменение свойств лизогена может происходить также за счёт IS-зависимой встройки профагов в разные *att*-сайты генома бактерии с последующим мутагенным эффектом на разобщённый ген (фаги мутаторы).

Дефектные профаги – различной протяжённости фрагменты ДНК бактериофагов или геномы фагов с повреждёнными генами репродукции, локализованные в хромосоме бактерии-хозяина. При сохранении целостности соответствующих генов они иногда могут обеспечивать иммунитет к суперинфекции гомологичным полноценным фагам и лизогенную конверсию, но не способны к литической реакции и репродукции.

Специфическая и общая трансдукция – перенос фаговыми корпускулами определённого (специфическая) или любого (общая) генетического материала от одного микроорганизма другому.

У чумных фагов наличие способности к лизогенизации, лизогенной конверсии и трансдукции длительное время отрицалось [Smith D.A., 1961]. С выделением бактериофагов Н и Л-413 [Ларина В.С., 1969; Новосельцев Н.Н., 1970, 1970a] были осуществлены первые попытки передать с их помощью внутри вида *Y. pestis* некоторые свойства. Фагом Н была трансдуцирована устойчивость к стрептомицину и ферментативная активность в отношении глицерина [Новосельцев Н.Н., 1970]. В результате использования фага Л-358, (серологический аналог Л-413), получены свидетельства в пользу передачи других маркеров - *lac*, *str*, *trp*, *pgm*, *gly*, *thi*, *fra* [Ларина В.С., Анисимов П.И., 1977]. Позже поиски трансдуцирующих фагов продолжились с использованием фагов кишечных бактерий: P1, P22, T4 [Домарадский И.В., 1984; Заренков М.И. и др., 1985; Лебедева С.А., 1993].

Удачей было получение устойчивых лизогенов бактерий чумы после их обработки фагом P1Cm (один из вариантов умеренного полигостального колибактериофага P1), который в своём геноме содержал вставку гена, отвечающего за устойчивость к хлорамфениколу [Lawton W.D., Molnar D.M., 1972; Zitman D., Ben-Gurion R., 1972]. Следующим этапом было испытание других вариантов этого бактериофага – P1vir и полученного на его основе фага P1 cml clr 100 ts [Rosner J., 1972], а также термочувствительного варианта умеренного фага Mu - Mu cts 61(62) - родственного, но не идентичного фагу P1 [Torres-Cabassa A.S., Gottesman S., 1987], хотя имеющего некоторые свойства, сходные с фагом Л 413С [Гуревич Г.К., Лебедева С.А., 1982; Гуревич Г.К. и др., 1983; Лебедева С.А. и др., 1981, 1984, 1984a; Ракин А.В. и др., 1982, 1985; Арсеньева Т.Е. и др., 2007].

Фаги P1 cml clr 100 ts и Mu cts 61(62) обладали рядом преимуществ. Во-первых, благодаря наличию соответствующих рецепторов у бактерии чумного микроба эти фаги могли на них адсорбироваться. Во-вторых, фаги достаточно эффективно лизогенизировали штаммы *Y. pestis* с внедрением фаговой ДНК в различные сайты хромосомы или собственных плазмид. В-третьих, в силу наличия у них термочувствительности профаги при 37°C активизировались, переходя в

литическую форму, и обеспечивали трансдукцию различного генетического материала. Получить μ -лизогены бактерий чумы оказалось возможным и после передачи в них плазмид с предварительно встроенным профагом μ cts 61(62). Несмотря на некоторое сходство фагов, удалось также получить дилизогены, способные к продукции производных фагов μ и P1 [Плотников О.П., 1982]. Доказательством наличия профагов P1cml clr 100 ts в предполагаемых лизогенных бактериях чумы была экспрессия гена cml, обеспечивающего устойчивость к хлорамфениколу. Более того, в ДНК бактериофага P1 cml clr 100 ts содержится детерминант, определяющий синтез рестриктазы EcoP1 [Boyer H.W., 1964; Krüger D.N. et al., 1977]. Эта рестриктаза ограничивает развитие фага T7, к которому возбудитель чумы чувствителен. Утрата этой чувствительности после контакта с бактериофагом P1 cml clr 100 ts - свидетельство лизогенизации и последующей конверсии.

Помимо приобретенной резистентности к хлорамфениколу и к бактериофагу T7 у лизогенов наблюдали также конверсию по признаку резистентности к специфическому диагностическому бактериофагу Покровской, (родственному фагу T7), что позволяет предположить действие рестриктазы EcoP1. Вместе с тем у лизогенов сохранились основные свойства, специфические для вида *Y. pestis*, [Гуревич Г.К., Лебедева С.А., 1982]. Чувствительность к бактериофагу Покровской при скрининге и идентификации культур, подозрительных на принадлежность к возбудителю чумы, проверяется на первом этапе в силу простоты постановки теста, его доступности и информативности. Возможность встречи бактерий чумы с полигостальным бактериофагом P1, который широко распространен в природе, вполне реальна. Появление и циркуляция таких скрытых P1-лизогенных штаммов *Y. pestis*, устойчивых к диагностическому бактериофагу, может усложнить идентификацию.

Ограниченный спектр свойств, изменённых у P1-лизогенов, вероятно объясняется существованием профага в автономном состоянии. У лизогенов чумного микроба, лишённых характерных плазмид после лизогенизации фагом P1 cml clr 100 ts обнаруживалась автономная ДНК на уровне 65-68 МД, которая исчезала после утраты описанных выше маркеров профага (Cm^R и EcoP1).

Помимо способности к активной продукции фага полученные в экспериментах лизогены по бактериофагу Mu cts 61(62), как правило, проявляли устойчивость к бактериофагу Л-413, который рекомендуют в качестве диагностического при скрининге типичных штаммов *Y. pestis* [Ларина В.С., 1969; Ракин А.В., 1984; и др.], а иногда менялись и другие свойства. Изменения могли возникать иногда за счёт трансдуцирующей активности фага, но чаще в результате встройки профага в различные сайты генома. Зарегистрированы дополнительные потребности в аминокислотах, отдельные изменения ферментативной активности и протяжённые дефекты плазмидных генов, в том числе отвечающих за синтез видоспецифического антигена F1, который играет определяющую роль при диагностике чумы [Ракин А.В., 1984; Ракин А.В. и др., 1985; Ракин А.В., Рыкова В.А., 1990].

Реальность лизогенной конверсии бактерий чумы в результате встройки в геном бактерий профагов, доказанная на модели бактериофага Ø, свидетельствует ещё об одном механизме изменения свойств, а именно, под влиянием встроек различных дефектных профагов, неспособных к литическому проявлению, или их фрагментов. Такие встройки могут обуславливать длительное нарушение функций повреждённых генов *Y. pestis*, а при утрате способности к самостоятельной эксцизии из генома обуславливать признаки, характерные для этого вида [Prentice M.B. et al., 2001]. Недавно в геноме возбудителя чумы был обнаружен фрагмент ДНК одного из нитчатых фагов, присутствие которого характерно для *Y. pestis*, но не для *Y. pseudotuberculosis* [Radnedge L. et al, 2001].

В последнее время предметом исследования стали области хромосомных ДНК разных бактерий, которые содержат короткие высококонсервативные последовательности, разделённые специфическими переменными «спейсерами» (CRISPRs). По мнению одних исследователей эти структуры соответствуют фрагментам некоторых известных профагов. Другие предполагают, что некоторые из «спейсеров» могут быть компонентами неизвестных пока вирусов. Этим элементам отводится регуляторная роль в функционировании некоторых генов, а также участие в эволюционных изменениях микробов. Такие же исследования CRISPRs проводятся на *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* [Zhou D. et al., 2004; Anisimov A.P. et al., 2004], Важно отметить, что тестирование специфических

последовательностей этих спейсеров с помощью ПЦР могут быть очень эффективным инструментом при идентификации указанных видов и их внутривидовой градации.

Сравнительно недавно в геноме штаммов *Y. pestis* биовара *orientalis* (океаническая глицериннегативная разновидность) был открыт новый филаментозный профаг *CUS-2* (Υ pf \emptyset), интегрированный с хромосомой, который в биоварах *mediaevalis* и *antiqua* был обнаружен в виде нестабильных внехромосомных элементов [Gonzales M.D. et al., 2002; Debris A. et al., 2006]. Интеграция определяется в сайте *dif*, относительно похожем на тот, который описан для гомологичного профага *CUS-1*, известного для штаммов *E. coli* O18:K1:H7. Оба типа лизогенных штаммов (*E. coli* и *Y. pestis*) продуцируют частицы со свойствами, характерными для однонитчатой фаговой ДНК. Усиление вирулентности, связанное с этим профагом, как полагают, происходит при реализации этого феномена внутри заражённого макроорганизма и не связано с повышением эффективности трансмиссии возбудителя блохами [Debris A. et al., 2006]. Наличие профага *CUS-1* у штаммов *E. coli* обычно эпидемиологически коррелирует с увеличением их вирулентности, за счёт патогенетических проявлений в процессе инвазии за пределы кишечника и возникновения сепсиса. Молекулярной основой этого отличительного потенциала болезни, как предполагают, является вовлечение специализированных генов вирулентности, привнесённых профагами [Johnson J. R., et al., 2001; Rode, C. K. et al., 1999]. Больше, чем 20 островков, выявленных в геноме штамма *Y. pestis* CO92 (включая связанный с вирулентностью *pgm*-локус), вероятно, было приобретено от других микроорганизмов [Parkhill J. et al., 2001; Zhou D. et al., 2004a]. Обнаружено, что 3 из них (остров 09, остров 14, и остров 15), присутствуют только у *Y. pestis* [Zhou D. et al., 2004b]. Очевидно, они были приобретены *Y. pestis* в ходе видообразования. Есть основания предполагать, что эти три острова содержат ДНК профагов. Известно, что некоторые бактериофаги содержат гены, кодирующие бактериальные белки, которые позволяют бактериям внедряться в клетки тканей хозяина, избегая действия защитных иммунных факторов, и даже повреждать их. Широко известны бактериофаги-носители генов экстрацеллюлярных токсинов, ферментов, в частности, супероксиддисмутаза, нейраминидаза, фосфолипаза, адгезинов

и митогенных факторов. Эти процессы довольно подробно описаны ранее [Brüssow H. et al., 2004]. С интеграцией генома бактериофага в бактериальную хромосому, факторы вирулентности, кодируемые профагом, могут конвертировать их бактериального хозяина из непатогенного штамма в вирулентный или в штамм с повышенной вирулентностью, а также изменять фенотип, препятствуя идентификации стандартными приёмами [Boyd E.F., Brüssow H., 2002]. Горизонтальное перемещение этих генов с помощью таких фагов признано в качестве первичного механизма, отвечающего за появление или возрождение патогенных микроорганизмов [Ochman H., 2000].

Трансдуцирующая активность, приводящая к изменению различных свойств чумного микроба, включая диагностические признаки, показанная вначале на модели фагов Л-358 и Н, была в дальнейшем более детально исследована с помощью полигостальных коли-фагов Mu cts 61(62), P1 cml clr 100 ts и P1 vir. В этих опытах с высокой эффективностью наблюдали внутри- и межвидовую передачу хромосомных генов, отвечающих за метаболизм, жизнеобеспечение, а также участвующих в экспрессии вирулентности, и перенос различных плазмид, транспозонов, а также отдельных плазмидных генов, определяющих видоспецифические признаки [Lawton W.D., Molnar D.M., 1972; Плотников О.П., 1982; Ракин А.В., 1984; Заренков М.И., 1984; Заренков М.И. и др., 1985, 1985а; Гребцова Н.Н. и др., 1985; Гуревич Г.К., Лебедева С.А., 1990; Гуревич Г.К. и др., 1991].

Ещё один механизм, приводящий к появлению атипичных признаков и устойчивости к диагностическим бактериофагам, выявлен при передаче некоторых плазмид (множественной лекарственной устойчивости, фертильности и др.). Эти плазмиды способны изменять структуру клеточной стенки бактерии-хозяина, нарушая рецепцию фагов, или содержат в своём геноме детерминанты рестриктаз, ограничивающих фаговую ДНК. Широкое распространение указанных выше бактериофагов и плазмид в природе создаёт условия для появления вариантов чумного микроба с измененным фенотипом, что включает устойчивость к диагностическим бактериофагам, снижение вирулентности и иммуногенности, а также изменение экспрессии свойства сорбировать пигменты [Лебедева С.А., 1993].

Обсуждая проблему фагоустойчивых вариантов чумного микроба и возможности изменчивости бактерий с участием различных бактериофагов, следует обратить внимание на следующее. Пробы на чувствительность к чумным диагностическим фагам Покровской и Д'Эрелля - тест широко и эффективно применяемый в практике. Он прост в исполнении и доступен в любых лабораторных условиях. Однако для корректного ответа необходимы качественные препараты бактериофагов с достаточно высоким рабочим титром и точное выполнение инструкций по постановке проб. Позитивные результаты не всегда гарантируют точный ответ, поскольку известны случаи проявления литической активности чумных диагностических бактериофагов по отношению к бактериям других видов сем. *Enterobacteriaceae*. С другой стороны, механизмы, описанные выше, могут обуславливать формирование реверсильных или стойких популяций, которые обладают нестабильностью фенотипа и фагоустойчивостью. Эти свойства существенно затрудняют выявление чумного микроба при обследовании природных очагов и требуют полного и более детального исследования материала.

Глава 6. Особенности структуры генома *Y.pestis*. Молекулярно-биологические и генетические методы в решении вопросов диагностики, таксономии и эволюции возбудителя чумы

А.Л. Трухачёв, С.А.Лебедева

6.1. Особенности плазмид *Y.pestis* в аспекте проблемы диагностики

Проблемы вирулентности, иммуногенности, диагностики и природной очаговости чумного микроба привлекают внимание специалистов всего мира. Известно, что для проявления первых двух свойств важно наличие у возбудителя чумы определённых детерминант [Burrows T.W., 1962, Brubaker R.R., 1972, 1984, 1985; Butler T., 1983; Гинцбург А.Л., 1987], часть из которых по данным литературы локализована на плазмидах и может быть использована также при разработке методов диагностики.

Бактериальные плазмиды это - внехромосомные цитоплазматические аутореплицирующиеся наследуемые двунитчатые замкнутые кольцевые ДНК, дополняющие геном, представленный хромосомой. Молекулярный вес большинства плазмид оценивается в пределах 1-150 МД. В составе плазмид имеются гены, отвечающие за ауторепликацию, и некоторые биологические свойства, характерные для микроба-носителя. Многие крупные плазмиды (более 30 МД) могут содержать набор *tra*-генов, обеспечивающих конъюгативный контакт бактерий, содержащих и не содержащих плазмиды, при которой происходит передача самой конъюгативной плазмиды и связанных с ней признаков фенотипа. Передаваться с разной частотой они могут также при их трансдукции фагами, при трансформации свободной плазмидной ДНК и при слиянии протопластов или L-форм. В ряде случаев эти плазмиды могут рекомбинироваться с другими плазмидами, образуя различные по стабильности коинтеграты или рекомбинантные плазмиды. Они могут линейно встраиваться в хромосому подобно профагам и не обнаруживаться в автономном состоянии. Сведения об этом относительно плазмид возбудителя чумы имеются в литературе [Protsenko O.A. et al., 1991; Гончаров Е.К., 1987].

Как правило, для свежесыведенных вирулентных штаммов *Y.pestis* характерно наличие трёх плазмид pFra/Tox, pPst и pCad. Две первые из них видоспецифические, а третья - общая для трёх видов патогенных по отношению к человеку иерсиний.

Информация о наличии этих плазмид *per se*, отдельных их генов и генных продуктов оценивается как имеющая дифференциально-диагностическое значение при идентификации бактерий чумы, обследовании природных очагов и эпидемиологическом анализе.

Прежде всего, следует отметить, что типичные размеры классических плазмид чумного микроба составляют по данным разных авторов и методов измерений: pFra/Tox - 65 ± 5 МД (в среднем 96-100 тыс. пар нуклеотидов = кб), pCad - 47 ± 3 МД (в среднем 70 кб); pPst 6 МД (в среднем 9-10 кб) [Ferber D.M., Brubaker R.R., 1981; Балахонов С.В., 1989; Иванова В.С. и др., 1990; Filippov A.A. et al., 1990; Hu P. et al., 1998 и др.]

При исследовании штаммов, хранящихся в музеях живых культур различные сроки и выделенных на различных этапах эпизоотического процесса в разных природных очагах, обнаружены отклонения в плазмидном составе. В частности, у отдельных типичных штаммов основного подвида при лабораторном содержании обнаружена вариабельность М.м. 65 МД плазмиды от 58 до 150 МД, у 47 МД плазмиды - от 40 до 50 МД, у 6 МД (9,5 кб) - увеличение М.м. до 19 кб, что может быть связано с дупликацией репликона [Chu M.C. et al., 1998; Dong X.Q. et al., 2000] (рис. 6.1). Встречаются штаммы *Y.pestis*, утратившие одну из плазмид, две или все три.

Вариабельность плазмидного состава у *Y.pestis* установлена не только по числу плазмид, типичных для этого вида бактерий, но и по наличию дополнительных криптических плазмид, различных по размеру [Tsukano H. et al., 1986; Leal N. et al., 1989; Иванова В.С. и др., 1990; Filippov A.A. et al., 1990;]. Вполне возможно у отдельных штаммов появление единичных дополнительных «случайных» плазмид с нетипичной молекулярной массой, которые возникают при генетических перестройках их ДНК в некоторых клетках популяций, впоследствии доминирующих. Однако среди криптических плазмид известны и стабильные классы, которые характерны для групп штаммов из определённых очагов. К ним можно отнести плазмиду с М.м. 4 МД [Жаринова Н.В. и др., 2002], которая присуща штаммам возбудителя чумы из определённого мезоочага в Кабардино-Балкарии на Кавказе [рис. 6.2.].



Рис. 6.1. Плазмидный профиль типичных штаммов *Y.pestis*. 1 – *ssp. pestis*; 2 – *ssp. caucasica*; 3 – *ssp. altaica*. Электрофорез в 0,7% агарозе. Окраска EtBr.

По имеющимся данным присутствие её коррелирует с нарушением синтеза аминокислоты «пролин», сопутствуя, таким образом, пролинзависимости [Грамотина Л.И. и др., 1987; Брюханов А.Ф. и др., 2002]. Другая маркерная дополнительная плазмида с М.м. 15 МД, по мнению авторов, впервые её обнаруживших, имеет отношение к детерминированию синтеза капсульного антигена *F1* чумного микроба [Butler T., 1983; Tsukano H. et al., 1986; Балахонов С.В. и др., 1991]. Её обычно обнаруживают у штаммов из мезоочагов Монголии или приближённых к ним, а также в бактериях штаммов *Y.pestis*, выделенных в Японии [рис.6.2]. Обе плазмиды оцениваются как маркерные [Кокушкин А.М., 1983; Иванова

В.С. и др., 1990]. Дополнительная плазмида с М.м. 14,9 МД описана у штаммов из Бразилии [Leal N. et al., 1989].

В связи с вариабельностью плазмидного профиля следует отметить два аспекта. Если большинство классических штаммов *Y.pestis* содержат все три указанные плазмиды, то для штаммов, относящихся к подвиду *caucasica* характерно обязательное отсутствие плазмиды пестициногенности и, соответственно, связанных с ней свойств. К сожалению, этот признак не является абсолютным, поскольку каждая из плазмид классических штаммов чумного микроба, в том числе и *pPst*, из-за изменчивости в процессе хранения или при циркуляции микроба в природных условиях может утрачиваться. Так что типичная картина триады плазмид (рис. 6.2) с характерной молекулярной массой на электрофореграммах нарушается, затрудняя идентификацию штамма.

Стабильные изменения размеров плазмид, типичных для классического возбудителя чумы (основной подвид), регистрируются в основном для

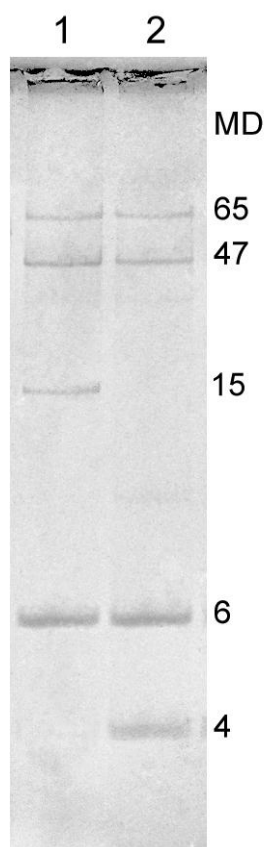


Рис. 6.2. Образцы криптических плазмид *Y.pestis*. 1 – 15 MD, ssp. *hissarica*; 2 – 4 MD, ssp. *pestis*. Электрофорез в 0,7% агарозе. Окраска EtBr.

штаммов дополнительных подвидов. Так, плазида pFra/Tox (65MD, 96 тыс п.н.) у подвида *caucasica* намного больше классической и достигает 90 MD (137 тыс п.н.) [Иванова В.С. и др., 1990; Filippov A.A. et al., 1990; Балахонов С.В. и др., 1991; Garsia E. et al., 2007]. У некоторых штаммов дополнительных подвидов из зоны Центральной Азии плазида pPst может достигать размеров 8 MD, а pFra/Tox варьирует в пределах от классического размера до 70-80 MD (рис. 6.1).

На классической 65 MD плазмиде pFra/Tox локализованы детерминанты, связанные с продукцией антигена «фракция 1» (Fra, Caf1) и экзотоксина «мышинного» токсина (Tox, Mur), [Проценко О.А. и др., 1983; Проценко О.А. и др., 1989; Кутырев В.В. и др., 1990]. Ранее по поводу плазмидной детерминированности синтеза фракции 1 высказывались сомнения [Straley S.C., Brubaker R.R., 1982; Butler T., 1983], поскольку есть штаммы, продуцирующие фракцию 1, но без плазмиды, и наоборот. Предполагали даже связь синтеза этого антигена с 15 MD плазмидой [Tsukano H. et al., 1986]. Эти вопросы проанализированы в главах 3 и 5.

«Мышиный» токсин получил своё название из-за его токсичности для ограниченного круга вида животных в первую очередь для мышей и крыс, у которых он ингибирует «митохондриальное дыхание» сердца [Rust J.H. et al., 1963], воздействует на тромбоцитарную систему и сосуды [Черкасова Т.Д., 1991]. Он является антагонистом β -адренэргической системы и, возможно, циклического аденозинмонофосфата [Braun S.D., Montie T.C., 1977; Montie T.C., 1981;]. Снижение уровня глюкозы и жирных кислот в крови после введения «мышинного» токсина позволило предположить его инсулиноподобный эффект. В связи с этими проявлениями биологической активности долгое время «мышинный» токсин относили к факторам вирулентности. При секвенировании соответствующего гена и сравнении с секвенсами других бактерий [Iwasaki Y., 1994] в нём выявлено наличие фрагмента, отвечающего за синтез фосфолипазы D. С её активностью и связали летальный эффект «мышинного» токсина для мышей и крыс [Черепанов П.А. и др., 1991; Ponting C.P., Kerr.I.D., 1996]. Однако позже необходимость D-

фосфолипазной активности и «мышинного» токсина для проявления вирулентности чумного микроба у мышей не подтвердилась [Hinnebusch J.P. et al., 2000]. Возможно, это заключение не окончательное, поскольку в литературе представлены и другие мнения, в частности об участии «мышинного» токсина в формировании высокотоксичных комплексных макромолекул с другими компонентами чумного микроба, например, с липополисахаридом [Тынянова В.И. и др., 1998; Соколова Е.П. и др., 2000]. Кроме того, в последние годы появились публикации, свидетельствующие о суперантигенной активности «мышинного» токсина, патогенетический эффект которого связывают также и с индукцией апоптоза иммунокомпетентных клеток [Мишанькин М.Б., 1997; Mishankin M.B. et al., 1997; Vasilieva G.I., et al., 2002; Васильева Г.И. и др. 2003, 2005]. Имеются данные об участии «мышинного» токсина в блокообразовании при инфицировании преджелудка блох [Hinnebusch J.P. et al., 2000].

Плазмида *Y.pestis* с М.м. 47 МД имеет много общих по функциям и гомологичных детерминант с аналогичной плазмидой других иерсиний [Шведун Г.П. и др., 1984; Bölin I., 1987; Skurnik M., 1985; Zaleska M. et al., 1985; Hu P. et al., 1998]. Ещё до её открытия признаки, впоследствии оказавшиеся связанными с ней, считали коррелирующими с вирулентностью и инвазивностью *Y.pestis* [Хрущелевский В.П., Хрущелеская Н.М., 1968]. По современным представлениям плазмида отвечает за экспрессию системы секреции III типа, во многом обеспечивающей патогенные свойства бактерий рода *Yersinia*. Плазмида определяет Ca^{2+} -зависимость и продукцию V-антигена [Portnoy D.A., Falkow S., 1981; Филиппов А.А. и др., 1982; Portnoy D.A. et al., 1983; Perry K.L. et al., 1986; Yother J. et al., 1986; Савостина Е.П., 1990; Хабаров А.В., 1990], продукцию поверхностных и секретируемых белков YOP [Видяева Н.А. и др., 1990, Portnoy D.A. et al., 1984; Straley S.C. Bowner W.S., 1986; Zaleska M. et al., 1985]. Она связана с температурным контролем роста [Yother J. et al., 1986], с проницаемостью клеточной стенки [Monola B.J. et al., 1983; Salamach A.A., Charnetzky W.A., 1986], влияет на её построение при участии ЛПС [Darveau R.P. et al., 1983]. Плазмиды этого типа у других иерсиний исследованы в большей степени. У них обнаружены детерминанты, влияющие на гидрофобность и поверхностный заряд бактерий [Lachica R.V., Zink D.L., 1984],

цитотоксичность [Goguen J.D. et al., 1986], иммуносупрессивность [Simonet M., Berche P., 1986], аутоагглютинацию при 37°C [Laird W.J., Cavanaugh D.C., 1980]. Для обеих тяжёлых плазмид характерна способность интегрировать с хромосомой [Анисимов П.И. и др., 1985; Анисимов П.И., Можаров О.Т., 1986; Кутырев В.В. и др., 1985; Protsenko O.A. et al., 1991]. Предполагается наличие транспозон-подобных структур в частности *Cad*-оперона [Можаров О.Т. и др., 1986] и детерминанта «мышинного» токсина [Заренков М.И., 1984]. Указанная выше функциональная нагрузка 47 Мд плазмиды обусловила её название «плазида вирулентности», распространённое в литературе, поскольку продукты значительного числа генов участвуют в экспрессии этого свойства. Так, показана антифагоцитарная активность V-антигена и его участие в формировании защиты от чумы у морских свинок [Burrows T.W., 1962; Une T., Brubaker R.R., 1984] и белых мышей [Wake A. et al., 1983]. В настоящее время это свойство V-антигена используется при конструировании рекомбинантных и комбинированных вакцин против чумы [Anderson J.G.W., 1996]. Кроме того, имеются данные о регуляторной роли этого антигена [Price S.B. et al., 1991].

Подобными функциями наделены и мембранные секретлируемые *YOP* белки [Bölin I., 1987; Forsberg A. et al., 1987]. Присутствие плазмиды, связанной с Ca^{2+} -зависимостью, повышает инвазивность бактерий–хозяев [Хабаров А.В., 1990]. При этом она скорее способствует усилению пролиферации возбудителя в макрофагах, а не гашению оксидативного взрыва [Charnetsky W.T., Shuford W.W., 1985]. Значимость *Cad-0*-оперона для чумного микроба не подвергается сомнению. Что касается псевдотуберкулёза, то эти бактерии, как показано в экспериментах, способны активно размножаться в селезёнке независимо от свойства Ca^{2+} -зависимости [Simonet M. et al., 1984].

Содержит детерминанты вирулентности и 6 Мд плазида [Кольцова Е.Г. и др., 1971; Sodeinde O.A. et al., 1988]. Поэтому тестирование штаммов *Y.pestis* на присутствие плазмиды и известных генов представляется также важным и именно с точки зрения возможности экспрессии бактериями чумы вирулентности. Свойство специфичности самой плазмиды пестициногенности и её продукта, пестицина 1, для *Y.pestis* определяет также их ценность для идентификации. Однако следует помнить,

что отсутствие этой плазмиды и, соответственно, гена *pst* характерно для закавказских полёвочьих штаммов (*Y.pestis*, подвид *caucasica*) и может иметь место у отдельных штаммов других внутривидовых групп.

У полноценных по плазмидному составу штаммов установлена корреляция чувствительности бактерий чумы к нормальной сыворотке с наличием этой плазмиды [Гвозденко Н.А. и др., 1990]. Хотя имеются данные о выраженной зависимости степени этой чувствительности от особенностей структуры ЛПС [Anisimov A.P. et al., 2005]. Связь пестицина 1 с вирулентностью предполагается, с одной стороны, из-за снижения её степени у штаммов после утраты пестициногенности, с другой – из-за наличия ослабленной и «избирательной» вирулентности у большинства апестициногенных штаммов [Вартанян А.А. и др., 1964; Ёлкин Ю.М. и др., 1972; Пейсахис Л.А., Ларионов Г.М., 1971; Burrows T.W., 1965; Butler T., 1983; Sikkema D.J., Brubaker R.R.]. Пестицин I известен как бактериоцин. Он разобщает окислительное фосфорилирование [Иванова В.С., 1976] и обладает *N*-ацетилглюкозидазной активностью, которая индуцирует образование сферопластов чувствительных к нему бактерий [Ferber D.M., Brubaker R.R., 1979]. В макроорганизме он, вероятно, может выполнять другие функции. Предполагается, например его участие в процессе обеспечения железом [Sikkema D.J., Brubaker R.R., 1987]. Нельзя исключить возможность некоторой аналогии с другими бактериоцинами, как, например, микроцином *Klebsiella pneumoniae*. Этот бактериоцин, подверженный модификациям, как доказано, обладает индуцибельной сидерофорной активностью [Thomas X. et al., 2004]. Определение роли пестицина *in vivo* требует более детального исследования условий, в которых индуцируется его синтез в организме млекопитающих или переносчиков возбудителя чумы. Не исключено, что его роль всё-таки связана с накоплением железа.

Ещё одним важным структурным компонентом плазмиды пестициногенности является ген иммунитета к пестицину *rim* [Sodeinde O.A., Goguen J.D., 1988 Rakin A et al., 1996]. Продукт этого гена, длиной 141 а.а. функционально связан с пестицином. Наличие плазмиды пестициногенности и полноценного гена иммунитета к пестицину обеспечивает микробному клону защиту от собственного пестицина и пестицинов других клонов. Этот механизм способствует сохранению

плазмиды пестициногенности в популяции микробных клеток и позволяет возбудителю чумы использовать для своей жизнедеятельности все возможности, которые предоставляет наличие генов, содержащихся на плазмиде pPst.

Известно, что бактериоцин 1 локализован в цитоплазме и высвобождается в окружающую среду только при лизисе погибающих бактерий, число которых увеличивается при повышении в окружающей среде концентрации ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} , но не железа. Железо сразу ингибирует собственно бактерицидную активность. Показано, что в условиях стаза из-за дефицита железа бактерии гибнут, и появляется активность бактериоцина. Если железо в избытке, то они не чувствительны [Brubaker R.R., 1965]. Возникает ли при этом конкуренция за железо между продуктами *pst* и *pim* генов пока не ясно. Неизвестно так же, как действуют ионы железа на другие предполагаемые функции пестицина и остальных продуктов 6 Мд плазмиды, включая активатор плазминогена и белок иммунитета к пестицину 1. Если основываться на имеющихся в настоящее время данных литературы, то существенная разница в вирулентности пестициногенных и непестициногенных изогенных штаммов связана скорее с дефицитностью по фибринолитической и плазмокоагулазной активности или по белку иммунитета к пестицину, синтез которых определяется той же 6 МД плазмидой. Бактерии штаммов, утративших пестициногенность снижают вирулентность при подкожном их введении. Но они оказываются столь же вирулентными, как и пестициногенный штамм, если животных заражать внутривенно, обеспечивая им возможность миновать все барьеры, в том числе и фибриноидный, и быстро попадать в фиксированные макрофаги и клетки РЭС печени и селезёнки [Sikkema D.J., Brubaker R.R., 1987]. Наличие детерминант коагулазной, фибринолитической активности совместно с бактерицидной на одной плазмиде, видимо, биологически целесообразно поскольку такое сочетание генов обнаруживается и у других бактерий. Так, нами у двух штаммов клебсиеллы, выделенных от больных пневмонией и менингитом, обнаружены плазмиды с М.м. 6-8 МД, определяющие синтез коагулазы, фибринолизина, и бактериоцина с широким спектром бактерицидного действия, включая способность ингибировать рост не только индикаторных для пестицина 1

бактерий, но и бактерий чумного микроба, резистентных к действию пестицина 1 за счёт собственного гена иммунитета *rim* [Кузнецова Л.С., Лебедева С.А, 1985].

Обычно плазмиды рассматриваются исследователями изолировано друг от друга. Однако, скорее всего их функции тесно взаимосвязаны. Так, плазида 6 МД детерминирует синтез фермента, который обладает не только коагулазной активностью (активатор плазминогена), но и протеазной, при этом последняя, вероятно, имеет большую значимость для вирулентности при подкожной инъекции микроба, поэтому часто этот продукт обозначают *pla*-протеазой [Brubaker R.R., 1984]. Именно она, как полагают, взаимодействует с некоторыми белками вирулентности, детерминируемого плазмидой Ca^{2+} -зависимости и, возможно, выполняет роль дополнительного регулятора их активности на разных этапах инфекционного процесса [Sodeinde O.A. et al., 1988]. Необходимость функционального взаимодействия между продуктами плазмид наверняка существует. Иначе, как объяснить, что полноценные во всех отношениях штаммы, способные служить возбудителем всех острых форм классической чумы должны обязательно иметь три плазмиды. Дефицит по одной из них наносит больший или меньший ущерб экспрессии полноценной вирулентности, хотя может и не быть критическим.

При оценке значимости плазмид в диагностике следует отметить три момента. Во-первых, для этих целей может быть применён скрининг плазмид с помощью гельэлектрофоретического исследования плазмидной ДНК, для выделения которой разработаны специальные методы и их модификации [Kado C.I., Liu S.-T., 1981; Birnboim H.C., Doly J., 1979; и др.]. Образцы гельэлектрофореграмм представлены выше. Наличие трёх типичных по М.м. плазмид явно свидетельствует в пользу принадлежности исследуемых бактерий к виду *Y.pestis*. Должно настораживать и наличие меньшего набора плазмид, по М.м. соответствующих типичным плазмидам чумного микроба. Выявление плазмид с 90 МД и 47 МД плазмидой требует особого внимания для решения вопроса о возможной принадлежности штамма к подвиду *caucasica Y. pestis* или *Y.pseudotuberculosis*. Полное отсутствие плазмид не может быть показателем непричастности штамма к виду *Y. pestis*, хотя нам не известны случаи выделения таких штаммов от больных

чумой людей или грызунов. Однако нельзя исключить возможность использования таких штаммов в целях дезориентации при терроризме или необходимости ретроградной идентификации сомнительных музейных штаммов. Во-вторых, для идентификации возбудителя эффективно используют приёмы выявления продуктов основных плазмидных генов с помощью иммунологических и микробиологических методов.

Основными видоспецифическими продуктами, синтез которых определяется pFra/Tox и pPst плазмидами *Y. pestis* и может быть обнаружен серологически, являются антиген *F1* (основной диагностический антиген), «мышинный» токсин, пестицин 1, *pla*-протеаза (данные об этом представлены в главе 7). Выявление пестицина 1 возможно также микробиологическим методом «отсроченного антагонизма», а *pla*-протеазы - в тесте с плазмой крови [Fredericq P., 1953; Кольцова Е.Г., 1971].

Из генов плазмиды *pCad* для микробиологического исследования доступны детерминанты Ca^{2+} -зависимости, выявление которых осуществляется с помощью дефицитной по ионам Ca^{2+} среды при 37°C [Jackson J., Burrows T.W., 1956]. Серологическое исследование продуктов плазмиды pCad имеет ограниченное значение. Эта плазида общая для трёх видов иерсиний имеет значительное число неспецифичных для чумного микроба генов, определяющих синтез родоспецифических субстратов. Приёмы дифференциальной диагностики с использованием продуктов генов, специфических для *Y. pestis*, в частности V-антигена и некоторых Yop-белков, которые являются показателями возможной высокой вирулентности, разрабатываются на основе моноклональных антител [Фёдорова В.А., 2003]. В этой же связи следует отметить, что один из белков, кодируемых этой плазмидой (Yop1) ,специфически не экспрессируется у возбудителя чумы за счёт мутации со сдвигом рамки считывания в *yadA* гене [Perry R.D. et al., 1998]. Антитела, специфические к нему, могут быть полезны для идентификации штаммов *Y. pseudotuberculosis* с pCad-плазмидой. Специфичность для возбудителя чумы плазмиды pPst, а следовательно, и её продуктов, пестицина 1, *pla*-протеазы, определяет возможность получения к этим белкам специфических

антител и серологического их тестирования [Иванова В.С., 1981; Тутенко М.М. и др., 1986; Фёдорова В.А., 2003].

Развитие молекулярной биологии расширило методические возможности изучения особенностей возбудителя чумы и позволило по-новому подойти к его идентификации. Рестрикционно-электрофоретический анализ хромосомной и плазмидной ДНК, основанный на существовании разно-локализованных специфических сайтов воздействия известных крупно- и мелкощепящих эндонуклеаз, обладающих различной специфичностью, расширил круг доступных для решения задач. С одной стороны, он обеспечил возможность типирования штаммов по числу и размерам рестрицированных фрагментов ДНК при гельэлектрофорезе в пульсирующем поле (PFGE) [Grothnes D., Tummler B., 1987; Lee J.J., Smith H.O., 1988; Itean I. et al., 1991; 1994; Lusier T.S., Brubaker R.R., 1992], с другой, - позволил использовать дактилоскопию сходных фрагментов при их перекрёстной гибридизации [Горшков О.В. и др., 2000; Горшков О.В., 2000; Бобров А.Г., Филиппов А.А., 1997]. А также сделал возможным при клонировании этих фрагментов конструирование специфических родо- и видоспецифических ДНК-зондов для гибридизационного анализа исследуемых ДНК [Дрыгин Ю.Ф. и др., 1992; Булгакова Е.Г., Попов Ю.А., 1990; Подладчикова О.Н., Диханов Г.Г., 1990; Попов Ю.А. и др., 1994; Лежнев Ф.И. и др., 1991; Куличенко А.Н. и др., 1991; Кутырев В.В. и др., 1989; Сучков И.Ю., 1989], как это имело место при зондировании по генам 16S-РНК, позволяющем внутривидовую градацию на риботипы [Guiyoule A. et al., 1997].

Совместное использование крупно- и мелкощепящих эндонуклеаз, отличающихся по сайтам рестрикции, обеспечило возможность составления физических и генных рестрикционных карт различных участков геномной ДНК разных бактерий [Kim N.W. et al., 1992], и как следствие, оказалось доступным определение протяжённости генома [Lusier T.S., Brubaker R.R., 1992] и секвенирование различных генов, которые были идентифицированы в последующем, за счёт экспрессии клонированных генов в клетках различных реципиентов векторной ДНК.

Одним из высокоэффективных методов, позволяющих решать многие вопросы, связанные с биологией возбудителя чумы, эволюцией, и диагностикой, является секвенирование полного генома у отдельных типовых штаммов вариабельных групп

вида *Y.pestis* с последующим сравнительным анализом фрагментов геномов различных штаммов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Эта реакция реализуется за счет способности праймерных последовательностей, гомологичных дистальному и проксимальному концу какого-либо специфического по составу нуклеотидов фрагмента геномной ДНК, в регламентированных условиях направлять его многократную репликацию (амплификацию). Появление ампликонов, определённого размера, свидетельствует о наличии в исследуемой ДНК гомологичного и специфического для определённой таксономической группы микробов фрагмента.

Именно такой подход позволяет выбрать праймеры для исследования различных бактерий, в том числе штаммов вида *Y.pestis* с целью (1) их идентификации и дифференциальной диагностики, (2) внутривидовой дифференциации в соответствии с задачами таксономии, (3) эпиданализа, (4) в связи с проблемами эволюционной изменчивости и текущей дивергенции внутривидовых групп.

В последние десятилетия литература обогатилась достаточно ёмкой информацией о генной структуре возбудителя чумы. Сведения касаются как характеристики особенностей плазмид, так и хромосом. Так, при секвенсе рFra помимо специфических ранее описанных для *Y.pestis caf1 (fra)* и *tox* детерминант [Protsenko O.A. et al., 1991] в мажорной плазмиде рFra/Tox штамма *Y.pestis* КИМ обнаружен также около 30 идентифицированных генов, в том числе гены поддержания автономного состояния плазмиды, её репликации, некоторых ферментов метаболизма и фаговых белков, а также более 40 генов неизвестных белков. Многие из идентифицированных и некоторые из неизвестных генов в той или иной степени гомологичны соответствующим генам *E.coli*, *Salmonella* и даже *Coxiella burnetti* и *Rhizobium*. [Hu P. et al., 1998]. Выявлено также две копии IS100, фрагмент IS285 и копия IS1541 [Бобров А.Г., Филиппов А.А. 1997; Hu P. et al., 1998]. В составе полного секвенса плазмиды вирулентности рMT1 *Yersinia pestis* КИМ5 выявлен фрагмент, проявляющий гомологию с отдельной областью плазмидного профага P7 *Escherichia coli*. Основные гены *parA* и *parB* и часть сайтов гена *parS* были высоко консервативны по секвенсу и организации. Клонированная в *E.coli*. *par* система рMT1 (отвечающая за репликацию плазмид при делении бактерий) была

полностью функциональна в *E.coli*. Иммунитет к суперинфекции *par*-система плазмиды pMT1 обеспечивала более слабо, чем P7*par* и P1*par*. [Hu P. et al., 1998].

Такая неоднородность плазмидной ДНК, подтверждённая различным соотношением АТ/ГС оснований в отдельных её генах и фрагментах, свидетельствует о космидном характере и рекомбинантном формировании плазмиды в процессе горизонтального обмена генетической информацией с другими бактериями. Сведения об этом в большом объёме представлены в литературе после сравнения данных рестрикционного и ПЦР-анализа, а также секвенирования плазмид различных биоваров *Y. pestis* и некоторых энтеробактерий. Именно в этих исследованиях была обнаружена гомология значительного числа фрагментов pMT (pFra) плазмиды и плазмиды *S.enterica* биовара *Typhi* [Prentice M.B.et al., 2001]

К настоящему времени накоплена также информация о результатах секвенирования ДНК pCad-плазмиды и отдельных её генов. Эта плазида тесно связана с вирулентностью трёх видов иерсиний, и при развитии инфекции *in vivo* активируются подавляющее большинство её генов [Lathem W.W. et al., 2005]. В связи с этим использование последовательностей пар оснований (п.о.), комплементарных фрагментам этой плазмиды, в качестве праймеров в ПЦР скорее будет свидетельствовать о полноте набора детерминант вирулентности у микроба, нежели о его видовой принадлежности. С другой стороны, в составе pCad есть последовательности п.о., которые считаются специфичными для вида *Y.pestis*, например, гены *usc RQPO*, *lcr RGV* [Hu P. et al., 1998]. Кроме этого в плазмиде возбудителя чумы обнаружено несколько инсерцинных последовательностей и псевдоген *yadI*, который инактивирован мутацией со сдвигом рамки считывания, а у других иерсиний полноценный. Однако у возбудителя псевдотуберкулёза также обнаруживаются единичные штаммы, которые имеют мутацию со сдвигом рамки считывания в гене *yadA*, характерную именно для *Y.pestis*. По этой причине использование особенностей структуры этого гена для дифференциации иерсиний не надёжно. При оценке *lcrGVH*-оперона с этой точки зрения провели его секвенирование у *Y.pestis* и *Y.pseudotuberculosis*. В итоге были синтезированы праймеры *ptb-V* и *pes-V* с различной видовой специфичностью. Первые из них реагировали только с ДНК pCad плазмиды возбудителя псевдотуберкулёза, вторые -

с ДНК той же плазмиды чумного микроба и единичных штаммов *Y.pseudotuberculosis* [Motin V.L. et al., 1992]. Последние, на наш взгляд, нуждаются в дополнительной проверке на принадлежность к виду *Y.pseudotuberculosis* с использованием современных методов диагностики [Арсеньева Т.Е. и др., 2007], дабы избежать сомнений в высокой специфичности упомянутых праймеров.

Секвенс rPst (6 МД, 9кб), второй уникальной плазмиды чумного микроба, выполнен при секвенировании генома штамма CO92 [Parkhill J. et al., 2001]. Анализ секвенса гена активатора плазминогена *Y.pestis* выявил определённую гомологию с *ompT* геном *E.coli* и *Salmonella* [Sodeinde O.A., Goguen J.D., 1989].

В настоящее время обнаружено значительное количество фрагментов плазмидной ДНК, являющимися уникальными для различных групп штаммов. Такое разнообразие, скорее всего, обусловлено изменением генетического материала и закреплением происшедших мутации среди штаммов ограниченных очагом распространения (фактор очага). С другой стороны ряд мутаций (делеции), приводящих к полной утрате фрагментов ДНК, но не влияющих на жизнедеятельность микробной клетки формируют новый генотип у более молодых клонов (фактор времени). Проследить мутационные изменения в утерянных участках ДНК у этих штаммов и клонов не представляется возможным, но сам факт присутствия у ряда штаммов последовательностей, иногда достаточно протяженных ставит вопрос о том, почему подобных последовательностей нет в других штаммах. Если речь идет о плазмидной ДНК, то возможны два варианта:

- 1) Возникновение нового генотипа происходит при горизонтальной передаче генетического материала, и эту наследственную информацию способны получать клоны, независимо от своего филогенетического возраста, и «старые», и «молодые». По-видимому, такой механизм можно наблюдать в различных природных очагах, где было зафиксировано наличие штаммов с характерным только для этой зоны составом криптоических плазмид.
- 2) Клон, содержащий генетическую информацию, которая отсутствует у других клонов, может быть их предшественником. У «молодых» клонов в этом случае мы отмечаем последствия делеционной мутации. Так, например, с большой вероятностью можно предположить, что встройка

последовательности *tra*-оперона у штаммов дополнительного подвида *caucasica* в плазмиду pFra [Golubov A. et al., 2004], произошла на этапе формирования вида *Yersinia pestis* (ранее в этой главе нами отмечалось, что у этой плазмиды увеличен размер), а затем эта последовательность была утрачена филогенетически более молодыми клонами. Так же интересен факт присутствия в плазмиде pFra всех дополнительных подвидов фрагмента ДНК, состоящего из трех ORF – CDS38, CDS39, CDS40 [Golubov A. et al., 2004] и отсутствия данных последовательностей у других штаммов. Этот пример более корректен, потому что различные штаммы, относящиеся к дополнительным подвидам, не ограничены одним очагом.

Таким образом, знание характерных особенностей генотипов штаммов циркулирующих в том или ином очаге и их филогенетический возраст, может быть полезным при диагностике этих штаммов и дальнейшем эпидемиологическом анализе полученных результатов. Вот почему большое число работ посвящено изучению генетического разнообразия штаммов возбудителя чумы и выяснения того, в какой степени это разнообразие зависит от места выделения штамма (фактор очага) и времени возникновения клона (фактор времени). Об этом более подробно в разделе 4 этой главы.

6.2. Общие сведения о хромосоме *Y.pestis*

Задолго до появления данных о нуклеотидной последовательности отдельных генов различных штаммов *Y.pestis* было известно о неоднородности генотипов у штаммов разного происхождения. Так ещё в 1992 году макрорестрикционный анализ хромосом штаммов чумного микроба из разных очагов показал, что они имеют близкие размеры, но могут отличаться по рестрикционному профилю. Этот факт свидетельствует о наличии вариабельных сайтов во внутренней структуре ДНК и в отдельных генах, которые могут быть характерны как для отдельных внутривидовых таксономических групп, так и индивидуальных штаммов [Lucier T.S., Brubaker R.R., 1992].

В настоящее время в литературе и Интернете представлены данные о нуклеотидных последовательностях полных геномов отдельных штаммов чумного

микроба как типичных (CO92, *orientalis*; KIM, *mediaevalis*, Antiqua, *antiqua*, Nepal 516, *antiqua*), так и обладающих некоторыми оригинальными свойствами (Pestoides F, *antiqua*; 91001, *mediaevalis-microtus*; Angola, *antiqua*) [Deng W. et al. 1999, 2002; Parkhill J. et al., 2001; Song Y. et al., 2004; Chain P.S.G. et al., 2004, 2006; Garsia E. et al., 2007; Worsham P.L. et al., 2003, 2007]. На данный момент продолжается работа по определению нуклеотидных последовательностей геномов у других штаммов *Y.pestis*, представляющих различные очаги и подвиды. Ожидается, что в ближайшее время будут опубликованы нуклеотидные последовательности полных геномов ещё у 15 штаммов *Y.pestis*. Среди исследуемых штаммы из Индии, Уганды, Мадагаскара, Китая, США и республик бывшего СССР. Сравнительный анализ их генотипов поможет лучше понять связь особенностей геномов с фенотипическими проявлениями их особенностей. Результаты секвенирования позволили определить размеры бактериальных репликонов у типовых штаммов *Y.pestis* (табл. 6.1) и более детально сравнить структуру и генный состав у них и возбудителя псевдотуберкулёза.

Получение нуклеотидных последовательностей полных геномов позволило определить генный состав репликонов иерсиний, выявить видоспецифические гены и у части генов, при сопоставлении с известными у других бактерий, определить их функции. Сравнение геномов *Y.pestis* с идентифицированным у *Y.pseudotuberculosis* позволило не только сделать вывод о происхождении возбудителя чумы от псевдотуберкулёзного микроба, но и выявить изменения последнего генома в процессе этого превращения. Установлено, что данное превращение произошло в результате «взрыва» активности и амплификации транслокабельных IS-элементов, что привело к значительным перестройкам в геноме и некоторому сокращению его размеров.

Таблица 6.1.

Отдельные характеристики типовых штаммов *Y.pestis*

Штамм	Ферментация рамно-зы (Rha)	Размер плазмиды (п.н.)				Размер хромосомы,	Автор
		pFra	pCad	pPst	криптическая		

						(п.н.)	
<i>Y.pestis</i> CO92 (orientalis)	-	96210	70305	9612	-	4653728	[Parkhill J. et al., 2001]
<i>Y.pestis</i> Antiqua (antiqua)	-	96471	70299	10777	-	4702289	[Chain P.S. et al., 2006]
<i>Y.pestis</i> Nepal 516 (antiqua)	-	100918	н.о.	10778	-	4534590	[Chain P.S. et al., 2006]
<i>Y.pestis</i> 91001 (microtus)	+	106642	70159	9606	21742	4595065	[Zhou D. et al, 2004]
<i>Y.pestis</i> Pestoides F (antique)	+	137010	71507	-	-	4517345	[Worsham, P.L. et al., 2003]
<i>Y.pestis</i> KIM (medievalis)	-	100990	70500	9500	-	4600755	[Deng W, et al., 2002]
<i>Y.pestis</i> Angola (antiqua)	+	-	68190	11457 0 pPst/ Fra	-	4504254	[Worsham, P.L. et al., 2007]
<i>Y.pseudotuberculosis</i> IP32953	+	-	68526	-	27702 pYptb	4744671	[Chain P. S. G., 2004]

В результате, по данным секвенса генома у разных штаммов, было утрачено около 300 генов, характерных для возбудителя псевдотуберкулёза. Около 150 генов, получив дефект, превратились в псевдогены. На некоторых этапах эволюции от других микроорганизмов была получена ДНК, составившая 2 специфические для *Y.pestis* плазмиды, и генетическая информация по трём десяткам новых генов. Всё это привело к изменению контроля за функцией генов и смене метаболических путей.

В процессе этого при селективном давлении условий обитания во внешней среде и организме хозяина микроб смог найти нишу для своего сохранения и реализовать сформировавшийся генотип в новых хозяевах. Так образовался вид *Y.pestis*. Считают, что он полностью ещё не сформировался. Его геном находится в «текучем» состоянии и движется в направлении сокращения до компактности, приближающей его к вирусам [Chain P.S.G. et al., 2004].

6.3. Использование полимеразной цепной реакции при идентификации бактерий чумы и их дифференциации от близкородственного возбудителя псевдотуберкулёза

Среди известных тестов идентификации бактерий большое внимание привлекает полимеразная цепная реакция (ПЦР), способная выявлять фрагменты ДНК, специфичные для определённого вида микроорганизма или внутривидовых групп, а также для индивидуальной характеристики штаммов конкретного вида микробов.

При решении проблемы диагностики, в первую очередь были клонированы и секвенированы хромосомные и плазмидные гены, продукты которых специфичны для возбудителя чумы и использовались ранее при исследовании микробиологическими и серологическими методами. Чаще всего используют праймеры для выявления видоспецифических генов *caf1*, *pla*, *lcrV*, *yop*, *pst*, *pgm*, в той или иной степени участвующих в реализации вирулентности.

Исследованию подвергаются фрагменты различных идентифицированных и гипотетических генов, а также другие последовательности в том числе специфические для рода *Yersinia*. Широкое внедрение методических приёмов определения нуклеотидной последовательности полных геномов микроорганизмов привело к выявлению в микробной ДНК различных структурных единиц, в ряде случаев с неясной функциональной значимостью, которые встречаются в виде тандемных повторов, расположенных в разных локусах генома, в том числе и между генами. Число копий, протяжённость и локализация последовательностей может быть характерной этих видов, индивидуальна для штаммов и отдельных их групп, что позволяет с помощью определения длины кластеров указанных выше структур выявлять их генотипические особенности. К таким последовательностям относятся **DFR** (отличающиеся области), **CRIPS** (кластерные регуляторные промежуточные короткие палиндромные повторы), **MST** (межгенные спейсерные тандемы), **RAPD** (случайно амплифицированные полиморфные ДНК), **VNTR** (вариабельные по числу тандемные повторы), **ERICs** (энтеробактериальные повторяющиеся межгенные консенсусные последовательности) и **LR REP** (полиморфные повторяющиеся элементы большого размера), которые могут выявляться с помощью моно- или мультилокусной ПЦР (**M**), а также соответствующих зондов.

ПЦР-характеристика штаммов чумного микроба проводится в различных направлениях. Во-первых, с целью идентификации получают доказательства принадлежности каждого из них к виду *Y.pestis* и отличия от *Y.pseudotuberculosis*. Признаки, доказывающие это, должны быть свойственны всем без исключения штаммам возбудителя чумы и не выявляться у возбудителя псевдотуберкулёза. На следующем этапе проводят тесты на присутствие генов, специфичных для возбудителя чумы и связанных в той или иной степени с экспрессией вирулентности, поскольку именно этот признак важен для определения опасности исследуемого штамма.

Существенный вклад в решение вопросов диагностики и микроэволюции, приносит проводимый у слабо исследованных штаммов сравнительный анализ секвенсов отдельных клонированных генов и ампликонов, получаемых при постановке ПЦР с различными праймерами. Уже обнаружены существенные отличия в структуре геномов у разных штаммов *Y. pestis*, возникшие как в итоге горизонтального обмена генетическим материалом с другими видами бактерий, так и за счёт IS-зависимых перестроек хозяйской ДНК и точковых мутаций. Всякого рода перестройки могут определять возникновение в отдельных генах дефектов, специфических для вида *Y. pestis*. Так, например, ген инвазии *inv*, интактный у возбудителя псевдотуберкулёза, «выключен» у чумного микроба встройкой IS200-подобного элемента [Simonet N.B. et al., 1996], что, с одной стороны создаёт условия для дифференциальной диагностики двух видов иерсиний, с другой – для создания праймеров, способных выявить этот дефект.

Среди ведущих признаков при лабораторной диагностике чумы, до сих пор остаётся способность к продукции видоспецифического капсульного антигена F1 [Baker E.E. et al., 1952], который детерминирован с одной из трёх специфических для *Y.pestis* плазмид (pFra) [Проценко О.А. и др., 1983]. Встречаются штаммы, лишённые F1-антигена за счёт утраты соответствующей плазмиды, а также с дефектами других диагностических признаков при сохранении определённой патогенетической активности. В связи с этим, требуются специальные подходы для видовой идентификации таких штаммов. Эту проблему можно решить, применяя ПЦР с праймерами, инициирующими амплификацию видоспецифических фрагментов ДНК, стабильных у подавляющего большинства, а лучше у всех

представителей вида *Y.pestis*. При утрате каждой или всех плазмид *Y. pestis* праймеры на основе плазмидной ДНК [Балахонов С.В., Лясоцкий Л.Л., 1997; Глухов А.И. и др., 2003; Куличенко А.Н. и др., 1994; Мишанькин Б.Н. и др., 1997; Campbell J. et al., 1993; Hinnebusch J., Schwan T.G., 1993] при анализе атипичных штаммов могут дать ложный отрицательный результат. Для исследования геномов классических вирулентных штаммов *Y. pestis* предложены праймеры на основе хромосомного «островка патогенности», однако им обладают далеко не все штаммы этого вида [Куклев В.Е. и др., 2006; Leal N.C., Almeida A.M., 1999]. Ранее в комбинации с плазмидными использовались праймеры, специфичные для 16S РНК иерсиний [Neubauer H. et al., 2000], β -субъединицы РНК-полимеразы [Thomas M. et al., 2004], а так же комплементарные генам *inv* и *ent F3* [Tsukano H. et al., 1996; Woron A.M. et al., 2006]. Сложность диагностики состоит в том, что два вида иерсиний, *Y.pestis* и *Y.pseudotuberculosis*, характеризуются высокой степенью гомологии хромосомы (более 90%), но отличаются за счёт существования у *Y.pestis* многих точечных мутаций или *mini*-делеций [Chase C.J. et al., 2005; Zhou D et al., 2004].

Данные сравнительного изучения структуры геномов возбудителя чумы и псевдотуберкулёза с помощью различных молекулярно-биологических методов позволяют считать, что чумной микроб является клоновым производным *Y.pseudotuberculosis* серовар О:1b [Achtman et al., 1999]. Формирование его произошло, скорее всего, поэтапно в процессе эволюции с вовлечением разнонаправленного обмена генетической информацией с другими бактериями, IS-зависимых внутриклоновых перестроек, под селективным давлением различных условий среды обитания, в том числе сменяющихся хозяев-носителей. Всё это определило специфичность микроба и появление особых патогенетических свойств сначала по отношению к грызунам, а потом и к человеку.

Оригинальность сайтов встройки IS100 элементов в хромосому *Y.pestis* [Motin V.L. et al., 2002] обусловили предложение набора праймеров (группы «*vlm*»), которые, судя по данным первичной апробации авторами на некоторых штаммах иерсиний, могут оказаться полезными при детекции классических вариантов возбудителя чумы, в том числе лишённых плазмид, а также при дифференциации их от бактерий псевдотуберкулёза.

Методом вычитания гомологичных секвенсов у возбудителя чумы была обнаружена последовательность в 41, 7 т.п.н., содержащая мотивы некоторых предполагаемых профагов, которые не обнаружены у возбудителя псевдотуберкулёза. Фланкирующие этот фрагмент последовательности имеются у обеих иерсиний. Олигонуклеотиды комплементарные фрагментам фланкирующих последовательностей предложены как праймеры «JS» для идентификации возбудителя псевдотуберкулёза. Краткое расстояние между ними разрешает праймерам направлять репликацию соответствующих ампликонов. Вставка у *Y.pestis* 41,7 т.п.н разобщает сайты взаимодействия двух праймерных последовательностей, делая невозможной амплификацию под контролем «JS» праймеров. Это определяет специфичность ПЦР с «JS» праймерами только для *Y. pseudotuberculosis* [Radnedge L. et al., 2001].

Привлекательными для широкой апробации в скрининге штаммов *Y.pestis* и дифференциации их от *Y. pseudotuberculosis* представляются также праймеры («3a», «3b», «3c», «3d»), эффективные вне зависимости от плазмидного состава исследуемого штамма, поскольку сконструированы на основе секвенса фрагментов предполагаемого профага, встроенного только в хромосому *Y.pestis* [Radnedge L. et al., 2001]. Необходимо отметить, что диагностическим праймером для вида *Y.pestis* авторами чаще испытывается праймер «3a», поскольку остальные реагируют с ДНК только у части штаммов. Диагностическая значимость праймера «3a» подтверждена и в других работах [Куклев В.Е. и др., 2006; Трухачёв А.Л. и др., 2006].

Наше предварительное исследование обнаружило существование отдельных изолятов *Y.pestis*, ДНК которых не реагирует в ПЦР с праймерами «3a» [Trukhachev A.L. et al., 2006]. Было решено расширить количество исследованных штаммов, очагов обследования и провести сравнение эффективности известных «хромосомных» праймеров для идентификации возбудителя чумы, отобрав те, которые обеспечивают максимальную эффективность детекции как типичных, так и атипичных (включая бесплазмидные) штаммов чумного микроба различного происхождения.

Были испытаны видоспецифические для *Y.pestis* праймеры «3a» [Radnedge L. et al., 2001], «v1m12for/ISrev216», «v1m33/ISfor1754» [Motin V.L. et al., 2002], пара праймеров «ур2769ms06», предложенных для мультилокусной внутривидовой градации *Y.pestis* по биоварам [Le Flèche et al., 2001], и пара специфичных для

Y.pseudotuberculosis праймеров - «JS» [Radnedge L. et al., 2001]. Исследован 201 штамм, микробиологически и иммунологически тестированных как вид *Y.pestis*. Штаммы распределялись на три группы (табл.6.2.). Среди них были как классические представители вида *Y.pestis*, рамнозопозитивные и рамнозонегативные (основной подвид *pestis*), так и рамнозопозитивные штаммы, называемые в России дополнительными подвидами (за рубежом – группа *Pestoides* [Radnedge L. et al., 2001] и биовар *microus* [Zhou D. et al., 2004]). Для контроля видоспецифичности праймеров использовали 35 штаммов *Y.pseudotuberculosis*, типовых (O:1 – O:16) [Tsubokura M., Aleksič S., 1995] и природных, выделенных в России, а также по 2 штамма различных микроорганизмов, близких по характеру роста к атипичным штаммам чумного микроба (*Y. aldove*, *Y. bercovieri*, *Y. enterocolitica*, *Y. fredericsonii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. mollaretii*, *Y. rohdei*, *Y. rukeri*, *P. multocida*, *S. typhi*, *S. dysenteriae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *K. oxitica*), всего 32 штамма. У 31 штамма отсутствовала *rFra*, включая два штамма подвида *caucasica*, который от природы характеризуется отсутствием *mini*-плазмиды пестициногенности (*pPst*) с *pla*-геном. Дефект по этим двум плазмидам обнаружен ещё у 6 штаммов основного *ssp. pestis*. Одна *pPst* плазида отсутствовала у 5 штаммов *ssp. pestis*, для которых она обязательна. В коллекции были также штаммы без плазмиды вирулентности (*pCad*), отвечающей за синтез некоторых мембранных белков, V-антигена и зависимость от ионов Ca^{2+} у трёх видов иерсиний. Три штамма были полностью бесплазмидными. Дефекты в плазмидном составе показывали полную бесперспективность применения праймеров на соответствующие плазмидные гены. Штаммы без плазмиды *rFra* не продуцировали F1-антигена, и он не определялся в РПГА [Трухачёв А.Л. и др., 2008]. В сумме это делало указанные штаммы в разной степени уклоняющимися от идентификации или вызывало сомнения в ходе их идентификации, поскольку используемые микробиологические тесты, зачастую, не являются строго видоспецифичными (ферментация рамнозы, мочевины, лактозы, сахарозы, отношение к бактериофагам, подвижность и др. [Домарадский И.В., 1971; Арсеньева Т.Е. и др., 2008]).

С использованием пары праймеров «За» практически у всех исследованных штаммов, независимо от их плазмидного состава и других особенностей, обнаружена амплификация характерных для возбудителя чумы фрагментов размером около 280 п.н. [Radnedge L. et al., 2001] (табл. 6.2). Но амплификаты не

обнаружены в пробах с ДНК четырёх длительно хранившихся штаммов, выделенных в Африке. ДНК всех 35 контрольных штаммов *Y.pseudotuberculosis* с этими праймерами не реагировала. Альтернативно, пары праймеров «JS» обеспечивали синтез фрагментов ДНК, размером примерно 220 п.н., в пробах со всеми штаммами *Y.pseudotuberculosis*, но не *Y.pestis*, включая и атипичные по реакции с «За» праймерами штаммы из Африки.

Среди олигонуклеотидов, ранее предложенных для изучения тандемных повторов у *Y. pestis* [Le Flèche et al., 2001], пара праймеров «ур2769ms06» позволила авторам различить использованные в опыте штаммы возбудителей чумы разных биоваров и псевдотуберкулеза. Однако по результатам нашего тестирования с праймерами «ур2769ms06» среди штаммов, типичных для известных биоваров (*antiqua*, *mediaevalis*, *orientalis*) выявлены штаммы, отклоняющиеся от этих типов. Это вызвало сомнение в пригодности «ур2769ms06» праймеров для внутривидовой градации *Y. pestis* по указанным биоварам. Или же структура генома *Y. pestis* выходит за пределы трёх известных биоваров. По нашим данным с помощью праймеров «ур2769ms06», исследованные штаммы *Y.pestis* оказалось возможным разделить по чётко различающимся размерам ампликонов на несколько групп. Этот размер колебался в зависимости от принадлежности к группе в пределах 250-620 н.п. [Trukhachev A.L. et al., 2006].

Праймеры «ур2769ms06» позволяли различать также возбудителей чумы и псевдотуберкулеза. ДНК большинства штаммов *Y.pseudotuberculosis* не реагировала с праймерами «ур2769ms06». У редких штаммов этого вида амплификацию регистрировали, однако протяжённость фрагментов превышала протяжённость «чумных» в 2 и более раз и соответствовала 1030-1050 и 1070-1100 п.н. Это отличие визуально было чётким и стабильным.

Следует отметить, что ДНК упомянутых выше четырёх атипичных штаммов *Y.pestis* из Африки, («отрицательных» в реакции с праймерами «За» и «JS») не реагировала с «ур2769ms06»-праймерами так же, как большинство штаммов *Y.pseudotuberculosis*. Если учесть возможность циркуляции в природе штаммов *Y.pestis*, представляющих первичные эволюционные периоды [Сунцов В.В, Сунцова Н.И., 2006], то, возможно, мы имеем дело со штаммами до приобретения ими фрагмента нитчатого профага [Radnedge L. et al., 2001]. В коллекции был ещё один, пятый штамм *Y.pestis*, ДНК которого не реагировала с праймерами «За», но в ПЦР с

«ур2769ms06»: регистрировались ампликоны 600 п.н., характерные для возбудителя чумы. Эти пять атипичных штаммов по основным диагностическим микробиологическим тестам [Руководство, 1992] и плазмидному составу принадлежали к виду *Y.pestis*. Таким образом «хромосомные» праймеры «ур2769ms06» и «3а» способны детектировать и дифференцировать большинство, но не все штаммы *Y.pestis*. В целях поиска более эффективных праймеров «хромосомного» происхождения дополнительно испытаны ещё две пары праймеров, способных у отдельных испытанных штаммов *Y.pestis* выявлять IS-элементы в определённых сайтах хромосомы («v1m12for/ISrev216» и «v1m33rev/ISfor1754») и инициировать амплификацию уникальных только для возбудителя чумы фрагментов в 390 и 400 н.п. [Motin V.L. et al., 2002]. Эта способность была подтверждена нами при исследовании всех типичных и атипичных 201 штамма *Y.pestis*, включая «уклоняющиеся» штаммы, негативные по «3а», «ур2769ms06» и «JS» праймерам. С «v1m12for/ISrev216» и «v1m33rev/ISfor1754» они реагировали позитивно и, судя по размеру амплификатов, соответственно виду *Y.pestis* (табл. 6.2). ДНК всех штаммов бактерий, использованных в качестве контрольных и не относящихся к видам *Y.pestis* и *Y.pseudotuberculosis*, не реагировала ни с одним из испытанных праймеров.

Таким образом, установлено, что отрицательные результаты ПЦР по одному из использованных праймеров не могут гарантировать правильность негативного ответа. Для полной успешной детекции типичных и атипичных штаммов *Y.pestis* и их дифференциации от возбудителя псевдотуберкулеза целесообразно использовать праймеры «3а», «JS», или «ур2769ms06», «JS» совместно с «v1m12for/ISrev216» или «v1m33rev/ISfor1754». Эти праймеры в сумме достаточно надёжно

Таблица 6.2

Результаты ПЦР-анализа штаммов *Yersinia* с различными праймерами

Вид бактерий	Отдельные характеристики	Локализация очагов, где выделены штаммы	Число штаммов	ПЦР с праймерами (наличие специфических фрагментов)				
				3a	JS	yp2769ms06	vim12for/ISrev 216	vim33 rev/ISfor 1754
<i>Y. pestis</i>	Rha- Fra+/-	Россия, Казахстан	54	+	-	+	+	+
<i>Y. pestis</i>	Rha+ Fra+/-	Россия, Казахстан	24	+	-	+	+	+
<i>Y. pestis</i>	Rha- Fra+/-	Центральная и Ю.-З.Азия, Африка	43	+	-	+	+	+
<i>Y. pestis</i>	Rha+Fra+/-	Центральная и Ю.-З.Азия, Африка	5	+	-	+	+	+
<i>Y. pestis</i>	Rha-Fra+	Африка (<i>antiqua</i>)	5	-	-	-	+	+
<i>Pestoides</i>	Rha+ Fra+	(<i>ssp.caucasica</i>), Россия, Армения, Азербайджан	35	+	-	+	+	+
<i>Pestoides</i>	Rha+ Fra+	(<i>ssp.altaica</i>) Россия, Монголия	11	+	-	+	+	+
<i>Pestoides</i>	Rha+ Fra+	(<i>ssp.ulegeica</i>) Монголия	3	+	-	+	+	+
<i>Pestoides</i>	Rha+ Fra+	(<i>ssp.hissarica</i>) Таджикистан	2	+	-	+	+	+
<i>Pestoides</i>	Rha+ Fra+/-	(<i>ssp. talassica</i>) Киргизия	4	+	-	+	+	+
<i>Y.pseudotuberculosis</i>	Rha+, serovar O1-O16 Fra-	Европа, Россия	15	-	+	-	-	-
<i>Y.pseudotuberculosis</i>	Rha+, serovar O1;O5 Fra-	Россия	5	-	+	+	-	-

Пояснения: Rha+ / Rha - рамноза-позитивные / - негативные; ПЦР – «+,-» - наличие/ отсутствие специфических фрагментов; Fra – специфический F1-антиген *Y.pestis*: + продуцируется, - не продуцируется; +/-разные штаммы.

идентифицируют типичные и атипичные бактерии *Y.pestis* вне зависимости от их фенотипа, состава плазмид и продукции связанных с ними диагностических протеинов и дифференцируют их от близкородственного вида *Y.pseudotuberculosis*. Сочетание этих праймеров можно предложить в качестве основного инструмента молекулярного скрининга и детекции штаммов возбудителя чумы из разных природных очагов, известных в мире [Трухачёв А.Л. и др., 2008]. Тетралокусное тестирование с помощью праймеров «3а», «JS», «ур2769ms06», и «vIm12for/ISrev216» позволит выявить все штаммы чумного микроба, независимо от особенностей структуры их генов, с одной стороны, дифференцировать их от бактерий возбудителя псевдотуберкулёза, с другой, и, наконец, обнаружить оригинальные штаммы, персистирующие в очагах Центральной Африки. Обнаруженная нами разница в результатах ПЦР-тестирования штаммов чумного микроба с помощью двух пар праймеров «3а» и «vIm12for/ISrev216» даёт возможность использовать их для выявления штаммов *Y.pestis*, проникших в нашу страну из зарубежья, либо в результате естественного заноса больными людьми и грызунами, либо при намеренном распространении возбудителя чумы. Такой вывод можно сделать в силу того, по нашим данным и результатам исследований отечественных авторов, все штаммы чумного микроба, выделенные на территории природных очагов Евразии, детектируются праймерами «3а». И только у некоторых штаммов из Африки последовательностей, гомологичных праймерным, не обнаружено. Но эти штаммы могут быть выявлены в ПЦР с праймерами «vIm12for/ISrev216».

Определение принадлежности к виду *Y. pestis* и наличия основных детерминантов вирулентности важно при диагностике заболевания и идентификации возбудителя эпидемии или вспышки. Помимо этого возникает необходимость эпиданализа ситуации и, конкретно, выяснения путей распространения инфекции. В этом случае помимо праймеров, определяющих наличие маркеров, характерных для отдельных подвигов чумного микроба, могут быть полезны другие. Анализ внутривидовой вариабельности важен также для решения вопросов таксономии и эволюции чумного микроба.

6.4. Геномные вариации, отражающие внутривидовую неоднородность *Y.pestis* и эволюционные изменения

Судя по большому разнообразию отличий структуры геномов разных штаммов чумного микроба, их геномы находятся в состоянии «текучести» [Anisimov A.P. et al., 2004]. Более того, известная современная полиморфность вида *Y.pestis* – свидетельство продолжающейся прогрессирующей и регрессивной эволюции различных его географических групп, которая обеспечивает выживание микроба в конкретных условиях каждого очага в каждый исторический период. Можно предположить, что изменчивость представителей вида *Y.pestis* и их дивергенция продолжаются с формированием в перспективе новых видов с другими основными признаками фенотипа и изменённой патогенетической активностью [Лебедева С.А. и др., 2002].

При внутривидовой дифференциации по данным секвенса обнаружены отличия по вставкам, делециям, заменам, одно-нуклеотидном полиморфизме. При сравнении секвенсов обнаружена одна уникальная область в хромосоме *Pestoides F* (приблизительно 7 кб), отсутствующая в полноценных ранее секвенированных геномах классических штаммов *Y.pestis*, но имеющаяся в *Y.pseudotuberculosis*. Таким образом, обнаруженные факты согласуются с тем, что *Pestoides F* происходит из наиболее древней линии штаммов *Y.pestis*, чем те типичные, геном которых уже секвенирован [Garsia E. et al., 2007].

Сравнение секвенсов хромосом двух штаммов различных таксономических групп обнаружило, что гены YPO2095- YPO2135 в классическом штамме чумного микроба EV76 биовара *orientalis* составляют 30 кб фрагмент, который отсутствует у «полёвочьего» штамма *Y.pestis* 91001 *bv. «microtus»* [Parkhill J. et al., 2001], авирулентного для человека [Fan Zh. et al., 1995; 1998]. Структура этого фрагмента или информация, закодированная на нём, может быть использована для целей диагностики. Среди генов, локализованных на этом фрагменте, есть те, которые отвечают за синтез 29 белков. Девять из этих белков обладают иммуногенностью, и возможно, их отсутствие определяет авирулентность упомянутого полёвочьего штамма для человека [Bei Li et al., 2005].

Изменения структуры генов обеспечивают формирование ложных временно неактивных или дефектных генов (псевдогенов) при этом попутно происходит

сокращение генома [Oyston P.C.F., Iserwood K.E., 2005]. Определение профиля псевдогенов с помощью ПЦР также используется для характеристики геномов штаммов *Y. pestis* как при внутривидовой дифференциации штаммов, так и при индивидуальной характеристике. При этом чем больше представителей вида *Y. pestis* имеют определённую мутацию или другую перестройку, тем раньше на пути эволюции она возникла. Степень распространённости подобной маркировки внутри вида даёт материал для предполагаемой позиции исследованных штаммов на филогенетическом дереве иерсиний. Так, при секвенировании в геноме штамма *Y. pestis* CO92, биовар *orientalis*, обнаружено около 150 псевдогенов [Parkhill J. et al., 2001; Oyston P.C.F., Iserwood K.E., 2005]. Ещё больше их в хромосоме штамма *KIM1*, биовар *medievalis* [Deng W. et al. 1999]. Этот факт находится в соответствии с предположением, допускающим самостоятельное, а не последовательное происхождение этих биоваров от биовара *antiqua*, сделанного при сравнении профиля псевдогенов у штаммов CO92 и *KIM1*, а также 91001 и CO92 [Tong Z. et al., 2005]. Исследование распространённости 24 мутации, приведших к образованию псевдогенов, у штаммов чумного микроба, циркулирующих в очагах Китая, позволило разделить их на 8 генотипов и обосновать ценность таких исследований для эпидемиологического анализа вспышек чумы и наблюдений за циркуляцией штаммов *Y. pestis* в природных очагах.

Однако следует учитывать, что данные анализа псевдогенов не могут быть абсолютными. Во-первых, псевдогены в ряде случаев при наличии умеренных сдвигов рамки считывания могут реверсировать с восстановлением функций. Во-вторых, большую убедительность имеют результаты мультилокусного анализа по нескольким псевдогенам или в совокупности с другими признаками.

Определённую роль играет внутривидовое разделение по принадлежности к биовару. Последнее время появляются высказывания, что разделение на биовары по признакам биохимической ферментативной активности может быть ненадёжным в связи с накоплением данных о мутационной изменчивости этих признаков. Поэтому при внутривидовом разделении штаммов возбудителя чумы на биовары предпочтительней учитывать различия на уровне генома. Возникает проблема поиска праймеров, с помощью которых можно было бы обнаружить особенности геномов у штаммов разных биоваров.

В этом случае имеют определённое значение *DFR*-профили. Специфические профили определены для всех трёх биоваров, хотя биовары *antiqua* и *mediaevalis* имеют и общий профиль, отличающийся от характерного для *Y. pseudotuberculosis* [Andersen G.L. et al., 2002]. Интересно отметить, что при разделении вида *Y. pestis* на риботипы биовар *orientalis* был также очень специфичным, тогда как среди штаммов биоваров *antiqua* и *mediaevalis* помимо специфических обнаруживали один общий риботип [Guiyoule A. et al., 1994].

При внутривидовой дифференциации и характеристики отдельных штаммов может быть полезным использование ПЦР с праймерами, которые типировать определённые последовательности нуклеотидов межгенных спейсеров (MST). Наличие в разных спейсерах вставок или делеций, специфичных для определённых биоваров, в сумме даёт возможность протестировать штаммы. Исследование трёх различных биовариантов с помощью MST последовательностей межгенных спейсеров локализованных рядом с генами *aceAK*, *glgAP*, *gar*, *lexA* *mrDEF*, *bioD* и др. показало полное соответствие результатов с итогами биохимического тестирования. Интересно, что когда в том же опыте была изучена пульпа зубов людей, умерших от чумы в первую и вторую пандемию, как предполагается вызванными, соответственно, биоварами *antiqua* и *mediaevalis*, то результаты опытов соответствовали данным, полученным с биоваром *orientalis*. Отсюда возникло предположение, что может быть все три пандемии были вызваны бактериями чумы одного биовара *orientalis* [Drancourt V. et al., 2004]

Групповая вариабельность генотипа в разных природных очагах внутри вида *Y. pestis* с учётом особенности их локализации используется при мультилокусном сравнительном анализе штаммов [Lowell J.L. et al., 2005]. Тип вариабельности чумного микроба, позволяющий отличить штаммы из разных природных очагов, связан с особенностями структуры генома и может быть прослежен за счёт определения числа и локализации различных вариабельных тандемных повторов (VNTR-последовательностей) [Le Flech Ph. et al., 2001]. Однако наши исследования свидетельствуют о том, что праймеры на основе последовательностей VNTR разделяют штаммы *Y. pestis* на большее число типов, чем это представлено в авторских работах, и эти праймеры можно использовать только для индивидуальной характеристики штаммов. Известно, что помимо внутривидовых вариационных

признаков, характерных для отдельных природных очагов обнаруживается ещё клоновая вариабельность, изучение которой может помочь при эпидемиологическом наблюдении за циркуляцией и распространением отдельных клонов возбудителя, а также при решении вопросов, касающихся эволюционного развития вида. Так при мультилокусном VNTR-анализе 180 штаммов чумного микроба из разных источников по 25 маркерам. Обнаружен 61 генотип, разделённый на три ветви, соответствующие известным биоварам. Биовар по фенотипу соответствующий *mediaevalis*, чётко отличается по мутации в *napA* гене. Штаммы биовара *antiqua* из Азии отличаются от *antiqua* из Африки. В работе описаны семь наиболее эффективных маркеров для тестирования новых не исследованных штаммов [Pourcel C. et al., 2004].

Обнаруженные у возбудителя чумы повторяющиеся последовательности нуклеотидов (CAAA)_N (9 аллелей по 3-13 повторов) и тандем, фланкирующий *pgm*-локус, (ATAGAAAG)_N (11 аллелей по 3-12 повторов по 8 н.о. и полных повторов с дополнительными внутренними нуклеотидами AAAG) использованы для сравнения отдельных штаммов и их групп на основании вычисленного коэффициента разнообразия [Adair D.M. et al., 2000; Blackman L.P. et al., , 2000; Klevitska A M. et al., 2001; Blackman L.P., 2002; Брюханов А.Ф. и др., 2002; Сучков И.Ю. и др., 2002]. При этом в ходе исследования с помощью (ATAGAAAG)_N у 56 штаммов *Y.pestis*, среди которых были 3 биовара, 22 риботипа и 20 нетипированных штаммов, у биовара *orientalis* выявлено 9 аллелей из 11, у *antiqua* - 3 аллеля (от 5 до 7 повторов), у *mediaevalis* - 1 аллель из 4 повторов. А у возбудителя пседотуберкулёза - только одна копия [Blackman L.P. et al., 2000]. VNTR-анализ использовался при изучении генетических особенностей *Yersinia pestis supsp. altaica*. Исследовали штаммы из разных мезоочагов Горно-Алтайского очага чумы по числу аллелей полных повторов 5'-CAAA-3'. Генетические различия VNTR профиля у этих штаммов коррелировали с локализацией природных очагов. Обнаружены и неполные повторы. Возможно, что такая вариабельность связана с принадлежностью основных носителей к различным видам грызунов [Балахонов С.В. и др., 2007]. Число VNTR у штамма от человека может коррелировать с числом штаммов из конкретного очага. Поэтому его можно использовать при эпидемиологическом

анализе и при судебном разбирательстве произошедшего террористического события [Lowel J.L. et al., 2005].

Внутривидовая вариабельность по наличию определённых последовательностей ДНК у групп штаммов, позволяющая привязать их к разным очагам была выявлена с помощью упомянутых выше праймеров «3а-3d» и «DRF» при исследовании полёвочьих штаммов из Закавказья (биовар *antiqua*) и Монголии (биовар *mediaevalis*). Ампликоны, направляемые праймерами «3b» «3с» «3d», обнаружены в равной степени в пробах с ДНК из всех классических и полёвочьих штаммов *Y.pestis* кавказского региона, но их не было при исследовании ДНК полёвочьих штаммов чумного микроба из природных очагов Монголии и прилежащих к ней [Radnedge L. et al., 2001]. Это позволяет предположить их обособленность. Отличия обнаружены также и при использовании DFR-анализа [Radnedge L. et al., 2001], когда был выявлен атипичный «полёвочий» штамм с ранее неизвестной оригинальной DFR-характеристикой (табл. 6.3, рис.6.3)

Таблица 6.3

Разделение «полёвочьих» штаммов *Y.pestis-Pestoides* на группы по результатам изучения DRF-профиля и ПЦР с праймерами «3а-3d» [Radnedge L. et al., 2001, 2002]

Биовар	Штамм	DRF-про-филь	ПЦР-фрагмент 41,7 кб		Праймеры DRF	
			3а	3b-d	4	3
<i>Mediaevalis</i> (монгольские)	<i>Pestoides A</i>	D	+	-	+	+
	<i>Pestoides B</i>	D	+	-	+	+
	<i>Pestoides C</i>	E	+	-	+	-
	<i>Pestoides D</i>	E	+	-	+	-
<i>Antiqua</i> (caucasica)	<i>Pestoides E</i>	M	+	+	-	+
	<i>Pestoides G</i>	M	+	+	-	+
	<i>Pestoides F</i>	K	+	+	-	+
Неизвестно	<i>Pestoides J</i> (DRF3, 4 отриц.)	I	+	+	-	-

При внутривидовой дифференциации штаммов *Y.pestis* могут быть использованы особенности структуры видоспецифических плазмид. Так, например, при сравнении с аминокислотной последовательностью LcrV-белка классического штамма *Y.pestis* CO92 с белками некоторых Rha⁺ штаммов дополнительных

подвидов обнаружено четыре точечных замены: в положениях 18 (Lys→Asn), 72 (Lys→Arg), 273 (Cys→Ser) и 324-326 (Ser-Gly-Lys →Arg). На основании этих данных исследованные 10 штаммов были распределены на 5 секвенс-типов, что даёт основание использовать эти особенности *lcrV*-гена для тестирования штаммов чумного микроба [Anisimov A.P., et al., 2007].

Схема по итогам таблицы 6.3

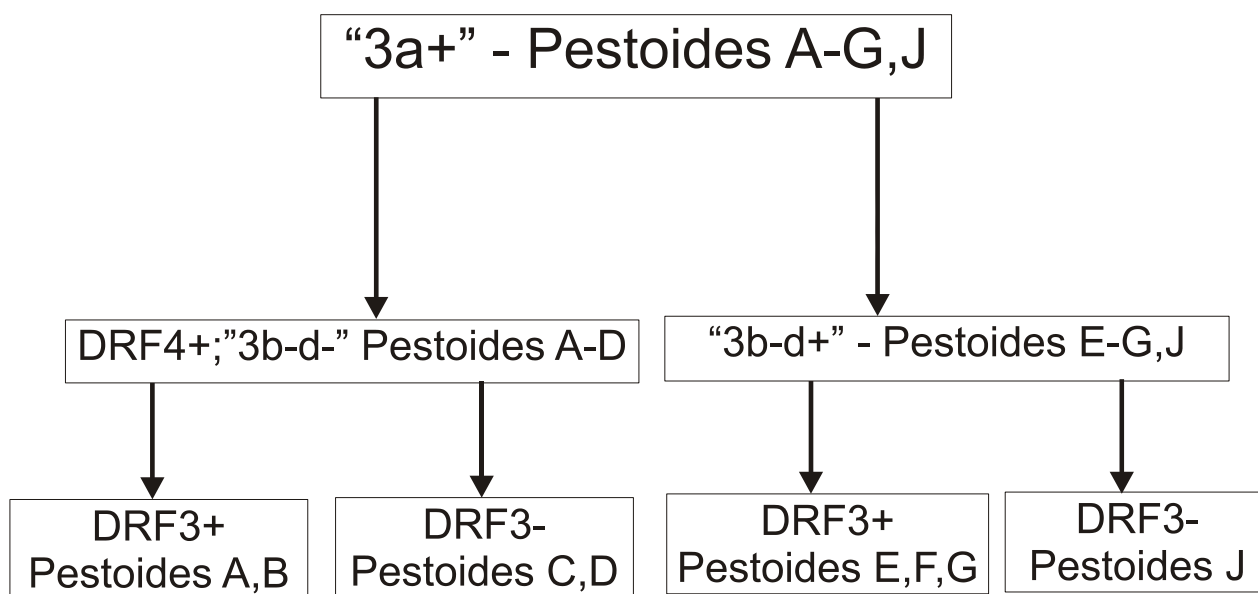


Рис.6.3 Схема разделения штаммов на группы в зависимости от результатов ПЦР с указанными праймерам

У штамма *Pestoides F* обнаружены особенности секвенса *lcrV* гена, которых нет у типичных штаммов *Y. pestis*, утративших рPst-плазмиду [Garsia E et al., 2007], что может быть использовано для градации внутри этого вида.

ПЦР-анализ совместно с секвенированием ампликонов продемонстрировали, что отрицательные по денитрификации штаммы *Y. pestis* обладали двумя типами замен триплетов одной вставкой н.о. в гене *napA*, что позволило идентифицировать классические штаммы биотипа *orientalis* (CO92) от полёвочьих штаммов типа 91001 («*microtus*») [Parkhill J.B.W. et al., 2001; Zhou D. et al., 2004] (более детально в главе 4).

Наличие определённых сайтов мутации в плазмидах, а именно, делеция 16 п.о. в *lcrV* гене и замена н.о. в *yopN* гене плазмиды рCad, замена п.н. в *pla* гене рPst

плазмиды и делеция 20 п.о. в *pMT* (*pFra*) могут использоваться при необходимости дифференциации классических штаммов *Y.pestis* от вариантов возбудителя чумы, подобных штамму 91001, который является представителем вновь предлагаемого биовара «*microtus*» [Zhou D. et al., 2004].

Эффективность внутривидового риботипирования штаммов чумного микроба при контроле за чумой была продемонстрирована на Мадагаскаре. Длительное сохранение в очаге одного риботипа, появление нового, и последующее его перемещение в соседние очаги позволяет судить о циркуляции возбудителя и появлении аутохтонных и завозных заболеваний [Guiyoule A. et al., 1997].

Недавно было предложено для типирования, комплексное использование (1) риботипирования родоспецифическим для иерсиний зондом на 16S РНК с использованием ДНК-ДНК гибридизации по Саузерну и (2) ПЦР-типирования (RAPD-ПЦР со случайными праймерами и ERIC-ПЦР на основе анализа повторяющихся межгенных консенсусных последовательностей) [Кутырев В.В. и др., 2007].

Поиск новых более эффективных праймеров может облегчить, уточнить и ускорить корректную идентификацию возбудителя чумы. Это направление исследований активно развивается. Постепенно расширяется круг исследуемых последовательностей и генов.

Так, при изучении структуры плазмиды (*pG8786*), определяющей продукцию капсульного антигена F1 у штамма *Y.pestis* 8786 полёвочьей разновидности из Грузии (подвид *caucasica*) выявлены два фрагмента, состоящие из 4642 п.н. и 32617 п.н.: область 1 и 2, соответственно. Область 1 содержит большую часть ДНК плазмиды *S. enterica* серовара *Typhi* *pHCM2* (локусы CDS), тогда как область 2 содержит фрагмент с 25 открытыми рамками считывания в большой степени, подобный *tra*-оперону кишечной палочки. ПЦР с соответствующими праймерами позволила выявить у авирулентного для людей штамма из Внутренней Монолии в Китае (*Y.pestis* 91001) наличие локусов CDS и отсутствие генов *tra*- оперона [Golubov A. et al., 2004; Zhou D. et al., 2004]. Этот факт позволил нам предположить возможность использовать его для внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis*.

На основе известных данных секвенса плазмиды *pG8786* [Golubov A. et al., 2004] были подобраны соответствующие праймеры (на последовательность CDS39-

40 и ген *traA*), и проведено мультилокусное ПЦР-тестирование более 200 штаммов *Y.pestis* известных подвидов из разных очагов. Все исследованные штаммы удалось разделить на три группы: (1) классические штаммы основного вида *ssp. pestis* (не имеют CDS и *tra* фрагментов), (2) группа, составляющая дополнительный рамнозопозитивный подвид *caucasica*, (имеет CDS-последовательности и *tra*-гены) и (3) группа рамнозопозитивных штаммов дополнительных подвидов, выделенных в Монголии и прилежащих к ней природных очагах чумы (имеет только CDS-последовательности) (рис. 6.4).

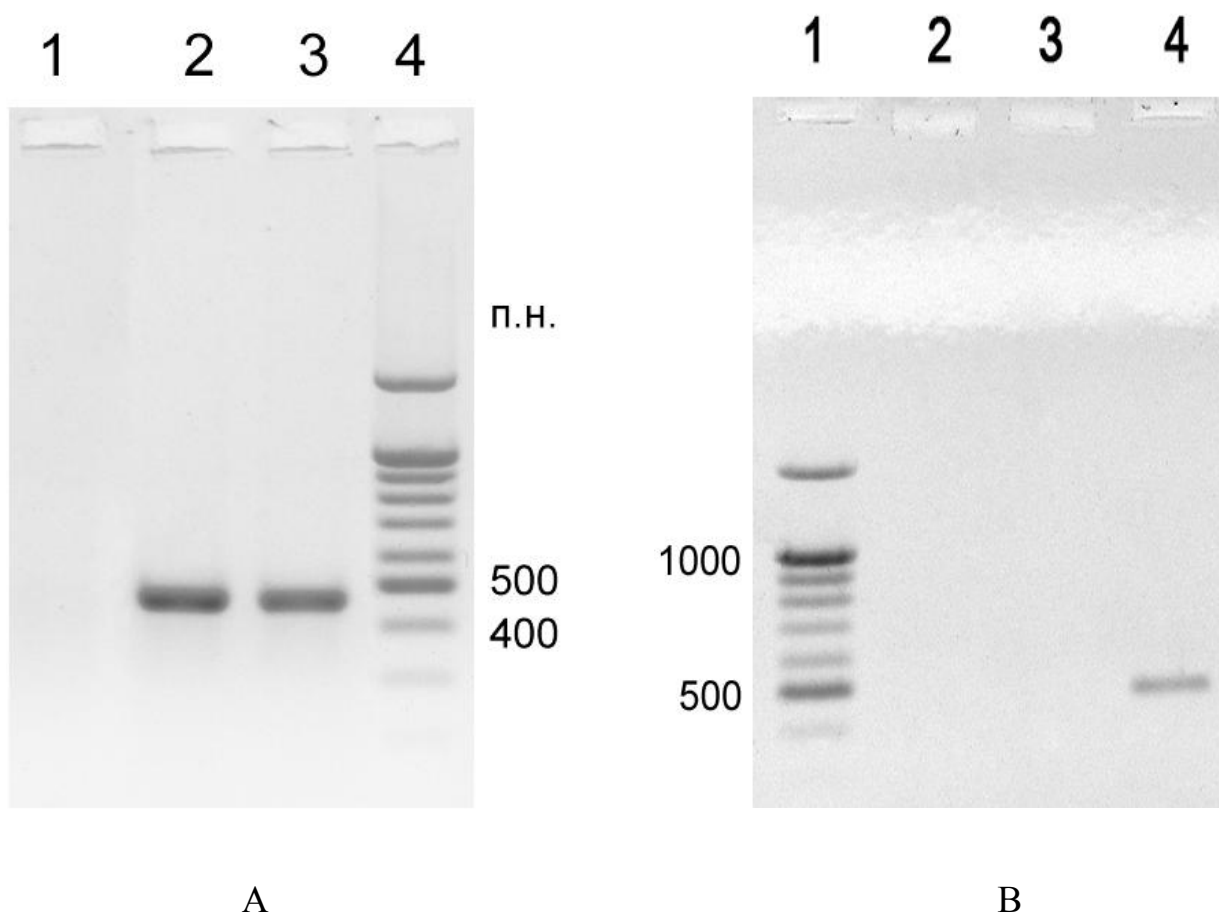


Рис 6.4. ПЦР – анализ штаммов *Y.pestis* с праймерами CDS40 (A) 1- *ssp. pestis*; 2 – *ssp. altaica*; 3 – *ssp. caucasica*; 4 – Mm и *traA* (B) 1- Mm; 2 – *ssp. pestis*; 3 – *ssp. altaica*; 4 – *ssp. caucasica*. Электрофорез в 2% агарозе. Окраска EtBr.

Учитывая, что праймеры на CDS –последовательности реагируют с ДНК плазмиды rFta полёвочьих «монгольских» штаммов мы получили подтверждение принадлежности последних с помощью праймеров «3d» [Radnedge L. et al., 2001]. ДНК бесфракционных рамнозопозитивных полёвочьих штаммов из регионов, прилежащих к Монголии, в отличие от контрольных позитивных проб, не реагировала с этими праймерами, свидетельствуя об их эффективности при дифференциации внутри дополнительных подвидов.

Ранее было доказано, что «полёвочьи» штаммы *Y.pestis* из разных очагов могут отличаться по способности ферментации арабинозы. При этом есть как полностью негативные по этому признаку, так и со смешанными популяциями [Касаткин Н.Ф., 1963]. Недавно обнаружено, что неспособность определённых «полёвочьих» штаммов ферментировать арабинозу связана с наличием делеции в гене *araC*, о чём уже сообщалось выше [Zhou D. et al., 2004]. Причём, по мнению исследователей, эта делеция является признаком, который определяет принадлежность таких штаммов (наряду с ферментацией глицерина и способностью к денитрификации) к предлагаемому новому биовару «*microtus*». Определяющим свойством этого биовара, как доказано на примере отдельных штаммов, является авирулентность для людей при подкожном и аэрозольном заражении [Zhenya F. et al., 1998; Zhou D. et al., 2004]. Синтезировав соответствующие праймеры («*araC-R1/araC-F1*») мы провели поиск штаммов с такой делецией, поскольку они могут быть объектом более детального их исследования, в том числе и в направлении особенностей их вирулентности. Нам удалось выявить такие штаммы [Трухачёв А.Л. и др., 2008] и продолжить их исследование. Таким образом, разделив штаммы *Y.pestis* из разных очагов с помощью праймеров CDS39, CDS40, *traA* и «3d» на 3 группы, только для одной из которых доказана высокая вирулентность для человека, с помощью «*araC-R1/araC-F1*» праймеров, нам удалось из группы «монгольских» полёвочьих штаммов выделить подгруппу штаммов, по своим свойствам предположительно авирулентных для людей (рис. 6.5).

Выполненные нами исследования позволили расширить круг праймеров и признаков, позволяющих более точно идентифицировать и охарактеризовать исследуемые штаммы чумного микроба, включая и те, которые характеризуются

значительными отличиями от классических образцов основного подвида *Y.pestis ssp. pestis* (табл. 6.4).

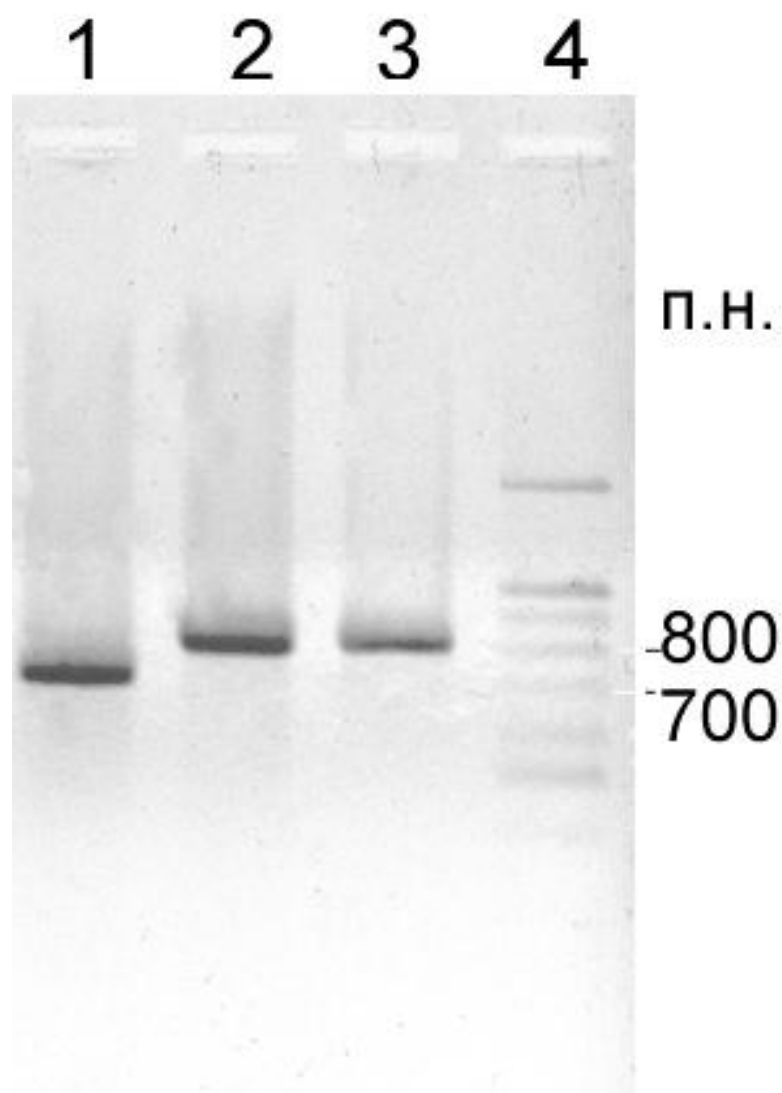


Рис 6.5. ПЦР – анализ штаммов *Y.pestis ssp. altaica* с праймерами «*araC-R1/araC-F1*»: 1 – Ara⁻₁; 2 - Ara⁻₂; 3 – Ara⁺ (Ara-фенотип указан по результатам биохимических тестов). Электрофорез в 2% агарозе. Окраска EtBr.

Таблица 6.4.

Описанные в литературе праймеры, предлагаемые для детекции и идентификации в ПЦР штаммов возбудителя чумы

№ п/п	Праймеры	Ссылка
1.	<i>pla</i>	<i>Hinnebusch J., Schwan T.G., 1993</i>
2.	<i>pla</i>	<i>Campbell J. et al., 1993</i>
3.	<i>caf1, pla</i>	<i>Norkina O.V. et al., 1994</i>
4.	<i>caf1, pla, YOP1*</i>	<i>Куличенко А.Н. с соавт., 1994</i>
5.	<i>caf1, yop M, pla, inv*</i>	<i>Tsukano H. et al., 1996</i>
6.	<i>caf1</i>	<i>Балахонов С.В., Лясоцкий Л.Л., 1997</i>
7.	<i>caf1, ген «мышинного токсина»</i>	<i>Мишанькин Б.Н. с соавт., 1997</i>
8.	<i>pla, lcrV, caf1, hms</i>	<i>Leal N.C., Almeida A.M., 1999</i>
9.	<i>F1, pla, V-ag, 16S RNK*</i>	<i>Neubauer H. et al., 2000</i>
10.	<i>F1</i>	<i>Rahalison L. et al., 2000</i>
11.	3a, JS*	<i>Radnedge L. et al., 2001</i>
12.	yp2769ms06	<i>Fleche F. et al., 2001</i>
13.	irp2*, caf1, lcrV and pla	<i>Melo A.C. et al., 2003</i>
14.	<i>pla</i>	<i>Глухов А.И. с соавт., 2003</i>
15.	16S RNK*, pla, caf1	<i>Tomaso H. et al., 2003</i>
16.	16S RNK*, pla, rpoB*	<i>Thomas M. et al., 2004</i>
17.	<i>pla, caf1, pCD1, ent*, F1</i>	<i>Woron A.M. et al., 2006</i>
18.	3a, irp*, lcrV(Vag)	<i>Куклев В.Е. и др., 2006, 2007</i>
19.	3a, vlm12for/ISrev216, yp2769ms06, JS*	<i>Trukhachev A.L. et al., 2006</i>
20.	ompF	<i>Стенкова А.М. и др., 2008</i>
21.	3a, vlm12for/ISrev216, yp2769ms06, JS*, CDS39; traA	<i>Трухачёв А.Л. и др., 2008</i>
22.	vlm12for/ISrev216, traA, CDS39; JS*; «araC-R1/araC-F1», pla	<i>Трухачёв А.Л. и др., 2008a</i>

Примечание: «курсив, жирный шрифт» - праймеры на хромосомные гены или VNTR-последовательности; остальные - на плазмидные. Праймеры **caf1 (F1), lcrV (V-ag), hms, pla, pCD1** – свидетели потенциальной вирулентности. «*»- праймеры при дифференциации с *Y.pseudotuberculosis*.

Глава 7. Иммунологическое исследование возбудителя чумы.

Моноклональные антитела в диагностике

Божко Н.В., Алексеева Л.П., Веркина Л.М., Лебедева С.А.,

7.1. История вопроса и методы исследования

Разработка методов серологической диагностики чумы началась в конце XIX века, когда в 1897 г. было показано, что фильтраты культур чумных бактерий при соединении с сыворотками больных чумой образуют хлопья. Именно специфическое взаимодействие антигена и антител, находящихся в сыворотке и продуцируемых в ответ на появление антигена клетками белой крови больного, и было положено в основу серологических методов диагностики.

За истекшие 110 лет для диагностики чумы были предложены и апробированы различные серологические реакции: агглютинации [*Shibajama C., 1905; Щастный С.М., 1910*], термопреципитации [*Piras L., 1913; Berlin H., 1915; Трифонова А.А., 1951*], диффузионной преципитации в геле [*Ouchterlony O, 1949; Канчух А.А., 1965*], связывания комплемента [*Bordet J., Gengou O., 1901; Обухова О.В., 1961*], подавление связывания комплемента [*Karrer Y. et al., 1950; Басова Н.Н., Леви М.И., 1960*], коагглютинации [*Берлин А.Л., 1930; Алёшина Е.Н., Простетова Н.П., 1949*] и другие методы, количество которых, по разным источникам, исчисляется десятками.

Многие из них в силу недостаточной чувствительности и специфичности, а также трудоёмкости выполнения не получили широкого распространения в лабораторной практике, хотя в научных исследованиях они применяются в отдельных случаях и до настоящего времени.

На определённом этапе для индикации и идентификации чумного микроба были предложены ализариновые суспензионные агглютинины [*Адамов А.К., 1962*]. Суспензия частиц угля использовалась в качестве твёрдого адсорбента для реакции агломерации антител к чумному микробу [*Яфаев Р.Х., 1961*]. В этой же реакции были использованы цветные антитела [*Никитин В.М., 1966*]. Однако эти методы были вытеснены методом флуоресцирующих антител и различными модификациями реакции непрямой гемагглютинации.

Серологические методы имеют ряд существенных преимуществ перед методами бактериологического анализа при исследованиях на чуму, Многие из них

отличаются простотой постановки, высокой чувствительностью, ускоренным учётом реакций (время учёта результатов – 2-4 ч). Важнейшим преимуществом также является возможность исследования материала, непригодного для бактериологического анализа (загнившие и мумифицированные трупы животных, погадки хищных птиц, субстраты гнездовой камеры грызунов).

Все серологические реакции в зависимости от цели исследования принято делить на две группы: реакции, с помощью которых можно обнаружить антиген, и реакции, направленные на поиск антител. Кроме того, серологические реакции можно разделить на две большие группы: простые и сложные. Под простыми реакциями подразумевают двухкомпонентные (участвуют только антиген и антитело) или трёхкомпонентные (участвуют антиген, антитело и реагирующая система). Сложные реакции состоят из двух или трёх простых реакций. Для иммунодиагностики возбудителя чумы разработано и апробировано более 20 серологических реакций. Простые двухкомпонентные реакции представлены реакцией агглютинации (РА), реакцией пассивной гемагглютинации (ПГА), реакцией объёмной агломерации (РАО), реакцией преципитации в агаре (РДПА), реакцией иммунофлуоресценции (прямой метод). Простые трёхкомпонентные реакции включают реакцию торможения гемагглютинации (РТПГА), реакцию нейтрализации антител (РНАТ) или антигена (РНАг), иммуноферментный анализ (ИФА). Реакцию связывания комплемента (РСК) и непрямой метод иммунофлуоресценции относят к сложным реакциям на чуму.

Наиболее простая из перечисленных двухкомпонентных реакций – РА. Она редко используется для идентификации чумного микроба. В серологических исследованиях на чуму РА применяется как показатель возникновения в организме специфических иммунологических сдвигов под влиянием инфекционного или вакцинального процессов. Однако высота титров агглютининов не всегда отражает степень напряжённости формирующегося противочумного иммунитета, поэтому РА при чуме не нашла такого широкого применения как при других инфекционных болезнях, таких, как бруцеллёз, туляремия, брюшной тиф и др.

Широко известна реакция преципитации в чашках с агар-агаром [*Ouchterlony O., 1949*]. Существуют различные варианты диффузной преципитации в агаре. При

одном из способов постановки РДПА антиген находится в смеси с агаром, а антитело помещают в специально вырезанные луночки (метод Манчини). Другой вариант – метод двойной диффузии. В этом случае агар не содержит компонентов реакции, а антиген и антитело располагаются в противоположащих луночках. Реагенты медленно диффундируют в агар, и в месте их соединения образуется преципитат в виде молочно-белых полос. Количество и интенсивность проявления зависят от иммунного сродства компонентов реакции. Предельное разведение сыворотки, при котором ещё видны зоны преципитации, считают преципитационным титром сыворотки. РДПА является весьма доступным методом, не требующим аппаратуры, и высокоспецифичным. Однако сравнительно низкая чувствительность характеризует его как метод качественный и не пригодный для количественного определения антигена [Чайка Н.А., 1981]. Тем не менее, простота в постановке и информативность способствовали широкому применению РДПА в исследованиях по изучению антигенной структуры чумного микроба и при тестировании родо- и видоспецифических экспериментальных сывороток. Позже эта реакция была модифицирована за счёт использования лунок малого размера, что способствовало более экономичному расходованию материалов и анализу большего количества проб в одной чашке. С помощью такой микропреципитации была, например, разработана методика определения пестицина 1 и антител к нему [Иванова В.С., 1981; Иванова В.С., Божко Н.В., 1981].

Разновидностью реакции, основанной на феномене преципитации, является иммуноэлектрофорез. Наибольшее распространение в исследованиях чумного микроба получил вариант иммунофореза, сочетающий метод электрофоретического разделения антигенов в агаровом геле и метод встречной двухмерной иммунодиффузии. Возможности иммунофореза в отношении выявления антигена достаточно высоки. С помощью видоспецифичных сывороток можно выявлять тот или иной антиген в сложной смеси антигенов и в различном материале, в том числе и непригодном для бактериологического исследования. Чувствительность метода довольно высокая, позволяет выявлять антиген в концентрации 10 мкг/мл. В отношении характеристики антител метод равнозначен РДПА. В современных методах исследования принципы иммуноэлектрофореза широко используются. Так,

возможность применения диск-электрофореза показана при внутривидовой дифференциации и уточнении филогенетического положения атипичных штаммов чумы [Зайцев А.А., 1994, 2006].

К простым двухкомпонентным серологическим методам относится реакция иммунофлуоресценции (МФА, прямой метод). Метод основан на способности некоторых флуорохромов образовывать светящиеся комплексы с сывороточными белками, не нарушая иммунологической специфичности иммуноглобулинов. МФА относится к табельным методам индикации, характеризуется как высокоспецифичный и высокочувствительный анализ. Преимуществом метода МФА является его высокая чувствительность (10^5 м.к./мл.), возможность получения быстрого ответа (1-2 ч), выявление как живых, так и погибших клеток, содержащих соответствующий антиген. Метод флуоресцирующих антител [Coons A.H. et al., 1942] сочетает в себе морфологическое и иммунологическое исследование с демонстративностью люминесцентной микроскопии.

Для обнаружения антигенов и антител метод флуоресцирующих антител предложен и в непрямой модификации. В этом варианте используется иммунная сыворотка против гамма-глобулина человека или животного, окрашенная флуорохромом. В связи с тем, что при проведении анализа вводится дополнительный этап окраски, это делает непрямой МФА более трудоёмким и по времени проведения анализа уступающим прямому методу. Однако метод непрямой иммунофлуоресценции в диагностике чумы применяется несколько шире, чем прямой вариант, так как используется не только для обнаружения антигена, но и титрования антител. В настоящее время разработана биотехнология приготовления тест-систем для обнаружения чумных бактерий по F1 антигену непрямым методом флуоресцирующих антител и определены перспективы его использования для экспресс-диагностики [Зайцев А.А., 1994, 2006; Зайцев А.А. и др., 1994; Иванов Ю.В., Коровкин С.А., 1997].

Прямой и непрямой методы флюоресценции с использованием антител к капсульному антигену чумного микроба успешно использовали при исследовании в течение ближайших 20 ч как посевов бактериальных культур на плотных питательных средах, так и органов заражённых чумой белых мышей и диких

грызунов [Carter C., Leise J., 1958; Moody M.D., Winter C.C., 1959; Winter C.C., Moody M.D., 1959; Winter C.C., Moody M.D., 1959a; Hudson B.W., Quan S.F., 1960; Hudson B.W. et al., 1962].

Недостатком МФА является необходимость использования люминесцентных микроскопов. Кроме того, для обеспечения достоверных результатов требуется значительная подготовительная работа по определению «рабочих разведений» люминесцирующих иммуноглобулинов и устранению фоновой флюоресценции препаратов.

У нас в стране применение методов флюоресценции нашло себя в это же время. При исследовании органов инфицированных возбудителем чумы животных метод проявлял достаточную специфичность. При его выполнении использовали меченый глобулин из агглютинирующей чумной сыворотки [Чибрикова Е.В. и др., 1960]. Чумная агглютинирующая сыворотка в непрямом варианте была испытана на различных видах микроорганизмов. Неудачной в этом случае была попытка отличить бактерии чумы от бактерий псевдотуберкулёза [Синицкий А.А. и др., 1960]. Позитивными были результаты идентификации чумного микроба с помощью непрямого метода окраски мазков при использовании адсорбированных агглютинирующих чумных сывороток, а также конъюгатов кроличьих чумных сывороток. Однако и в этих опытах попытки дифференцировать возбудитель чумы от псевдотуберкулёзного микроба были безуспешны [Знаменский В.А. и др., 1962]. Затруднения наблюдались и при выявлении возбудителя чумы в процессе обследования очагов с помощью капсульных флюоресцирующих антител непосредственно в организме инфицированных блох [Hudson B.W. et al., 1966]. Это происходило из-за постепенного снижения уровня синтеза антигена F1 в этих условиях [Cavanaugh D.S., Randall R., 1959]. Более эффективным в данном случае было использование чумных капсульно-соматических и общих видоспецифических люминесцирующих антител [Дертева И.И. и др., 1970], полученных ранее наряду со специфическими для возбудителя псевдотуберкулёза [Чибрикова Е.В. и др., 1960, 1962а, 1962б; Табаков П.К. и др. 1962, 1966; Вельнер Е.И. и др., 1965а, 1965б; Дертева И.И. и др., 1966; Веренков М.С., Вельнер Е.И., 1966]. Такие люминесцентные сыворотки были с успехом использованы не только при изучении

чистых культур чумного микроба, но и при обнаружении их в органах диких грызунов, выловленных в зоне чумных эпизоотий [Сомова Н.М., Гурьянова Л.И., 1964 и др.]. Позже было показана целесообразность использования для идентификации чумного микроба общих люминесцирующих видоспецифических чумных антител. Непременным условием при этом должно быть исследование штаммов, выращенных при 37° и 28°С.

В инструкциях по применению люминесцирующих чумных антител для диагностических целей рекомендуется применять одновременно капсульно-соматическую сыворотку и антитела против фракции 1. Однако дифференцировать бесфракционные штаммы возбудителя чумы от возбудителя псевдотуберкулёза в этом случае не представляется возможным. Для выполнения дифференцирующего теста необходимы препараты поливалентных псевдотуберкулёзных антител. Естественно, что предпочтительным в этом случае был бы один уникальный препарат, решающий проблему видовой идентификации штаммов *Y.pestis*.

В 1956 г. Комитетом экспертов ВОЗ по чуме была составлена и опубликована первая инструкция по применению серологических методов для эпидемиологических целей.

Способность свежих эритроцитов млекопитающих, в том числе барана и птиц адсорбировать на своей поверхности различные вещества, описана давно [Збарский Б.И., 1925; Зильбер Л.А., 1927; Беленков А.И., 1946; Кравченко А.Т., Соколов М.И., 1946;]. Эта способность легла в основу реакции непрямой гемагглютинации [Boydén S.V., 1951]. Оптимизация визуализации результатов реакции имела место потому, что сами эритроциты были не только носителями сенситина, но и индикатором реакции, который делал её более наглядной. После этого эритроциты стали применять в качестве адсорбента различных бактериальных, вирусных и тканевых антигенов.

При всей эффективности эритроцитарные диагностикмы, приготовленные на основе свежих эритроцитов, зачастую довольно быстро утрачивают свою активность. В связи с этим были отработаны методики их формализации [Ingraham J., 1958; Weinbach R., 1958; Csizmas L., 1960; Леви М.И. и др., 1962; Меньшов П.И., Шмутер М.Ф., 1969]. Препараты формализованных

эритроцитов могли длительно сохраняться и использоваться по мере надобности. Затем эти формализированные антигены с целью сенсibilизации обрабатывали сначала танином, а потом исследуемым антигеном [*Леви М.И., 1962; Басова Н.Н. и др., 1961*].

Использование эритроцитов, обработанных танином и сенсibilизированных чумным антигеном в качестве антигенов при анализе сывороток крови больных людей, значительно повысило эффективность серологических методов

Опыт использования РПГА и впервые предложенной реакции нейтрализации антител (РНАт) в практике эпизоотологического обследования природных очагов чумы был обобщён также в инструктивных материалах Ростовского противочумного института в 1962 г.

В дальнейшем была разработана принципиально новая высокочувствительная реакции нейтрализации антигена (РНАг) и сконструирован соответствующий диагностикум на чуму [*Беленков Я.И., 1946; Леви М.И. и др., 1961; и др.*]. В конце 60-х годов в Среднеазиатском противочумном институте было освоено серийное производство антигенного и антительного эритроцитарных диагностикумов [*Шмутер М.Ф., 1969*], что обеспечило широкое использование серологических методов при эпизоотологическом обследовании природных очагов чумы. В эти же годы была предложена общая классификация серологических реакций и дана характеристика сопряжённых гомологических реакций, получивших название «система реакций» [*Леви М.И., 1961*].

Кроме перечисленных выше реакций в прямом варианте анализа и с применением торможения и нейтрализации может быть использована реакция объёмной агломерации (РАО). Она представляет собой полноценную иммуносуппензионную реакцию по типу РНГА. При этом РАО имеет значительные преимущества по сравнению с РНГА, так как лишена недостатков этого метода, связанных с эритроцитарным носителем сенситина.

Сравнительно ограниченный срок годности жидких эритроцитарных диагностических препаратов и повышенная частота неспецифических результатов за счёт наличия перекрестных антигенов побудили провести исследования возможности их консервации. Исследования показали, что наиболее подходящим

для консервирования сенсibilизированных эритроцитов оказалось их высушивание в вакууме после предварительного замораживания при (-30)-(-70°C) в защитной среде, которой оказались желатино- и желатозо-сахарозная. Срок годности таких диагностикумов был 2-3 года и более [Mc Kenna J.M., 1957; Сомов Г.П., Виноградов В.Я., 1966; Головачёва С.Н., 1967; Канатов Ю.В., Сагатовский В.Н., 1967; Родионова А.В., 1968; Ерохин Е.П., Фомичёва А.С., 1969].

Для подтверждения специфичности реакции обычно применяют реакцию торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА), суть которой - предварительная нейтрализация специфических антител исследуемой сыворотки известным антигеном, который использован для сенсibilизации эритроцитов, с последующей обработкой проб этим эритроцитарным диагностикумом [Леви М.И., 1962]. На основе РНГА и РТНГА была разработана реакция нейтрализации антител (РНА), которая апробирована при эпизоотологическом обследовании диких грызунов в очагах чумы и признана как чувствительная и специфичная [Леви М.И. и др., 1963; Сучков Ю.Г., 1963; Залыгина Н.Н., 1964а, 1964б].

Диагностическое значение РНГА особенно возросло с тех пор, когда разработали методику сенсibilизации свежих, консервированных борной кислотой с глюкозой и формализированных эритроцитов иммунными сыворотками или γ -глобулинами, выделенными из них [Рыцай Т., 1956; Яфаев Р.Х., Чепелев С.А., 1961; Синицын В.А., Шварцман Я.С., 1962; Баяр Г.А. и др., 1966, 1968]. К сожалению, не все иммунные сыворотки оказывались пригодными для сенсibilизации эритроцитов, что предположительно может определяться классом доминирующих в сыворотке специфических антиглобулинов и соотношением полных и неполных антител [Гурлева Г.Г., 1963 и др.].

В практике используют стойкие специфические эритроцитарные диагностикумы для РНГА, приготовленные на основе формализированных эритроцитов и сенсibilизированных антифракционными кроличьими сыворотками, коммерческими гипериммунными лошадиными сыворотками и гамма-глобулинами, выделенными из них [Сучков Ю.Г., Канатов Ю.В., 1965; Шмутер М.Ф., 1969]. Эти диагностикумы использовали в реакции нейтрализации антигена (РНАг) для обнаружения чумного микроба и его антигенов.

При диагностике чумы применяют несколько модификаций РНГА. Для определения антигенов чумного микроба эффективна РНГА с эритроцитами, сенсibilизированными антителами, и реакция нейтрализации антител (РНАт). Сочетание этих взаимоконтролирующих реакций позволяет точнее определить наличие возбудителя или антител к нему и выдать окончательный ответ.

Высокую активность и специфичность эритроцитов, сенсibilизированных антигенами и антителами, при чуме показали многие исследователи [*Леви М.И. и др., 1961, 1962, 1963, 1964; Вальков Б.Г., 1961; Залыгина Н.И., 1962, 1964; Орлова Г.М., Леви М.И., 1964; Канатов Ю.В., 1967, 1968, 1969; Ривкус Ю.З. и др., 1967; Эссель А.Е. и др., 1969; Dodin A. et al., 1969; Hallet A.F. et al., 1970; Пшеничная Л.А. и др., 1970; и другие.*]

Судя по приведенным данным, из всех описанных в литературе серологических реакций наиболее широкое применение получили различные модификации РНГА и метода флюоресцирующих антител (ФА). Равнозначной по эффективности с РНГА считают также реакцию суспензионной агломерации на F1-антиген [*Гальцева Г.В. и др., 1992*]. Однако существующие антительные и антигенные препараты позволяют идентифицировать возбудителя чумы и диагностировать это заболевание только по капсульному антигену или антителам к нему. К недостаткам метода ФА обносится обязательное использование комплекса сывороток. В сумме это определяет необходимость создания диагностикумов, которые были бы лишены одного или обоих недостатков.

Ещё одним направлением совершенствования диагностических препаратов были исследования по замене эритроцитарных носителей сенситинов на полимерные сферические. В результате в 80-х годах на смену эритроцитам «пришли» латексные синтетические носители, которые, совершенствуясь, сохраняются до настоящего времени. Примером таких работ является разработка биотехнологии приготовления полиакролеиновых чумных диагностикумов: антигенного и на основе МКА и ПКА к F1, а также определение перспектив их использования для обнаружения противочумных антител и F1 в серологических реакциях для ускоренной идентификации и индикации возбудителя чумы в лабораториях СПЭБ [*Зайцев А.А., 2006*]. Смена носителя позволила также

разработать и широко внедрить в практику исследований при чуме иммуноферментный метод. Специфическая особенность метода ИФА заключается в премировании антигена или антитела ферментным маркером, который проявляя свою энзиматическую активность, позволяет визуально или с помощью регистрирующих приборов определить комплекс «антиген-антитело». Уже получена чумная иммуноферментная тест-система по типу двойного антительного «сэндвича» на основе алюмосиликатных магно-иммуносорбентов и пероксидазного иммунолипосомного конъюгата, которая позволяет определить F1-антиген во взвесах с 10^2 - 10^3 м.к. [Зайцев А.А., 2006].

7.2. Антигены чумного микроба, использованные для получения диагностических препаратов

Поскольку основными компонентами всех перечисленных иммунологических реакций являются антигены или противочумные антитела, изложенное выше определило необходимость поиска антигенов, которые помогли бы обеспечить специфическую диагностику чумного микроба.

Изучение антигенов *Y. pestis* было начато давно [Тараненко Т.М. и др., 1968; Дальвадянц С.М., 1968; Дальвадянц С.М. и др., 1969; Николаев Н.И. и др., 1969; Вейнблат В.И., 1974; и другие]. С помощью диффузионной преципитации в геле различными авторами было обнаружено от 7 до 20 антигенов [Заплатина С.И., Хохлова А.М., 1959; Surgalla M.J., 1960; Lawton W.D. et al., 1960]. В их числе исследовался липид А-ассоциированный протеин чумного микроба [Ермакова Г.В. и др., 1992]. Наряду со специфическими для вида *Y. pestis* антигенами среди обнаруженных антигенов были по серологическим свойствам общие с возбудителем псевдотуберкулёза, который является ближайшим родственником чумного микроба. Позже обнаружено, что возбудитель чумы имеет также антигены, дающие перекрестные реакции, с антигенами других бактерий сем. *Enterobacteriaceae* и некоторыми белками клеток и тканей млекопитающих (эритроциты, клетки печени, селезёнки, лёгких, тимуса) [Гонтарь И.П. и др., 1980; Ходаковская В.Н. и др., 2001, 2002; Коссе Л.В. и др., 1992, 1997, 1998; Фёдорова В.А., Девдариани З.Л., 2002; Белякова Н.И. и др., 1991, Мареев В.И., 1982; Жуков-Вережников Н.Н. и др., 1944, 1972; Бочко Г.М. и др., 1980; Некляев В.Н., 1984 и др.; Видяева Н.А. и др., 1992].

Таким образом, уже известно, что возбудитель чумы имеет очень сложный антигенный состав, исследование которого представляет большой интерес не только в аспекте их видоспецифичности и диагностического значения, но и в ракурсе особенности структуры и биологической роли, в исследованиях которых специфические диагностические препараты могут сыграть существенную роль. Вполне понятно, что для целей диагностики в дальнейшем использовались антигены, проявляющие наибольшую степень специфичности для чумного микроба, тогда как неспецифические были в этом отношении лишь помехой, в силу того, что могли обуславливать ложно-положительные результаты анализов. На данном этапе целесообразно рассмотреть диагностические приёмы, основанные на использовании специфических антигенов

Основные диагностические препараты для серологической диагностики чумы первоначально и до настоящего времени сконструированы при использовании в качестве сенситина специфического капсульного антигена *Y. pestis*, названного «фракция 1» (Baker) и антител к нему. Детально этот антиген описан в 3-ей главе этой книги. Использовался этот антиген и антитела к нему при изготовлении как коммерческих форм диагностикумов, так и экспериментальных авторских. Среди них были не только монокомпонентные, но и сложные. Разработана методика получения лиофилизированных эритроцитов, сенсibilизированных одновременно двумя антигенами (F1 чумного микроба и полным туляремийным антигеном, F1 и полным мелиоидозным антигеном) [Родионова А.В., 1968]. Описан препарат лиофилизированных формализированных бараньих эритроцитов, которые были сенсibilизированы иммунными γ -глобулинами, пригодными для индикации возбудителей чумы и туляремии [Ерохин Е.П., Фомичёва А.С., 1969].

Многолетняя практика исследований возбудителя показала существование в природе и у больных людей вариантов чумного микроба, лишенных антигена F1 [Butler T., 1983; Meka-Meckenko T.V., 2002]. Во многих случаях это штаммы с пониженной вирулентностью, но они также способны вызывать заболевания, хотя и менее тяжелые по форме проявления. Однако иногда среди таких вариантов возбудителя встречаются штаммы с достаточно высокой вирулентностью. В связи с

этим проблема выявления и идентификации чумного микроба, дефектного по F1-антигену не менее актуальна, чем в отношении его полноценных вариантов.

В связи с этим помимо F1 в качестве сенситина для приготовления эритроцитарных диагностикумов, использовали экзотоксин («мышиный» токсин) чумного микроба и антитела к нему. После доказательства идентичности «мышинного» токсина у вирулентных и авирулентных штаммов *Y.pestis*, была показана возможность определения его с помощью антительного диагностикума на нативных бараньих эритроцитах в реакции непрямой гемагглютинации [Warren J. et al., 1955]. Стойким был эритроцитарный препарат, позволяющий выявлять антитела к «мышинному» токсину чумного микроба в РНГА. Эритроциты, сенсibilизированные токсином, сохраняли полезные свойства в нормальной сыворотке с добавлением формалина в течение года хранения на холоду. Сложнее обстояло дело с получением антительного диагностикума, поскольку, как уже упоминалось, не все сыворотки могут быть использованы в этих целях. Антитоксические сыворотки относились также к этому типу и обычным способом сенсibilизировать эритроциты антитоксическими сыворотками и γ -глобулинами, полученными из них, не удавалось [Баяр Г.А. и др., 1966; Герасюк Л.Г. и др., 1970a]. Этот факт побудил ряд исследователей использовать для адсорбции на эритроцитах белки антисывороток после предварительной поликонденсации их бифункциональными соединениями, такими как тетразоат диаминадифениламина, глюторальдегида и другие [Оловников А.М., 1964; Onkelinx E., Meuldermans W., 1969; и др.]. С использованием иммунных сывороток, после поликонденсации их белков тетразоат диаминадифениламином были получены специфические для «мышинного» токсина, высокочувствительный антительный диагностикум для РПГА [Герасюк Л.Г. и др., 1970a]. Активность его при хранении в условиях холодильника не снижалась в течение всего срока наблюдения (5 мес). Следует отметить, что создание эритроцитарного препарата на основе «мышинного» токсина и антител к нему, а также практическое использование связаны с рядом трудностей. К ним можно отнести сложность получения высокоочищенных препаратов токсина [Домарадский И.В. и др., 1961; Kadis et al, 1963; Вейнблат В.И., Адамов А.К., 1969; Метлин В.Н. и др., 1970; Канчух А.А., Иванова В.С., 1971], их низкая

иммунохимическая активность [Baker et al., 1947; Герасюк Л.Г. и др., 1970б; Коссе Л.В., 1998 и др.], необходимость создания особых условий для сенсibilизации эритроцитов, а также резкие колебания уровня содержания токсина у разных штаммов (минимальная концентрация $6 \cdot 10^3$ - $2,5 \cdot 10^8$ м.к.), что делает результаты некоторых определений сомнительными. В связи с перечисленным применение эритроцитов, сенсibilизированных токсином или антителами к нему, не вышло за рамки лабораторных исследований. Хотя позже появилась обнадеживающая публикация о получении антигенного эритроцитарного диагностикума на основе фракции II (экзотоксин, «мышинный» токсин) [Рыбкин В.С. и др., 1982]. Выявление чумных эпизоотий при исследовании эктопаразитов с помощью диагностикумов на «мышинный» токсин и ОСА (основной соматический антиген) позволило показать возможность выявления не только бесфракционных штаммов, но и бактерий чумы, находящихся в L-форме. Более того, было обнаружено, что «мышинный» токсин обнаруживается у части заражённых клещей намного дольше, чем F1-антиген, хотя последний обнаруживается у клещей более длительное время, чем в блохах [Соколов П.Н. и др., 1992].

Диагностическая ценность известного для возбудителя чумы V-антигена, участвующего в реализации вирулентности, ограничена его специфичностью ещё для двух других иерсиний (*Y.pseudotuberculosis*, *Y.enterocolitica*), так что с его помощью может решаться вопрос скорее о родовой принадлежности к роду *Yersinia*, и характере фенотипа штаммов, но не об идентификации вида «*pestis*».

Не всегда были удачными работы по получению подобных диагностических препаратов на основе антигена рНб и антител к нему [Cherepanov P.A. et al., 1998]. Однако авторские образцы препаратов для обнаружения антигена с помощью ИФА описаны [Водопьянов С.О. и др., 1988].

К числу антигенов, имеющих поверхностную локализацию в структуре клетки, как указано в предыдущем разделе, относится липополисахарид (ЛПС). Чумной микроб, как известно, не способен к синтезу полисахарида, обладающего свойствами O-антигена [Басова Н.Н., Герасюк Л.Г., 1965; Дальвадяц С.М., 1968; Вейнблат В.И., 1974]. При воздействии на клетки чумного микроба экстрагенов, обычно применяемых для получения O-антигена у грам-отрицательных бактерий,

были выделены два самостоятельных серологически активных полисахаридсодержащих комплекса: ЛПС и комплекс, получивший название - основной соматический антиген (ОСА) и изучены их структура и свойства [Дальвадяню С.М. и др., 1972; Бахрах Е.Э. и др., 1972; Вейнблат В.И. и др., 1984; Тараненко Т.М., Вейнблат В.И., 1985;].

Характеристика ЛПС, особенности его генетической детерминированности, структуры и биологической активности, а также данные о структуре и свойствах липида А у чумного микроба описаны довольно подробно [Brade H. et al., 1983; Дальвадяню С.М. с соавт., 1984; Skurnik M. et al., 2000; Knirel Y.A. et al., 2005; Hitchen P.G. et al., 2002; Vinogradov E.V. et al., 2002; Aussel L. et al., 2000; Kawahara K. et al., 2002; Gremyakova T.A. et al., 2003; Rebeil R. et al., 2004; Anisimov A.P. et al., 2005; Knirel Y. et al. 2006, 2007; Шайхутдинова Р.С., 2008; Дентовская С.В., Бахтеева И.В., Тутарева Г.М. и др., 2008 и другие]. В результате дана положительная оценка диагностических свойств ЛПС [Chart H. et al., 1995], а также ценность препарата, приготовленного на основе ЛПС чумного микроба, при выявлении бактерий чумы, не продуцирующих F1. Обоснована также перспективность его совершенствования [Дальвадяню С.М. с и др., 1984]. Известно о получении поликлональных иммуноглобулинов к ЛПС чумного микроба, проявляющих диагностическую способность в отношении возбудителя чумы [Фёдорова В.А. и др., 1994]. Сообщалось об эффективном использовании сконструированного эритроцитарного диагностикума на ЛПС чумного микроба. Он успешно применялся не только для идентификации штаммов. Оказалось, что в организме животных заражённых чумой, легче выявить антитела к ЛПС, чем к антигену F1. В связи с этим диагностикум на ЛПС применяли для определения эффективности лечения антибиотиками [Тугамбаев Т.И. и др., 1992].

Известная специфичность некоторых белков внешней мембраны чумного микроба была посылкой для изучения возможности их использования в целях диагностики. Показана возможность конструирования на основе этих белков внешней мембраны антигенных и антительных диагностикумов, преимуществом которых является их способность выявлять «бесфракционных» штаммы возбудителя чумы [Щербаков А.А. и др., 1984].

При разработке препаратов для диагностики чумы вообще, и в частности для выявления штаммов, лишённых F1, в сфере внимания специалистов находятся также белки поверхностного S-слоя, которые оцениваются перспективными с диагностической точки зрения [Антонова О.А., 1999; Дятлов И.А., Волох О.А., 2004]

В литературе сообщается о специфичности FC-антигена (фибринолизин, коагулаза Pla), связанного со свойством пестициногенности чумного микроба. Имеются сведения о конструировании диагностикума на основе фибринолизина возбудителя чумы [Вейнблат В.И., 1989]. Описывается возможность получения на основе FC-антигена в смеси с F1 антигеном бивалентного диагностикума для ИФА, способного выявлять Fra⁺ и Fra⁻ варианты возбудителя чумы [Титенко М.М. и др., 1986].

Однако, невзирая на проводимые работы, проблема диагностики чумы с помощью препаратов, иных, чем F1-антиген, сохраняет свою актуальность, и исследования в этом направлении продолжаются. Причём не только в связи с тем, что большинство тест-систем или диагностикумов, разработанных с использованием этих антигенов чумного микроба, к сожалению, не доходят до «коммерческого» уровня и потому не находят широкого применения в лабораторной практике. Значительная фенотипическая и генотипическая вариабельность чумного микроба также позволяет ему «ускользнуть» от выявления разными диагностикумами.

Нами также была предпринята попытка определить возможность конструирования диагностических препаратов на основе антигенной фракции из бактерий варианта вакцинного штамма *Y.pestis EV76*, не способного продуцировать антиген F1 [Божко Н.В., 1972; Божко Н.В. и др., 1998, 2005]. Антигенный препарат из живых и высушенных ацетоном бактериальных клеток извлекали поэтапно при действии возрастающих концентраций ПАВ (ДОХ, тритон-X100). Фракционировали пятикратно, центрифугируя на каждом этапе. Последний супернатант содержал «фракцию V», которую после освобождения от ПАВ [Лурье Ю.Ю., Рыбникова А.И., 1966], осаждения и диализа высушивали.

По данным биохимического анализа известными методами [Спирин А.С., 1958; Folch T. et al., 1951; Jermin M.A., 1956; Lowry O.H. et al., 1951; Грабар П., Буртен П., 1963; Laemly V., 1970; Towbin H. et al., 1979] «фракция V» состояла в основном из

белка (46,9%). В небольшом количестве в ней содержались нуклеиновые кислоты (4,1%), углеводы (3,4%) и липиды (4,1%). В сухом виде она представляла собой сероватый порошок, плохо растворимый в воде и физиологическом растворе. Растворимость её значительно повышалась при добавлении ПАВ. «Фракция V» оказалась термостабильной. Для белых мышей в дозе 2 мг на животное она была не токсична. При постановке реакции с чумной агглютинирующей сывороткой [Ouchterlony O. et al., 1950] обнаружены чёткие специфические полосы преципитации, что указывало на достаточно выраженную антигенность препарата.

С помощью «фракции V» были сенсibilизированы формализированные танизированные эритроциты и получены кроличьи анти-FV-сыворотки. Полученные ПКС были активны в реакции непрямой иммунофлюоресценции. «Фракция V» проявляла серологическую активность в РПГА и РНАт с коммерческими противочумными сыворотками, экспериментальными кроличьими, полученными с помощью «фракции V», и сыворотками морских свинок, иммунизированных живыми бактериями вакцинного штамма *Y.pestis EV* (линия НИИЭГ) и его бесфракционным и атоксическим вариантом [Филимонова Ю.А., 1967].

Специфичность экспериментального антигенного эритроцитарного диагностикума на фракцию V для возбудителя чумы была подтверждена в РНАт с микробами 12 видов: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* (всего 189 штаммов) и *E. coli*, *S. paratyphi* "A", "B", *S. typhi*, *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *F. tularensis*, *B. anthracis*, *V. cholerae* (всего 68 штаммов). Для реакции использовали коммерческую чумную агглютинирующую сыворотку. 130 исследованных музейных штаммов чумного микроба имели разную характеристику. Большинство из них продуцировали F1-антиген и «мышиный» токсин. У других не определялся F1-антиген или «мышиный» токсин, или же оба антигена. При тестировании в РНАт штаммов чумного микроба в виде взвеси микробов (10^8 м.к./мл) оптимальным оказалось использование культур, выращенных при 28°C. Штаммы с дефектом F1-антигена не реагировали с контрольным коммерческим стандартным антигенным эритроцитарным диагностикумом, титр которого в РПГА с чумной агглютинирующей сывороткой достигал 1:1280 тыс. Бактерии всех штаммов чумного микроба, выращенных при 28°C, независимо от Fra-фенотипа реагировали с

эритроцитами, сенсibilизированными «V фракцией». Минимальное количество микробов в пробе, определяемое с помощью этого диагностикума, оказалось в пределах $1,6 \cdot 10^5 - 5 \cdot 10^6$ м.к. В то же время с помощью эритроцитов, сенсibilизированных F1-антигеном, из 104 Fra⁺ штаммов, выращенных при 28°C, были выявлены только 74% в дозах $4 \cdot 10^5 - 5 \cdot 10^7$ м.к. Все Fra⁺ штаммы чумного микроба, выращенные при 37°C, выявляли обоими диагностикумами. Однако чувствительность реакций с эритроцитами, сенсibilизированными F1, была выше, чем с эритроцитами, сенсibilизированными «фракцией V».

Fra⁻ штаммы выявлялись при обеих температурах культивирования только с помощью эритроцитов, сенсibilизированных «фракцией V». Из всех других видов микроорганизмов положительные результаты с диагностикумом на V фракцию наблюдали только с отдельными штаммами возбудителя псевдотуберкулеза, находящимися в R-форме. Штаммы типичной S-формы не реагировали, и результат был отрицательный. РНАт была отрицательной во всех случаях при тестировании штаммов *E. coli*, *S. paratyphi* «A» и «B», *S. typhi*, *Shigella*, *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *V. cholerae*, *F. tularensis*, *Brucella*, *Y. enterocolitica*, *B. anthracis*. Результаты тестирования штаммов возбудителя чумы, дефектных по F1 и/или «мышинному» токсину свидетельствуют о том, что с помощью эритроцитов, сенсibilизированных «фракцией V», можно выявлять все штаммы *Y. pestis*, дефектные как по одному, так и по двум антигенам, тогда как эритроциты, сенсibilизированные антигеном F1(Baker), позволяли обнаруживать только капсульные варианты.

Специфичность FV-эритроцитарного диагностикума подтвердилась также в пробах с гетерогенными сыворотками. Если чумная сыворотка реагировала в титре 1:2560000, то титры псевдотуберкулезных (типовых), бруцеллезной, туляремийной, сапной и колийной были в пределах 1:200-1:1600, а брюшнотифозная и дизентерийная не реагировали вовсе [Божко Н.В., 1972, 1998].

Иммунные кроличьи сыворотки к «фракции V» специфически реагировали в НИМФ со всеми штаммами чумного микроба независимо от температуры выращивания и фазы диссоциации. Хотя они давали положительную реакцию с единичными штаммами возбудителя псевдотуберкулеза, находящимися в R-форме. Сыворотки не взаимодействовали ни с одним штаммом этого вида, находящимся в

S-форме, характерной для вирулентных вариантов, а также с другими микроорганизмами. При исследовании состава «фракции V» в реакции иммуноблоттинга с ПКС на электрофореграмме обнаружено 12-13 линий в виде так называемой «лестницы», при наличии одной мажорной «протеиновой» полосы, соответствующей расположению белка с мол.массой около 42-43 кД.

Эритроциты, сенсibilизированные «фракцией V» сравнили по агглютинабельности с эритроцитами, сенсibilизированными капсульным антигеном F1 (Baker), используя гипериммунные лошадиные противочумные сыворотками в РПГА. Все показатели в опыте и контроле были одного порядка, что свидетельствует о наличии во всех чумных агглютинирующих сыворотках антител к «V фракции». При этом «фракция V» не уступала по своей диагностической активности капсульному антигену, поскольку титры антител в РНГА к обеим фракциям были почти одинаковы [Божко Н.В. и др., 2005].

Таблица 7.1

Титры антител к «фракции V» и фракции 1 (Baker) в разных сериях чумной агглютинирующей сыворотки при постановке РНГА [Божко Н.В., 1972]

Производство сыворотки	Серия	Титр в реакции агглютинации	Титры антител в РПГА с эритроцитами, сенсibilизированными	
			V фракцией	I фракцией
РосНИПЧИ «Микроб».	264/5	1:5120	1:1920000	1:2240000
-«-	260/4	1:10240	1:1120000	1:1280000
-«-	265/4	1:5120	1:800000	1:1120000
-«-	144	1:10240	1:1920000	1:1760000
-«-	67	1:5120	1:800000	1:1120000
ПЧИ Сибири и Дальнего Востока.	30-1	1:1200	1:1440000	1:560000
-«-	6-1	1:2560	1:800000	1:560000
-«-	18-1	1:1200	1:1440000	1:560000
-«	25-1	1:1280	1:1280000	1:1440000

ПРИМЕЧАНИЕ: в таблице представлены средние арифметические величины титров сывороток после четырех дублированных опытов.

Применение эритроцитов, нагруженных «фракцией V», позволило четко проследить иммунологическую перестройку у животных, вакцинированных как капсульным, так и «бескапсульным» штаммами чумного микроба. В сыворотках морских свинок, иммунизированных Fga+ вариантом вакцинного штамма чумного микроба, антитела к F1 и «фракции V» обнаруживали до 60-го дня при максимуме на 21 сут. Титры антител к «фракции V» в сыворотках были выше, чем к F1. Через 100 дней после иммунизации антитела к фракции 1 не выявлялись, а к «фракции V» определялись, но снизились почти до уровня фоновых. В сыворотках животных, иммунизированных «бескапсульным» вариантом, антитела обнаруживали только при помощи эритроцитов, сенсibilизированных «фракцией V». При этом наивысшие титры антител были к 21 сут [Божко Н.В. и др., 1972, 2005].

Определенное место в разработке диагностических препаратов занимают исследования, связанные с коаггутинацией. Работы этого плана проводятся на модели различных микроорганизмов [Титенко М.М. и др., 1986; Сивкова О.В., 1988]. Применительно к возбудителю чумы имеются сообщения о получении коаггутинирующих препаратов, содержащих антитела к видоспецифическому F1-антигену и тотальным иммуноглобулинам класса IgG противочумной сыворотки [Баканурская Т.Л. и др., 1990; Пашин А.Ю. и др., 1990; Орлова Г.М. и др., 1992]. Однако, невзирая на эти положительные результаты, проблему диагностики чумы, вызванной «бесфракционными» штаммами возбудителя в практических специализированных лабораториях всё ещё нельзя считать решенной, как в силу малой доступности перечисленных молекулярно-биологических тестов и указанных выше диагностикумов для практиков, так и по причине недостаточной их изученности. Учитывая широкое использование в практике иммунологической диагностики методов, основанных на коаггутинации, была проверена возможность конструирования сухого **КоА**-диагностикума на основе кроличьих IgG-антител к антигену FV [Божко Н.В. и др., 1998; Божко Н.В. и др., 2005] и сухого коммерческого стафилококкового реагента (Ленинградский НИИЭМ им. Пастера).

Оценка его способности выявлять штаммы чумного микроба, полноценные и дефектные по диагностическим антигенам, включая F1, после культивирования бактерий при 37° и 28°С выполнена с использованием 362 штаммов *Y.pestis*, природных из разных очагов и лабораторных из разных источников, а также 12 штаммов возбудителя псевдотуберкулёза (включая 6 типовых штаммов в R- и S-форме) и по 5 штаммов *Y.enterocolitica*, *E. coli*, *S. typhi*, *B.mallei*, *B.pseudomallei*, *F.tularensis*, *Shigella* и *Brucella*. Оказалось, что полученный препарат **КоА**-диагностикума на основе кроличьих антител к «фракции V» чумного микроба специфически реагировал с бактериями возбудителя чумы, независимо от способности продуцировать ими основной диагностический капсульный антиген F1, при чувствительности диагностикума, равной 10⁷-10⁹ м.к./мл. Это делает его перспективным для целей идентификации возбудителя чумы. Разрешающая способность полученного FV-**КоА**-диагностикума при 28°С оказалась выше, чем у коммерческого F1-диагностикума. Интенсивность агглютинации бактерий Fra⁺ штаммов с FV-**КоА**-диагностикумом при 37°С была несколько меньше, но и в этих условиях он сохранял способность чётко выявлять все штаммы чумного микроба, включая Fra⁻, которые были недоступны при идентификации по F1-антигену. Полученные образцы FV-**КоА**-диагностикума оказались также способными идентифицировать штаммы возбудителя чумы, не продуцирующие антиген F1 выращенные при 28°С. К тому же продукция антигена FV не требует для культивирования бактерий питательных сред повышенного качества, необходимого для синтеза капсульного диагностического антигена F1. Из гетерологичных штаммов позитивная реакция отмечена только с единственным штаммом близкородственного возбудителя псевдотуберкулёза, находящимся в авирулентной R-форме [Божко Н.В. и др., 2006]. Препарат FV-**КоА**-диагностикума с положительным результатом был испытан в полевых условиях при обследовании природных очагов Центрального Кавказа, что позволило определить не только типичные Fra⁺ штаммы чумного микроба, но и не продуцирующие F1-антиген [Орлова Г.М. и др., 1992; Казаков А.М. и др., 1998].

Приведенные данные позволяют сделать заключение, что выделенная «фракция V» заслуживает внимания как антиген, перспективный при конструировании

препаратов для серологической диагностики чумы и идентификации её возбудителя с различным Fra-фенотипом, поскольку опытные образцы диагностикумов специфически выявляли все исследованные штаммы *Y.pestis* и давали положительную реакцию с сыворотками иммунизированных против чумы животных, не содержащими антител к F1-антигену.

Факт перекрестной реакции диагностикумов на «фракцию V» с отдельными R-штаммами бактерий псевдотуберкулеза не совсем благоприятный. Однако в отличие от возбудителя чумы псевдотуберкулезный микроб вирулентен в S-форме, которая не выявляется предлагаемым чумным диагностикумом. R-формы в природе, в случае псевдотуберкулёза - событие довольно редкое, и они, как правило, авирулентны. Такие формы слабо патогенны или безопасны. Хотя при использовании диагностикума на основе полного препарата «фракция V» они могут быть причиной гипердиагностики чумы при её отсутствии. Однако, это менее опасно, чем упущение Fra чумы при использовании диагностикумов, специфически реагирующих только с F1-антигеном, так как применение дополняющих приёмов диагностики при возникшем подозрении на чуму поможет уточнить идентификацию.

Все перечисленное выше, с нашей точки зрения, свидетельствует о перспективности разработки диагностических препаратов на основе «фракции V» и антител к её мажорному иммунокомпетентному компоненту.

7.3. Диагностическая значимость моноклональных антител, направленных к эпитопам поверхностных антигенов возбудителя чумы

С момента открытия моноклональные антитела используются в различных иммунологических тестах при диагностике чумы и идентификации её возбудителя.

Особое внимание при создании диагностических препаратов уделяется изучению поверхностных структур чумного микроба, так как в результате серологического исследования установлено, что к ним относится большая часть видо- и группоспецифических антигенов [Butler T., 1983; Анисимов П.И. и др., 1985; Пустовалов В.Л. и др., 1986]. Серодиагностика возбудителя чумы базируется главным образом на обнаружении поверхностного капсульного антигена (F1) или же антител к нему, выявляемых в сыворотках животных.

Поэтому, прежде всего, нашли практическое применение МКА к видоспецифическому капсульному антигену F1. Успешным было их использование в радиоиммунных пробах (РИА) при поиске антигена в тканях животных [Soergel M.E. et al., 1982], в иммуноферментном анализе (ELISA) [Рудник М.П. и др., 1983; Williams J.E. et al., 1984; Леви М.И. и др., 1984]. В специальных исследованиях при постановке ELISA были определены оптимальные параметры постановки теста и условий хранения диагностических антител [Williams J.E. et al., 1988]. Большая специфичность эритроцитарных диагностикумов, приготовленных на основе МКА, была показана при сравнении с коммерческими поликлональными в реакции пассивной гемагглютинации и реакции нейтрализации антител при определении антигена F1 в исследуемом материале, так и антител к нему в сыворотке крови больных [Канатов Ю.В. и др., 1985; Сергеев и др., 1985].

Однако хорошо известно, что наличие капсульного антигена на поверхности микробной клетки не является постоянным признаком, так как зависит от температуры культивирования возбудителя, наличия 65мД рFra/Тох плазмиды, состава среды обитания и ряда других факторов [Burrows T.W., 1962]. Кроме того, в природных очагах чумы наряду с типичными капсулообразующими штаммами нередко выделяются бескапсульные варианты чумного микроба [Бибикова В.А. и др., 1972; Метлин В.Н. и др., 1970; Кондрашкина К.И. и др., 1971]. Были сообщения об обнаружении F1 у других микроорганизмов и антител к нему в сыворотках животных, не контактировавших с *Y.pestis* [Басова Н.Н., 1982; Мареев В.И., 1982]. Обычно это объяснялось неточной идентификацией чумного микроба или возможной гипердиагностикой. Однако сравнительный анализ специфичности капсульного антигена и препаратов, выделенных аналогичными методами из природных штаммов других представителей семейства *Enterobacteriaceae* позволил выявить общую для некоторых энтеробактерий антигенную детерминанту с иммунохимическими свойствами F1 [Коссе Л.В., 1992]. Это обстоятельство также может ограничить использование антикапсульных диагностикумов для обнаружения возбудителя чумы.

Существующие экспериментальные как поликлональные, так и моноклональные диагностические препараты, созданные на основе других

поверхностных антигенов чумного микроба, в отличие от антикапсульных, позволяют выявить типичные и атипичные формы возбудителя, однако не всегда дифференцируют его с другими близкородственными организмами.

Трудности, связанные с диагностикой чумы, определяют необходимость поиска новых поверхностных видоспецифических антигенов с целью создания на их основе тест-систем, позволяющих выявить возбудителя чумы независимо от его способности синтезировать F1. Наряду с исследованием поверхностных антигенов в диагностических целях, представляет интерес изучить их роль в иммуногенезе и патогенезе при чуме. Это будет способствовать также выявлению антигенов, стимулирующих защитные реакции макроорганизма. Известно, что в целом иммуногенность микробной клетки определяется не только иммунобиологическими свойствами, входящих в её состав специфических антигенов, но и степенью их доступности для распознающих систем микроорганизма [*Лященко В.В., Воробьёв А.А., 1982*]. Проведению таких исследований в значительной степени будут способствовать высокоспецифические антитела.

Новые методы, по мере их появления, постоянно привлекаются для решения вышеупомянутых проблем. Широкие возможности для выполнения исследований такого рода предоставила гибридная технология. Несмотря на определенные трудности, встречающиеся в процессе получения моноклональных антител (МКА), их с самого начала стали активно внедрять в иммунологические и микробиологические исследования с целью создания новых лечебных и диагностических препаратов, а также изучения строения и функций индивидуальных антигенных детерминант микробной клетки.

В первую очередь следует выделить ряд преимуществ МКА, благодаря которым они находят широкое практическое применение.

Во-первых, антитела одного клона характеризуются высокой специфичностью, так как направлены только к одной антигенной детерминанте, что позволяет с их помощью распознавать даже близкородственные антигены.

Во-вторых, МКА стабильны, как в первом, так и во всех последующих поколениях, в отношении специфичности и аффинности. При этом гибридная

технология позволяет целенаправленно отобрать моноклоны, вырабатывающие антитела с определенными свойствами (класс, аффинность, специфичность).

В-третьих, культивирование гибридных клонов «*in vitro*» и «*in vivo*» дает возможность получать гомогенные препараты антител практически в неограниченном количестве, что очень важно для стандартизации экспериментов и создания диагностических препаратов.

Кроме того, для получения МКА обязательно использовать очищенные препараты антигенов, так как принципы гибридомной технологии позволяют выделить из общей массы гибридом, обладающих различной специфичностью, клон, продуцирующий антитела к интересующему исследователей антигену [Kochler G., Milstein C., 1976].

Однако для получения и наработки препаративных количеств МКА предварительно необходимо выполнить ряд технологических процедур, каждая из которых требует тщательной, а в некоторых случаях индивидуальной подготовки. К ним относятся: подготовка клеток миеломной линии, иммунизация животных-доноров селезеночных клеток, слияние, селекция гибридом, выявление гибридных клонов, синтезирующих специфические антитела, клонирование позитивных культур и накопление препаративных количеств МКА «*in vitro*» и «*in vivo*».

Исследовательские работы по получению МКА к антигенам чумного микроба были начаты в 80-е годы прошлого столетия. В руки исследователей поступил неисчерпаемый источник практически чистых антител к конкретным детерминантам антигена. Такие антитела начали использовать в разных областях, но, прежде всего, в диагностических целях – ИФА, эритроцитарные диагностикумы, аффинная хроматография. В отечественной практике первыми были созданы гибридомы – продуценты МКА к капсульному антигену возбудителя чумы [Северин С.Е., 1985]. Появление моноспецифических иммуноглобулинов обусловило новые возможности для получения на их основе чумного антительного эритроцитарного диагностикума. Чтобы приготовить экспериментальные серии нового диагностикума из асцитической жидкости гибридомы выделяли иммуноглобулиновую фракцию 50% насыщением сернокислым аммонием, которую после диализа сенсibiliзировали формализированными эритроцитами барана [Сергиев В. П. и др. 1985]. Препараты

хранили в лиофилизированном виде. Результаты сравнительных испытаний показали, что моноклональный эритроцитарный диагностикум позволяет обнаружить капсульный антиген чумного микроба и антитела к нему, причем, как по частоте положительных результатов, так и по активности исследованных материалов в серологических реакциях, моноклональный препарат, практически не уступа^{пая} коммерческому антительному эритроцитарному диагностикуму, изготовленному на основе поликлональной гипериммунной сыворотки. Так, активность коммерческого антительного диагностикума в РПГА со взвесью вакцинного штамма чумного микроба обычно проявлялась при концентрации не менее $6,25 \cdot 10^5$ - $1,25 \cdot 10^6$ мк/мл, а у моноклонального она определялась при $1,25 \cdot 10^6$ – $3,12 \cdot 10^6$ мк/мл. По специфичности моноклональный диагностикум превосходил коммерческий антительный эритроцитарный диагностикум, который в некоторых случаях давал положительную реакцию РПГА со взвесью клеток некоторых штаммов возбудителя псевдотуберкулеза. Моноклональный диагностикум обеспечивал четкую достоверную реакцию РПГА только со взвесью штаммов чумного микроба, которые были выращены при 37°C и синтезировали капсульный антиген. Данные испытаний свидетельствовали о целесообразности применения в практике для диагностики чумы моноклонального антительного препарата.

В предыдущем разделе проанализирована перспективность применения ИФА при эпизоотологическом обследовании природных очагов чумы, а также для научно – исследовательских работ. Отмечена высокая специфичность и чувствительность ИФА, в некоторых случаях превышающая чувствительность общепринятых иммунно – суспензионных тестов на 7 – 42 % [Леви М.И., 1985, Рудник М.П. и др., 1983].

В Казахском противочумном институте была создана иммуноферментная моноклональная тест-система для обнаружения возбудителя чумы [Темиралиева Г. А. и др., 1988]. В состав коммерческого набора иммунноферментной (ИФ) тест-системы входили сухие чумные моноклональные иммуноглобулины для сорбции, навески растворителей проб, конъюгата иммуноглобулинов, хромогена, а также сухой иммуноферментный конъюгат чумных моноклональных иммуноглобулинов с пероксидазой хрена и положительный контроль раствор фракции 1 (F1). Такая тест-

система позволила выявить примерно 30 нг/мл фракции 1 чумного микроба. Применение готового набора обеспечивает стандартность опыта и ускоряет постановку реакции. Специфичность ИФ моноклональной тест-системы испытывали на 60 штаммах псевдотуберкулезного микроба и 20 штаммах кишечных иерсиний. Взаимодействие антикапсульных МКА в ИФА отмечено с двумя штаммами псевдотуберкулезного микроба в дозе 10^8 мк/мл. Тогда как в РПГА с коммерческим эритроцитарным диагностикумом, положительный результат зарегистрирован с семью штаммами псевдотуберкулезного микроба и двумя штаммами кишечных иерсиний в дозе 5×10^7 мк/мл. Чувствительность ИФ тест-системы и гемагглютинационных тестов в отношении возбудителя чумы находилась в пределах $(1,2 - 2,5) \times 10^5$ мк/мл. Кроме взвесей бактерий возбудителя чумы были исследованы осветленные эмульсии органов и тканей экспериментально зараженных чумой больших песчанок, белых мышей, морских свинок. Из 350 суспензий внутренних органов грызунов, зараженных чумным микробом, последний был выявлен с помощью РПГА в 68,5% случаев, ИФА – 70%. Результаты анализа позволили заключить, что иммунноферментная моноклональная тест-система, используемая с целью обнаружения возбудителя чумы, пригодна для постановки реакции и в лабораторных, и в полевых условиях.

Весьма перспективным методом экспресс-диагностики чумной инфекции продолжает оставаться люминесцентная микроскопия. Однако достоверность этого метода обнаружения возбудителя в значительной мере зависит от специфической активности иммуноглобулинов. В лабораторной практике используют коммерческий чумной поликлональный люминесцирующий препарат. В конце 80-х годов активно продолжалась работа по замене поликлональных антител в различных диагностических наборах на моноклональные. В институте «Микроб» на основе МКА к капсульному антигену чумного микроба были разработаны и внедрены в практику отечественного здравоохранения иммуноглобулины диагностические чумные антикапсульные моноклональные люминесцирующие сухие, на которые была составлена и утверждена нормативно-техническая документация [Девдариани З.Л. и др., 1986]. В соответствии с приказом от 9.03.87 о внедрении в практику здравоохранения новых МИБП в институте «Микроб» был организован

производственный выпуск препарат и приготовлено 17 коммерческих серий препарата.

Сравнительные испытания показали, что чумные моноклональные люминесцирующие иммуноглобулины обладают высокой специфической активностью, в 8 раз превышающей активность коммерческого препарата при выявлении капсульных Fra⁺ форм возбудителя чумы. В рабочем разведении моноклональный препарат обладал одинаковой чувствительностью с коммерческим и выявлял чумные микробы в мазках, приготовленных из взвесей культур, содержащих 5×10^5 и более микробных клеток в 1 мл. Единичные капсульные бактерии *Y.pestis* обнаруживали в мазках, приготовленных из взвесей с концентрацией $2,5 \times 10^5$ м.к./мл. Штаммы чумного микроба, не содержащие F1-антигена, не реагировали с моноклональным препаратом, как в рабочем разведении, так и в более низких титрах. Этот факт подтверждает специфическую направленность МКА к конкретным антигенам, в данном случае к F1 чумного микроба [Девдариани З.Л. и др., 1986].

Анализ специфичности чумных моноклональных люминесцирующих сухих иммуноглобулинов проводился при исследовании мазков гетерогенных и близкородственных микроорганизмов в прямом МФА. Всего было изучено 96 штаммов. Из них 50 - *Y. pseudotuberculosis*, 40 - *Y. enterocolitica*, 3 - *E. coli*, 2 - *S. typhimurium*, 1 - *Sh. dysenteriae Sonne*. Ни в одном случае не было выявлено достоверного свечения микроорганизмов с яркостью 3-4 креста, что свидетельствовало о высокой специфичности диагностического препарата [Девдариани З.Л. и др., 1989]

С целью определения возможности использования люминесцирующих МКА для обнаружения чумного микроба в мазках-отпечатках органов инфицированных чумой животных было проведено подкожное заражение морских свинок вирулентным штаммом в дозе 200 DCL. Животные погибли на 7-14-е сутки от септической формы чумы. В мазках - отпечатках, приготовленных из внутренних органов, места введения, крови и окрашенных люминесцирующими моноклональными иммуноглобулинами, а также коммерческим препаратом, отмечено большое количество микробов (20-30 м.к.) в поле зрения со

специфическим ярко выраженным свечением. Особенно большое число бактерий чумы с наиболее отчетливой флуоресценцией наблюдалась в мазках, приготовленных из селезенки и печени. В мазках – отпечатках внутренних органов незараженных морских свинок иммунофлуоресценции не было. Полученный и испытанный препарат чумных диагностических моноклональных антикапсульных люминесцирующих иммуноглобулинов был утвержден ГИСК им Л.А. Тарасевича в качестве отраслевого стандартного образца для контроля производственных серий аналогичного препарата.

Таким образом, в условиях экспериментального производства на основе гибридной биотехнологии был получен моноклональный иммуноглобулиновый диагностический препарат, обладающий высокой активностью и специфичностью. Результаты его изучения свидетельствовали о перспективности создания иммуноглобулиновых диагностикумов с использованием техники гибридизации соматических иммунокомпетентных клеток. Однако из-за узкой специфичности чумные моноклональные люминесцирующие антикапсульные иммуноглобулины лишены способности выявлять отдельные бескапсульные штаммы. Следовательно, диагностикумы, созданные на основе антикапсульных МКА, обладая уникальной специфичностью, не отличаются универсальностью-способностью выявлять атипичные варианты чумного микроба.

В Ростовском противочумном институте [Бичуль О.К. и др., 1989;] была создана панель МКА к эпитопам поверхностных антигенов чумного микроба. Мышей *Balb/c* иммунизировали бактериями вакцинного штамма *Y. pestis EV76*, выращенными при 28° и 37°С, а также 28°-бактериями бесплазмидного штамма *Y. pestis Yawa*. С помощью полученных МКА антиген F1 выявлялся методом непрямой иммунофлуоресценции (НИМФ) у культур чумного микроба после выращивания не только при 37°С но и 28°С, Причем у 28°-культур это наблюдали с большей эффективностью, чем с использованием коммерческих поликлональных диагностикумов на антиген F1. Обработка 28°-культур возбудителя чумы с помощью МКА в НИМФ характеризовалась наличием в исследованных мазках на фоне основной массы негативно реагирующих клеток единичных клеток с интенсивным специфическим свечением. Одной из причин уменьшения количества

F1 при 28°C, по мнению автора, является не снижение уровня синтеза антигена всеми клетками популяции, а выключение его у большей части, который затем проявляется у 37°C – культур. Способность препаратов МКА эффективно выявлять клетки чумного микроба, продуцирующего F1, не только при 37°C, но и 28°C – показатель их преимущества и свидетельство высокой специфичности иммуноглобулинов. На их основе были приготовлены экспериментальные серии чумных моноклональных флуоресцирующих антител, применение которых особенно полезно, если отсутствуют специально выращенные при 37°C культуры или штаммы отличаются низкой продукцией [Бичуль О.К., 1992; Бичуль О.К. и др., 1993].

При использовании в качестве иммуногена микробных клеток бесплазмидного штамма *Y. pestis Yawa* дало возможность получить МКА, вступающие в специфические взаимодействия со штаммами чумного микроба независимо от их плазмидного состава, температуры культивирования, способности к синтезу капсульного антигена. Эти МКА связывались с антигенным комплексом «фракция V» (FV) возбудителя чумы, полученным из «бескапсульного» варианта вакцинного штамма *Y. pestis EV76* и обнаруженным позже у всех без исключения штаммов чумного микроба, независимо от изменений плазмидного состава и других диагностических свойств (см. раздел 7.2.) [Божко Н.В., 1972; Божко Н.В. и др., 2005] Электрофоретическое разделение и изучение белкового профиля FV методом иммуноблотинга показало, что МКА выявляют две зоны антигена, соответствующие Мм 23000 и 46000 кД. Последний компонент преобладает в препаратах.

Изучение методом НИМФ на штаммах чумного микроба и представителях сем. *Enterobacteriaceae* специфической активности МКА, узнающих эпитопы FV, показало, что с их помощью можно выявить различные по происхождению и свойствам капсульные и бескапсульные варианты возбудителей чумы и единичные штаммы *Y. pseudotuberculosis*, хотя у последних эти детерминанты удается определить только после культивирования при 37°C. Выращивание штаммов *Y. pseudotuberculosis* при 28°C приводило к потере способности микробных клеток специфически связываться с МКА, комплементарных FV. Результаты экспериментов убедительно свидетельствовали о целесообразности и

перспективности более детального исследования FV и получения на ее основе диагностикума. Моноспецифические иммуноглобулины, строго специфичные в отношении FV, могут быть использованы для конструирования антительного диагностикума. Диагностические препараты на основе FV и антител к ней перспективны для выявления заболевания чумой, вызванного полноценными и бесфракционными штаммами *Y.pestis*, а также для идентификации форм возбудителя, уклоняющихся от выявления наиболее принятыми в практике диагностикумами на антиген F1 [Бичуль О.К., 1990; Бичуль О.К. и др., 1993].

При создании новых диагностикумов была предпринята попытка получить также МКА к ЛПС, чтобы с их помощью проводить идентификацию и типичных, и атипичных штаммов чумного микроба [Девдариани З.Л. и др., 1989, 1993; Фёдорова В.А., 1994]. Направленность МКА к ЛПС чумного микроба была подтверждена в реакции преципитации с различными антигенами (F1, мембранные белки, ОСА). Все образцы асцитных МКА формировали линию преципитации только с ЛПС чумного микроба. Эти МКА послужили основой для приготовления и изучения в прямом МФА специфичной активности экспериментальных серий люминесцирующих моноклональных иммуноглобулинов. Для сравнительного изучения эффективности серологической идентификации возбудителя чумы в прямом МФА использовали коммерческие диагностические чумные люминесцирующие иммуноглобулины и экспериментальные моноклональные флюоресцирующие иммуноглобулины к F1 и ЛПС чумного микроба. Специфическую активность препаратов изучали на 144 штаммах *Y.pestis*, выделенных на территории различных природных очагов чумы, а также на экспериментальных штаммах возбудителя чумы с различным набором собственных плазмид, полученных методом генной инженерии в институте “Микроб”. Кроме того, в испытания были привлечены близкородственные в антигенном отношении штаммы возбудителя псевдотуберкулеза (I - VI серовары), штаммы *Y. enterocolitica* и представители других видов бактерий. Результаты оценки моноклонального иммуноглобулинового препарата к ЛПС чумного микроба свидетельствовали о широком диапазоне его специфичности, позволяющем обнаружить не только атипичные апестициногенные (pPst-) или бескапсульные (pFra-), но полностью бесплазмидные (pPst -, pFra-, pCad-) варианты бактерий чумы,

выращенные как при 28°C, так и при 37°C. Вместе с тем из-за общности антигенной структуры липополисахаридов, локализованных в клеточных стенках чумных и псевдотуберкулезных бактерий, этот препарат наряду с чумным микробом взаимодействует с 60% бактерий псевдотуберкулеза, находящихся преимущественно в R – форме. С другими гетерологичными микроорганизмами, в том числе с бактериями близкородственного в антигенном отношении возбудителя кишечного иерсиниоза (*Y. enterocolitica*), МКА к ЛПС возбудителя чумы не реагировали [Devdariani Z.L. et al., 1993; Фёдорова В.А. и др., 1998].

Проверка этих иммуноглобулинов завершилась предложением [Девдариани З.Л. и др., 1993], использовать для детекции и идентификации плазмидных и бесплазмидных форм возбудителя чумы набор из двух препаратов – псевдотуберкулезных люминесцирующих иммуноглобулинов и люминесцирующих моноклональных иммуноглобулинов к ЛПС *Y.pestis*. Положительный иммунофлюоресцентный анализ с чумными иммуноглобулинами и отрицательный с псевдотуберкулезными будет свидетельством обнаружения чумного микроба. Положительная реакция с псевдотуберкулезными антителами независимо от результатов анализа с МКА к ЛПС возбудителя чумы характеризует наличие в материале псевдотуберкулезного микроба.

К видоспецифическим антителам относят и фибринолизин (Fib - активатор пламиногена), экспрессия которого детерминирована уникальной для чумного микроба плазмидой пестициногенности (pPst). Поверхностная локализация, прочная связь с клеточной стенкой, конститутивность синтеза, полипептидная природа, выраженные антигенные свойства позволили обозначить его в некоторых работах как видоспецифический поверхностно – соматический антиген (ВПСА). Другое его название FC – антиген связано с проявлением наряду с фибринолитической также и коагулазной активности. Антигены с фибринолитической или коагулазной активностью выделить в чистом виде не удалось, также как и не доказана иммунохимическая или генетическая разнородность этих признаков. Имеются также и данные, согласно которым FC-антиген (*pla*-протеаза) в очищенном виде взаимодействовал с коммерческим препаратом “Иммуноглобулины диагностические чумные люминесцирующие”. Результаты этих опытов

свидетельствовали, что из всех изученных штаммов *Y. pestis*, выращенных при 28°C, специфическим свечением обладали клетки только тех штаммов, которые содержали pPst плазмиду. Утрата этой плазмиды сопровождается утратой способности возбудителя чумы специфически связываться с диагностическими люминесцирующими иммуноглобулинами. Вопросы, возникшие в процессе изучения FC-антигена, были успешно решены с помощью МКА. Полученная панель МКА к Fib *Y. pestis* была использована для иммунохимической характеристики указанного антигена. В исследовании показана иммунохимическая идентичность фибринолизина и коагулазы *Y. pestis*. Получены доказательства существования этих субстанций в виде сложного белка Pla-протеазы с двумя независимыми активностями. МКА ингибировали фибринолитическую и коагулазную активности *Y. pestis*, реагировали с 35 кД и 37 кД протеинами чумного микроба в иммуноблотте. Впервые установлено участие антигенных детерминантов коагулазы в феномене специфической флуоресценции клеток штаммов чумного микроба, выращенного при 28°C [Федорова В.А. и др., 2000].

Полученные данные согласуются с результатами генетических методов, установивших, что Fib и Cgl детерминированы одним геном *pla*, свидетельствующим об иммунохимической гомогенности FC-антигена, его термоидуцибельности, функциональная активность которого экспрессируется в зависимости от температурного режима, как коагулазная при 28°C или фибринолитическая при 37°C. Применение МКА позволило продемонстрировать выраженные антигенные свойства обеих полипептидных субъединиц этого антигена и, что не менее важно, участие коагулазы в обеспечении специфической иммунофлуоресценции клеток чумного микроба, тогда как ранее этот процесс связывали исключительно с фибринолизином. Все испытываемые МКА обеспечивали высокий уровень иммунофлуоресценции с pPst+ штаммами, выращенными при 28°C и 37°C и не обнаружили кросс-реактивности в НИМФ с другими грамотрицательными бактериями, обладающими активностью активатора плазминогена. Строгая специфичность МКА к Fib *Y. pestis*, установленная в НИМФ и ТИФА на широком наборе гомологичных и гетерологичных штаммов, послужила основанием для разработки нового диагностического теста – дот-ИФА,

предназначенного для достоверной идентификации чумного микроба. Эта тест-система имеет преимущества по сравнению с аналогичными диагностикумами, основанными на МКА к F1-антигену *Y. pestis*, поскольку позволяет выявить штаммы чумного микроба, выросшие как при 37°C, так и при 28°C. Предполагается использовать эти строго специфичные МКА для выявления штаммов *Y. pestis*, лишенных капсульного антигена.

Предлагаемая дот-ИФА пригодна в качестве клинического диагностического инструмента и может быть использована в полевых условиях и в случае эпиднадзора за чумой [Девдариани З.Л. и др., 1997; Федорова В.А., Девдариани З. П., 2000]. Ещё в одном исследовании получены МКА к рекомбинантному активатору плазминогена (фибринолизину), синтез которого детерминирован геном *pla*, входящему в состав pPst плазмиды [Mahesh S. et al., 2005]. В иммуноблотте МКА обеспечивали положительную реакцию с *pla*-антигеном в области фракций с величиной Мм 37 и 35 кД только у штаммов *Y. pestis*. С помощью МКА белок Pla был выявлен у всех 18 штаммов *Y. pestis*, выделенных из мокроты больных легочной чумой, из печени и селезенки грызунов на пораженных чумой территориях Индии в 1994 – 1995гг, а также в 7 из 8 штаммов, изолированных от грызунов в течение 1998г на подлежащих эпидназору регионах Hosuz и Palmer. Присутствие белка, детерминированного геном *pla*, обнаруживали методом дот-ИФА на поверхности клеток штаммов чумного микроба. Одновременно была отмечена перспективность совместного использования набора МКА к Fib и F1-антигену [Feodorova V.A., Devdariani Z.L., 2000]. Представляется перспективным использование набора из мышинных МКА к ЛПС чумного микроба и лошадиных чумных поликлональных иммуноглобулинов (IgG). Апробация показала их высокую чувствительность, хотя в некоторых случаях был отмечен «перекрест» с некоторыми штаммами чумного микроба [Девдариани З.Л. и др., 1997].

В литературе имеется также описание получения линии гибридных клеток, продуцирующих МКА к антигену *Y. pestis* с молекулярной массой 43 кД. На основе полученных МКА предложен ИФА по схеме двойной сэндвич, позволяющий определить антиген *Y. pestis* с молекулярной массой 43 кД. Данная тест система предназначена для идентификации штаммов возбудителя чумы, не образующих

капсульного антигена, с чувствительностью равной около 10 нг/мл. В отношении МКА, полученных к 43 кД белку, продемонстрирована их перспективность для серодиагностики бесфракционных штаммов в сочетании с ПЦР и постановкой усовершенствованной биологической пробы [Зайцев А. А., 2006].

В работах показана высокая специфичность и чувствительность препаратов для ELISA на основе МКА к секретируемому нативному антигену, который представляет собой LcrV белок (Vag), детерминируемый плазмидой Ca^{2+} -зависимости. Этот белок, участвующий в экспрессии вирулентных свойств иерсиний имеет эпитопы, характерные только для чумного микроба. МКА к ним обладают способностью не только идентифицировать инфекционное заболевание и принадлежность этиологического штамма к виду *Y. pestis*, но и свидетельствовать о наличии в последнем упомянутой плазмиды, обязательной для вирулентных штаммов возбудителя чумы. Как показано этот диагностикум может быть использован как инструмент для подтверждения диагноза чумы у пациентов с лёгочной формой заболевания [Gomes-Solecki M.J. et al., 2005].

Дальнейшее развитие технологии диагностики с помощью МКА требует расширения спектра наружных белков, используемых в качестве антигенов и специфичных для возбудителя чумы. С этой целью был изучен антительный ответ на введение возбудителя чумы. Сравнивали уровень образования антител (IgG) к наружным белкам: **F1, LcrV, YopH, YopM, YopD, Pla, YpkA, YopB, YopN, YopE, YopK, рН6, ЛПС**. Указанные первыми шесть белков вызывали наибольший антительный ответ. Сделано заключение, что именно их целесообразней использовать для получения МКА и направлять диагностические тесты на них и связанные с ними антитела. Однако, как выяснилось в экспериментах, антибиотикотерапия больных людей снижает уровень антителообразования, что следует учитывать при исследовании их сывороток. В другом исследовании 149 белков у бактерий чумы кроме Vag и F1 антигенов обнаружили ещё 11 специфических белков, индуцирующих достаточно активно синтез специфических антител, которые могут быть использованы в качестве цели или агента при диагностике чумы [Li B. et al., 2005].

Глава 8. Некоторые особенности биологического тестирования патогенетических свойств чумного микроба

С.А.Лебедева

8.1. Общее представление о типах вирулентности *Y.pestis*

Одним из тестов при детекции возбудителя чумы в исследуемом материале или при изучении и идентификации этих бактерий признан биологический. Заражение биомоделей (биопроба), наблюдение за проявлением признаков инфекции, выраженностью и длительностью течения заболевания, а также патоанатомическими и патогистологическими проявлениями даёт много сведений для суждения о характере вирулентности исследуемых штаммов. Бактериальные штаммы, представляющие вид *Y. pestis*, могут отличаться по выраженности вызываемого ими инфекционного процесса болезнетворной активности. Их патогенетический потенциал в зависимости от фено- и генотипа, а также принадлежности к внутривидовым группам колеблется в широком диапазоне: от авирулентных до высоковирулентных с промежуточными позициями (аттенуированные, слабо вирулентные и вирулентные). Особое отношение к аттенуированным штаммам. В современной литературе имеется определение этого понятия. К аттенуированным предложено относить «штаммы микроорганизмов, надёжно (необратимо) понизившие опасные (вирулентные) свойства до уровня допустимого риска, позволяющего отнести его к менее опасной группе действующей классификации ПБА» [цит. по Ежов И.Н. и др., 2007]. Вирулентность характеризуют также термины «избирательная», «остаточная» и «латентная» вирулентность.

Общая для известных носителей инфекции видовая вирулентность возбудителя чумы (от слабой до высокой) характерна для типичных штаммов, признанных возбудителем классической чумы. Она проявляется по отношению к основным и сопутствующим носителям чумного микроба у бактерий основного подвида *Y. pestis*. Показателем общевидовой вирулентности является широкий круг определённых носителей, чувствительных к классическим высоковирулентным штаммам *Y. pestis*. В их число не входят лошади, коровы, свиньи, птицы, пресмыкающиеся и земноводные [Фёдоров В.Н. и др., 1955; Анисимов П.И.,

Можаров О.Т., 1991], что в некоторых случаях учитывается при дифференциальной диагностике с возбудителем псевдотуберкулёза. Основными носителями классической формы возбудителя чумы в природных очагах являются дикие и синантропные грызуны, в том числе различные виды крыс, песчанок, сусликов, сурков. Болеют чумой и обитающие в природных очагах этой инфекции тушканчики, пищухи, полёвки, хомяки, домовые и лесные мыши, «свинковые» грызуны. В отдельных очагах Африки и Южной Америки существенную роль в распространении чумы играют некоторые виды кроликов и зайцев, хотя чувствительность их к чуме снижена, но значительно выше, чем у слабо чувствительных видов полёвок. Как уже упоминалось, высоко чувствительны к классическим штаммам чумного микроба некоторые лабораторные животные (белые мыши, морские свинки, белые крысы). Относительно пониженная чувствительность к классической чуме у некоторых природных носителей, как предполагают многие исследователи, обусловлена возможностью существования хронических и скрытых форм чумной инфекции. При обследовании природных очагов помимо грызунов чумной микроб обнаружен у домашней кошки, лисицы, ласки, землероек, барсука и степного хорька. В настоящее время известно более 70 видов разных животных, чувствительных к чумному микробу. Широко известна чувствительность к чуме одногорбых и двугорбых верблюдов. Больные верблюды - один из источников групповых заражений чумой людей [Ралль Ю.М., 1958]. Известны сообщения, авторы которых считают, что к чуме чувствительны также медведи, буйволы и слоны [Hopstra T. et al., 1969; Gordon D. et al., 1979].

Нередко происходит заражение человека, который, как правило, попадает в кругооборот возбудителя случайно. В силу высокой чувствительности к инфекции и её высокой контагиозности человек может стать жертвой и источником дальнейшего распространения болезни, которая без своевременного и эффективного лечения способна протекать в виде эпидемий с высокой степенью летальности.

Различные по форме и тяжести заболевания чумой (бубонная, септическая, лёгочная) требуют, прежде всего, своевременной диагностики. Поэтому правильность взятия и хранения материала для анализа имеет первостепенное значение. Информативность биопроб зависит от правильности выбора взятого для

этой цели вида животного, его чувствительности конкретно к исследуемому штамму чумного микроба, от степени инфицированности исследуемого материала, способа контрольного заражения (подкожного, внутрибрюшинного, внутримышечного или ускоряющего развитие инфекции - внутривенного, интраназально и интратрахеально). С целью сокращения сроков инфекции имеется также рекомендации инфицировать животных через кожу внутripечёночно, что значительно проще других приёмов ускорения инфекции [Черченко И.И. и др., 1978]. Длина хоботка блохи позволяет ей ввести бактерии при укусе либо в капилляры кожи, либо внутрикожно. Инъекция возбудителя шприцом не адекватна последствиям укуса. В связи с этим в литературе описана методика введения инфекта в кожу уха белой мыши, что более соответствует укусу блохи и вызывает более естественную физиологическую реакцию мыши и, соответственно, этапы инфекции [Guinet F., Carniel E., 2000]. Требуется особых приёмов также анализ гнилостного материала. При этом целесообразно использование накожного заражения или посева костного мозга. Детали этих исследований подробно описаны в соответствующих изданиях [в частности, Самойлова Л.В. и др., 1998]. Моделями при изучении патогенности возбудителя чумы могут быть дикие грызуны, белые мыши, морские свинки, приматы. Как правило, для тестирования вирулентности чаще используют белых мышей, реже - морских свинок, а при получении антител в опытах по иммуногенности - кроликов, линейных мышей, реже лошадей. Недавно появилось сообщение, о том, что показателем вирулентности штамма бактерий чумы может быть также их способность к формированию биоплёнки на поверхности червей *Caenorhabditis elegans*, которых они способны в этих условиях убивать (Li Tan, Creg Darby, 2004). Возбудитель чумы способен к образованию биоплёнки в промежутке температур 26-34°C. Она нужна ему, с одной стороны, для его эффективной передачи блохами, в преджелудке которых и образуются биоплёнка [Forman S. et al., 2006]. Предполагается её формирование и на поверхности слизистых дыхательных путей чувствительных к чуме млекопитающих после инфекции и участия в построении общей биоплёнки сообщества почвенных микроорганизмов. В этот процесс вовлечены шесть Hms-белков Pgm-локуса, участвующих в реализации признака пигмент-(гемин)-сорбции, характерного для вирулентных штаммов *Y.pestis*. Локальный механизм образования биоплёнки регулируется взаимодействием белка с белком, зависимым от их структуры [Bobrov

A.G. et al., 2006]. Изменение её за счёт делеций или замен нуклеотидов в определённых участках соответствующих генов приводит к нарушению экспрессии феномена плёнообразования [Forman S. et al., 2006]. На образование биоплёнки влияет также второй механизм, действующий опосредовано через полиамины и независимый от Hms-белков. Дефект этого механизма не комплементируется полноценными Hms-белками [Worsham B.W. et al., 2006]. В настоящее время начаты исследования профиля экспрессии генов, участвующих в образовании биоплёнки. Получены первые данные сравнительного анализа в условиях *in vitro* и в планктоне. Проведено *microarray*-тестирование с целью идентификации генов, экспрессирующихся при образовании биоплёнки в преджелудке блохи [Valyvaloo V. et al., 2006]. Ведётся поиск генов хозяина, необходимых *in vivo* для прикрепления микроба и формирования им биоплёнки, способствующей эффективному заражению [Drace K., Darby C., 2006].

Обычно высоковирулентные и вирулентные штаммы чумного микроба при подкожном их введении обеспечивают гибель 50% заражённых животных (LD_{50}) в дозах $1-1 \cdot 10^4$ м.к., слабовирулентные – в дозах до 10^5 м.к. и более. В последнее время штаммы с LD_{50} , равной 5-10 м.к. считают высоковирулентными, более 10^5 м.к. – слабовирулентными, а более 10^6 м.к. – авирулентными. Патоанатомические изменения при этом весьма разнообразны и чётко выражены, в зависимости от формы инфекционного процесса. Они детально описаны в литературе [Руднев М.М., 1977; Самойлова Л.В. и др., 1998; и другие]. Атенуированные штаммы даже при очень высоких дозах заражения, как правило, не вызывают гибели или крайне редко индуцируют вялый инфекционный процесс, протекающий в форме, которую некоторые специалисты склонны называть временным носительством. Однако такие штаммы вызывают иммунологические реакции, приводящие к формированию иммунитета.

При низком содержании инфекта в исследуемом материале и слабой степени инфицированности посевного материала, когда в инъецированном объёме бактерий содержится меньше, чем LD_{50} , биопробы могут дать ложный отрицательный ответ. Повторная биопроба с материалом из выросших подозрительных колоний в заражающих дозах, гарантирующих летальное действие при любой степени вирулентности, или «слепой» пассаж материала из первой биопробы будут более эффективными. С целью ускорить получение результатов биопроб используют дополнительные приёмы, в частности обработку животных гидрокортизоном

[Кураев И.И., 1966], поэтапное вскрытие заражённых животных [Тинкер И.С. и др., 1970] и определение антигенурии у заражённых животных до их гибели [Трауб Л.А. и др., 1990]

При исследовании вирулентности различных штаммов чумного микроба иногда проявляется феномен «переживания» [Голубева В.К., Анисимова Т.И., 1965; Будыка Д.А., 2001]. Он регистрируется у штаммов, популяция, которых неоднородна по степени вирулентности. В этих случаях возможна ситуация, когда при заражении большими дозами бактерий число павших животных меньше, чем в группах, инфицированных средними и малыми дозами. Существует мнение, что при инъекции больших доз возбудителя, где содержится достаточно много клонов с пониженной вирулентностью, последние интенсивно индуцируют процесс иммунизации, который препятствует развитию летального инфекционного процесса. Протективную роль клонов с низкой вирулентностью и авирулентных клонов подтверждает другой феномен: «немедленная» защита от чумы при одновременном подкожном введении бактерий живой чумной вакцины и высоковирулентного штамма *Y. pestis* 231 [Будыка Д.А., 2001]. Вирулентность бактерий, в том числе и возбудителя чумы, тесно связана со способностью «побеждать» в конкуренции с макроорганизмом за ионы железа с помощью специальных функционирующих систем и, соответственно синтеза специфических веществ - сидерофоров. Есть предположение, имеющее косвенные доказательства, что клоны штаммов вакцинных и с пониженной вирулентностью в определённых условиях и, возможно, на определённых этапах инфекции продуцируют вещество, ингибирующее функции сидерофоров, собирающих и сохраняющих ионы железа [Podladchikova O.N. et al., 2002, 2002a]. Можно предположить, что оно может препятствовать проявлению летальных эффекторов возбудителя чумы, и тем самым способствовать более длительному сосуществованию возбудителя с носителем, хронизации инфекции, так характерной для слабовирулентных штаммов *Y. pestis*, и индукции неспецифических звеньев иммунитета.

Требуют более детального изучения также два других феномена известных как «остаточная» и «латентная» вирулентность.

Проблема защиты людей от чумы была и остается актуальной. Долгие годы одним из факторов защиты от эпидемий чумы являлась вакцинация. Исследовали различные подходы к этой проблеме, в том числе пытались использовать аттенуированные штаммы возбудителя чумы с утраченной вирулентностью. Однако среди этих штаммов были (1) утратившие не только вирулентность, но и иммуногенность, (2) сохранившие иммуногенность, но недостаточно снизившие вирулентность и, (3) наконец, утратившие вирулентность настолько, что бактерии обладали способностью индуцировать механизмы иммуногенеза, но не вызывали инфекционного заболевания. Такая умеренная «остаточная» вирулентность, а так же «безвредность» бактерий относится к обязательным свойствам живых вакцинных штаммов. Показателем «безвредности» по данным литературы считают отсутствие визуальных изменений в органах морских свинок через 35 сут после введения 15-20 млрд бактерий аттенуированного штамма [Коробкова Е.И., 1956].

Многие годы, вплоть до настоящего времени, в нашей стране используют вакцину, которая готовится на основе штамма *Y. pestis EV* (линия НИИЭГ). При накожном и внутрикожном введении она даёт ощутимый протективный эффект в отношении бубонной чумы, по длительности не превышающий 8-12 мес, хотя более выраженным он бывает в первые 3-4 мес. Однако она почти не защищает от лёгочной и септической чумы. В связи с этим, предметом обсуждений периодически бывают повышение иммуногенности этой вакцины за счёт использования очищенных антигенов [Girardon Ph. et al., 1981; Бывалов А.А. и др., 1984; Куреев М.Н. и др., 1992; Булгакова Е.Г. и др., 1994; Anderson J.G.W., 1996; Leary S. et al., 1998 и другие], предложения заменить вакцинный штамм *EV* (линия НИИЭГ) его мутантами [Feodorova V.A. et al., 2007] и другими аттенуированными штаммами вида *Y. pestis*: кызыл-кумовскими и некоторыми штаммами основного подвида [Малинина З.Е., Зубова М.В., 1965; Пономарев Н.Г. и др., 1968а; Шмутер М.Ф., 1973, 1974;], недавно обнаруженным авирулентным для людей штаммом биовара «*microtus*» [Zhou D et al., 2004], штаммами близкородственного вида *Y. pseudotuberculosis*, имеющими общие антигены с возбудителем чумы [Thal E., 1956; Заплатина С.И., Хохлова А.М., 1959; Домарадский И.В. и др., 1963], а также природными и гибридными вариантами некоторых представителей сем.

Enterobacteriaceae, содержащими детерминанты, иммуностимулирующих перекрестно-реагирующих или специфических антигенов чумного микроба [Михайлова Р.С., 1964; Карлышев А.В. и др., 1989; Лебедева С.А. и др., 1991, 1992; Кузнецова Л.С. и др., 1992; Коссе Л.В. и др., 1993; Гремякова Т.А. и др., 1994; Анисимов А.П., 1999; Morton M. et al., 2004]. Эти штаммы так же должны иметь «остаточную» вирулентность на соответствующем уровне, контроль которого требует постоянного внимания. К тому же, у вакцинного штамма *Y. pestis EV* (линия НИИЭГ) при длительном использовании может ослабевать иммуногенность именно за счёт снижения «остаточной» вирулентности. Критерии оценки «остаточной» вирулентности аттенуированных штаммов, предлагаемых на роль вакцины, описаны специалистами [Бургасов П.Н. и др., 1973; Основные критерии..., 1976]

В литературе описан целый ряд детерминантов, экспрессия которых коррелирует со свойством вирулентности или обеспечивает её реализацию. В этом плане различные авторы отмечают CafI и V антигены, белки наружной мембраны Yop, фибринолизин и плазмокоагулазу, антиген рН6, D-фосфолипазную активность «мышинного» токсина, ЛПС и комплекс некоторых из этих компонентов, а также белки, участвующие в обмене железа, определяемые плазмидой пестициногенности и хромосомой и некоторые другие [Burrows T.W., 1963; Brubaker R., 1972, 1985; Анисимов А.П. и др., 1991; Волковой К.И., 1999; Fields K.A. et al., 1999 и др.]. Причастность тех или иных детерминант к экспрессии вирулентности проверяют не только на модели штаммов с изменённым гено- и фенотипом. Много даёт проверка характера воздействия продуктов этих детерминант на организм экспериментальных животных с использованием культуры тканей. При этом представляется возможность использовать любые эукариотические клетки, в том числе человека, и получить данные, характеризующие не только исследуемый генный продукт, но и дополняющие наше представление о патогенезе чумы [Земцова И.Н., и др., 1975; Косило С.А., Инокентьева Т.И., 1992; Кисёлёв Ю.К. и др., 1992].

Данные литературы [Коробкова Е.И., 1956, 1964; Чернявская А.С. и др., 1990; Гребцова Н.Н. и др., 1990; 1991] свидетельствуют о том, что только часть детерминантов вирулентности обязательны и существенны для иммуногенеза. Утрата части детерминант в первую очередь вызывает снижение или утрату

вирулентности, а значительная изменчивость по детерминантам вирулентности приводит к утрате и иммуногенности. Именно эти, утраченные в последнюю очередь, детерминанты и обеспечивают «остаточную» вирулентность. К ним большей частью можно отнести детерминанты, обеспечивающие способность к инвазии и кратковременной приживаемости бактерий, а также способности представлять иммуностимулирующие антигены, которые вызывают патологические сдвиги, недостаточные для развития инфекционного болезненного процесса. Штаммы с высокой «остаточной» вирулентностью превышают этот допустимый порог и могут проявлять себя как возбудители атипичного инфекционного процесса.

В некоторых работах [Коробкова Е.И., 1957, 1964] «остаточная» вирулентность описана как способность аттенуированного штамма, утратившего устойчивость к защитным силам носителя, размножаться и распространяться в органах привитого организма и приживаться в зависимости от дозы введенных бактерий. В других [Тинкер А.И. и др., 1990], под «остаточной» вирулентностью аттенуированных, в том числе и вакцинных, штаммов понимают способность микробов временно на тот или иной период задерживаться в иммунологически реактивном организме, вызывая специфическую перестройку, свойственную вакцинальному, а не инфекционному процессу.

О связи «остаточной» вирулентности с иммуногенностью и о корреляции этих свойств известно давно [Коробкова Е.И., 1957; 1964]. Как отмечено разными исследователями [Jackson S., Burrows T.W., 1956; Коробкова Е.И., 1957; Аванян Л.А. и др., 1963; Пономарёв Н.Г., Гриззатулина С.К., 1967; Васенин А.С., 1971; Тинкер А.И. и др., 1990; Лебедева С.А. и др., 1991], уровень «остаточной» вирулентности может быть относительным показателем иммуногенности. По имеющимся данным [Чекомасова А.В., Кирдеев В.К., 1973], чем дольше бактерии вакцины способны существовать в привитом организме, тем выше их иммуногенность. Благодаря «остаточной» вирулентности бактерии, обладающие ею, могут быть выделены из инфицированного макроорганизма через несколько суток после инъекции. При этом, по заключению исследователей, гистологически выявляют изменения в органах, лишь в малой степени напоминающие те, которые возникают при типичной инфекции. Так, инфильтрат после подкожного введения бактерий не проявляет

характерной при чуме остроты и быстро рассасывается с последующей организацией. Слабая инфильтрация в лёгких не переходит в пневмонию. В тканях лимфоузлов, печени и селезёнки появляются ограниченные изменения, выраженные в гиперплазии и инфильтрации «гиалинизированными» клетками. Именно поэтому в качестве теста, характеризующего «остаточную» вирулентность, могут быть использованы показатели гистологического анализа тканей животных, инфицированных бактериями аттенуированных штаммов [Клец Э.И., Колесник Р.С., 1957; 1957a].

К особенностям патологических проявлений в ходе иммунного процесса относят пиринофилию лимфоидных и ретикулярных клеток (их способность окрашиваться пиронилметилгрюном) [Колесник Р.С., 1970]. При этом отмечают, что интенсивность её коррелирует с уровнем иммуногенности. То же известно и относительно плазмноклеточной метаплазии [Coons A.H. et al., 1955]. Кратковременное нарастание числа гиалинизированных клеток после введения бактерий также связывают с процессом иммуногенеза, но это нарастание не всегда коррелирует с пиринофилией [Колесник Р.С., 1970]. Имеются данные о проявлении «остаточной» вирулентности в виде грануломатоза, который обнаруживают в селезёнке и печени. Однако с иммуногенностью коррелирует лишь средняя степень проявления такого процесса [Колесник Р.С., 1970]. При достаточно выраженной «остаточной» вирулентности характерны сдвиги в белой крови. Вначале это увеличение общего числа лейкоцитов и нейтрофильный сдвиг, затем – уменьшение общего числа лейкоцитов и развитие лимфоцитарного сдвига, а иногда лейкоцитоз с лимфомоноцитозом. Наблюдаются также ферментативные сдвиги, появляются антитела [Исупов И.В. и др., 1973]

После элиминации аттенуированных бактерий из макроорганизма под действием его защитных факторов, обнаруживаются выраженные в разной степени иммунологические сдвиги.

Таким образом, по заключению различных исследователей, для бактерий вакцинных штаммов важна не только способность выжить в макроорганизме в месте введения, но распространиться в нём при некотором размножении и осуществить синтез и продукцию антигенов, активирующих гуморальные и клеточные

механизмы иммунитета. Интенсивность распространения и длительность сохранения в инфицированном организме бактерий аттенуированных или вакцинных штаммов, индуцирующих умеренные патогенетические изменения, являются свидетельством наличия «остаточной» вирулентности.

Известно, что в результате длительного хранения на искусственных питательных средах бактерии вакцинных штаммов меняют свои биологические свойства, в частности, снижается их «остаточная» вирулентность и иммуногенность [Коробкова Е.И., 1956, 1957; Тинкер А.И., 1968; Аванян Л.А. и др., 1963; Чекомасова А.В., Курдеев В.К., 1973]. Это обусловило необходимость разработки подходов к восстановлению «остаточной» вирулентности вакцинных штаммов, чтобы повысить иммуногенность.

Широко распространён метод одно- и многократного пассирования бактерий через организм чувствительных лабораторных животных, так называемая «анимализация». Этот приём, впервые применённый в 80-х годах XIX века для сохранения вакцинного штамма сибирской язвы. Методика «анимализации» не стандартизована и варьирует у различных авторов, но сводится к введению разными способами больших доз аттенуированных бактерий лабораторным животным и последующему выделению бактериальных культур из органов особей, забитых спустя несколько дней. О механизме действия феномена нет единого мнения: модификация ли это бактерий вакцины на различных этапах их пребывания в макроорганизме, селективное ли подавление «сапрофитизированной» части микробной популяции или то и другое одновременно – окончательное заключение пока не сделано, но приём этот широко используют для повышения иммуногенности. Параллельно повышается и «остаточная» вирулентность аттенуированных штаммов. Причём, частота и эффективность выделения культур из органов инфицированного животного, а также степень распространённости бактерий в макроорганизме находятся в прямой зависимости от уровня «остаточной» вирулентности. Чем выше «остаточная» вирулентность и иммуногенность бактерий, тем дольше они сохраняются в макроорганизме. Нельзя исключить переход «инфекции» в скрытое хроническое состояние, по патогенезу напоминающее ситуацию при нестерильном иммунитете. В отношении

аттенуированных штаммов *Y. pestis* и, в частности, вакцины анимализацию вначале выполняли, вводя подкожно большие дозы бактерий ($0,5-1 \cdot 10^9$ м.к.) морским свинкам и белым мышам, выделяя затем культуру из «места введения», региональных лимфоузлов, печени, селезёнки у забитых на 4-5 сут животных [Коробкова Е.И., 1957]. В настоящее время используют разные методы введения бактерий, внутримышечно, подкожно, внутрибрюшинно, интратестикулярно.

Одним из примеров многократного пассирования через организм лабораторных животных является работа, выполненная на модели белых мышей с использованием четырёх различающихся по иммуногенности лабораторных штаммов чумного микроба (EV76, 1, 17 и Otten/106). Этот приём не только повысил иммуногенность, но и дал возможность сравнить у этих штаммов исследуемые свойства. В ходе 20 пассажей обнаружены различия по интенсивности распространения бактерий в организме, что проявлялось в том, что они выделялись или только из «места введения», или даже из других органов (селезёнки, печени, лёгких и крови) [Васильева Г.И. и др., 1984].

Изучение механизма повышения уровня «остаточной» вирулентности в процессе пассажей через организм крайне необходимо. Одним из эффективных факторов воздействия на бактерии в макроорганизме могут быть клетки белой крови, в частности фагоцитирующие. Давно известно, что после пассажа через моноциты бактерии чумы модифицируются в формы и популяции, которые способны обеспечивать развитие острой инфекции [Cavanaugh D.C., Randall R., 1959]. Фагоцитирующие клетки чувствительных животных участвуют во многих важных процессах при инфекции, обусловленной внутриклеточным паразитированием возбудителя. При этом не исключена возможность повышения «остаточной» вирулентности при пассажах через организм лабораторных животных именно за счёт персистенции в фагоцитах, при которой может оказываться как индуцирующее в отношении биосинтеза антигенов, так и селективное для бактерий воздействие. Доказательство этому – результаты исследования слабовирулентных и вакцинных штаммов *Y. pestis*. После их пассажей через перитонеальные макрофаги *in vitro* [Васильева Г.И. и др., 1988; Дорошенко Е.П. и др., 1992] было отмечено повышение «остаточной» вирулентности. Более выраженным было воздействие

макрофагов морских свинок, а не белых мышей. Разница в рецепторной структуре и активности клеточной поверхности тех и других макрофагов в значительной степени определяет селективность фагоцитоза на этих моделях, а внутриклеточные функциональные особенности этих же макрофагов обеспечивают отбор разных клонов и формирование, после разрушения фагоцита, новой популяции бактерий, модифицированной в различной степени. Одним из примеров может быть реверсия популяций фагоустойчивых авирулентных вариантов *Y. pestis* в вирулентное фагочувствительное состояние после пассажа через макрофаги [Гребцова Н.Н. и др., 1998].

Проведение экспериментов *in vitro* с макрофагами позволило оценивать уровень «остаточной» вирулентности по индексу завершенности фагоцитоза (ИЗФ) [Пустовалов В.Л. и др., 1984]. Штаммы, обладающие разной «остаточной» вирулентностью, характеризуются положительным или отрицательным значением ИЗФ. Варианты со слабой «остаточной» вирулентностью при определённой бактериальной нагрузке на макрофаг обладают ИЗФ относительно близким к нулю. Чем выше «остаточная» вирулентность, тем ближе ИЗФ к значениям (-1)-(-2). В связи с чем, этот метод рекомендован авторами к использованию для оценки «остаточной» вирулентности.

Повысить эффективность взаимодействия патогенных бактерий с клетками иммунной системы хозяина можно, используя метод проточной цитофлюорометрии. Апробация этого метода на возбудителе чумы дала ценные результаты при введении бактерий чумы непосредственно в кровь без предварительного выделения лейкоцитов. Метод позволяет исследовать ответ иммунокомпетентных клеток при культивировании бактерий до 48 час, проводить контроль содержания популяций лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов и состояния бактерицидных систем у последних двух типов клеток, участвующих в реализации врождённого иммунитета. Метод позволяет быстрое выделение суммарной лейкоцитарной фракции и подсчёт фагоцитов с ДНК поглощённых бактерий. Устойчивые к лейкоцитарному фагоцитозу бактерии чумы по данным этих экспериментов индуцируют в цельной крови человека другой характер апоптотической гибели лейкоцитов, чем в обычных

условиях опытов без использования проточной цитофлюорометрии [Кравцов А.Л. и др., 2007].

В условиях *in vitro* повысить иммуногенность, связанную с «остаточной» вирулентностью предлагается также с помощью пассажей через нормальную сыворотку [Кравцов А.Н., 1989]. Степень выживаемости в этих условиях отражает способность бактерий расти в условиях дефицита железа и проявлять резистентность к комплементу. Оба эти признака важны для приживаемости бактерий и последующей экспрессии вирулентных свойств *in vivo*. Поэтому при пассажах происходит селекция бактерий с большей степенью как вирулентности *per se*, так и «остаточной» вирулентности.

Усилить проявление «остаточной» вирулентности можно также, снизив естественную сопротивляемость лабораторных животных. Намеренное ослабление защитных сил макроорганизма может обеспечивать развитие инфекционного процесса при введении меньших, чем при «анимализации» доз аттенуированных бактерий. Это облегчает разделение штаммов по степени «остаточной» вирулентности и позволяет также выявить «латентную» вирулентность. С этой целью испытывались разные приёмы. В частности, апробировали хлористый кальций, молочную кислоту, этиловый спирт, новокаин, генцианвиолет, тестикулярный экстракт, чумную антифаговую сыворотку, куриный желток, трипановую синь [Кураев И.И., 1960; Апарин Г.П., 1969]. Последние два агента явно ускоряли гибель животных. В соответствии со сведениями о влиянии коры надпочечников и гипофиза на восприимчивость лабораторных животных к возбудителю чумы, испытали кортизон, дезоксикортикостерон, АКТГ, и отдали предпочтение АКТГ. Кортизон в этих опытах действовал слабее, а дезоксикортикостерон был неэффективен [Акимович В.В., Доброцветова Т.Я., 1960].

При сравнении новэмбихина, куриного желтка и гистамина отмечена эффективность первых двух веществ [Колесник Р.С., 1970]. Причём новэмбихин, ослабляя фагоцитарные функции и резко подавляя ретикуло-эндотелиальную систему у белых мышей, создавал условия для беспрепятственного размножения микробов чумы, даже аттенуированных. Одновременно появлялись условия для развития аутоинфекции из кишечника, что приводило к гибели животных до

проявления чумной инфекции. Это вынудило авторов рекомендовать к использованию только яичный желток.

Наряду с термином «остаточная» вирулентность в литературе используется понятие «латентная» вирулентность [Пономарёв Н.Г. и др., 1968]. В работах исследователей мы не встретили чёткого разграничения этих терминов, что во многом мешает корректному анализу фактического материала. Не исключено, что в ряде случаев исследователи имели дело со штаммами, обладающими как «остаточной», так и «латентной» вирулентностью, как это свойственно вакцинному штамму *Y. pestis* EV76. Вполне вероятно, что наличие «латентной» вирулентности, то есть свойств отдельных или многих клеток популяции только в определённых условиях проявлять вирулентность, необходимо также и для иммуногенности.

Для выявления «латентной» вирулентности и оценки её по летальному эффекту рекомендована обработка белых мышей препаратами закисного сернокислого железа [Аванян Л.А., Губина Н.Е., 1963; Аванян Л.А. и др., 1963]. Этот приём наиболее распространён при исследовании аттенуированных, в том числе и вакцинных, штаммов *Y. pestis*. Пассажи через организм таких «обработанных» животных способствуют выявлению и сохранению «остаточной» вирулентности и сохранению иммуногенности. Эффект препаратов железа может иметь двойное действие. С одной стороны, избыток ионов железа нарушает систему конкуренции за них, которая обычно действует в пользу макроорганизма. С другой стороны, повышение концентрации ионов железа позволяет преодолеть дефектность системы накопления железа у вакцинного и некоторых аттенуированных штаммов и усиливает их жизнеобеспечение. Всё это способствует усилению антимакрофагальной активности бактерий и экспрессии патогенетических свойств микроба в конкретный момент и в конкретной ситуации. Иными словами, введение ионов железа животным обеспечивает проявление «остаточной» и некоторых форм «латентной» вирулентности, при которых микроб в состоянии обеспечить не только индукцию иммунных реакций, но и развитие инфекционного процесса с летальным исходом. Такая процедура может обеспечить летальный эффект вакцинного штамма EV76 при LD_{50} , равной 10 м.к., подтверждая, что основной дефект этих бактерий – нарушение метаболизма железа. Кстати, обработка мышей железом не превращает

инфицирующие вакцинные и другие аттенуированные штаммы в стабильно вирулентные, поскольку меняет только «сиюминутные» условия взаимодействия возбудителя и макроорганизма, а не генотип микроба. Хотя, в условиях *in vivo*, нельзя исключить параллельного «удаления» сапрофитизированных, не способных приживаться клеток из состава популяции, которое делает её более однородной по «остаточной» вирулентности и потому более иммуногенной.

Нарушение сорбции железа и пигментов у вакцинного штамма *Y. pestis* EV76, как известно, связано с дефектом Pgm-локуса из-за неспособности синтезировать сидерофор иерсиниабактин. В последнее время обнаружено, что в популяции этого штамма встречаются клетки, слабо проявляющие эту способность и продуцирующие ранее неизвестный иерсиниахелин, который синтезируется при 28°C и способствует росту бактерий в условиях дефицита железа. Судя по всему, иерсиниахелин необходим для приживания бактерий в макроорганизме и, следовательно, сопряжён с их «латентной» или «остаточной» вирулентностью [Подладчикова О.Н. и др., 2003]. Этот факт требует дальнейшего исследования на более широком круге штаммов. Возможно, такой подход поможет в условиях *in vitro* ориентировочно, но менее трудоёмко, определять уровень этих типов вирулентности и, следовательно, иммуногенности, и селектировать клоны с большей степенью экспрессии этих свойств.

Скрытой «латентной» вирулентностью обладают также пуриазависимые мутанты *Y. pestis*. Введение их белым мышам одновременно с экзогенным пурином вызывает гибель животных [Brubaker R.R., 1972]. Вирулентность «скрыта» и у Ca^{2+} мутантов, Ca^{2+} -зависимость которых утрачена в связи с интеграцией соответствующей плазмиды в хромосому. Пребывание таких штаммов в фагоцитах и организме животных может вызвать у отдельных клеток дезинтеграцию репликаонов с восстановлением вирулентности [Проценко О.А., Кутырев В.В., 1982; Brubaker R.R., 1985]. По всей вероятности существуют и другие формы изменчивости бактерий чумы, когда термин «латентная» вирулентность может быть уместен. В частности, это касается флюктуации вирулентности на разных реверсибельных этапах *L*-трансформации чумного микроба, часто регистрируемой как в природных, так и лабораторных исследованиях (см. гл. 5).

Подводя итог изложенному выше, можно заключить, что свойство «остаточной» и «латентной» вирулентности чумного микроба нуждается в более глубокой проработке и заслуживает внимания, поскольку оно позволяет аттенуированным формам бактерий выжить определённое время или в определённых условиях в макроорганизме и индуцировать иммуногенез. При этом выраженность этого свойства является относительным критерием не только иммуногенности, но и безвредности аттенуированных и «претендующих» на роль вакцины штаммов. В связи с этим оно широко используется для характеристики и контроля вакцинных штаммов чумного микроба.

Проанализированные выше типы вирулентности касаются патогенных свойств возбудителя чумы, которые проявляются по отношению ко всем природным носителям и большинству лабораторных животных.

Однако, есть группы штаммов внутри вида *Y. pestis*, для которых круг восприимчивых хозяев значительно уже, чем у классических штаммов того же вида. Такой тип вирулентности принято называть «избирательной». К такому типу вирулентности условно можно отнести вирулентность штаммов «песчаночьей» разновидности, которая проявляется по-разному у песчанок, обитающих в природных очагах чумы на левом и правом берегу Волги. Это послужило основой для выделения этой разновидности в самостоятельную [Леви М.И., 1962].

Классическим примером «избирательной» внутривидовой вирулентности является ограниченная вирулентность «полёвочьих» штаммов *Y. pestis* дополнительных подвидов. Они неvirulentны или слабо вирулентны для основных носителей классических штаммов возбудителя чумы (сурков, сусликов, многих видов песчанок, крыс и лабораторных морских свинок). Их эпидемическая и этиологическая роль для людей, согласно наблюдениям, подвергается сомнению [Мартиневский И.Л., 1969; Тарасова В.Е., 1980; Dongzeng Yu. et al., 1998]. Имеются экспериментальные доказательства авирулентности одной из таксономических групп (условно биовар *microtus*) этих штаммов для человека при заражении как подкожно, так и аэрозольно [Zhou D. et al., 2004]. Причём, несмотря на то, что все эти штаммы высоковирулентны для белых мышей и пищух, по-разному вирулентны для различных видов полёвок, тушканчиков, красных сурков, даурских хомячков и

некоторых других мелких грызунов, обитающих в особых высокогорных природных очагах. Механизмы такой естественной устойчивости к заболеванию чумой и «избирательной» вирулентности связаны не только с особенностями молекулярной структуры и свойств бактерий возбудителя, но определяются также особенностями рецепторов иммунокомпетентных клеток инфицированного макроорганизма. Совокупность действия механизмов пагубного воздействия на макроорганизм, общих у многих патогенных микробов и сугубо специфичных для чумного микроба, определяет характер воздействия возбудителя на инфицированный организм, а особенности клеточного звена иммунитета носителя инфекции, обуславливают тип ответа на инфекцию и определяют общий эффект взаимодействия. В случае чумы многое пока не известно. Но вопрос этот крайне актуальный, требует специальных исследований на высоком методическом уровне и отдельного детального обсуждения. Именно от его решения будет зависеть судьба эффективных профилактических мер и совершенство приёмов терапии.

8.2. Отдельные подходы к отбору биомоделей

Одной из проблем экспериментальной медицины является отбор биомоделей, особенно если используют обычных беспородных животных. Как правило, проводят лишь сравнительную оценку физиологического состояния животных. В ходе использования беспородных животных перспективнее выбирать из популяции только здоровых по иммунологическим показателям особей. Об их клеточном иммунитете можно судить, используя тесты *in vitro*, в частности качественные тесты оценки лимфоцитарного звена, например с помощью реакции бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ).

Предварительная оценка иммунологического состояния животных разделяет их на группы по степени иммунного ответа, что имеет ряд положительных моментов. Этот метод отбора биомоделей может служить тестом при контроле за состоянием стада животных и одним из тестов отбора маточного поголовья, поскольку есть

модификации РБТЛ, которые легко воспроизводятся, не требуют дорогостоящего оборудования и реактивов. Изучение чувствительности животных к различным инфекциям, в том числе и к вирулентным или иммуногенным штаммам, может быть более информативным, если заведомо разделить общую выборку экспериментальных животных на группы с одинаковым исходным (высоким или низким) иммунным ответом. Такое разделение даст возможность более успешно изучать механизмы взаимодействия микроба с макроорганизмом и корректнее оценивать полученные результаты. Иммунизация животных, имеющих высокий процент трансформированных лимфоцитов в РБТЛ, позволяет получать сыворотки с высоким титром антител и использовать меньшее количество животных. При этом статистическая обработка данных становится более достоверной, так как работа с особями, сгруппированными по иммунологическим показателям, позволяет избежать существенных индивидуальных различий между найденными в опыте величинами [Шукуля Н.А. и др., 1992].

Влияют на результаты экспериментов также и особенности видов используемых экспериментальных животных. В качестве примера мы приводим здесь данные о различиях эффективности иммунизации в зависимости от особенностей генотипа различных пород кроликов (табл.8.1). Подобные данные могут быть ориентиром для суждений касающихся не только выбора породы животных для опыта, интенсивности индукции образования антител и их класса, но и антигенности использованных для иммунизации препаратов [Коссе Л.В., 1992].

Введение в лабораторную практику линейных животных оказалось существенным прогрессом для получения более достоверных и стабильных результатов. Использование в качестве среды выживания самих животных или культур клеток млекопитающих позволяет ответить на многие вопросы, связанные с патогенетической и иммуногенной активностью чумного микроба и успешно решать проблемы эпидемиологического, специфического терапевтического и профилактического плана. Многие годы изучение вирулентности, иммуногенности, скрининг эффективных лекарственных средств

Таблица 8.1

Обратные величины средних титров антител в сыворотках кроликов разных пород иммунизированных различными препаратами F1-антигена *Y.pestis* [Коссе Л.В., 1992]

Порода кроликов	Обратные величины титров антител к антигенам							
	F1(Baker), <i>Y.pestis</i> EV76		F1(Baker), <i>Y.pestis</i> EV76 + изофокусирование		F1(Baker), <i>Y.pestis</i> EV76, диссоциированная форма (SDS)		F1(Baker), рекомбинант <i>C.freundii</i>	
	РПГА	РДП	РПГА	РДП	РПГА	РДП	РПГА	РДП
шиншилла	2032	16	3320	16	926	4	4716	4
новозеландские	3120	32	2961	16	589	8	7320	64
калифорнийские	3313	64	4270	64	2087	8	795	128

Пояснение: РПГА - реакция пассивной гемагглютинации с коммерческим F1-антигенным диагностикумом; РДП – реакция диффузионной преципитации в геле с препаратом F1(Baker) *Y.pestis* EV76.

и подбор вакцинных штаммов проводили на модели беспородных, или точнее нелинейных, животных. Постепенно их место стали занимать животные инбредных линий. Это обусловлено тем, что все животные в пределах одной линии генетически однородны, что обеспечивает воспроизводимость и однородность результатов, получаемых при их использовании, сокращает объёмы экспериментов за счёт уменьшения их повторов, но значительно повышает надёжность исследований, их эффективность и информативность. Разведение при поддержании чистоты линий требует специальных знаний и условий, кропотливого труда и пунктуальности. Именно поэтому предпочтительно приобретение таких животных в специализированных питомниках. Выбор линий для экспериментов основывается на данных об их биологической и генетической особенностях. К настоящему времени выведены десятки и сотни инбредных линий разных животных. Наиболее распространенными видами в экспериментах с возбудителем чумы являются, прежде всего, мыши, затем морские свинки, а иногда это - кролики и белые крысы.

Линий морских свинок сравнительно немного и они сориентированы в основном на исследования в области аллергологии и иммунологии. Многие из них

не испытаны в экспериментах с возбудителем чумы. Ещё меньше линий кроликов. Их насчитывается чуть более десятка.

Число инбредных линий мышей в настоящее время превышает 100. В значительной степени они предназначены для онкологических и эмбриологических исследований. Большинство из этих животных не апробированы в исследованиях возбудителя чумы. Среди известных много линий мышей, имеющих мутации в геноме, которые могут индуцировать наследственные патологии, обеспечивать склонность к определённым онкологическим заболеваниям или наоборот устойчивость к ним, позволяют анализировать механизмы иммуногенеза или особенности патогенеза различных, в том числе и некоторых инфекционных, заболеваний.

В настоящее время кроме инбредных мышей используют в экспериментах также гибриды первого поколения различных линий. Особенно это допустимо при определении активности вакцин, сывороток, лекарственных препаратов, иммуностимуляторов. Обе эти категории животных, невзирая на некоторые свои генетические и фенотипические особенности, в равной степени обеспечивают высокую воспроизводимость результатов экспериментов и требуют наименьшего из всех возможных вариантов числа животных на точку эксперимента. Гибриды первого поколения (F1) являются потомками от скрещиваний двух высокоинбредных линий. Они генетически однородны также как инбредные родители, но гетерозиготны по тем парам генов, по которым отличаются друг от друга родители. Огромным преимуществом гибридов F1 является их фенотипическая однородность, большая устойчивость к изменениям внешней среды, к которым инбредные родительские линии чувствительны. Ответ их организма стабильный. Воспроизводимость опытов такая же высокая как на инбредных животных. Во многих исследованиях гибридным мышам отдаётся предпочтение.

В исследованиях чумного микроба показана высокая результативность применения мышей линии *BALB/c* для получения моноклональных антител [Девдариани З.Л. и др., 1998; Бичуль О.К. и др., 1989]. В исследованиях вирулентности чумного микроба показана высокая чувствительность к *Y. pestis*

инбредных мышей линии СС57W/Mv, полученных от скрещивания инбредных линий BALB/cN и C57 BL/N [Смирнова Л.А. и др., 1974]. Они обладают самым высоким фагоцитарным числом и чувствительны к *S. typhimurium*. В сравнительных опытах по изучению вирулентности чумного микроба при разных способах заражения животных использовали также мыши линии BALB/c [Worsham P.I., Roy C., 2003], больше предназначенных для иммунологических экспериментов. Именно на этих мышцах проводили испытания иммуногенности антигена F1 чумного микроба [Simpson W.J. et al., 1990].

При изучении воздействия «мышинного» токсина чумного микроба на мышей линий СВА и C57 BL/6γ обнаружено, что у последней в отличие от СВА линии имеется две популяции макрофагов, с низким и высоким содержанием липосом, а гибрид этих линий имеет ту же характеристику, что и белые нелинейные мыши [Кравцов А.Л. и др., 1993]. Инбредные мыши линии BALB/c и СВ-17/Lсг применяли также при изучении токсичности, вирулентности и в иммунологических экспериментах с близкородственным *Y. pestis* псевдотуберкулёзным микробом [Кириличева Г.В. и др., 1993; Kano H. et al., 2003]

Имеются данные, характеризующие сравнительную чувствительность мышей линий BALB/c, DBA/2, СВА/Lас, C57BL/6 при подкожном введении бактерий штамма *Y.pestis* 231 основного подвида ($LD_{50} = 2-5$ КОЕ).

Мыши линии BALB/c происходят от имбридинга белых мышей, начатого в 1923 г. Проявляют склонность к образованию различных опухолей. Имеют увеличенные ретикулоэндотелиальные органы. Восприимчивы к *S. typhimurium* [Душкин В.А., 1967; Plant J., Glynn A.A., 1974; 1976]. Имеют среднюю чувствительность к *B. anthracis*. Дают высокий иммунный ответ на эритроциты барана [Borel J.F., 1974], салмонеллёзный и пневмококковый полисахариды [Di Pauli R., 1972; Cramer M., Braun D.G., 1974], на стрептококки группы А [Braun D.G. et al., 1972], бактериальные липополисахариды [Rudbach J.A., Reed N., 1977], стафилококковую инфекцию [Акатов А.К., 1963]. Обладают высокой активностью комплемента [Staats J., 1972]. При введении кортизона наблюдается эозинопения. Максимальный эффект при дозе 96 мг [Chai Ch.K., Dickie M., 1966]. Наиболее чувствительны к радиации [Storer J.B., 1966]. Характеризуются высокой

активностью щелочной фосфатазы в лёгких [Грицюте Л.А., 1971]. Неагрессивны, имеют сильно выраженный инстинкт запасаения пищи. Используются во всех областях медико-биологических исследований, в том числе при изучении процессов формирования тромбозов и потенциальных фибринолизиннов. Продолжительность жизни 400-600 сут.

DBA/2 - линия является производным линии **DBA/1**. Заложена впервые в 1948 г. Эти мыши резистентны к большинству опухолей, возникающих у **DBA/1**. Резистентны к подкожному введению 10^5 м.к. *S. typhimurium* [Plant J., Glynn A.A., 1976]. Не способны продуцировать антитела к эндотоксину кишечной палочки [Borel J.F., 1974]. Вырабатывают меньше антител на общий антиген энтеробактерий [Gordsinsky T. et al., 1970]. Дают низкий иммунный ответ на ДНК [Fournie G.J. et al., 1976]. По образованию антител высокореактивны к иммунизации липополисахаридом *E. coli* или *Salmonella* [Watson J., Riblet R., 1974]. Комплемент не определяется [Staats J., 1980]. Относительно резистентны к содержанию озона, но крайне чувствительны к содержанию паров хлороформа. Хорошая экспериментальная память на условные рефлексy. Нет тяги к спирту. Продолжительность жизни – около 700 сут.

СВА/Лас - линия от скрещивания BALB/c с DBA в 1920 г. Мыши резистентны к онкогенезу [Агеенко А.И., Ерхов В.С., 1976]. Имеют один из низких показателей веса тимуса, селезёнки и лимфоузлов [Badr F.M. et al., 1968]. Устойчивы к салмонеллёзной инфекции [Душкин В.А., 1967]. Устойчивы к бескапсульному и чувствительны к капсульному штаммам сибирской язвы [Абалкин В.А., Черкасский Б.Л., 1978]. Дают высокий иммунный ответ на общий антиген энтеробактерий [Gordsinsky T. et al., 1970]. Имеют самый высокий титр антител к эритроцитам барана [Петров Р.В. и др., 1966]. Чувствительны к хроническому облучению всего тела [Staats J., 1980]. Очень чувствительны к минимальным дозам хлороформа (гибнут от поражения почек). Рекомендуются при исследованиях спонтанных опухолей и возрастных особенностей беременности. Удобны как долгожители (около 700 сут.)

С57BL/6 - линия была впервые выведена в 1937г. Мыши этой линии характеризуются различными физиологическим и физическим дефектами.

Высококочувствительны к заражению салмонеллами [Душкин В.А., 1967]. Фенольная вакцина из *S. typhimurium* вызывает образование опсонизирующих антител, но не защищает от заражения [Medina S., 1975]. Чувствительны к стафилококковой инфекции [Акатов А.К., 1963]. Более чувствительны к листериозу, чем BALB/c [Cheers C. et al., 1978]. Обладают высокой активностью комплемента [Staats J., 1972]. Титр антител к эритроцитам барана самый низкий [Петров Р.В. и др., 1966]. Высокореактивны в отношении лептоспир [Петров Р.В., 1973] и общего антигена энтеробактерий [Gordsinsky T. et al., 1970]. Дают высокий иммунный ответ на бычий гамма-глобулин, но не полисахарид группы А стафилококков. У этих мышей самая низкая активность сывороточного лизоцима и самая высокая переваривающая активность нейтрофилов [Bach J.F., Dardenne M., 1973]. Устойчивы к иммунодепрессивному действию уретана [Горелик Л.С., Каган А.Ф., 1972]. Относительно резистентны к летальному действию озона [Goldstein B.D. et al., 1973] и хлороформа [Meier Y., Fuller J.L., 1966]. Имеют среднюю чувствительность к радиации [Storer J.B., 1966]. Характерна склонность к дракам и алкоголю [Wimer R.E., Fuller J.L., 1966]. Используют в исследованиях, не связанных с бактериальной инфекционной патологией. Характеристика чувствительности этих четырёх линий мышей к чумному микробу приведена в таблице 8.2.

Самыми чувствительными, по общему числу павших, являются мыши линии DBA/2 и нелинейные белые мыши. Близкие по чувствительности к возбудителю чумы являются мыши линий C57 BL/6 и CBA/Lac. Тот же вывод можно было сделать и на основании значений LD_{50} . Близкая к этой оценка выявлена по показателям доз, обеспечивающих гибель 100% животных в группах. В этих условиях и DBA/2 и нелинейные мыши оказывались наиболее чувствительными. Остальные линии мышей (BALB/c и C57 BLc/6 с CBA/Lac) занимали промежуточное положение по чувствительности к заражению с десятикратным колебанием показателя 100%-летальных доз (DCL) в пределах $4,6 \cdot 10^2$ - $4,6 \cdot 10^3$ КОЕ.

Таблица 8.2

Оценка чувствительности мышей различных линий к высоковирулентному штамму возбудителя чумы

Доза заражения в КОЕ и другие показатели		Линии инбредных и гибридных мышей				
		BALB/c	DBA/2	CBA/Lac	C57BL/6	Контроль (нелинейные белые мыши)
Продолжительность жизни в зависимости от заражающей дозы, КОЕ:	4,6	5,0	8,1	8,6	8,1	9,5
	$4,6 \times 10^4$	4,2	6,0	3,2	3,6	3,9
% павших из числа зараженных мышей		78 ± 11	94 ± 7	88 ± 9	92 ± 8	96 ± 6
LD_{50} в КОЕ		18 (7-46)	2 (1-7)	6 (2-15)	4 (1-9)	2 (1-6)
Доза, вызвавшая гибель 100% животных		$4,6 \times 10^2$	$4,6 \times 10$	$4,6 \times 10^2$	$4,6 \times 10^3$	$4,6 \times 10$

Пояснения: КОЕ – колонии образующие единицы (микробные клетки)

LD_{50} - число КОЕ, вызывающих гибель 50% инфицированных мышей.

При инфицировании малыми дозами длительность течения инфекции в этих опытах, достигающая в среднем 10 сут, была характерна для нелинейных мышей. Когда заражали большими дозами, дольше всего жили мыши линии DBA/2. У мышей BALB/c средняя продолжительность жизни была наименьшей при заражении всеми дозами бактерий чумы. Описанные выше линейные мыши применимы в экспериментах с различной целью и данные об их чувствительности к *Y.pestis* могут служить ориентиром для выбора той или иной линии с учетом задач эксперимента. Нам представляется, что линия DBA/2 более подходит для титрования вирулентности штаммов чумного микроба, чем BALB/c, которая, судя по данным литературы, всё-таки используется для этих целей. Хотя пока не изучена их реакция на бактерии со сниженной или «остаточной» вирулентностью. С другой стороны, несколькостораживает слабая зависимость длительности заболевания от инфицирующей дозы. Это определяет необходимость более детального исследования особенностей патогенеза и механизмов воздействия возбудителя на организм этих мышей, включая аллергические и токсические факторы возбудителя. Более продолжительная жизнь мышей линии DBA/2 при заражении большими

дозами предоставляет больше времени для опытов по разработке специфического и неспецифического лечения экспериментальной чумы.

В этих опытах не обнаружено чёткой корреляции каких-либо особенностей линейных мышей с чувствительностью к возбудителю чумы. Кажется лишь достойным внимания факт обратной связи высокого уровня чувствительности к чуме, с пониженной выраженностью спонтанного онкогенеза у мышей линии DBA/2 и сравнительно ослабленная восприимчивость к инфекции с известным высоким уровнем чувствительности к радиации у BALB/c. Интересен факт описанной высокой чувствительности к полисахаридным комплексам клебсиелл и стафилококков и обнаруженной к чумному микробу у мышей линии DBA/2. Однако эти факты результат первого впечатления и нуждаются в строгой экспериментальной проверке.

Известно, что однотипный ответ на воздействие у мышей разных линий свидетельствует о малом значении для эффекта существующих отличий генотипа сравниваемых мышей. Разный ответ отражает влияние имеющихся отдельных особенностей генотипа на конкретные вариации ответа. В указанном плане характеристики, полученные при испытании линий мышей с различным генотипом, представляют большой интерес. Эти наблюдения поднимают ряд вопросов, ответ на которые может дать только глубокий анализ геномов мышей и более широкая характеристика их иммунологических особенностей при взаимоотношений с различными патогенными бактериями и их компонентами. Кроме того, они демонстрируют возможность выяснения особенностей патогенеза при чуме и идентификации мишеней для микроба-возбудителя в конкретном макроорганизме.

Описанный выше уровень чувствительности различных инбредных линий к чуме в определенной степени совпадает с результатами работы по изучению общности антигенов в органах мышей и бактериях чумы [Белякова Н.И. и др., 1993]. В этой работе показана высокая частота встречаемости общих антигенов «мимикрии» во всех основных органах мышей линии C57 BL/6, средний уровень частоты встречаемости у мышей линии CBA и совсем низкий у мышей линии BALB/c. у которых общие антигены с возбудителем чумы имеются только в печени и у меньшего числа мышей. Сопоставление результатов этих двух исследований

свидетельствует в пользу значимости антигенов мимикрии и конкретной их локализации в развитии чумной инфекции.

Полезным оказался и анализ функций капсульного чумного антигена «фракция 1» в отношении перитонеальных макрофагов на модели различных по чувствительности линий инбредных мышей (CBA, C57 BL/6, BALB/c) и гибрида (F1 CBA x C57 BL/6) со сниженной чувствительностью к возбудителю чумы [Батурина И.Г. и др., 1993]. Полученные данные, свидетельствуют о различном эффекте антигена на макрофаги и также могут объяснить некоторые особенности течения инфекции и уровня чувствительности к ней. Незначительная разница в степени вирулентности при её проверке на мышах CBA и C57/BL6 линий не позволяет утверждать значимость различий в свойствах у субпопуляций перитонеальных макрофагов для экспрессии вирулентности. Тем более что при отсутствии каких-либо отличий на уровне субпопуляций гибрид мышей F1 CBA x C57 BL/6 существенно отличается по чувствительности к летальному действию вирулентного штамма возбудителя чумы. Интересно, что при высоком уровне комплемента в сыворотке крови у мышей BALB/c и C57 BL/6 уровень летальности их после заражения *Y.pestis* отличается. В то же время у мышей линии DBA/2, по уровню летальности близких к C57 BL/6, комплемент, судя по характеристике линии, вовсе не определяется. Лизоцим сыворотки считается важным компонентом при взаимодействии возбудителя и макроорганизма. Однако при высокой чувствительности к инфекции у последней линии он находится на низком уровне. Представляется, что выводы по этим фактам делать ещё рано. Требуются дополнительные исследования относительно взаимодействия всех компонентов в совокупности. Подобный разнонаправленный анализ, с нашей точки зрения, приведёт к конкретизации и идентификации компонентов макроорганизма и процессов в нём, которые делают его чувствительным к чуме. В связи с этим целесообразно отметить ещё одну работу на инбредных мышах. Известна различная чувствительность людей разного пола и возрастных категорий к чуме. На модели устойчивых к чуме линий мышей Swiss Webster и особенно HLA-DQ8 $\alpha\beta$ было обнаружено, что для выживания после инфицирования чумой важно состояние адаптивных систем, элементы которых в зависимости от пола и возраста могут быть

разными. Полученные на этих мышах результаты по мнению авторов работы могут быть экстраполированы на человека [O'Briant D.M. et al., 2006].

В целом всё перечисленное позволит изменить подходы к профилактике и даже к лечению чумы. Перспективы и успех этого направления во многом зависят не только от стабильности каждой из испытываемых линий лабораторных животных, которая обеспечивает воспроизводимость результатов, но в большей степени от детальной характеристики этих линий. На сегодняшний день они явно не достаточны и нуждаются в расширении и целенаправленности выбора признаков, а также зависят от согласованности экспериментов. Мы оцениваем подобные исследования как весьма перспективные, актуальные и обладающие значительно большей разрешающей способностью, чем эксперименты на неохарактеризованных и переменных по индивидуальным свойствам неллинейных животных.

8.3. Примеры приёмов выявления молекулярных основ вирулентности возбудителя чумы

Развитие молекулярной биологии определило возможность использования новых подходов к выяснению механизмов вирулентности и патогенеза у возбудителя чумы. Циркулируя между насекомыми и млекопитающими, бактерии чумы применяют несколько стратегий, чтобы выжить в макрофагах и быть готовым к формированию плёнок в организме блох. В том числе, они экспрессируют факторы вирулентности и использует чёткую регуляцию генов [Oyston P.C.F., Iserwood K. E., 2005]. Встреча с внутренней средой млекопитающих для микроба чумы является стрессом, и вынуждает микроб использовать все свои силы и возможности для выживания и размножения. Для изучения особенностей биологии микроорганизмов при взаимодействии с лабораторными животными в условиях *in vivo* предложено использовать культивирование в диффузионных камерах. Камеры, приготовленные из оргстекла, заполняют средой, близкой по составу плазме крови и инфицированной исследуемыми микроорганизмами. После чего их подшивают под кожу экспериментального животного. Через определённые сроки животных забивают, а размножившиеся в камере микробы исследуют. Обязательное условие эксперимента – наличие устойчивости микроба к нативной сыворотке крови [Илюхин В.И. и др., 1978; Day E.J. et al., 1980]. Описанные камеры использовались

применительно к чумному микробу с целью изучения особенностей фенотипа *in vivo* и изменения свойств на различных этапах инфекции [Саямов С.Р., 1984; Самойлова С.В. и др., 1989, 1990]. В последнее время на первый план в исследованиях вышло направление «от геномики к вирулентности».

Выше уже рассматривалась роль макрофагов в инфекционном процессе при взаимодействии с возбудителем чумы. Интересные данные были получены с помощью ряда молекулярно-биологических методов, в том числе многоступенчатой DNA-microarray. При изучении популяции mRNA разных генов хозяина после воздействия бактерий чумы было обнаружено увеличение активности около 20 генов макрофагов, участвующих в иммуногенезе и отвечающих за некоторые цитокины, энзимы цитокинов, рецепторы, лиганды, транскрипционные факторы, протеины, вовлекаемые в построение цитоскелета. Более того, среди них были также гены, отвечающие за деление клеток и регуляцию апоптоза. Экспрессию этих генов проверяли при взаимодействии макрофагов с бактериями чумы, выращенными при 28°C и 37°C. Исследование выявило два стиля поведения возбудителя чумы: внутриклеточный и внеклеточный. В обоих случаях доминировали внеклеточные бактерии. Однако при 37°C живых бактерий внутри клеток было в два раза меньше, чем вне их, тогда как при росте в условиях 28°C разница была незначительной. Активация 7 генов, которые играют значительную роль в клеточной пролиферации и анти-апоптозе, в большей степени была при внутриклеточной инфекции *Y.pestis*, свидетельствуя об их важности именно для такого пути распространения микроба. Более того, при внутриклеточной инфекции бактерии не продуцировали токсины, необходимые для убийства клеток хозяина. При внеклеточной инфекции *Y.pestis* целью патогена была гибель макрофагов, чтобы их элиминация привела к нарушению первой линии защиты хозяина. Активация хозяйских анти-апоптических генов, таким образом, может быть бактериальной стратегией, которая предохраняет инфицированные клетки от подверженности апоптозу, так что хозяин может функционировать как «заповедник для патогена» [Ng L.-Ch. et al., 2002].

Полезную информацию об экспрессии генов патогенности чумного микроба может дать сравнительное исследование у штаммов, выращенных на питательной

среде и в организме, тотальной РНК с помощью *s*-ДНК и real-time ПЦР [Wullf C., et al., 2006].

Об адаптации к условиям среды обитания, в том числе и к организму млекопитающего, свидетельствуют результаты изучения широкого геномного ответа на гиперосмотический и гипертонический солевой стрессы с помощью метода DNA-microarray. При гиперосмотическом стрессе наиболее высокая степень экспрессии была характерна для генов, ответственных за ABC-тип транспорта и накопление в цитоплазме некоторых полисахаридов, тогда как при гипертоническом солевом стрессе индуцировалась транскрипция генов, кодирующих протеины деления и некоторые общие транскрипционные регуляторы. Среди генов, чья транскрипция была повышенной при обоих типах стрессов, были те, которые кодировали осеопротективные транспортные системы и, что обращает на себя внимание, набор детерминант вирулентности. Число генов с пониженной регуляцией при двух типах стрессов было намного меньшим, чем с повышенной. Это наводило на мысль о том что, ни один из стрессов серьёзно не подавлял клеточные процессы, но индуцировал защитные и агрессивные факторы, связанные с вирулентностью. Функции многих отдельно регулируемых генов, в том числе их значимость для вирулентности, всё ещё не определены. Хотя бактерии *Y.pestis* распознавали солевой и гиперосмотический стрессы как разные виды воздействия внешней среды, и запускали различные механизмы защиты от этих двух видов стрессов, однако они включали и общие механизмы для адаптации к обоим видам стрессов. К этим механизмам, видимо, следует отнести и регуляцию некоторых детерминант вирулентности [Han Y. et al., 2005].

Определённые данные об участии различных генных продуктов в реализации вирулентности были получены с использованием протеомного (белкового) анализа при сравнении с помощью двухмерного разделяющего гельэлектрофореза белкового профиля бактерий *Y.pestis*, выращенных при 28° и 37°С, а также с ионами Ca^{2+} и без них (факторы имитирующие условия *in vivo*). В лизатах бактерий было обнаружено свыше 4100 протеиновых «пятен», многие из которых экспрессировались по-разному. Из них с помощью масс-спектрометрии были идентифицированы 24 уникальных протеина. Различия в экспрессии наблюдали и у некоторых протеинов,

связанных с вирулентностью: каталазы-пероксидазы (KatY), мышинового токсина (Ymt), активатора плазминогена (Pla), F1-капсульного антигена (Caf1), у нескольких предполагаемых факторов вирулентности, а также у некоторых белков, метаболических и связанных с мембраной. Отличающиеся по экспрессии белки, связь которых с вирулентностью ранее не описывалась, являются кандидатами для более детального исследования структуры и механизма действия, чтобы определить их потенциал как новых детерминант вирулентности [Chromy B.A. et al., 2005]. Протеомный анализ культур, выращенных в крови человека, культуре моноцитов U937 и на модели мышей [Roumagnac P. et al., 2006] также способствует уточнению и пониманию механизма патогенности и выбору лекарственных препаратов, направленных на наиболее чувствительные сайты микроб чумы, с целью излечения от этой инфекции.

Способы передачи чумы могут быть разные. Наиболее часто это происходит при укусе блохи и некоторых других эктопаразитов, или при вдыхании аэрозолей, содержащих бактерии возбудителя.

Хоботок блохи может ввести возбудителя или внутрикожно с последующим распространением по лимфатическим путям с образованием бубона, или внутрикапиллярно [Hinnebusch B.J., 2004]. Однако вместе со слюной в ранку попадают содержащиеся в ней иммуномодуляторные эффекторы, ингибирующие фагоцитоз, пролиферацию T-клеток и секрецию цитокинов [Schoelder G.B., Wikel S.K., 2001; Montgomery R.R. et al., 2004]. Изучение эффекта этих компонентов на ход экспериментальной инфекции во многом поможет более точно определить степень вирулентности исследуемых штаммов и прояснить некоторые этапы инфекции.

Наиболее изучены механизмы распространения и проявления инфекции при бубонной чуме. Септическая и первичная лёгочная чума изучены в меньшей степени. Септицемия конечная смертельная фаза заболевания. С целью идентифицировать гены, которые важны для проявления септической чумы у людей, были проведены первые этапы транскриптомного анализа высоковирулентного штамма *Y.pestis* CO92. Бактерии выращивали или в человеческой плазме, лишённой комплемента, или в LB среде, при 28°C или при 37°C, до середины экспоненциальной фазы роста и до стационарной. В человеческой

плазме обнаружили специфическую индукцию генов, вовлечённых в 12 систем, ответственных за сбор ионов железа, и одну систему, сохраняющую их (*bfr*-бактериоферритин и *bfd*-внутриклеточные). Среди индуцируемых выявлены *ybt* и *tonB* гены (кодирующие иерсиниобактериновый сидерофорный вирулентный фактор и сидерофорный транспортёр, соответственно). Они индуцировались при 37°C, т.е. в условиях, имитирующих среду организма млекопитающих. Выращивание в человеческой плазме повышало также регуляцию генов, участвующих в синтезе пяти структур, подобных фимбриям (включая Psa-фактор вирулентности), и имеющих отношение к метаболизму пуринов и пиримидинов (*nrd*-гены). В человеческой плазме гены чумного микроба, подобные тем, которые, как известно, играют роль в вирулентности некоторых бактериальных патогенов (кодирующие Lpp липопротеин и белки накопления других металлов, кроме железа) были индуцированы как в экспоненциальной, так и стационарной фазе. И, наконец, 120 генов, ответственных за синтез протеинов с неизвестной функцией, также усиливали свою регуляцию в плазме человека. У одиннадцати из этих генов транскрипция проходила специфически при 37°C. Возможно, они могут быть новыми факторами вирулентности, важными в период септической фазы чумы у людей [*Chauvaux S. et al., 2007*].

Хотя лёгочная чума является тяжёлой смертельной формой заболевания, к сожалению, имеется слишком мало информации о клеточных и молекулярных механизмах, ответственных за эту форму заболевания. Одной из попыток получить более полную информацию были исследования по характеристике лёгочной чумы на модели мышей, заражённых интраназально. Мыши заболевали гнойной мультилокусной тяжёлой экссудативной бронхопневмонией, которая напоминала заболевание, наблюдаемое у людей. Анализ выявил строго бифазный синдром, в котором инфекция начиналась с противовоспалительной фазы, длящейся первые 24-36 ч, а затем быстро прогрессировала в резко выраженную провоспалительную фазу до 48 ч и приводила к смерти на 3 сут. Для оценки адаптации *Y. pestis* к условиям внутри млекопитающих была использована DNA-microarray технология, позволяющая проанализировать транскрипционный ответ бактерий в процессе их взаимодействия с лёгкими мышей. Известно, что среди генов с повышенной

регуляцией *in vivo* имеются такие, которые вовлекаются в *uop-usc* систему секреции III типа, и гены, содержащиеся в хромосомном локусе пигментсорбции. При исследовании их с помощью DNA-microarray удалось подтвердить, что они являются локусами важными для вирулентности *Y. pestis* и показать адекватность использованного метода [Lathem W.W.et al., 2005]. Были получены данные, свидетельствующие о вовлечённости разных цитокинов в инфекционный процесс при его лёгочной локализации. Из данных в таблицы 8.3 видна различная роль этих иммунокомпетентных продуктов макроорганизма в заболевании и характер воздействия на них микроба-возбудителя.

Таблица 8.3
Уровень цитокинов в гомогенатах лёгких [Lathem W.W.et al., 2005]

Наименование цитокина	Уровень (ng/g ткани) $\pm P_{095}$ через			
	0 ч	24 ч	48 ч	72ч
IL-12p70	52 \pm 5	47 \pm 5	137 \pm 34	170 \pm 23
TNF	31 \pm 3	46 \pm 7	1031 \pm 251	1474 \pm 174
IFN	н/о	57 \pm 30	3715 \pm 977	2871 \pm 462
MCP-1	246 \pm 28	128 \pm 15	1099 \pm 350	22056 \pm 10939
IL10	н/о	н/о	н/о	1 \pm 1
IL6	40 \pm 11	505 \pm 293	21484 \pm 5786	126132 \pm 7015

Пояснение: н/о – не обнаруживается.

Результаты анализа транскриптом показали также, что при развитии чумной пневмонии у части хромосомных генов наблюдается активация экспрессии, у других, напротив, - ингибция. Наибольшая степень индукции с кратностью превышающей 100 наблюдали в отношении гипотетического гена, обеспечивающего энергетический обмен и транспорт электронов (в 111 раз). Увеличивался в 50 - 15 раз синтез (1) мембранных белков; (2) протеинов, связанных с транспортом; (3) белков биосинтеза аминокислот пироватного семейства; (4) белков, участвующих в синтезе и модификации макромолекул; (5) белков, связанных биосинтезом аминокислот семейства аспартата; (6) протеинов, связанных с транспортом карбогидратов, органики и алкоголя. Сведения о продуктах

упоминаемых генов и об их функциях детально приведены в цитируемой работе [Lathern W.W. et al., 2005], а кратко представлены в таблицах 8.4 и 8.5.

Таблица 8.4

Повышение уровня экспрессии хромосомных генов *Y.pestis* при лёгочной чуме белых мышей [по *Lathern W.W. et al., 2005*]

Гены	Кратность индукции генов				
	100	50-40	30-15	10-5	4-2
идентифицированные	-	-	ekgM ilvC lamB malB metA metF	cysJ cys P cru cdd enoA fla flg B flbA fliM glnD hisC ilvM livG met K metR metE metB nupC nirD pstC rnpA sepB	abc aceC aspB adeK ansB arcA bipA csdA cmr ccmC ccmA ccmD chlS cspB cutE cysK cysZ cyst cspa1 cspa2 dead ddg dctA dyl fadR fexA flk fyuA gapA genA gltB gltD glyA gptB hisA hisB hisG hisIE hisF hmpA hmpX hmsF hmsH hmsR hmsS holA hydN ilvD ilvE lvG ilvH ilvI irp1 irp2 irp4 irp5 irp6 irp7 irp8 irp9 lipB livH livF livK livJ livM lemA leuC map mdf metJ metL mobA mssB nitA ndh nirC oleR pdhR pncB potF potG psn psuA ptsI ptsL purF rbsK recRibA rnhB rho rpsA rpsM sapD sapF serA speA spoT ssyF tehB thiJ tndB treR trpC trpD trp140OA typA yacC ybeX ybtE ybtT ybtS ybtQ ybtP ybtX yecC yecS yfeA yidC znuA
гипотетические	YPO3001	YPO2782 YPO3607 YPO3966	YPO1187 YPO1343 YPO3135 YPO3798	YPO1184 YPO1344 YPO1316 YPO3887 YPO0261 YPO2443 YPO3803 YPO1517 YPO1576 YPO0465 YPO0426 YPO3071 YPO1516	YPO1244; YPO1072; YPO2976; YPO3498 YPO3484; YPO0932; YPO1011; YPO0448 YPO0473; YPO3910; YPO1069; YPO2460 YPO0854; YPO0862; YPO2360; YPO0042 YPO0131; YPO0284; YPO0063; YPO3139 YPO0417; YPO3966; YPO2449; YPO1084 YPO3340; YPO0250; YPO1941; YPO0988 YPO1345; YPO4409; YPO1943; YPO2592 YPO0434; YPO2040; YPO2262; YPO0163 YPO2974; YPO3881; YPO3336; YPO2348 YPO0286; YPO0449; YPO1411; YPO0190

Таблица 8.5

Снижение уровня экспрессии генов хромосомы *Y.pestis* при лёгочной чуме белых мышей [*Lathern W.W. et al., 2005*]

Гены	Кратность ингибиции синтеза			
	10-15	6-9	5-4	3-2
идентифицированные	psaA (pH6)	amn cspD cspH sdaC dcrA dada dadR aspA psaE psaB	araD cdh cstA cytR cybC fabB fabC fadD fadL glnH hdeD hisJ mglA ndk psaF rmf ttr yhbH	acpS argC asc asd atpB atpE atpF cdfA cfa cybA cybB dapD degP dpj fabA fadA fadB fadH fdoI feoA feoB flgF flgG frdB frdC frdD glnF gltA glut gmhA gsrA htrA icdB idnO katA katY lpcA metC mglB narP nifU ntrA oldA oldB oppA oppD osmB papD papF papH pdxJ rbsB rpoN sdhB sdhC sdhD sodB spr stilA sucA sucD tfrAtufA tufB uncB uncE uncF usg-1 uspA yfgD yqjD
гипотетические	YPO2674 YPO 4037 YPO3527	YPO3050 YPO1573 YPO2590 YPO3682 YPO2191 YPO3647 YPO1700 YPO2511 YPO1699 YPO1718	YPO2290 YPO2012 YPO3820 YPO3633 YPO3648 YPO1771 YPO0407 YPO1290 YPO0544 YPO1566 YPO3649 YPO1255 YPO2577	YPO0252; YPO0781; YPO0819; YPO0251; YPO0959; YPO1277; YPO1698; YPO1308; YPO1649; YPO1565; YPO1563; YPO0301; YPO3128; YPO3650; YPO0858; YPO2174; YPO1201; YPO1501; YPO2410; YPO3922; YPO3662; YPO3708; YPO2237; YPO3049; YPO2436; YPO0628; YPO0588; YPO2857; YPO2675; YPO1996; YPO2746; YPO1728; YPO0569; YPO0411; YPO3661; YPO2497; YPO2894; YPO2846; YPO0412; YPO3651; YPO0498; YPO2962; YPO2795; YPO3151; YPO2080; YPO2315

			YPO3048 YPO2233 YPO3681 YPO1572 YPO0409 YPO0424 YPO4064	
--	--	--	---	--

В отношении плазмидных штаммов интересно отметить, что на использованной модели лёгочной чумы белых мышей выявлялась индукция подавляющего большинства генов плазмиды Ca^{2+} -зависимости. Экспрессия исследованных четырех генов плазмиды pMT (pFra) с неизвестной функцией подвергалась 2-4-кратной ингибиции. Тестирование транскриптом генов плазмиды пестициногенности (pPst) показало заметное снижение экспрессии белка регулятора репликации плазмиды. Но особое внимание привлекает четырёхкратное снижение активности гена белка иммунности к пестицину и особенно 6-ти кратная ингибиция *pla*-гена активатора плазминогена. Неожиданна и ингибиция хромосомных *psa*-генов, связанных с синтезом антигена рНб.

Китайские исследователи выставили на сайте Интернета результаты нескольких работ [*Han Y. et al., 2005; и др.*] по транскриптному анализу, характеризующие активность более 4000 генов некоторых штаммов бактерий *Y. pestis* в зависимости от условий их обитания, а именно высокого осмотического давления и высоких концентраций солей, температуры выращивания 26°C и 37°C , при тепловом и холодном шоке, при воздействии перекиси водорода, кислой рН, элементов, влияющих на обмен железа, ионов Mg^{2+} , антибактериальных пептидов, некоторых антибиотиков. Определения проводили при выращивании на питательных средах разного состава и в различные фазы роста. Тщательный анализ полученных результатов в будущем представляется крайне информативным и «обещает» чрезвычайно интересные и важные выводы, касающиеся различных сторон биологии возбудителя чумы. Ценность сведений ещё более значима, что исследование проводили на модели некоторых типичных для биотипов штаммов чумного микроба и относительно тех свойств, которые тесно связаны с вирулентностью. Определение групп генов, меняющих свою регуляцию и *modus* взаимодействия в разных условиях, приближённых к системе *in vivo*, значительно приблизит нас к прояснению механизмов взаимодействия возбудителя чумы с его носителями. Данные этой работы и других, где используются возможности методов молекулярной биологии, могут дать много информации для понимания механизмов и тестирования вирулентности возбудителя чумы. Особенно полезными нам представляется их совмещение с биологическими методами и использованием

различных, в том числе мутантных, форм возбудителя. Эти же методы наверняка будут исключительно эффективными для сравнения патогенности эволюционно разделённых групп бактерий, составляющих вид *Y.pestis*.

Глава 9. Возбудитель чумы в свете дискуссий и гипотез

С.А. Лебедева, Ю.И. Арутюнов

Многие десятилетия специалисты заняты изучением возбудителя чумы и связанных с ним проблем. Однако ещё многое остаётся не ясным и требует изучения.

Анализ эпидемических проявлений чумы в мире с V в. до н.э. до XX в. н.э. показал, что они регистрировались почти каждое столетие («отсутствие» эпидемий связано с утратой документированных источников). Начиная с VI в. н.э. чуму в мире регистрировали постоянно. В течение каждого века отмечена неравномерность проявлений заболевания в мире. Рост числа заболевших начинался, как правило, в последние годы столетия, достигал максимума к середине и снижалось к концу века [*Kilbourne-Matossian M., 1986*].

Ежегодные данные ВОЗ и литературы о заболеваемости чумой на разных континентах и в разных странах мы представили в виде таблиц и кривых чтобы чётче высветить особенности флюктуации этого показателя. В сводной таблице 9.1 приведено число заболеваний в разных странах на разных континентах по данным отдельных публикаций. Показатели этой таблицы касаются только тех случаев чумы, которые охарактеризованы как не завозные. Данные свидетельствуют о различной степени поражения стран инфекцией. Более того, для некоторых из них типично постоянство уровня заболеваемости (Мадагаскар, Демократическая республика Конго - в Африке; Боливия, Перу, Бразилия, США - в Америке; Мьянма, Вьетнам в Азии. В то же время для других стран более характерна периодичность заболевания с малым или большим интервалом. Однажды появившись, она может регистрироваться на протяжении определённого периода, достигая пика, затем наблюдается спад, и чума исчезает на неопределённое время. Такое явление имело место в Африке в Мозамбике (1976-78), Намибии (1961-63, 1974, 1999 гг.), Уганде, Замбии. То же наблюдали в Южной Америке – в Эквадоре, Колумбии, Венесуэле; в Азии – в Индонезии, Непале, Иране. Полностью эти сведения не соответствуют данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), приведенным ниже в виде таблиц и схем, что, к сожалению, отражает некоторые дефекты способов учёта. Отчасти подобное явление можно объяснить недостаточным вниманием

специалистов к обследованию природных очагов чумы, нехваткой специалистов, а также нежеланием «демонстрировать» наличие заболеваний, особенно, если число их незначительно. Приходится считаться также с тем, что даже заявленная заболеваемость в ряде случаев не отражает полноты действительной ситуации. Тем не менее, остаётся загадкой ситуация «молчащих» очагов (межэпизоотический, межэпидемический периоды), когда на протяжении ряда лет (иногда десятилетий) чума себя никак не проявляет, хотя социальные факторы в стране существенно не меняются.

В таблице 9.2 приведены сведения о колебании заболеваемости по отношению к максимуму заболеваний индивидуально на каждом континенте по годам. На рисунке 9.1. совмещены эти индивидуальные кривые, что даёт возможность сопоставить их у разных континентов. Наглядна альтернативность расположения максимумов заболеваний чумой в Азии и Африке с интервалом в 30 лет. И колебания числа заболеваний с интервалом в 10 лет на Американских континентах. В таблице 9.3 и на рисунке 9.2 представлены данные ВОЗ, характеризующие «вклад» каждого континента в общую заболеваемость чумой в мире. Видно, что в 1960-65 году основная доля заболеваний людей чумой зарегистрирована в странах Азии и Америки. На азиатском континенте она оставалась определяющей до 1980 г. Наметившийся в 1979 г. рост заболеваемости чумой в Африке с 1983 г. стал преобладающим в мире вплоть до 2003 г. При «смене» континентов, в 1981 г., основная заболеваемость определялась ростом числа больных на американском континенте.

Согласно регулярной информации ВОЗ с 1984 по 2003 и отрывочной с 2004 по 2006, лёгочную чуму не регистрировали с 1970 по 1990 гг. Наиболее активно лёгочная форма проявляла себя в Африке (Конго-5 случаев), Азии – 3 случая, Америке – 1 случай. За последние годы заболеваемость чумой в мире возросла и эта проблема, по мнению специалистов, при современном образе жизни человечества касается всего мирового сообщества, а не только стран эндемичных по чуме [Топорков В.П. и др., 2007, 2008].

К сожалению, ВОЗ перестала регулярно информировать национальные органы здравоохранения о числе заболевших бубонной чумой в мире, на континентах и в

отдельных странах, поэтому анализ заболеваемости чумой, а тем более её прогнозы, стали невозможны.

Таблица 9.1

Заболееваемость чумой в разных странах по годам (не завозные случаи)

Страны		Годы								
		1959	1960	1961	1962	1963	1964	1965	1966	1967
А Ф Р И К А	Экв.Гвинея									
	Верх.Вольта								1	
	Камерун			1						
	Ботсвана									
	Конго(ДР)	12	26	6	1	5		16	8	7
	Кения	12	36	3	2	2			-	1
	Мадагаскар	5	6	4	28	10	10	32	9	10
	Малави					30				
	Мозамбик									
	Намибия			9	80	4			-	-
	Уганда	2								
	Танзания				2			1	-	-
	Замбия									
	Зимбабве								-	-
	Алжир									
	Ангола									
	Ливан(Ливия)								-	-
ЮАР	10	1	1	4	-				-	
Лесото								-	-	
А М Е Р И К А	Боливия		12	20	-	53	-	149		
	Бразилия	16	28	106	36	39		119		
	Эквадор	40	77	139	326	258		374		
	Перу	33	139	68	164	72		200		
	США	4	2	3	-	1		8		
	Колумбия					8				
	Венесуэла			6	1					
А З И Я	Китай									
	Индия	34?	122		697	204		14		
	Индонезия	18	5	1						
	Казахстан									
	Лаос			6						
	Монголия			3						
	Мйанма	21	22	4	49	34		36		
	Вьетнам		14		29	116		377		
	Кампучия									
Непал			9							
Иран					26					

Пояснение: «-» сообщалось об отсутствии заболеваний; пустая графа – сообщения о наличии заболеваний не было

Продолжение №1 таблицы 9.1

Страны		Годы								
		1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976
А Ф Р И К А	Экв.Гвинея		49	3						
	Верх.Вольта									
	Камерун									
	Ботсвана							-	-	-
	Конго(ДР)	128	68	16	3	8	30	-	1	12
	Кения	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Мадагаскар	28	26	8	17	63	20	38	55	47
	Малави						-	-	-	-
	Мозамбик		-	-	-		-	-	-	15
	Намибия	-	-	-	-	-	-	102	-	-
	Уганда						-	-	-	-
	Танзания	6	2	-	-	32	-	-	-	-
	Замбия						-	-	-	-
	Зимбабве	-	-	-	-	-	-	23	34	-
	Алжир						-	-	-	-
	Ангола	-	-	-	-	-	-	-	49	-
	Ливан(Ливия)	-	-	-	-	16	-	-	-	(19)
ЮАР	2	-	-	-	1	-	-	-	-	
Лесото	57	2	-	-	8	-	-	8		
А М Е Р И К А	Боливия	35	95	54	19			14	2	24
	Бразилия	285	293	101	146	169	152	291	496	97
	Эквадор	24	23	30	27	9	1	-	-	8
	Перу	45	8	128	22	118	30	8	3	1
	США	3	5	13	2	1	2	8	20	16
	Колумбия									
	Венесуэла									
А З И Я	Китай						
	Индия									
	Индонезия	102	-	10	-		-	-	-	-
	Казахстан									
	Лаос									
	Монголия									...
	Мьянма	86	32	43	189	63	17	700	275	673
	Вьетнам	4194	3850	4056	3997	1340	425	1552	536	593
	Кампучия		-	-	-	5	1			
	Непал	13								
Иран										

Продолжение №2 таблицы 9.1

Страны		Годы								
		1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985
А Ф Р И К А	Экв.Гвинея									
	Верх.Вольта									
	Камерун									
	Ботсвана	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Конго (ДР)	4	-	1	-	-	-	-	-	-
	Кения	-	166	227	5	-	-	-	-	-
	Мадагаскар	58	25	23	11	44	38	24	39	85
	Малави	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Мозамбик	97	12	-	-	-	-	-	-	-
	Намибия	-	-	-	-	-	-	-	-	355
	Уганда	-	-	-	-	-	153	-	-	-
	Танзания	2	-	-	49	9	76	569	603	129
	Замбия	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Зимбабве	-	-	-	-	-	3	1	-	1
	Алжир	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ангола	-	-	-	21	6	-	-	-	-
Ливан(Ливия)	(11)	-	-	-	-	-	-	8	-	
ЮАР	-	-	-	-	-	19	-	-	-	
Лесото				-	-					
А М Е Р И К А	Боливия	29	68	10	26	21	1	21	12	-
	Бразилия	1	11	-	98	59	151	82	37	64
	Эквадор	1	-	-	-	8	-	65	7	3
	Перу	-	6	-	-	27	11	17	413	44
	США	18	12	13	18	13	19	40	31	17
	Колумбия									
	Венесуэла									
А З И Я	Китай	8	30	1	-	25	-	6
	Индия	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Индонезия	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Казахстан
	Лаос	-	-	-	-	-	-	-	-	...
	Монголия	2	1
	Мьянма	591	171	73	73	1	165	96	10	35
	Вьетнам	667	3014	306	180	11	116	127	196	137
	Кампучия									
	Непал									
Иран										

Продолжение №3 таблицы 9.1

Страны		Годы								
		1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994
А Ф Р И К А	Экв.Гвинея									
	Верх.Вольта									
	Камерун									
	Ботсвана	-	-	-	103	70	-	-	-	-
	Конго(ДР)	-	474	369	1	-	289	390	636	82
	Кения	-	-	-	-	44	-	-	-	-
	Мадагаскар	29	23	93	170	226	137	198	147	126
	Малави	-	-	-	-	-	-	-	-	9
	Мозамбик	-	-	-	-	-	-	-	-	216
	Намибия	371	146	31	116	169	1092	458	42	4
	Уганда	340	-	-	-	-	-	-	167	-
	Танзания	360	356	647	31	364	1293	16	18	444
	Замбия		1	-	-	-	-	-	-	-
	Зимбабве		-	-	-	-	-	-	-	392
	Алжир		-	-	-	-	-	-	-	-
	Ангола		-	-	-	-	-	-	-	-
Ливан(Ливия)		-	-	-	-	-	-	-	-	
ЮАР		-	-	-	-	-	-	-	-	
Лесото			-	-	-	-	-	-	-	
А М Е Р И К А	Боливия	94	2	2	-	10	-	-	-	-
	Бразилия	58	43	25	26	18	10	25	-	4
	Эквадор	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Перу	-	31	10	-	18	-	120	611	420
	США	10	12	15	4	2	11	13	10	14
	Колумбия									
	Венесуэла									
А З И Я	Китай	8	7	6	10	75	29	35	13	7
	Индия	-	-	-	-	-	-	-	-	876
	Индонезия	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Казахстан	2	4	1	-	3	-
	Лаос
	Монголия	5	15	3	12	21	-
	Мьянма	6	5	8	34	6	100	528	87	6
	Вьетнам	104	107	196	374	405	94	437	481	339
	Кампучия									
	Непал									
Иран										

Продолжение №4 таблицы 9.1

Страны		Годы								
		1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003
А Ф Р И К А	Экв.Гвинея									
	Верх.Вольта									
	Камерун									
	Ботсвана	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Конго (ДР)	582	-	-	95	90	371	509	798	1032
	Кения	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Мадагаскар	1147	1629	2863	1473	1304	1333	804	658	933
	Малави	-	-	582	-	74	-	-	242	-
	Мозамбик	-	-	825	430	316	451	73	45	31
	Намибия	-	-	-	-	131	-	-	-	-
	Уганда	-	-	-	49	-	202	319	60	24
	Танзания	831	947	504	286	420	74	2	19	-
	Замбия	-	-	319	-	-	-	850	-	-
	Зимбабве	-	-	8	8	9	-	-	-	-
	Алжир	-	-	-	-	-	-	-	-	11
	Ангола	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ливан(Ливия)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ЮАР	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Лесото	-	-			-			-		
А М Е Р И К А	Боливия	-	26	1	-	-	-	-	-	-
	Бразилия	9	1	-	4	6	2	-	-	-
	Эквадор	-	-	-	14	-	-	-	-	-
	Перу	97	23	39	1	22	17	10	2	-
	США	9	5	4	9	9	6	2	2	1
	Колумбия									
	Венесуэла									
А З И Я	Китай	8	98	43	...	16	25	79	68	13
	Индия	-	-	-	-	-	-	-	16	-
	Индонезия		-	6	-	-	-	-	-	-
	Казахстан	-	-	1	-	7	-	2	1	3
	Лаос	7	3	-	-	-	-	-	-	-
	Монголия	1	6	4	10	4	10	8	6	10
	Мьянма	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Вьетнам	170	279	220	85	195	22	13	8	-
	Кампучия	5	1							
	Непал									
Иран										

Общее число случаев чумы в мире по данным ВОЗ

Континент	Общее число случаев чумы на континентах по годам (абс. и %)										
	1959	1960	61	62	63	64	65	66	67	68	69
Африка	41	69	24	124	49	524	49	18	18	221	147
% от макс. 1997	0,8	1,4	0,5	2,5	1	10,5	1	0,3	0,3	4,3	2,9
Сев. Америка	4	2	3	-	1	-	8	-	-	3	5
% от макс. 1983	10	5	7,5	-	2,5	-	20	-	-	7,5	12,5
Юж. Америка	89	256	300	527	422	653	837	897	223	389	419
% от макс. 1966	10	28,5	34,4	58,3	47	72,8	93, 3	100	24,9	43,4	46,7
Азия	73	163	453	788	354	515	432	2903	5763	4395	3882
% от макс. 1967	1,3	2,8	7,8	13,7	6,1	8,9	7,5	50,4	100	76,3	67,4

Продолжение № 1 таблицы 9.2

Континент	Общее число случаев чумы на континентах по годам (абс. и %)										
	1970	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Африка	27	20	128	50	183	147	93	172	203	251	86
% от макс. 1997	0,5	0,4	2,5	1	3,6	2,9	1,8	3,4	4	4,9	1,7
Сев. Америка	13	2	1	2	8	20	16	18	12	13	18
% от макс. 1983	32,5	5	2,5	5	20	50	40	45	30	32, 5	45
Юж. Америка	313	214	296	183	313	501	130	30	85	10	12 4
% от макс. 1966	34,9	23,9	33	20,4	34,9	55,8	14,5	3,3	9,5	1,1	13, 9
Азия	4109	4186	1408	443	2252	811	1266	1258	485	387	28 5
% от макс. 1967	71,3	72,6	24,4	7,7	33,1	14,1	22	21,8	8,4	6,7	4,9

Продолжение № 2 таблицы 9.2

Континент	Общее число случаев чумы на континентах по годам (абс. и %)										
	1981	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91
Африка	59	290	594	650	570	1100	1000	1140	421	873	2761
% от макс. 1997	1,2	5,8	11,9	13	11,4	22	20	22,8	8,4	17, 5	55,2
Сев. Америка	13	19	40	31	17	10	12	15	4	2	11
% от макс. 1983	32,5	47,5	100	77,5	42,5	25	30	37,5	10	5	27,5
Юж. Америка	115	163	185	469	111	152	76	37	26	46	10
% от макс. 1966.	12,8	18,1	20,6	52,3	12,4	16,9	8,5	4,1	2,9	5,1	1,1
Азия	13	281	248	206	179	118	119	210	425	505	227
% от макс. 1967.	0,2	4,9	4,3	3,6	3,1	2	2,1	3,6	7,4	8,8	3,9

Продолжение № 3 таблицы 9.2

Континент	Общее число случаев чумы на континентах по годам (абс. и %)											
	1992	93	94	95	96	97	98	99	00	01	02	03
Африка	1062	1010	1273	2560	2576	5101	2341	2344	2431	2557	1822	2091
% от макс. 1997	20,8	19,8	25	50,2	50,5	100	45,9	46	47,7	50	35,7	41
Сев.Аме рика	13	10	14	9	5	4	9	9	6	2	2	1
% от макс. 1983	32,5	25	35	22,5	12,5	10	22,5	22,5	15	5	5	2,5
Юж.Аме рика	145	611	424	106	50	40	19	28	19	10	2	-
% от макс. 1966	16,1	68,1	47,3	11,8	5,6	4,5	2,1	3,1	2,1	1,1	0,2	-
Азия	1012	605	1229	186	386	274	95	222	57	102	99	26
% от макс. 1967	17,6	10,5	21,3	3,2	6,7	4,6	1,6	3,9	1	1,8	1,7	0,5

Таблица 9.3

**Распределение мирового уровня заболеваемости чумой по годам и континентам
(данные ВОЗ)**

Континент	Общее число случаев чумы по годам (абс., %)										
	1959	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69
Африка	41	69	21	124	49	524	49	18	18	221	147
<i>%мир. уровня</i>	<i>19,8</i>	<i>14,1</i>	<i>2,7</i>	<i>8,6</i>	<i>5,9</i>	<i>32,4</i>	<i>3,7</i>	<i>0,5</i>	<i>0,3</i>	<i>4,4</i>	<i>3,3</i>
Сев. Америка	4	2	3	-	1	-	8	-	-	3	5
<i>%мир. уровня</i>	<i>1,9</i>	<i>0,4</i>	<i>0,4</i>	<i>-</i>	<i>0,1</i>	<i>-</i>	<i>0,6</i>	<i>-</i>	<i>-</i>	<i><0,1</i>	<i>0,1</i>
Юж. Америка	89	256	300	527	422	653	837	897	223	389	419
<i>%мир. уровня</i>	<i>43</i>	<i>52,2</i>	<i>38,6</i>	<i>36,6</i>	<i>51,1</i>	<i>38,6</i>	<i>63</i>	<i>23,5</i>	<i>3,7</i>	<i>7,8</i>	<i>9,4</i>
Азия	73	163	453	788	354	515	432	2903	5763	4395	3882
<i>%мир. уровня</i>	<i>35,2</i>	<i>33,3</i>	<i>58,3</i>	<i>54,8</i>	<i>42,9</i>	<i>29</i>	<i>32,6</i>	<i>76</i>	<i>96</i>	<i>87,2</i>	<i>82,7</i>
Всего в мире	2071	490	780	1439	826	1692	1326	3818	6004	5008	4453
Число стран	12	13	16	13	15	??	11	??	??	14	13

Продолжение № 1 таблицы 9.3

Континент	Общее число случаев чумы по годам (абс., %)										
	1970	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Африка	27	20	128	50	183	147	93	172	203	251	86
<i>%мир. уровня</i>	<i>0,6</i>	<i>0,4</i>	<i>7</i>	<i>7,4</i>	<i>6,6</i>	<i>9,9</i>	<i>6,2</i>	<i>11,7</i>	<i>25,9</i>	<i>38</i>	<i>16,7</i>
Сев. Америка	13	2	1	2	8	20	16	18	12	13	18
<i>%мир. уровня</i>	<i>0,3</i>	<i><0,1</i>	<i><0,1</i>	<i>0,3</i>	<i>0,3</i>	<i>1,3</i>	<i>1,1</i>	<i>1,2</i>	<i>1,5</i>	<i>2</i>	<i>3,5</i>
Юж. Америка	313	214	296	183	313	501	130	30	85	10	124
<i>%мир. уровня</i>	<i>7</i>	<i>4,8</i>	<i>16,1</i>	<i>27</i>	<i>11,4</i>	<i>33,9</i>	<i>8,6</i>	<i>2</i>	<i>10,8</i>	<i>1,5</i>	<i>24,2</i>
Азия	4109	4186	1408	443	2252	811	1266	1258	485	387	285
<i>%мир. уровня</i>	<i>82,1</i>	<i>94,7</i>	<i>76,8</i>	<i>65,3</i>	<i>81,8</i>	<i>54,9</i>	<i>84,1</i>	<i>85,1</i>	<i>61,8</i>	<i>56,3</i>	<i>55,6</i>
Всего в мире	4462	4422	1833	678	2756	1479	1505	1478	785	661	513
Число стран	11	9	13	9	9	11	11	11	9	8	11

Продолжение № 2 таблицы 9.3

Континент	Общее число случаев чумы по годам (абс., %)										
	1981	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91
Африка	59	290	594	650	570	1100	1000	1140	421	873	2761
%мир. уровня	29,5	38,5	55,7	47,9	65	79,7	82,9	81,3	48,1	61,2	91,7
Сев. Америка	13	19	40	31	17	10	12	15	4	2	11
%мир. уровня	6,5	2,5	3,7	2,3	1,9	0,7	1	1,1	0,5	0,1	0,4
Юж. Америка	115	163	185	469	111	152	76	37	26	46	10
%мир. уровня	57,5	21,6	17,3	34,6	12,7	11	6,3	2,6	2,9	3,2	0,3
Азия	13	281	248	206	179	118	119	210	425	505	227
%мир. уровня	6,5	37,3	23,2	15,2	20,4	8,6	9,8	15	48,5	35,4	7,6
Всего в мире	200	753	1067	1356	877	1380	1207	1402	876	1426	3009
Число стран	11	11	11	10	12	10	12	11	12	14	11

Продолжение № 3 таблицы 9.3

Континент	Общее число случаев чумы по годам (абс., %)											
	92	93	94	95	96	97	98	99	00	01	02	03
Африка	1062	1010	1273	2560	2576	5101	2341	2344	2431	2557	1822	2091
%мир. уровня	47,6	45,2	43,3	89,5	85,4	94,1	95	90,1	96,7	95,7	94,7	98,7
Сев. Америка	13	10	14	9	5	4	9	9	6	2	2	1
%мир. уровня	0,6	0,4	0,5	0,3	0,2	0,1	0,4	0,3	0,2	0,1	0,1	<0,1
Юж. Америка	145	611	424	106	50	40	19	28	19	10	2	-
%мир. уровня	6,5	27,3	14,4	4	1,7	0,7	0,8	1,1	0,8	0,4	0,1	-
Азия	1012	605	1229	186	386	274	95	222	57	102	99	26
%мир. уровня	45,3	27	41,8	6,5	12,8	5,1	3,8	8,5	2,3	3,8	5,1	1,2
Всего в мире	2232	2236	2940	2861	3017	5419	2464	2603	2513	2671	1925	2118
Число стран	11	12	14	10	10	14	12	11	11	12	13	9

Рис 9.1. Индивидуальные колебания заболеваемости чумой на отдельных континентах по годам

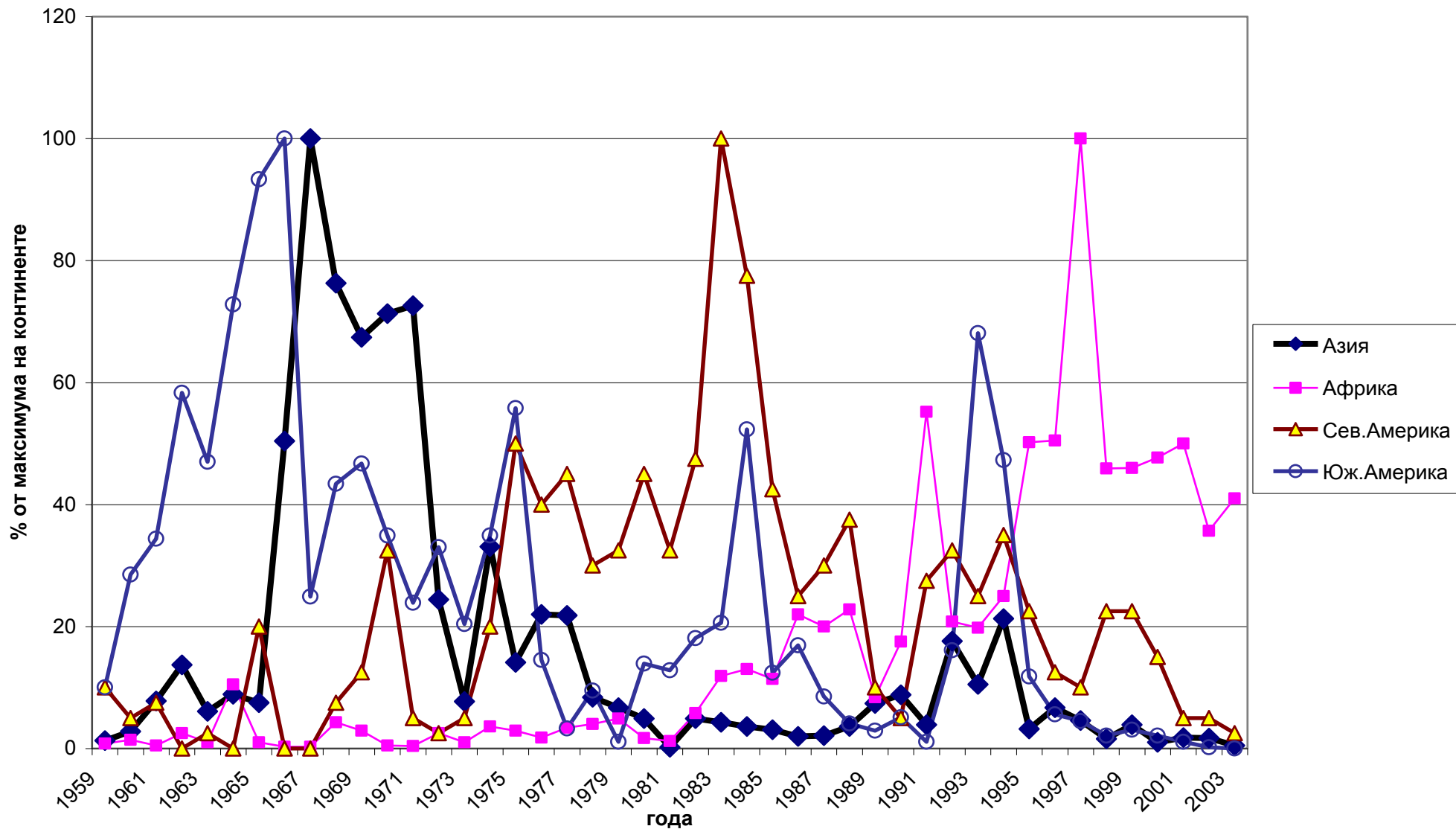
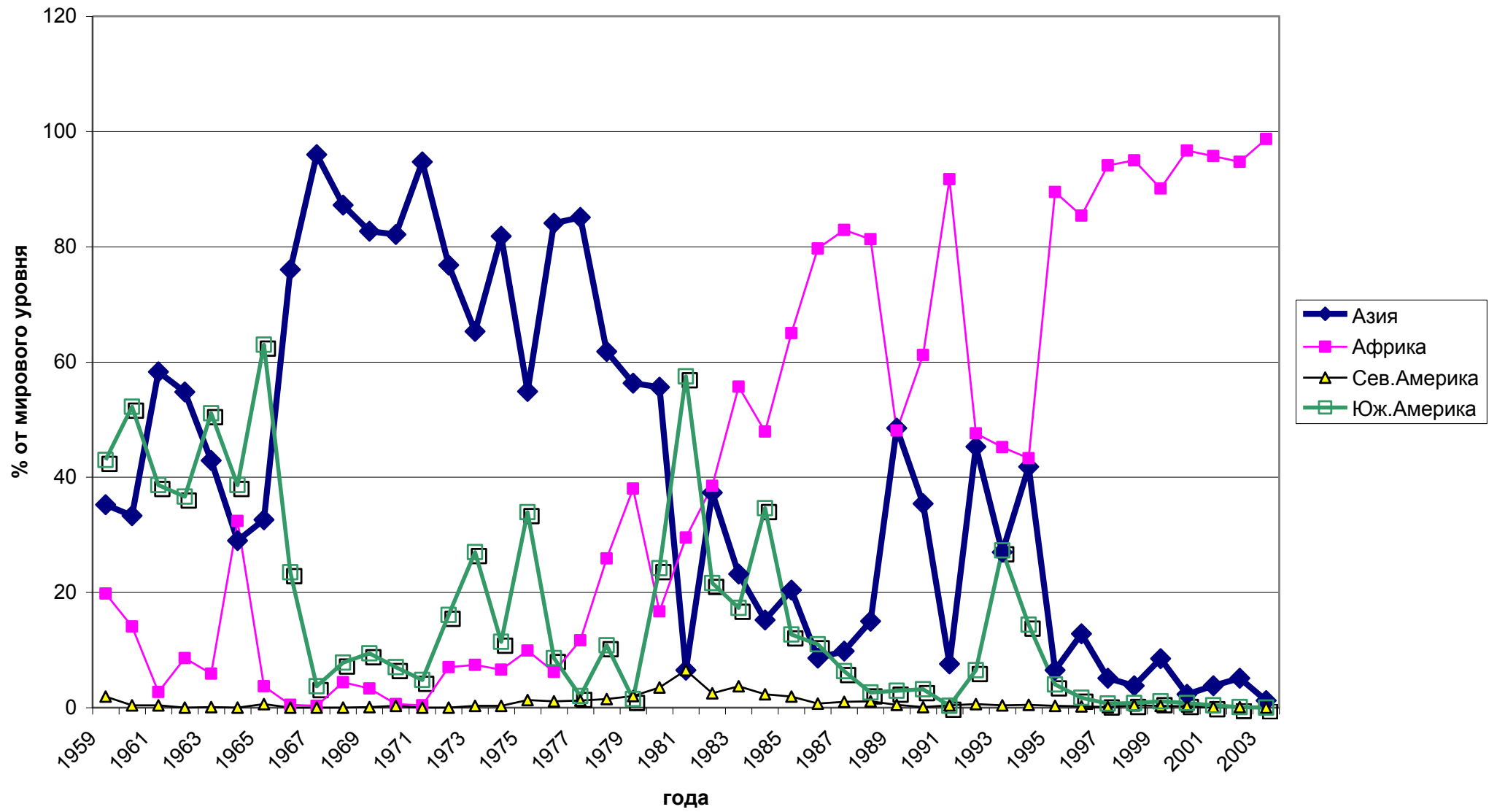


Рис 9.2. Распределение мирового уровня заболеваемости чумой по годам и континентам



Сожаление это вызывает ещё и потому, что в последнее время проводятся активно работы, в которых на основе данных эпидемиологического анализа уровня заболеваний чумой, изучения феноменологии и фактов, и в целях оперативного получения информации о динамике эпидемий разработаны математические и компьютерные программы по созданию моделей развития эпидемического процесса при чуме в чрезвычайных ситуациях природного и техногенного характера, позволяющие оперативно оценивать обстановку, эффективность проводимых мероприятий и возможный экономический ущерб [*Лопатин А.А., Куклев Е.В., 2007*].

Повышение заболеваемости чумой и увеличение числа поражённых стран всегда и практически синхронно начинались на территориях, где имеются природные очаги. На синхронность появления не влияли удалённость стран друг от друга (Юго-Восточная, Средняя, Юго-Западная Азия, Северо-Восточная Африка, Восточная Европа), отсутствие между ними торговых и иных связей, различия государственного устройства, особенности быта и социального уровня населения [*Кокушкин А.М., 1995, 1997*]. Подобное явление невозможно объяснить исключительно влиянием социального фактора.

В литературе неоднократно поднимались вопросы о причине «исчезновения» возбудителя чумы из природного очага на длительное время (межэпизоотические периоды разной продолжительности), последующего проявления эпизоотий одновременно на разных участках природного очага или в нескольких очагах, не связанных территориально. Вызывает удивление некоторая цикличность эпизоотических проявлений чумы в природных очагах [*А.И. Дятлов, 1989*]. Длительное отсутствие осложнений зарегистрировано в Северном Иране, природные очаги которого в 1950-е годы служили полигоном для изучения закономерностей циркуляции и существования возбудителя чумы в природе. После продолжительного «молчания» зарегистрированы заболевания людей в Индии (1994 г.), в Алжире (2003 г). Спустя 12 лет после последних осложнений чума у людей была зарегистрирована в Эквадоре (1996 г.), а в Намибии (1999 г.), Мозамбике (1994 г.) и Заире (1993 г.) спустя 5-6 лет после предыдущих проявлений. Эти вопросы длительное время оставались без ответа. Предлагалось много гипотез для

объяснения механизма таких флюктуаций активности очагов и заболеваний людей. Некоторые не состоялись и были забыты. Другие обсуждаются, и ведутся поиски доказательств их состоятельности.

Ниже мы приводим некоторые из существующих гипотез, требующих внимательного и критического восприятия и специальных исследований.

9.1. Состояние вопроса по изучению механизма сохранения возбудителя чумы в межэпизоотические годы

Вопрос о сохранении возбудителя в природных очагах обсуждается давно, особенно в отношении продолжительных межэпизоотических периодов. Особый интерес представляют ситуации, когда в довольно близко расположенных очагах длительность интервалов между эпизоотиями резко отличается: в одном - эпизоотии регистрируются почти ежегодно, а в другом - с интервалом в несколько лет. Неясность механизмов, определяющих такие флюктуации, затрудняет прогнозирование заболеваемости, эпидемических осложнений и планирование эффективных профилактических мероприятий [Акиев А.К., 1970; Солдаткин И.С., Руденчик Ю.В., 1995]. В дискуссиях относительно этих механизмов рассматривают различные факторы [Кондрашкина К.И. и др., 1976].

Большее предпочтение отдаётся существованию чумы в микроочагах, разделённых достаточно большими расстояниями, чтобы исключить возможность перекрёстной миграции грызунов и инфицированных эктопаразитов. Здесь же обсуждается и возможность мигрирующей чумы, «блуждающей» между этими очагами без формирования сплошных эпизоотий. Долгое время обсуждалась теллурическая чума, при которой возбудитель обитает и выживает в почве. Эта гипотеза поддерживалась многими специалистами и существовала долгое время. Однако до сих пор не получены убедительные данные при наблюдении за возбудителем чумы в природе. Хотя в лабораторных условиях подобный процесс воспроизводили, однако во всех случаях отмечали постепенное отмирание микроба. Впервые мнение о теллурической чуме сформировалось после выделения культур из почвы через 7, 11 и 19 мес после окончания эпизоотий [Baltazard M., 1964]. Других описаний столь длительного сохранения возбудителя в почве не было. В лабораторных условиях при заражении почвы культурой возбудителя чумы он

сохранялся от 215 до 1700 сут [Тимофеева Л.А. и др., 1966; Клец Э.И., Щекунова З.И., 1961]. В настоящее время нет убедительных данных ни у сторонников «теллурической» чумы, ни у противников. Вероятно, сама по себе почва не может быть субстратом, полностью обеспечивающим жизнедеятельность микроба чумы, но она может быть составной частью экосистемы, где микроб, взаимодействуя с сочленами этого сообщества, персистирует в сменяющихся друг друга формах как типичных, атипичных, так и скрытых от диагностики. Во всяком случае, на уровне атипичных форм микроба существование его в непаразитарной форме специалистами допускается, а точнее, не отрицается.

Признавая существование возбудителя только в паразитарной форме, неизбежно следует допустить, как обязательное звено, затяжную латентную чуму или длительное сохранение в блохе, в клещах в виде изменённых, в том числе «некультивируемых» форм микроба. Но обязательно в этом случае функционирование цепи грызун-переносчик-грызун. С проявлением в значительном числе случаев разрешающей формы. Обычно в природе не удаётся обнаружить зверьков с затяжной формой ни в конце эпизоотии, ни в межсезонье, хотя лабораторные заражения дают такую картину [Галузо И.Г. и др, 1951; Шварц Е.А., Шиляев Л.Ф., 1963]. Однако в некоторых случаях это удаётся [Плетнёва Н.А., 1958; Котурга Л.Н., 1969]. Всё-таки следует отметить, что большинство исследователей до настоящего времени к затяжной форме чумы у грызунов относятся сдержанно. Причиной может быть недостаточная эффективность диагностических приёмов по отношению к изменённым формам чумного микроба, которые появляются при сохранении вида в условиях, исключающих паразитарный образ жизни возбудителя (бесфракционные варианты, слабовирулентные, находящиеся при носительстве в инкапсулированном состоянии в селезёнке, печени, а также в виде L-форм и, похоже, в некультивируемом состоянии).

Затяжная форма чумы возможна не только при циркуляции возбудителя *a priori* находящегося в атипичной форме. Известно наличие общих антигенов у *Y.pestis* и возбудителей других инфекционных заболеваний. При контакте грызунов с ними может возникать определённая степень снижения восприимчивости к чуме. Как это, например, показано на примере 17 кД неспецифического гликопротеина,

выделенного из чумного микроба вместе с капсульным белком и характерного для некоторых видов сем. *Enterobacteriaceae*. Этот гликопротеин способен обеспечивать «немедленную» защиту против чумы, а также индуцировать иммунную перестройку макроорганизма [Коссе Л.В., 1998; Лебедева С.А. и др., 2006]. Описана способность возбудителя псевдотуберкулеза обеспечивать выраженный иммунитет к чуме, в том числе и к лёгочной [Колесник Р.С. и др., 1968], и широко известна циркуляция этих двух иерсиний в одних и тех же очагах. Так что появление в очаге особей носителей с меньшей, чем обычно, чувствительностью к чуме вполне реально. Иммунные животные при заражении чумой могут быть невосприимчивыми или заболеть в хронической форме, при этом возможно как выздоровление, так и гибель в отдалённые сроки, превышающие 250 сут. [Хрущелевская В.П., Хрущелеская Н.М., 1968]. До сих пор нет данных о заражении в эксперименте через блох, предварительно кормившихся на животных с затяжной формой чумы. Однако в качестве переносчика в этом случае нельзя исключить клещей, насасывающих большее количество крови, следовательно, и возбудителя. Доказано, что антиген *F1* в клещах определяется спустя 6 лет после окончания эпизоотии [Соколов Н.П. и др., 1992]. Трудно предположить, что антиген сохраняется столь длительное время в организме насекомого или в мёртвых бактериях. Более вероятно, что он продуцируется жизнеспособным возбудителем, находящимся в биологически активном состоянии, скорее всего в изменённой форме, но способной к синтезу этого антигена. Исследование данного феномена, особенно с точки зрения сохранения возбудителя в длительные периоды между эпизоотиями, представляется актуальным.

С другой стороны, не обязательно формирование блока преджелудка блох. Существует и алиментарный путь заражения связанный с некрофагией, а также с употреблением воды и продуктов, контаминированных заражённой мочой и фекалиями больных грызунов, подобно тому, как это имеет место при туляремии [Тарасов М.П., 1979]. Известно, что при таком пути распространения чумной инфекции возможны как хронические формы заболевания, так и носительство [Дорожко О.В., 1975; Дорожко О.В. и др., 1976]. Уместно добавить, что при хроническом течении инфекции из разных органов можно выделить культуры

возбудителя чумы, обладающие резко отличающимся уровнем вирулентности [Хрущелевская В.П., Хрущелевская Н.М., 1968]. Не достаточно изучена возможность передачи скрытой формы чумы, способной обеспечивать сопутствующую иммунизацию и пассивный иммунитет, от грызунов к потомству с последующим носительством возбудителя. Данные об обострении течения чумы у беременных самок [Бибикова В.А., Хрущелевская Н.М., 1965] свидетельствуют, что такая ситуация мало вероятна, но сведений, полностью отрицающих такую возможность, пока не представлено. В то же время не вызывают сомнения существование сезонного межэпизоотического периода с сохранением возбудителя в природном очаге. Оно реально и может быть обеспечено как зимоспящими грызунами, так и блохами у спящих и не спящих носителей [Тинкер И.С., Иофф И.Г., 1951; Бибилов Д.И., 1961; Шарец А.С. и др., 1958; Шварц Е.А., Шилев Л.Ф., 1963; Бондаренко М.Ф., 1963; Гауштейн Д.М. и др., 1967; Инжеватова М.В., 1968; Акиев А.К. и др., 1968].

Теория микроочагового сохранения нашла подтверждение в некоторых работах [Иофф И.Г. и др., 1951; Некипелов Н.В. 1962]. Было прослежено сохранение чумы в микроочагах северо-восточного Прикаспия в течение 5-6 лет [Тинкер И.С. и др., 1959; Постникова Г.Б., 1965 и др.]. Можно считать, что микроочаговость в межэпизоотический период – доказанная реальность. Но каков её вклад в проблему длительных межэпизоотических перерывов при полном отсутствии фактов выделения культур возбудителя в исследуемых объектах – вопрос, требующий ответа. Трудности выявления возбудителя имеют место в том случае, если условий для образования «очажков» нет из-за депрессии популяций носителей в связи с неблагоприятными условиями. Это приводит к большой разреженности точек обитания отдельных грызунов. Микроочаги не образуются, и находки культур чумного микроба бывают только спорадическими и случайными. При такой ситуации возможно перемещение грызунов из мелких очажков вместе с возбудителем в поисках лучших мест обитания. Но есть очаги, где в периоды межэпизоотий культуры возбудителя не были найдены, и не обнаружено ни мелких очажков, ни кочующих [Фёдоров В.Н., 1944; Фенюк Б.К., 1944]. В этих условиях, возможно, и возникают спорадические случаи. Но для проявления инфекции нужен

определённый уровень популяций грызунов и блох и возможность контакта животных из разных нор и поселений в пределах природного макроочага.

В отдельных работах предполагается возможность транспорта заражённых блох птицами [*Ширанович П.И., Чумаков Т.В., 1961; Калабухов Н.И., 1969; Шевченко В.Л. и др., 1969*]. В частности это относится к птицам, обитающим в норах (например, к каменкам) хотя с такой ситуацией не все соглашаются, так как в ходе сезонных миграций они, как правило, лишены блох. Более того, такая возможность не подтверждена данными о возникающих как следствие эпизоотиях.

К изложенному следует добавить, что роль многих из перечисленных выше возможных факторов, которые теоретически могут обеспечивать сохранение возбудителя чумы в длительные межэпизоотические периоды или его занос, не подкреплена конкретными наблюдениями.

Проблематичным является также сохранение возбудителя чумы в переносчиках, основным из которых признаются блохи разных видов, которые обитают на носителях инфекции [*Голов Д.А, Иофф И.Г. 1928, Флегонтова А.А., 1951*]. Наблюдения показывают, что длительность сохранения микроба зависит от вида блох и носителей, на которых они обитают. Известны данные о сохранении чумного микроба в блохах в течение 3 мес, 8 мес, 1года, 420 сут после окончания эпизоотии или голодания [*Тинкер И.С., 1940; Шварц Е.А., Шляев Л.Ф., 1963; Дмитриевская М.Е., 1961*]. Полагают, что микроб чумы в естественных условиях нор может сохраняться в блохе всю её жизнь [*Иофф И.Г. и Покровская М.П., 1929*], т.е. 1-2 года. Однако есть сведения, [*Иофф И.Г., 1941*], что в лабораторных условиях блохи при ежемесячном подкармливании на любом прокормителе сохраняют жизнеспособность 1725 сут., а блохи из личинок живут голодными до 100 сут. Иными словами, в покинутых норах инфицированные блохи могут некоторое время жить без кормления, сохраняя возбудителя.

В связи со способностью блох длительное время сохранять возбудителя интересно рассмотреть аспект их взаимодействия с обитателями окружающей среды. Предположение, высказанное в одной из работ [*Попов Н.В. и др., 2007*] с нашей точки зрения заслуживает внимания. Считается, что постулировать инфицирование блох возбудителем чумы только в связи с кровососанием на

больных чумой грызунах затрудняет принятие возможности сохранения чумного микроба в многолетний межэпизоотический период. Предложено по-иному взглянуть на эту проблему. Как установлено, бактерии чумы могут находиться в почве в составе биоплёнок на клетках простейших, на внутренних и внешних поверхностях личинок и взрослых нематод, связанных пищевой цепью, что повышает сопротивляемость микробов неблагоприятным факторам [Darby G. et al., 2002; Styer K. et al., 2005]. На определённой стадии развития личинки нематод, в том числе и те, на которых имеются инфицированные чумным микробом биоплёнки, проникают в блох [Рубцов И.А., 1981], перенося в них возбудителя чумы на себе. Заражённые блохи способны индуцировать сначала единичные заражения теплокровных животных, а затем, при высокой численности нематод, и обширные эпизоотии. Размножению нематод способствуют влажность и тепло [Попов Н.В. и др., 2007]. Эта гипотеза в сумме с предположением о сосуществовании возбудителя чумы в виде сообществ L-форм [Ларина В.С. и др., 1992ж] после экспериментальной проверки может значительно прояснить ситуацию с сохранением возбудителя чумы в длительные межэпизоотические периоды.

Чумные бактерии сами по себе не чувствительны к холоду и могут выживать 25 лет при хранении в условиях температуры ниже 20°C. Оптимальная для блох температура обитания находится в пределах от 20 до 25°C. Личинки блохи не могут переносить относительную влажность ниже 60%. Жара и сухость сокращают жизнь заблокированной блохи. Холодная и влажная погода вынуждают их к снижению активности и к спячке [Politzer R., 1954; Harrison's..., 1980;]. В закупоренных земляной пробкой норах условия влажности и температуры более благоприятные, и блохи могут, по всей видимости, жить дольше, хотя проблематично переживание блох в таких норах в жаркий период, когда физиологическая активность у них высока, и создаются условия, способствующие лизису блока преджелудка. Но чётких данных по этому вопросу нет, хотя в таких норах блох всегда больше [Дубянский М.А., 1963; Акиев А.К. и др., 1968] и, очевидно, может долго сохраняться возбудитель чумы. Это тем более вероятно, если в процессе участвуют клещи, в которых возбудитель чумы, может сохраняться долго, сначала в типичной форме, а потом в виде L-форм [Вахрушева З.П., Моисеева Г.П., 1992; Соколов П.Н. и др., 1992]

Итак, по-прежнему остаются актуальными поиски «микроочажков» чумы, наблюдение за замурованными норами, анализ мелких очажков, выяснение возможности переживания возбудителя в блохах, поиск затяжной чумы и её экспериментальное воспроизведение и изучение. Требуют внимания поиски атипичных форм чумы и фенотипически изменённых вариантов её возбудителя, а также разработка методов их идентификации и культивирования, определение эпизоотологического значения авирулентных штаммов, анализ их инвазивности, патогенетической активности и способности вызывать бактериемию.

В ряде природных очагов анализировали степень причастности *L*-трансформации микроорганизмов к механизмам, которые обеспечивают многолетнее скрытое сохранение возбудителя чумы в почве [Ларина В.С., 1992; Ларина В.С. и др., 1992а, 1992б, 1992в, 1992г, 1992е, 1992ж; Соколов П.Н. и др., 1992 и др.]. Исследовали процесс формирования *L*-форм чумного и псевдотуберкулёзного микробов, цист микробов и простейших в почве, а также их взаимодействие и процесс реверсии в биологически активные полноценные формы с учётом факторов внешней среды и временных параметров. В результате длительных и трудоёмких исследований с использованием микробиологических, биологических и электронно-микроскопических методов были получены данные, позволившие сформулировать одну из гипотез относительно сохранения чумного микроба в окружающей среде. Согласно представлениям авторов гипотезы [Ларина В.С. и др., 1992ж], бактерии чумы, попадая в почву с мочой и мокротой больных грызунов или с экскрементами эктопаразитов, претерпевают *L*-трансформацию и в силу выраженной адгезивности клеточной поверхности, обусловленной характерными не только для этого микроба компонентами, сорбируются на наружной оболочке простейших или на поверхности многих видов почвенных бактерий, которые сами могут быть в *L*-форме. В состоянии адгезии бактерии чумы попадают в цисты или паразитируют на бактериях-носителях. При нарушениях целостности клеточной стенки у бактерии-паразита и бактерии-носителя на различных этапах *L*-трансформации может происходить их слияние. При действии факторов, нарушающих симбиотическое равновесие, *L*-формы возбудителя чумы реверсируют поэтапно в бактерии, восстановившие в разной степени функциональное состояние.

При этом реверсия происходит по типу взрыва при доминировании за счёт паразитизма и под контролем возбудителя чумы до такой степени, что *L*-клетки почвенных бактерий гибнут, «давая жизнь» бактериям чумы. Последние при попадании в селективные для него условия, включая организм чувствительного животного, в ходе последующих пассажей постепенно восстанавливают свою вирулентную форму, вызывая заболевание, а в подходящих условиях и эпизоотию. Если условия жизнеобеспечения непостоянны и не всегда благоприятны, то циклы *L*-трансформация и реверсия могут повторяться. Таким образом, согласно этой гипотезе возбудитель чумы выступает здесь в ипостаси факультативного паразита неприхотливых сапрофитных бактерий, проявляя и по отношению к ним вирулентные свойства, позволяющие доминировать при реверсии и выживании, и «отбирать» факторы жизнеобеспечения. Исследование этого феномена, проведенные в различных природных очагах, показали однотипность видов бактерий-носителей в ассоциациях с возбудителем чумы. Данные, полученные в экспериментах, свидетельствуют о возможности существования такого жизнеспособного симбиоза от 1 до 2-3 десятков лет. Такое же свойство паразитировать за счёт сапрофитных бактерий обнаружено также у возбудителя псевдотуберкулёза и сальмонелл [Ларина В.С. и др., 1992ж].

Данная гипотеза вызывала много споров и сомнений. По-всей вероятности, это связано со сложностью исследований, со слабой разработкой надёжных чувствительных методов индикации нетипичных форм возбудителя и недостаточной методической оснащённостью для решения целого ряда вопросов и проведения контрольных исследований.

На наш взгляд, дальнейшая разработка этого направления будет чрезвычайно полезной для решения проблемы «теллурической» чумы и сохранения «молчащих» многие годы очагов. В пользу реальности такой ситуации свидетельствует доказательство возможности сохранения жизнеспособности чумного микроба за счёт феномена синтрофизма [Лебедева С.А. и др., 1970], тем более что сапрофитные бактерии, как правило, прототрофны и способны обеспечивать ассоциантов факторами роста. Широко известен феномен слияния протопластов (начальная стадия формирования *L*-форм), при котором известно длительное существование

гетерозиготных гибридных форм при возможности гибридизации наследственного материала и последующей диссоциации при реверсии полноценных бактерий [Дроздов И.Г. и др., 1984; Чернов В.С., 1984]. О возможности длительного сохранения бактерий в цистах простейших (срок, которого трудно проконтролировать) уже сообщалось выше. Нам представляется, что эта гипотеза имеет право жить и быть исследованной на современном уровне.

9.2. О потенциальных факторах, стимулирующих инфекционную активность возбудителя чумы в природных очагах

Исследователями предпринимались неоднократные попытки прояснить ситуацию с чумой при анализе исторических материалов. Из всех эпидемий в Европе, предшествующих XVI столетию, чумная пандемия 1348-1350 гг. была наиболее полно описана современниками и, следовательно, единственная, которая может диагностироваться *post factum* с наибольшей достоверностью. После 1722 г. чума перестала быть столь суровой. Хотя в юго-восточной Европе, Азии и на Ближнем Востоке чума оставалась серьёзной проблемой, связанной со здоровьем людей, до середины XIX столетия. Существует ещё много вопросов, связанных с эпидемиологией чумы, ответ на которые может быть получен при анализе эпидемиологических ситуаций прошлых лет. Так, например, есть противоречивые заключения об этиологии разных пандемий. Наиболее распространённым является предположение, что первой была пандемия, вызванная возбудителем чумы биовара *antiqua*, основные носители его - сурки. Затем вспыхнула пандемия в связи с распространением биовара *mediaevalis*, основным носителем которой являются суслики и песчанки. И только за третью пандемию, как принято считать, отвечает «крысиный» биовар *orientalis*. Однако в летописных документах относительно всех трёх пандемий упоминаются поральные заболевания людей в различных населённых пунктах, в том числе и городского типа, при сопутствующей массовой гибели не только крыс, но чаще других синантропных грызунов. Неизвестно, была ли тому причиной скученность населения, при низком санитарном состоянии (большое количество крыс и блох) и высокой чувствительности этих грызунов к любому биовару возбудителя, или предположение о дифференцированной роли

биофаров возбудителя не справедливо. Тогда может оказаться, что за все пандемии отвечает крысиный биофар *orientalis*, возможно, наиболее контагиозный для человека [Butler T., 1983; Drancourt M. et al., 2004, 2007; Сунцов В.В., Сунцова Н.И., 2007]. Ответ предстоит получить в будущем.

Определённую роль в колебаниях чувствительности носителей и людей к чумной инфекции и, соответственно, в создании благоприятных условий для распространения возбудителя чумы и возникновения вспышек чумы среди людей и природных носителей может играть иммунный статус. Вполне вероятно, что массовое воздействие иммунодепрессантов может сыграть трагическую роль в перспективе заболевания чумой при встрече с возбудителем. В числе потенциальных иммунодепрессантов известны некоторые микотоксины, которые продуцируются микрогрибами, поражающими непросушенное зерно, например, такие как E-2 токсин [Hill E.W. et al., 1983; Eichner R.D., Mulbacher A., 1984]. Когда такой токсин повреждает иммунную систему, он сразу может не вызывать видимых симптомов, нужна его кумуляция. Роль такого повреждения в индукции заболевания может остаться скрытой. Так, лица с иммунными дисфункциями («иммунокомпромиссные») на начальных стадиях алиментарной токсической алейкии выглядят вполне здоровыми без жалоб на какие-нибудь острые недомогания. Для того, чтобы выявить их патологию, нужны специальные лабораторные исследования. Иммунодефицитные люди становятся более чувствительными к другим инфекционным заболеваниям. Например, многие люди, соприкасавшиеся с возбудителем туберкулёза, не болеют. Заболевают только часть их. Большинство из заболевших, как теперь выяснилось, характеризуются иммунодисфункциями, в частности, имеют дефицит T-хелперных клеток. То же можно сказать о лепре. В случае СПИД'а основным патогеном является вирус, который атакует иммунную систему. Тем самым он обеспечивает уязвимость пациента для вторичной инфекции. Именно она в этом случае вызывает летальный исход, а при интактной иммунной системе вторичная инфекция выражена слабо или протекает бессимптомно. Существует предположение, что в природных очагах чумы ранее, когда употребляли много зерна, сохраняемого во влажном климате в некондиционных условиях и, как следствие, пораженного микотоксином, это

приводило к иммунодефициту и повышению восприимчивости людей к заражению чумой. Однако пока нет экспериментальных доказательств существования связи появления чумы с проявлением массовых иммуносупрессий в отдельных человеческих общинах, вызванных общими биотическими факторами. Хотя уже сейчас известно, что возбудитель чумы продуцирует вещества, обладающие иммуносупрессивным действием (например, антиген *F1*), следовательно, этот феномен может способствовать развитию чумной инфекции. Интересно, что смертность от чумы может широко варьировать в соседствующих общинах людей. Уровень смертности от чумы до открытия антибиотиков находился на уровне 92,2% в Астраханской губернии (1909-1910 гг.) и только 26,7% в Одессе (1910 г.). Авторы, исследовавшие эти факты, не исключают различий в иммунном статусе населения этих двух зон и в возможности алиментарных токсических воздействий, прежде всего связанных с различным качеством сохраняемых зерновых культур. Вполне возможно, что эти различия могут определяться вариациями в содержании иммуносупрессирующих микотоксинов в зерне [Клименко В.С., 1910; Cipolla С.М., 1981]. Но даже, если не существует такой связи между качеством пищи конкретно у людей и появлением чумы, более отчётливо микотоксины играют важную роль в диете крыс и других синантропных грызунов. При возрастании крысиной смертности в очаге, не только от чумы, может возрасти число «бесхозных» инфицированных чумой блох, которые в поисках пищи будут стремиться к человеку.

Если исключить спорадические заносы инфекции при миграции людей, то имеются несколько хорошо доказанных ассоциаций между возникновением чумы, возрастом жертвы, наличием в зоне заболевания определённых видов грызунов, хранилищ зерна с некондиционными условиями и влажностью. Чума имеет тенденцию убивать чаще детей и молодых взрослых, чем зрелых взрослых, но менее агрессивна по отношению к младенцам [Hollingsworth M.F., Hollingsworth T.H., 1971; Bradley I., 1977; Herliny D. Klapisch-Zuber C., 1978; Mann J.M. et al., 1982].

В историческом аспекте появление чумы очень часто коррелировало с кривой влажности, дождей, наводнений [Biraben J.N., 1975; Martin C. 1879; Corradi F., 1865; Stratton J.M., Brown J.N., 1979]. Именно влажность и неудовлетворительные условия

хранения зерна могли приводить к его заражению мицелиями грибов, продуцирующих ядовитые микотоксины. В одной из летописей указано, что в 1665-66 гг. чума вспыхивала на фоне дождей при сборе сырого урожая, при последующих оттепелях и заморозках. Чума пощадилась Ирландию, где основным продуктом питания были молочные продукты, а зерно, бывшее в дефиците, употреблялось мало. А в холодные сухие годы заболеваемости не было [Flinn M., 1979; Ell S.R., 1961]. Поэтому в истории пандемий в самых холодных и сухих областях (Исландия, Сев.Норвегия, Швеция, Финляндия, большие зоны России и Балкан, гористые и пустынные области Ближнего Востока) заболеваний чумой у людей не возникало [MacArthur W.P., 1949; Josselin R., 1976].

До сих пор находится на уровне гипотез ответ на вопрос, почему чума, основные носители которой представлены несколькими видами грызунов, вспыхивает среди людей, и почему со временем она затихает. Ведь простая близость к природному очагу чумы или нахождение в нём не всегда приводит к переносу заболевания в человеческую популяцию. Какие факторы являются решающими в этой ситуации?

Многих исследователей последнего времени интересует вопрос о причинах убывания чумы с конца XVII столетия в Европе, где она «бушевала» неоднократно. Не было никаких критических ситуаций, которые способствовали бы этому. Появилась гипотеза, согласно которой чувствительность к чуме людей снизилась за счёт появления среди человеческой популяции значительной прослойки с изменениями на уровне генофонда [Bayliss J.H., 1980]. Снижение чувствительности к чуме в некоторых работах связывают с распространением в мире у людей мутации СС5-рецептора хемокина за счёт делеции в соответствующем гене 32 пар нуклеотидов, более характерной для народов, населяющих зону Кавказа. Однако специальное исследование показало, что уровень летальности от чумы связан, более вероятно, с половой принадлежностью. А эта мутация значительно снижает чувствительность к оспе, которая и могла вызвать упомянутые сдвиги в генотипе человеческой популяции [Mecsas J. et al., 2004]. Для определения исторических перспектив заболевания чумой решение этого вопроса очень важно.

Никто не высказывается с определённой уверенностью, что чумной микроб сейчас менее вирулентен, чем в прежние века. Существуют природные очаги и носители, где сохраняется этот возбудитель, и с ними контактируют люди. Спорадические заболевания, как в бубонной, так и в лёгочной форме, протекают с той же клиникой, как и раньше. Совершенно очевидно, что чумной микроб, грызуны и их эктопаразиты необходимы для того, чтобы закономерно вызвать человеческую чумную эпидемию. Но пока не ясно, воздействие каких факторов и ситуаций может стать критическим и привести к развитию новых пандемий, или они в прошлом? Если инфекция менее контагиозна, кто «виноват» в этом, микроб или человек? Даже с учётом всех профилактических и противоэпидемических мер и более высокой культуры поведения в жизни этот вопрос сохраняет свою актуальность. Тем более, что в ряде случаев в природных очагах эти факторы, препятствующие контакту с возбудителем, находятся не на высоте.

В дополнение к таким необъяснённым ситуациям малопонятно распространение чумных эпизоотий в пространстве и времени. Совсем не ясно, почему некоторые зоны могут быть свободны от чумы, тогда как в соседних областях она проявляется? Даже во время больших пандемий некоторые части Европы избегали опасности, а в других отмечалась относительно низкая смертность. Среди последних были Бельгия, Эльзас, Лотарингия, Нюрнберг, Богемия и другие области восточной Европы [Biraben J.N., 1975; Girard G. 1974; Rackham J., 1976]. Более того, при исследовании чумных эпидемий 1628-1629 гг. в Швейцарии были обнаружены три маленькие свободные от чумы зоны, окружённые сильно поражёнными этой инфекцией областями. Опять-таки не понятно, почему в соседствующих поражённых зонах имелись достоверные различия уровней смертности от чумы [Poos R.L., 1981; Eckert E.A., 1982].

9.2.1 Чума и солнечная активность

Нерешённость многих вопросов, связанных с существованием и активностью возбудителя чумы, создаёт трудности при оценке перспектив заболевания чумой и локализации её будущих вспышек. Важным было заключение о наличии корреляции возникновения чумы в природных очагах с динамикой увлажнения окружающей среды, обилием осадков и наводнений. В дополнение к этому прогноз

заболеваемости инфекционными болезнями «обрёл большую уверенность» с тех пор, как была установлена гелиообусловленность эпидемических осложнений [Чижевский А.Л., 1976; первое издание - 1936 г.]. По результатам анализа ситуаций было сделано заключение, что большинство вспышек «за время с VI по XVII в. хорошо совпадают с датами эпох солнечных максимумов». Однако в XIX в. «эпохи чумных эпидемий последовательно чередуются то с эпохами максимумов, то с эпохами минимумов». Ритмичность динамики численности грызунов и эпизоотического процесса при чуме в природных очагах обнаружена и другими исследователями [Ротшильд Е.В. и др., 1970; Руденчик Ю.В., Ермилова А.П., 1975]. При этом периодические подъёмы численности грызунов были связаны с комплексом погодных и климатических факторов, предшествующих им.

Показано, что ритмика эпизоотий чумы является отражением ритмики солнечной активности [Лавровский А.А., 1969, 1971; Лавровский А.А. и др., 1974; Лавровский А.А., Попов Н.В., 1978], поскольку и эпизоотическое проявление чумы в природных очагах имеет, как правило, 10-11-летнюю цикличность. Оказалось, что наиболее крупные эпизоотии совпадали с фазами минимума солнечной активности, а эпизоотии меньшей интенсивности приурочены к фазам максимальной деятельности Солнца, выраженной среднегодовым числом пятен на Солнце (число Вольфа, имеющее 11-летнюю цикличность). Одновременно было показано, что в природных очагах чумы на территории бывшего СССР эпизоотии возникают одновременно в сходных ландшафтах, начиная с северных территорий и затем перемещаясь к югу. В то же время территориям с различным ландшафтом присущи свои особенности, хотя цикличность протекающих на них явлений сохраняется [Лавровский А.А., 1969].

Понятно, что при повышенной активности Солнца преобладают засушливые годы. В этот период отмечается депрессивная численность грызунов, в связи с чем, эпизоотии проявляются редко, носят локальный характер, а возбудитель сохраняется в основном в микроочагах. В фазу пониженной активности Солнца число умеренно влажных лет возрастает, грызуны начинают интенсивно размножаться, чему способствует обилие кормовой базы. Эпизоотический процесс

выходит за пределы микроочага в силу усиления динамической плотности грызунов, что совпадает с очередной засухой и неурожаем кормов [Лавровский А.А., 1971].

Изучение гелиообусловленности эпизоотического процесса в природных очагах чумы в Северо-Западном Прикаспии позволяет установить закономерности, присущие конкретному очагу. Так, после 35-летнего перерыва в 1972 г. была выявлена эпизоотия чумы на малых сусликах. Причинами резкого падения эпизоотического потенциала очага были (1) интенсивные истребительные работы, начатые в 1933 г., и (2) аномалии метеорологических условий, предопределившие глубокую депрессию численности малого суслика с 1952 по 1962 гг. Резкие перепады температур, в период весеннего пробуждения, летние засухи и другие неблагоприятные факторы тормозили восстановление численности этих грызунов. К началу очередного 11-летнего цикла в 1972 г в основном ядре очага сохранялись благоприятные условия для развития эпизоотии. Жесточайшая весенне-летняя засуха 1972 г. привела к скоплению грызунов на отдельных участках, что и привело к эпизоотии [Лавровский А.А. и др. 1974].

Дальнейшее изучение этого прикаспийского очага показало, что эпизоотия 1972 г. и ретроспективно проанализированные другие осложнения развивались по единому «сценарию». Засуха приводила к скоплению грызунов и началу эпизоотий или являлась толчком для её развития. В последующем благоприятные условия стимулировали размножение малого суслика и других мелких животных на фоне эпизоотии, способствуя её дальнейшему развитию [Попов Н.В., 1975].

Было установлено, что на активность эпизоотического процесса при чуме влияют ветры определённой силы и направленности, тип атмосферной циркуляции, геомагнитная возмущённость [Дубянский М.А. и др., 1979; 1979а; 1979в].

Изучение чумного очага Северного и Северо-Западного Прикаспия позволили создать концепцию солнечно-атмосферных связей с энзоотиями чумы и феноменом их цикличности. Согласно концепции атмосферные явления, в виде осадков, имеют 5-6-, 10-11-, 22- и 80-90-летние (вековые) циклы, которые удивительно синхронизированы с эпизоотическим и эпидемическими проявлениями чумы [Попов Н.В. и др., 1999; Дроздов О.А., Григорьева А.С., 1971]. Однако механизм воздействия метеорологических факторов достаточно сложен и осуществляется чаще всего по

принципу многоступенчатых связей. В качестве важных промежуточных звеньев выступает трофический фактор, численность носителей и переносчиков возбудителя чумы.

В основе же цикличности климатических факторов лежат солнечно-атмосферные связи той же ритмики. В прошлом активизация природных очагов чумы Северного, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья совпадала с нисходящими ветвями и минимумами 11- и 80-90-летних циклов солнечной активности. Такая же закономерность выявлена для природных очагов чумы в республике Казахстан. Установлено, что в нисходящих фазах 11-летних солнечных циклов заражённых секторов в очагах чумы становится больше, чем в восходящих [Аубакиров С.А, Сержанов О.С., 1997].

Напротив, на ветви роста солнечной активности векового цикла (1950-е годы) произошла значительная активизация пустынных природных очагов чумы песчаночьего типа в Средней Азии и Казахстане. Современная эпизоотическая обстановка в природных очагах чумы в России, Средней Азии и Казахстане повторяет картину середины прошлого века. Низкая эпизоотическая активность равнинных очагов на территории Юго-Восточной России, подъём активности пустынных песчаночьих очагов. В эпохи вековых минимумов активности Солнца (усиление зональных форм циркуляции атмосферы) отмечается синхронный подъём эпизоотической активности равнинных природных очагов России, Казахстана и Средней Азии [Попов Н.В. и др., 2006]. Проанализировав достоверность кратковременных прогнозов для различных природных очагов чумы (сусликовых, сурочьих, песчаночьих, полёвочьих, пищуховых), установлено совпадение предсказанного по ожидаемой солнечной активности подъёма эпизоотической активности в 63, 56, 75, 77 и 95% случаев, соответственно. Особенно высока достоверность прогноза на отсутствие эпизоотий – 84-100% для очагов различного типа.

Сверхдолгосрочные прогнозы основываются на связи циклического характера проявления чумы в зональных природных очагах с гелио-климатическими факторами. Сделанный в 1970-е годы прогноз активизации очагов Северного и Северо-Западного Прикаспия, а также пустынных и полупустынных очагов чумы

Средней Азии и Казахстана оправдался. Установлено, что природным очагам, расположенным в степной и полупустынной зонах Северного, Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья присуща 25-37 летняя периодичность межэпизоотических периодов. Для очагов северной пустыни характерна 5-6- и 10-11-летняя цикличность. Периоды отсутствия эпизоотий на отдельных участках составляют 2-3 года (максимум 6 лет). На основе выявленной закономерности даётся прогноз эпизоотической активности для различных очагов чумы вплоть до 2020 года [Попов Н.В. и др., 2006а].

Являются ли эпидемические проявления чумы обусловленными теми же факторами, и существует ли цикличность в этом процессе? Анализ заболеваемости людей на азиатском, африканском и американском континентах за период с 1900 по 1993 гг. в сопоставлении с кривой солнечной активности показал, что большинство случаев заболевания чумой отмечаются за два года до минимума и в год минимума солнечной активности. В эпоху максимума наибольшее число эпидемических осложнений приходится на год максимума, предшествующий и следующий за ним годы, а также на третий год после максимума солнечной активности. На указанные временные точки приходится 72% пиков заболеваний. Отмеченные годы характеризуются повышенной гелиоактивностью [Витинский Ю.И. и др., 1985, 1986]. Средний интервал между пиками повышенной заболеваемости в Азии составляет 4 года, в Африке – 3,6 года, а на американском континенте – 3,1 года (ритмика низшего порядка). Цикл проявлений заболеваний людей чумой в Азии составляет в среднем 11 лет. В Африке и Америке – 10,7 года. Максимальное число заболеваний приходится, как правило, на фазу пониженной пятнообразующей активности Солнца. Результаты математической обработки данных показали, что на каждом континенте существует 5- и 10-11-летняя цикличность проявления чумы, а в Азии и Америке имеется ещё и 7-летняя периодика. В чётные циклы солнечной активности число случаев заболеваний людей чумой на континентах, как правило, больше, чем в нечётные. Это даёт основание предполагать существование 22-летней периодики [Арутюнов Ю.И. и др. 1997, 1998, 1998а].

Впоследствии проявление эпидемических осложнений по чуме изучили в разрезе отдельных стран: в России (в т.ч. СССР, СНГ), на о. Мадагаскар, во Вьетнаме, в США.

Анализ данных о заболеваемости людей чумой в России и странах СНГ за период с 1875 по 1995 гг. показал, что эпидемические проявления гелиообусловлены. Имеется цикличность таких проявлений, составляющая 11,2 года, а средний интервал между пиками заболеваний людей составляет 3,6 года (ритмика низшего порядка). В фазе минимума солнечной активности регистрируют в среднем в 1,8 раза большее число больных, чем в максимальной её фазе. На минимум солнечной деятельности и смежные с ним годы приходится 34,5% случаев, на максимум и следующий за ним год 28,1%. Ещё одна активная фаза осложнений регистрируется на нисходящей ветви солнечного цикла, приходящаяся на 3 год после максимума. Суммарно на отмеченные фазы приходится 72,1% всех наблюдавшихся пиков заболеваний. Отмечена взаимосвязанность годов эпидемических проявлений с годами эпизоотической активности [Арутюнов Ю.И. и др., 1998в; 2005].

Анализ эпидемиологических проявлений чумы во Вьетнаме и на о. Мадагаскар представляет интерес по ряду обстоятельств. Одинаковое широтное расположение обеих территорий (8-24° с. и ю. ш.) по разные стороны экватора определяет сходство климатических условий с наличием сухого и влажного сезонов, проявляющихся противофазно. Сходство рельефа – узкая низменная прибрежная полоса, переходящая в горное плато. На территории обеих стран чума впервые зарегистрирована в 1898 г. в портовых городах, а позже проникла во внутренние районы страны в связи с расселением инфицированных носителей и созданием антропогенных очагов. Однообразная система хозяйствования – подсечно-огневое земледелие, когда сводится первичный лес, и распахиваются освободившиеся территории, создаёт благоприятные условия для расселения грызунов. После обширных эпизоотий инфекция с поражённых территорий «исчезала», но через 3-4 года появлялась вновь.

Сопоставление пиков эпидемических осложнений с ходом кривой солнечной активности (число Вольфа) показало, что наибольшее число эпидемических

проявлений в фазе минимума зарегистрировано (1) на Мадагаскаре в предшествующий и последующий годы от минимума, (2) а во Вьетнаме 2 года до минимума в год минимума и 1 год после него. В фазе максимума заболеваемость была наибольшей на Мадагаскаре в год максимума и в последующие три года, а во Вьетнаме в течение двух лет после максимума активности. В те годы, когда отмечено наибольшее число больных, число провинций, поражённых чумой, также было наибольшим. [Арутюнов Ю.И. и др. 2001, 2003]. Из 37 годов с пиками заболеваемости (18 - по Вьетнаму и 19 – по Мадагаскару) 8 приходятся на один и тот же год. В 20 случаях пик числа заболеваний отмечен на год раньше в одной из стран. Это свидетельствует о совпадении эпидемических процессов в этих странах по времени в 75,7% случаев [Арутюнов Ю.И. и др., 2003].

Анализ заболеваемости чумой в США за время с 1900 по 2002 гг. показал, что так же, как во Вьетнаме и на Мадагаскаре, возбудитель первоначально проявил себя как портовая инфекция, а затем проник в глубь страны. Сопоставление годов-пиков больных чумой с ходом кривой солнечной активности показало, что наибольшее число пиков приходится на год до, год после и сам год минимума, и на 2-ой, 3-ий и 4-ый год после максимума [Арутюнов Ю.И. и др., 2006]. Таким образом, результаты сравнительного изучения заболеваемости людей чумой на отдельных континентах и в странах, расположенных на разных континентах, свидетельствует об единовременном активном проявлении (скорее активизации) инфекции. Это является свидетельством универсальности фактора, который инициирует и регулирует эпидемический процесс, каковым и является, видимо, деятельность Солнца.

С активностью Солнца связывают также рост заболеваемости, вызванной некоторыми другими представителями сем. *Enterobacteriaceae*. Так, например, регистрируются некоторые кишечные инфекции, возникающие одновременно в разных странах, и известна одновременная периодическая смена экотипов возбудителя дизентерии на больших территориях. Установлено, что в магнитовозмущённые дни усиливается репродукция микроорганизмов сем. *Enterobacteriaceae*. Более чувствительными к геомагнитным возмущениям и магнитным бурям оказались *E. coli* и *Sh. sonnei*, более устойчивыми *Sh. flexneri* и *S.*

enteritis серовар *Typhi*. У чувствительных микроорганизмов зарегистрирована и более продолжительная по времени репродуктивная стимуляция [Чернощёков К.А., 1993]. Электромагнитное поле в эксперименте стимулировало размножение бактерий. Эффективность этого воздействия зависела от его частоты и вида микроорганизма. Более чувствительными оказались бактерии кишечной группы, менее чувствительными – *S. diphtheriae*. Выраженное действие оказывало электромагнитное воздействие с частотой 0,1 гц. Культивирование в поле с частотами 0,5 и 1 гц также способствовало увеличению жизнеспособных особей, однако эффект был меньшим [Чернощёков К.А., Лепёхин А.В., 1993; Владимирский Б.М. и др., 1971]. При импульсивном воздействии на микроорганизмы наибольшая стимуляция роста наблюдалась при частоте 0,3 гц, тогда как статическое поле оказывало ингибирующее действие за счёт подавления способности бактерий к размножению [Moore R.L., 1980].

Облучение *E. coli* в микроволновом диапазоне значительно стимулирует рост бактерий, особенно в фазе замедления роста [Seto Y.J., Hsieh S.T., 1975]. Магнитное поле оказывает на рост микроорганизмов как стимулирующее, так и ингибирующее действие. На грамотрицательные бактерии стимулирующий эффект магнитного поля сказывается сильнее, чем в случае грампозитивных организмов. Максимальная стимуляция роста происходит при индукции магнитного поля в 150 гц, а максимальное ингибирование при 300 гц.

Процессы изменчивости более выражены в годы нисходящей ветви солнечной деятельности, и в экспериментах по искусственному воздействию электромагнитного поля они синхронизируются с его естественным влиянием. В эти периоды отмечают больший выход изменённых вариантов [Чернощёков К.А., Лепёхин А.В., 1993].

Исследования на модели *Staphylococcus aureus* показали зависимость продукции микробами факторов агрессии (ДНКаза, РНКаза, лецитиназа, протеиназа, желатиназа, гемолизин) от циклических изменений солнечной активности. В качестве параметров, характеристики активности Солнца использовали (1) среднемесячные показатели числа солнечных пятен, (2) плотность потока радиоизлучения на частоте 300 МГц. Изменение вертикальной составляющей

магнитного поля Земли на широте г. Москвы. Наибольшие изменения ферментативной активности наблюдали, как правило, в периоды резких колебаний солнечной и/или геомагнитной активности [Поликарпов Н.А., 1994. 1995].

Число наблюдений за эффектом воздействия на микроб чумы весьма ограничено. В основном они связаны с влиянием УФ-облучения. Отмечено, что ультрафиолетовые лучи стимулировали появление непестициногенных мутантов чумного микроба. Одновременно эти мутанты теряли фибринолитическую, плазмокоагулирующую активности и вирулентность [Пак Г.Ю., 1969]. Поскольку все три эти свойства детерминируются минорной плазмидой pPst можно сделать вывод, что облучение УФ приводит к её утрате. Учитывая, что вирулентность чумного микроба связана с комплексом свойств, можно предположить более глубокое воздействие УФ-облучения.

Повторное УФ-облучение бактерий чумы с увеличением экспозиции воздействия повышает устойчивость штамма к облучению [Елюбаева А.М., 1967; Огарёв Н.Н., 1968]. Опыты с вирулентными штаммами чумного микроба показали, что УФ-облучение стимулировало образование *OR*- и *OS*-форм. У отдельных рамнозонегативных штаммов отмечено появление способности к ферментации рамнозы и снижение активности ферментации глицерина. При повторных облучениях обнаружены нарушения экспрессии детерминант вирулентности. А именно, в популяции нарастала доля Ca^{2+} -независимых и дефектных по пигментсорбции клеток. Не удивительно, что штаммы резко снижали вирулентность для белых мышей после первого же облучения [Огарёв Н.Н., 1968].

Изучена зависимость чувствительности к УФ-облучению штаммов *Y. pestis* с разным плазмидным составом. Наиболее чувствительными были бесплазмидные штаммы *TRU* и *Java*. Наиболее устойчивым - полноценный по плазмидному составу штамм *EV76*. Различия по числу выживших после УФ-воздействия бактерий достигали трех порядков. Штаммы, лишённые одной или двух из трёх характерных плазмид по чувствительности занимали промежуточное положение. При сравнении со штаммами кишечной палочки, имеющими дефекты в *rec*-генах, штамм *Y. pestis EV76* имел чувствительность, равную *E. coli MRrecB21*, тогда как бесплазмидные

штаммы *TRU* и *Java* были более чувствительны соответственно штамму *E.coli 2463 recA* [Стыцэнко Т.М., Лебедева С.А., 1984].

УФ-лучи способны индуцировать у *Y.pestis* появление мутантов, снизивших питательные потребности за счёт утраты зависимости роста от в фенилаланина или метионина (основных для питания аминокислот), хотя и с низкой частотой. Наблюдалось возникновение мутантов с устойчивостью к некоторым аминогликозидам, по-видимому, за счёт изменения структуры рибосомных белков [Степанов В.М., 1968; Мартиневский И.Л., 1969; Сучков Ю.Г., Голубинский Е.П., 1969]. В результате УФ-облучения возбудителя чумы появлялись *lon*-мутанты с нарушениями цикла деления [Мартиневский И.Л., 1972]. Эффект воздействия УФ был более выражен на ранних стадиях деления клеток и особенно высок при синхронном делении [Сучков Ю.Г. и др., 1970].

При прогнозируемых магнитных возмущениях, естественного происхождения, характеризующихся плавным подъёмом, рост возбудителя чумы на плотных питательных средах характеризуется большей репродуктивностью (образуется большее число колоний), тогда как в фазе их спада число выросших колоний снижалось. При больших и очень больших магнитных бурях с внезапным началом наиболее высокие показатели роста отмечены в посевах в период спада активности геомагнитного поля. Следовательно, умеренная возмущённость геомагнитного поля стимулирует репродукцию возбудителя чумы. По мнению исследователя, экранирование воздействия магнитного поля должно отрицательно сказываться на жизнедеятельности бактерий, определённый интервал активности этого поля влияет положительно [Дубянский М.А. и др., 1985].

Все экспериментальные исследования с облучением микроорганизмов всегда будут ограниченными как по диапазону используемых волн, так и по продолжительности воздействия. Солнечное излучение воздействует на биосферу постоянно и комплексно, сочетанным диапазоном волн от сверхнизких до сверхвысоких с постоянно меняющейся интенсивностью. Необходимо также учитывать, что атмосфера Земли поглощает большую часть излучения и воздействие на биосферу осуществляется «дозированной» волновой энергией, а также корпускулярной, через колебания магнитного поля Земли.

Изложенные в этой главе материалы во многом гипотетичны. Но события, сопровождающие описанные ситуации реальны и вполне могут служить основой и побудительными факторами для развития соответствующих исследований и решения возникших вопросов, тем более что методические приёмы в настоящее время стали намного более совершенными и эффективными.

Заключение

Обзорные материалы, представленные нами в каждой из глав, отражают этапы развития науки о возбудителе чумы в аспектах его вариабельности и диагностики. Даже при таком кратком, как в книге, изложении данных литературы становятся очевидными проблемы, которые являются наиболее актуальными и требуют дополнительных углублённых исследований.

Практикуемые в настоящее время схемы диагностики в определённой степени корректны лишь применительно к типичным вариантам основного подвида чумного микроба, несомненно, представляющих собой возбудителя классической чумы во всём разнообразии её клинических форм и эпидемиологических проявлений. В то же время детекция и оценка опасности дополнительных подвидов чумного микроба и атипичных форм возбудителя требует значительного совершенствования методов диагностики и определения критериев, достоверных для достижения этих целей. Обсуждение проблем диагностики обычно связано с выделением культур от больных людей или животных-носителей. Однако необходимость детекции и идентификации чумного микроба возникает и в других ситуациях. К ним можно отнести обследование очагов в межэпизоотический период, ретроспективный анализ на основании характеристик давно выделенных штаммов, уточнение и проверка таксономических позиций музейных штаммов и отдельных клонов при анализе популяций диссоциирующих штаммов или смешанных бактериальных культур, особенно в очагах, заражённых разными иерсиниями, и, наконец, анализ ситуаций при намеренном распространении возбудителя террористами или при авариях с подозрительными, но неизученными штаммами. Во всех этих случаях может произойти встреча с атипичными штаммами *Y.pestis*, в том числе с имеющими изменения диагностических признаков в сторону сходства с возбудителем псевдотуберкулёза или другими бактериями. В силу этого выявление и идентификация атипичных бактерий основного подвида *Y.pestis ssp. pestis* может иметь гораздо большие трудности, чем диагностика дополнительных подвидов бактерий чумы. Имеются несколько феноменов, проявление которых является значительной помехой для корректной диагностики. Следует вспомнить о

существовании таких форм возбудителя с изменённым «диагностическим» фенотипом, как лишённые диагностического антигена F1, который наряду с антителами к нему используется для создания основных иммунодиагностикумов при чуме. В значительной степени изменёнными и «трудноузнаваемыми» являются варианты чумного микроба, устойчивые к диагностическим бактериофагам, для которых характерна реверсибельная плейотропная изменчивость по многим признакам, в том числе снижение или прекращение синтеза антигена F1 и реверсибельная утрата вирулентности. Большое место в спектре изменчивости возбудителя чумы, затрудняющей его детекцию и идентификацию, занимает L-трансформация, формирование фильтрующихся форм микроба и некультивируемых форм, которые в сумме играют существенную, если не основную роль при сохранении чумного микроба в природе. Наиболее изученным с точки зрения механизма образования представляются штаммы *Y.pestis*, лишённые способности синтезировать F1-антиген. Генетические основы этого признака рассмотрены в главах 3 и 5. Однако остаются открытыми вопросы, которые касаются механизмов, определяющих снижение, утрату и различия вирулентности у штаммов *Y.pestis* с разными дефектами генов *caf*-оперона по отношению к различным носителям инфекции. Решение их весьма актуально, особенно после получения данных о сохранении полной вирулентности при точковой мутации, выключающей синтез Caf1-белка. Не ясны пока суммарные эффекты взаимодействия Caf1-белка с другими компонентами бактериальной клетки при контакте микроба с макроорганизмом и реализации патогенетического потенциала возбудителя. Слабо изучены сложные конформационные эпитопы антигена F1, возникающие в итоге процессинга антигена и комплексования его с другими компонентами капсулы.

В главе о бактериофагах хотелось бы обратить внимание на многогранность сведений, которые можно получить, используя их. Информативными могут быть исследования собственно бактериофагов в аспекте механизмов, определяющих их специфичность и полигостальность. Привлекает внимание изменение их литической активности и специфичности, которое может происходить при селективном воздействии бактерий, как за счёт мутационных изменений структуры фаговых рецепторов, так и под влиянием факторов бактерии-хозяина, контролирующих

внутриклеточное размножение фагов или приводящих к изменению структуры генома фага. Крайне важны аспекты диагностической ценности бактериофагов при внутривидовой, видовой и родовой идентификации микроорганизмов, а также идентификации бактериальных компонентов, важных для взаимодействия с макроорганизмом. Известно, что они имеют определённую гомологию с компонентами фагов, которые участвуют в рецепции и могут выполнять как адгезивные, так и транспортные функции. Сведения, по всем этим вопросам полезны для решения проблем, выходящих за рамки этой книги, как, например, использование бактериофагов в целях терапии заболеваний, вызванных лизабельными бактериями.

Проблема фагоустойчивости, как нам представляется, может быть тесно связана с другими, решение которых не менее существенно для выяснения механизмов сохранения возбудителя чумы в природе вообще и межэпизоотический период, в частности. Не зря привлекают внимание специалистов случаи выделения бактерий чумы, в т.ч. фагоустойчивых, из фильтратов экспериментальных чумных фагов, предварительно прошедших бактериологический контроль на стерильность и хранившихся разные сроки [Ларина В.С. и др., 1992; Гребцова Н.Н. и др., 1998]. О фильтрующихся формах существования возбудителя чумы сообщали ещё в ранний период исследований *Y. pestis* [Петрунина О.М., 1951; Туманский В.М., 1958]. Фагоустойчивость бактерий чумы, с соответствующим изменённым фенотипом, свойственна L-формам, а также некультивируемым и «нетипируемым» формам чумного микроба. Всё это позволяет предполагать общность некоторых этапов их формирования и оценить фагоустойчивость возбудителя чумы, связанную с отбором предсуществующих или перманентно возникающих с низкой частотой фагорезистентных вариантов, как один из признаков приспособительных форм микробов при сохранении в природе. Уместно здесь вспомнить также о возможности временного изменения наружного слоя клеточной стенки, включая рецепторы фага, как один из этапов в общей цепи приспособительных модификаций *Y. pestis* в различных условиях обитания. Всё это позволяет надеяться, что углублённое изучение на современном методическом уровне фагоустойчивых вариантов чумного микроба, а также механизмов формирования и флюктуации их

фенотипа, предоставит много ценных сведений. Эти сведения будут способствовать пониманию сути и происхождения других форм микроба, которые уклоняются от выявления при бактериологическом исследовании, но занимают большой сектор в общей изменчивости *Y. pestis*, благодаря которой возбудитель чумы выживает и сохраняется десятилетиями в природе, угрожая здоровью и жизни людей.

Не менее актуальным для исследователей представляется вопрос о способности возбудителя существовать в виде «нетипируемых» и некультивируемых форм. Известные результаты предварительного изучения их более, чем скромные.

Все эти типы изменчивости возбудителя чумы создают проблемы при его видовой идентификации, контроле над распространением и сохранением в природе и, как следствие, в диагностике вызываемых им форм заболевания. Факт сходства фенотипа у вариантов *Y. pestis*, появившихся в результате селекции по различным признакам (по снижению или утрате продукции основного диагностического *F1*-антигена, снижению или утрате чувствительности к диагностическим фагам, по атипичности результатов биологических проб и сложности культивирования в условиях *in vitro*, включая потребность в специализированных питательных средах) требует особого внимания и специальных разработок. Проблемы исключительно важны, тем более, если учесть, что такие атипичные формы возбудителя чумы могут под влиянием различных факторов реверсировать в классические вирулентные штаммы со всеми вытекающими последствиями. В связи с этим крайне насущной является разработка и внедрение в практику методов идентификации, на основе других более стабильных специфических диагностических признаков и питательных сред, приготовленных с учётом особых потребностей у изменённых вариантов *Y. pestis*. Остро стоит также вопрос о более широком внедрении модифицированных и клеточных методов определения патогенетической активности *in vivo* с уклоном на человеческий организм. Помимо существенного для практики совершенствования методов, такие исследования позволят получить теоретические выводы, расширяющие наши представления о механизмах изменчивости возбудителя, о способах сохранения его в природных очагах и о факторах, отвечающих за патогенность. Не исключено, что низкая эффективность существующих методов идентификации применительно к изменённым атипичным формам, слабая

изученность скорости и механизмов их реверсий в исходную классическую форму не позволяют проследить за вариабельностью уровня их патогенетической активности, изменчивостью атипичных форм заболеваний, или характером патологических сдвигов, которые они могут вызывать. В этой связи считаем необходимым привлечь внимание к таким методам изучения основ патогенности чумного микроба как протеомный и транскриптомный анализ экспрессии различных генов в условиях, соответствующих или приближённых к ситуации *in vivo*. Эти методы начали внедряться в последнее время, и уже ясно, что они позволят ближе подойти к выяснению механизмов вирулентности.

При анализе патогенетической активности и вирулентности возбудителя чумы особое положение занимают так называемые «остаточная» и «латентная» вирулентность. Экспрессия этих свойств не приводит к развитию полноценного заболевания, или для этого требуются дополнительные «способствующие» факторы. Однако, с нашей точки зрения, эти формы патогенетической активности изучены явно недостаточно. При получении дополнительных сведений эффективность использования этих феноменов может быть значительно повышена за счёт расширения спектра тестов по количественной оценке уровня этих двух типов «скрытой» вирулентности. Подобные исследования позволят получить данные, необходимые для понимания механизмов взаимодействия различных форм возбудителя чумы с носителем инфекции, важные для создания живых вакцин и оценки степени их безвредности при любых формах реверсидельной вариабельности микроба.

Особо стоит вопрос о патогенности для человека дополнительных подвидов *Y.pestis*. Он далеко ещё не решён. И экспериментальных данных китайских авторов об авирулентности для людей двух полёвочьих штаммов, явно не достаточно, хотя они и привлекают повышенное внимание к проблеме, и стимулируют активный интерес специалистов. В связи с этим нужна разработка такого набора тестов, которые, в обход необходимости прямого заражения людей, могли бы давать ответы на этот вопрос с достаточной степенью гарантии.

Внедрение в практику диагностики методов молекулярной биологии, в том числе ПЦР-анализа, в значительной степени расширило возможности более точной

идентификации бактерий возбудителя чумы и её диагностики даже при существовании их в атипичной форме. VNTR-анализ и другие методы изучения тонкой структуры геномной ДНК при расширении круга исследуемых штаммов показывают наличие значительной вариабельности в последовательностях нуклеотидов отдельных локусов. Причём эти изменения могут быть случайными или закономерными, характерными для отдельных групп штаммов или единичных штаммов, или даже для отдельных клонов из их популяций. Часть из них могут иметь диагностическое значение, другие - служить маркером при эпидемиологическом анализе и прослеживании путей распространения возбудителя чумы из разных очагов, третьи – быть маркером отдельных клонов популяции, свидетельствующим о её нестабильности.

Широко распространёнными параллельно внедрению молекулярно-биологических методов диагностики являются иммунологические методы исследования. Причем, в настоящее время, судя по данным литературы, они снова привлекают всё большее внимание. Однако по-прежнему сохраняется необходимость повышения надёжности диагностики за счёт разработки диагностических препаратов на антигены иные, чем F1. В этом особенно нуждаются специалисты при поиске и идентификации «бесфракционных» штаммов *Y.pestis*. Нет сомнения, что расширение спектра антигенов, которые индуцируют наиболее активно антителообразование при чуме будет полезно при решении проблем иммунодиагностики. В этом отношении полученные нами диагностикумы на фракцию V чумного микроба вполне оправдывают своё предназначение. Полезной на следующем этапе исследований фракции V является смена эритроцитарного носителя на более современные синтетические микросферы. Это определяется общепризнанными преимуществами «сфер» как с точки зрения повышения специфичности реагирования, так и экономичности производства. Перспективно дополнительное фракционирование антигена «фракция V» и подбор более рационального метода его выделения. Эти разработки будут способствовать повышению качества конструируемых диагностических препаратов, позволяющих эффективно выявлять возбудителя чумы как в капсульной, так и «бескапсульной» форме.

Очень перспективным для повышения специфичности диагностикумов и расширения решаемых с их помощью задач, являются использование моноклональных антител, позволяющих не только диагностику, сравнительный анализ штаммов, но также тестирование антигенов и анализ их структуры при культивировании в разных условиях. Наличие МКА к фракции V, более специфических для идентификации штаммов *Y.pestis*, чем поликлональный КоА-диагностикум, открывает путь для создания нового моноспецифического диагностикума, способного без проявлений перекрёстных реакций выявить все типичные и изменённые штаммы чумного микроба.

В одной из глав рассмотрены циклические проявления эпизоотического и эпидемического процессов при чуме на уровне континентов, в отдельных странах, отдельных природных очагах. Обсуждалась возможность сохранения чумы в «кочующих» и микро-очажках чумы в природных условиях, проблема сохранения возбудителя на фоне хронических бессимптомных форм заболеваний при персистенции атипичных, некультивируемых, изменённых до L-состояния микробов возбудителя. Рассмотрена возможность длительного многолетнего сохранения возбудителя чумы в виде L-форм, паразитирующих на ассоциации простейших и L-форм сапрофитных почвенных микроорганизмов.

Проанализирована связь эпидемической и эпизоотической активности возбудителя с климатическими условиями, показана коррелятивная связь цикличности функционирования природных очагов и заболеваемости людей с циклической активностью Солнца. Эта связь позволяет говорить о побудительной способности Солнца активизировать природные очаги чумы. Реализация такого влияния, судя по данным анализа ситуаций, осуществляется опосредовано (воздействие излучения на тропосферу – климат – погоду – кормовую базу – численность носителей и переносчиков). Не исключено и прямое воздействие на иммунную систему чувствительных к чуме макроорганизмов и, как показали немногочисленные опыты, собственно на возбудителя чумы. С нашей точки зрения всё это достойно внимания, но требует специальных исследований в перспективе. Детальное изучение возбудителя чумы в указанных аспектах может оказаться

полезным для решения многих вопросов, связанных с эпидемиологией и экологией возбудителя чумы.

Всё изложенное выше позволяет нам надеяться, что материалы данной книги будут способствовать развитию науки о возбудителе чумы и большей степени подконтрольности заболеваний чумой, а также повысят заинтересованность специалистов в дальнейших исследованиях

ЛИТЕРАТУРА

1. Абалкин В.А., Черкасский Б.Л. Использование мышей инбредных линий как модели для индикации и дифференциации штаммов *B. anthracis* //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1978. – №2. – С.146-147.
2. Абгарян Г.П. Характеристика некоторых штаммов чумного микроба, выделенных на Армянском нагорье от обыкновенных полевых: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Саратов, 1966. - 16 с.
3. Абгарян Г.П., Самойлова Л.В. К вопросу о фагоцитарной активности лейкоцитов морских свинок и белых мышей в отношении штаммов чумного микроба, выделенных на Закавказском нагорье //Особо опас. инф. на Кавказе: Матер.науч.конф. противочум. учрежд. Кавквза по эпидемиол., эпизоотол., профилакт. особо опас. инф. - Ставрополь, 1966. - С.7-8.
4. Абдурахманов Г.А., Казаков В.П., Джафаров Н.И. и др. Новый высокогорный очаг чумы полёвочьего типа в Южном Дагестане //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1978. – Вып. 6. - С.23-25.
5. Аванян Л.А., Губина Н.Е. Действие железа на рост и вирулентность чумного микроба //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1961. - №3. – С.92-97.
6. Аванян Л.А. Губина Н.Е., Иванова В.Ф. Влияние железа на вирулентность и иммуногенность авирулентных штаммов чумного микроба //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1963. - №5. – С.17-23.
7. Агеенко А.И., Ерхов В.С. Аутореактивность спленоцитов мышей чувствительных линий в латентном периоде канцерогенеза, индуцированного вирусом S47 (C8) //Вопр. вирусологии. – 1976. - №6. – С.734-737.
8. Адаева Н.Ф. К вопросу о специфичности чумных и псевдотуберкулёзных бактериофагов //Тр. ин-та «Микроб». - Саратов, 1951. – Вып.1. – С.260-262.
9. Адамов А.К. Антитела, адсорбированные на твёрдых веществах, и применение их в микробиологии: Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. – Саратов, 1962. – 34 с.
10. Адамс М. Бактериофаги /Пер. с англ. – М., 1961. - 527 с.
11. Адъяасурен З., Лхамсурен С., Жамьянсурен П. Характеристика штаммов чумного микроба, выделенных в Северо-Восточном Хангае в 1978-1979 гг.

- //Пробл. природной очаговости чумы: Тез. докл. к IV Совет.-Монгол. конф. специалистов противочумн. учрежд. - Иркутск, 1980. - Ч.2. - С.59-60.
12. Акатов А.К. Выбор экспериментальной модели для изучения стафилококковой инфекции с использованием биометрического анализа //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1963. - №11. – С.39-45.
 13. Акиев А.К. Состояние вопроса по изучению механизма сохранения возбудителя чумы в межэпизоотические годы //Пробл. особо опас. инф. - Саратов, 1970. – Вып. 4 – С.13-33.
 14. Акиев А.К., Деревянченко К.И., Лалазаров Г.А, Новикова Е.И. Сохранение возбудителя чумы в блохах *Xenopsilla conformis* в зимний межэпизоотический сезон //Грызуны и их эктопаразиты. Экология, эпидемиологическое значение, борьба): Сб. науч. работ противочум. учрежд. страны. – Саратов, 1968. – С.211-215.
 15. Акимович В.В., Доброцветова Т.Я. Влияние кортизона, дезоксикортикостерона, адренкортикотропного гормона на развитие экспериментальной чумы у белых мышей //Тр. ин-та «Микроб». – Саратов, 1960. – Вып. 4. – С.320-326.
 16. Акимович В.В., Кондрашкина К.И., Лапина Н.Ф. и др. Роль фракции 1 и «мышинного» токсина возбудителя чумы для приживаемости в организме блох //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1969. – Вып. 3 – С.149-155.
 17. Акимович В.В., Узенцов С.А., Белобородов Р.А. Кожная гиперчувствительность к фракции 1 чумного микроба у морских свинок, sensibilizированных бактериями чумы //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1969. – Вып.5. - С.18-23.
 18. Акимович В.В., Шанина Л.Н. Варианты чумного микроба, не образующие капсульного антигена //Вопр. микробиол. и лаб.диагност. особо опас. инф.: Сб. науч. трудов работ. противочум. учрежд. – Саратов, 1965. – С.54-57.
 19. Акопян А.К. Гистоморфологическая характеристика инфекционного процесса у обыкновенных полевок, зараженных полевыми штаммами возбудителя чумы //Особо опас. инф. на Кавказе: Матер.науч.конф. противочум. учрежд. Кавказа по эпидемиол., эпизоотол., профилакт. особо опас. инф. - Ставрополь, 1966. - С.16-17.

20. Аксёнов М.Ю., Гаровникова Ю.С., Левина Г.А. и др. Использование метода полимеразной цепной реакции для изучения процесса перехода клеток *Salmonella typhimurium* в некультивируемое состояние //Мол. генет., микробиол., вирусол. – 1994. - №2. – С.17-20.
21. Аксёнов М.Ю., Гинцбург А.Л. Диагностика инфекционных заболеваний с помощью метода полимеразной цепной реакции //Мол. генет., микробиол., вирусол. – 1993. - №4. – С.3-8.
22. Аксёнов М.Ю., Мисуренко Е.Н., Шустрова Н.М. и др. Выявление и изучение динамики численности некультивируемых форм *Yersinia pseudotuberculosis* во внешней среде при использовании полимеразной цепной реакции //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. - 1995. - №2. – С.80-83.
23. Алёшина Е.Н., Простетова Н.П. Использование нагруженных чумным бактериофагом брюшнотифозных бактерий для реакции агглютинации с чумной антисывороткой //Тр. Ростовского-на-Дону н.-и. противочум. ин-та. – Ростов н/Д, 1949. – Т.8. – С.100-102.
24. Алиев М.Н. Возбудитель чумы и условия его существования в Восточном Закавказье: Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. - Баку, 1969. - 60 с.
25. Алиев М.Н., Лобанова Т.И., Юдицкая С.И. и др. Эпизоотия чумы в высокогорье Нахичеванской АССР //Тр. Армянской ПЧС. – Ереван, 1964. – Вып.3. – С.31-43.
26. Амиров Э.Я., Домарадский И.В. Трансдукция: возможности, ограничения, перспективы //Обзорная информация. Серия II. Общие вопросы микробиологической промышленности. – М., 1981. – 43 с.
27. Ананян Е.Л., Давтян Г.Г., Елкин Ю.М. и др. Инфекционная чувствительность и характер бактериемии у обыкновенных полевок при заражении их возбудителем чумы полевочьей, песчаночьей и сусликовой разновидностей //Особо опас. инф. на Кавказе: Матер. науч. конф. противочум. учрежд. Кавквза по эпидемиол., эпизоотол., профилакт. особо опас. инф. - Ставрополь, 1966. - С.22-24.
28. Ананян Е.Л., Юндин Е.В. Чувствительность обыкновенных полевок Закавказского нагорья к токсическим веществам чумного микроба. //Особо опас. инф. на Кавказе: Матер.науч.конф. противочум. учрежд. Кавквза по эпидемиол., эпизоотол., профилакт. особо опас. инф. - Ставрополь, 1966. - С.25-26.

29. Анисимов А.П. К вопросу ускоренного определения вирулентности культур *Y. pestis* при эпизоотологическом обследовании природных очагов чумы //Военно-медицинский журн. – 1993. - №.11. – С.47.
30. Анисимов А.П. Молекулярно-генетические механизмы образования и функциональной значимости капсулы *Yersinia pestis*: Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. – Саратов,-2000. - 38с.
31. Анисимов А.П., Захарова Н.М. Серовариация капсульного антигена возбудителя чумы //Мол. генет., микробиол., вирусол. – 1992. - №9-10. – С.26-29.
32. Анисимов А.П. , Карбышев А.В., Кравченко В.И. и др. Получение авирулентных вариантов *Yersinia pestis* с *Fra+*, *V+*, *Cad+*, *Fib-Coa+*, *Pst I+* *Psb+* фенотипом //Генетика, микробиол. и совершенст. методов лаб. диагност. особо опас. инф. – Саратов, 1991. – С.29-33.
33. Анисимов П.И., Можаров О.Т. К вопросу таксономии чумного микроба //Мол. биология и микробиол. природ.-очаг. инф. – Саратов, 1986. – С.3-14.
34. Анисимов П.И., Можаров О.Т. Систематическое положение возбудителя чумы //Генетика, микробиол. и совершенств. методов лаб. диагност. особо опас. инф. – Саратов, 1991. – С.78-86.
35. Анисимов П.И., Можаров О.Т., Кондрашин Ю.М. и др. Определение степени гомологии геномов *Y.pestis* и *Y.pseudotuberculosis* //Иммунохимия и лаб. диагност. особо опас. инф. – Саратов, 1985. – С.87-96.
36. Анисимов А.П., Нечитайло Т.А., Дашенко В.Ф., Андрющенко Б.Н. Селекция мутантов чумного микроба с атипичной капсулой в организме иммунных мышей //Генетика и биохимия вирулент. возб. особо опас. инф.: Тез. докл. Рос. науч. конф. – Волгоград, 1992. – С.70.
37. Анисимов П.И., Щербаков А.А., Веренков М.С. и др. Люминесцирующие иммуноглобулины к мембранным белкам чумного микроба //Вопр. генетики, мол. биол. и микробиол. чумы и холеры. – Саратов, 1985. – С.49-53.
38. Антонова О.А. Выявление и изучение структуры и иммунобиологических свойств S-слоя чумного микроба: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. - Саратов, 1999. – 20 с.

39. Апарин Г.П. К вопросу об эффективности интраназального заражения морских свинок чумным микробом //Докл. Иркутск. н.-и. противочум. н.-и. ин-та Сибири и Дальнего Востока. – Кызыл, 1969. – Вып.8. – С.54-56.
40. Апарин Г.П. К характеристике сухого куриного желтка как препарата, повышающего чувствительность лабораторных животных к чуме //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1969. – Вып. 2. – С.70-73.
41. Апарин Г.П. О популяционном составе штаммов возбудителя чумы, выделенных в Горном Алтае //Эпидемиол. и профилактик. особо опас. инфекций в МНР и СССР. – Улан-Батор, 1978. – С.69-70.
42. Апарин Г.П., Адьяасурен З., Балахонов С.В. и др. Таксономия и плазмидный состав штаммов чумного микроба, выделенных на территории Монгольской республики в 1982-1987 гг. //Природная очаговость чумы в Монгольской народ. республ.: Матер. Советско-Монгол. симпоз. - Иркутск, 1988. - С.12-14.
43. Апарин Г.П., Голубинский Е.П. Микробиология чумы: Руководство. - Иркутск, 1989. - 91 с.
44. Апарин Г.П., Равдоникас И.О. Обнаружение спонтанных рамнозопозитивных мутантов у штаммов чумного микроба из Тувинского природного очага //Пробл. природной очаговости чумы: Тез. докл. к IV Сов.-Монгол. конф. специалистов противочум. учрежд. - Иркутск, 1980. - Ч.2. - С.55-56.
45. Апарин Г.П., Солодка А.Д. Материалы к изучению значения полёвки Брандта в природной очаговости чумы в Забайкалье //Изв.Иркутск. н.-и. противочум. ин-та Сибири и Дальнего Востока. – Иркутск, 1966. - Т.26. - С.25-28.
46. Апарин Г.П., Тимофеева Л.А. Современные представления о таксономии чумного микроба //Пробл. природной очаговости чумы. - Иркутск, 1980. - Ч.2. - С.10-12.
47. Арсеньева Т.Е, Трухачёв А.Л., Васильева Е.А., Лебедева С.А. Проблемы дифференциальной диагностики *Yersinia pestis* от *Yersinia pseudotuberculosis* //Диагност., лечение, и профилактик. опас. и особо опас. инф. забол. Биотехнология: Матер. Всерос. науч. конф., посвящ. 80-лет. основ. ФГУ «48 ЦНИИ МО России». - Киров, 2008. - С.42-46.

48. Арсеньева Т.Е., Трухачёв А.Л., Лебедева С.А. и др. Подходы к видовому типированию двойных «микст»-культур, включающих бактерии возбудителя псевдотуберкулёза и атипичных штаммов чумного микроба //Клин. лаб. диагностика. – 2007. - № 7 - С.52-56.
49. Арутюнов Ю.И. Сравнительное изучение биологических свойств чумных и псевдотуберкулёзных бактериофагов: Автореф. дис. ... канд. мед.наук. – Саратов, 1967. – 20 с.
50. Арутюнов Ю.И. Сравнительное изучение биологических свойств чумных и псевдотуберкулёзных бактериофагов //Генетика, биохимия и иммунохимия особо опас. инф. – Ростов-на-Дону, 1967а. – Вып.1. – С. 382-390.
51. Арутюнов Ю.И. К вопросу о диапазоне специфичности действия чумного бактериофага //Микробиол., иммунол. особо опас.инф.: Сб. работ противочум. учрежд. – Саратов, 1968. - Вып.3. – С. 235-240.
52. Арутюнов Ю.И. Биологическая характеристика псевдотуберкулёзных бактериофагов. Сообщение 1. Устойчивость к действию различных факторов и серологические свойства //Биохимия, генетика и иммунология (особо опас. инф.). - Ростов-на-Дону, 1968а. – С. 105-110.
53. Арутюнов Ю.И. Биологическая характеристика чумных и псевдотуберкулёзных бактериофагов //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1970. - №8. – С. 106-111.
54. Арутюнов Ю.И., Мишанькин Б.Н., Рыжков В.Ю., и др. Гелиообусловленность эпидемических осложнений при чуме //Матер. VII съезда Всерос. об-ва эпидемиол., микробиол. и паразитол. – М., 1997. – Т.1. - С.63.
55. Арутюнов Ю.И., Мишанькин Б.Н., Рыжков В.Ю., и др. Цикличность эпидемий чумы на континентах и связь их с солнечной активностью //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1998. - №1. – С.88-89.
56. Арутюнов Ю.И. Мишанькин Б.Н., Рыжков В.Ю. и др. Чума: цикличность эпидемических проявлений и активность Солнца //Эпидемиол. и инф. болезни. - 1998а. - №4. – С. 42-46.
57. Арутюнов Ю.И. Мишанькин Б.Н., Кокушкин А.М. и др. Гелиообусловленность эпидемических проявлений чумы на территории Российской империи, СССР и

- СНГ (1875-1995 гг.) //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1998b. - №5. – С.84-85.
58. Арутюнов Ю.И., Мишанькин Б.Н., Ломов Ю.М. и др. Некоторые эпидемиологические особенности чумы во Вьетнаме //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 2003. – Вып. 86. – С. 3-13.
59. Арутюнов Ю.И., Мишанькин Б.Н., Ломов Ю.М. и др. Некоторые особенности эпидемических проявлений чумы //Эпидемиол. и инф. болезни. – 2005. - №1. – С.8-10.
60. Арутюнов Ю.И., Мишанькин Б.Н., Ломов Ю.М. и др. Чума в США //Эпидемиол. и инф. болезни. - 2006. - №1. – С.45-48.
61. Арутюнов Ю.И., Москвитина Э.А., Ломов Ю.М. и др. Некоторые особенности эпидемических проявлений чумы на Мадагаскаре //Пробл. особо опас. инф. – 2001. – Вып. 2 – С.61-68.
62. Арыкпаева У.Т., Классовский Л.Н., Пак Г.Ю., и др. О дополнительном методе дифференциации возбудителя чумы и псевдотуберкулёза //Спец. профилакт. чумы и холеры (Тр. противочум учрежд.). – Саратов, 1980. – С.23-24.
63. Асеева Л.Е., Мишанькин М.Б., Гончаров Е.К., Шевченко Л.А. Некоторые особенности действия «мышинового» токсина и антигена фракция I *Yersinia pestis* на клетки чувствительных к чуме животных //Бюлл. эксперим.биол. и медицины. – 1995. - №2. – С.193-195.
64. Аубакиров Б.Б., Бурделов А.С., Степанов В.М. О поисках и изучении новых природных очагов чумы //Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилакт.: Матер.межгос.науч.-практ. конф. – Алма-Ата,1992. - Ч.II. - С.186-189.
65. Аубакиров С.А., Сержанов О.С. Интенсивность эпизоотического процесса в некоторых автономных очагах чумы республики Казахстан в зависимости от фаз солнечных циклов //Матер. науч.-практ. конф., посвящ. 100-лет. образован. противочум. службы России - Саратов, 1997. – Т.1. – С.11.
66. Бабёнышев В.П., Давтян Г.Г., Есаджанян М.М. и др. Эпизоотия чумы в Армении //Тр. Армянской ПЧС. - Ереван,1960. - Вып. 1. - С.51-78.

67. Базанова Л.П., Никитин А.Я., Маевский М.П. Сохранение возбудителя чумы в зимний период самками и самцами *Citellopilus tesquorum altaicus* //Мед.паразитол. и паразитар. болезни. – 2007. - №4. – С.34-36.
68. Баканурская Т.Л., Степанов В.М., Семиотрочев В.Л. Нетипируемая форма микроба чумы //Организация эпиднадзора при чуме и меры ее профилакти.: Матер. межгосуд. науч. – практ. конф. – Алма-Ата, 1992. – Т.1. – С.79-82.
69. Баканурская Т.Л., Степанов В.М., Шамардин В.А. и др. Иммуноглобулиновый чумной ко-диагностикум для индикации возбудителя чумы //Состояние и перспективы развития диагност. бактериал. инф.: Матер. рабоч. совещ. – Оболенск, 1990. – С.63.
70. Балахонов С.В. Молекулярно-биологические критерии геномной близости в систематике рода *Yersinia* : Автореф. дис ... канд. биол. наук. – Саратов, 1987. – 21 с.
71. Балахонов С.В. Результаты скрининга плазмид штаммов *Yersinia pestis*, из разных очагов Центрально-Азиатской зоны природной очаговости чумы //Мол. генет., микробиол., вирусол.. – 1989. - №4. - С.39-42.
72. Балахонов С.В., Белькова С.А., Гремякова Т.А., Шайхутдинова Р.З. О возможности внутривидового типирования *Y. pestis* бактериофагами *FP1* и *FP3* //Актуал. аспекты природ.-очаг. болезней: Матер. межрегион. науч.-практ. конф., посвящ. 80-лет. Омского НИИПИ. - Омск, 2001. - С.170-172.
73. Балахонов С.В., Лясоцкий Л.Л. Апробация ПЦР для детекции *Fra1*-вариантов возбудителя чумы //Матер. науч.-практ. конф., посвящ. 100-лет. образования противочум. службы России. - Саратов, 1997. - Т.2. - С.159-160.
74. Балахонов С.В., Цэнджав С., Эрдэнебат А. Новые плазмидовары штаммов возбудителя чумы, изолированных в Монголии // Мол. генет., микробиол., вирусол. – 1991. - №11. - С.27-29.
75. Балахонов С.В., Шестопалов М.Ю., Романова И.Ф. Изучение генетических особенностей *Yersinia pestis supsp. altaica* с использованием *VNTR*-анализа //Международ. медико-санитар. правила и реализац. глобальной стратегии борьбы с инф. бол. в госуд.-участ. СНГ: МатерVIII межгосуд. науч. практ. конф.госуд.-участ. СНГ. – Саратов, 2007. - С.162-163.

76. Басова Н.Н., Герасюк Л.Г. К изучению иммуноотормозящего действия фракции 1 чумного микроба //Профилактик. особо опас. б-ней: Тез.докл. межинститутск. научн. конф. – Ростов-наДону, 1963. – С.17-18.
77. Басова Н.Н., Герасюк Л.Г., Орлова Г.М. Серологические исследования при чуме. Сообщение X. К усовершенствованию приготовления стойкого диагностикума для реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) Ростов н/Д ПЧИ, //Сб. науч. работ Дагест. ПЧС. – Махачкала, 1961. – С.106-114.
78. Басова Н.Н., Кравцов Ф.Е., Наумович Л.С. и др. Нормальные антитела к капсульному антигену возбудителя чумы //Соврем. пробл. серологических исследований при эпидемиол. надзоре в природных очагах чумы СССР: Тез. докл. Всесоюз. конф. – Саратов, 1982. – С. 58-59.
79. Басова Н.Н., Леви М.И. Реакция подавления связывания комплемента //Вопр. вирусологии. – 1960. - №3. – С.259-266.
80. Батурина И.Г., Наумов А.В., Тараненко Т.М. и др. Особенности иммуномодулирующей активности капсульного антигена чумного микроба у мышей различных линий //Иммунология. и спец. профилактик. особо опас. инф.: Матер.Рос. науч. конф. – Саратов, 1993. – С.5-6.
81. Бахрах Е.Э., Боровикова Т.П., Вейнблат В.И. и др. К характеристике соматических антигенов чумного микроба //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1972. - №9. – С. 101-105.
82. Бахтеева И.В., Титарёва Г.М., Дентовская С.В. и др. Влияние рН6 антигена на адгезию *Yersinia pestis* и *Yersinia.pseudotuberculosis* к эпителиальным клеткам и макрофагам //Международ. медико-санитар. правила и реализац. глобальной стратегии борьбы с инф. бол. в госуд.-участ. СНГ: Матер. VIII Межгос. науч.-практ. конф. госуд.- участ. СНГ. - Саратов, 2007. - С.171-172.
83. Баяр Г.А., Конилова Р.Е., Крылов В.Н. О методике постановки реакции непрямой гемагглютинации с эритроцитами, сенсibilизированными антителами //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1966. - №7. – С.97-102.
84. Баяр Г.А., Конилова Р.Е., Крылов В.Н. Капельный метод постановки реакции непрямой агглютинации с чумными бактериями //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1968. – Вып. 3. – С.95-97.

85. Безсонова А.А. О двух разновидностях *B. pestis*, обнаруживаемых при росте на глицериновых средах //Вестн. микробиол., эпидемиол. и паразитол. – Саратов, 1928. - Т.7., Вып.3. – С.250-253.
86. Безсонова А.А. Пептонная вода с рамнозой, как дифференциальная среда для *B. pestis* и *B. pseudotuberculosis rod. Pfeiffer'a* //Вестн. микробиол., эпидемиол. и паразитол.. – Саратов, 1929. – Т.8, Вып.4. – С.458-461.
87. Бейер А.П. К характеристике фенотипической изменчивости чумного микроба в блохе: Автореф. дис. ... канд.мед. наук. – Саратов, 1979. – 18с.
88. Бейер А.П., Брюханова Г.Д., Грижебовский Г.М. и др. Некоторые аспекты взаимоотношений чумного микроба с организмом переносчика //Диагностика, лечение и профилактика опас. инф. забол.. Биотехнология. Ветеринария: Матер. юбил. науч. конф., посвящ. 70-лет. НИИ микробиол. МО РФ. – Киров, 1998. – С.354-356.
89. Беленков Я.И. Серологический метод быстрой идентификации бактерий чумы: Автореф. дис. ... канд мед. наук. – Киров, 1946. – 23 с.
90. Беловостов А.С. Полимеразная цепная реакция: принципы, традиционные методики и нововведения //Мол. генет., микробиол., вирусол. - 1995. - №2. – С.21-26.
91. Белякова Н.И., Шанина Л.Н., Пономарёв Н.Г. и др. К вопросу о взаимосвязи антигенов мимикрии в тканях грызунов с уровнем их естественной резистентности к чуме //Генетика, микробиол., и соверш. методов лаб.диагност. особо опас. инф. – Саратов, 1991. – С.91-95.
92. Белякова Н.И., Шанина Л.Н., Пономарёв Н.Г. и др. Влияние мимикрии на уровень естественной резистентности к чуме инбредных линий мышей //Иммунология. и спец. профилактика особо опас. инф.: Матер. Рос. науч. конф. – Саратов, 1993. – С.170-171.
93. Берлин А.Л. Спонтанная агглютинация бактерий и «защита» как метод её устранения //Вестн. микробиол., эпидемиол. и паразитол. – Саратов, 1930. – Т.9. – Вып.3. – С.291-318.
94. Берлин А.А., Борзенков А.К. Ферментативная характеристика монгольских штаммов *B. pestis*. 1. Ферментативная активность в отношении различных

- углеводов, спиртов и глюкозидов. Отношение чумных штаммов к глицерину //Вестн. микробиол., эпидемиол. и паразитол. – Саратов, 1938. – Т.17, Вып.3-4. – С.215-226.
95. Бибииков Д.И. К вопросу о ландшафтных закономерностях природной очаговости чумы в Тянь-Шане //Природ. очагов. б-ни. и вопр. паразитол.: Тр. IV конф. по природ. очаг. бол. и вопр. паразитол. республ. Ср.Азии и Казахстана. – Алма-Ата, 1961. – Вып.3. – С.49-53.
96. Бибиикова В.А., Алексеева А.Н. Заражённость и блокообразование блох в зависимости от количества попавших в них микробов чумы //Паразитология. – 1969. – Т.3, №3. – С.196-202.
97. Бибииков Д.И., Бибиикова В.А. Опыт оценки некоторых факторов, определяющих сезонную закономерность эпизоотий чумы на сурках в Тянь-Шане //Тр. Средне-Азиат. н.-и. противочум. ин-та. – Алма-Ата, 1958. – Вып.4. – С.55-73.
98. Бибиикова В.А., Классовский Л.Н., Пейсахис Л.А., Хрущелевский В.П. К эпизоотологической оценке атипичных форм возбудителя чумы //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1972. – Вып. 4. – С. 5-10
99. Бибиикова В.А., Хрущелевская Н.М. Одно из направлений изучения блох и возбудителя чумы //Матер. IV научн. конф. по природн. очаговости и профилакт. чумы – Алма-Ата, 1965. – С.33-34.
100. Бичуль О.К. Моноклональные антитела к поверхностным антигенам чумного микроба: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Ростов-на-Дону, 1993. – 20 с.
101. Бичуль О.К., Лебедева С.А., Алексеева Л.П. и др.. Получение моноклональных антител к антигену фракции 1 чумного микроба и их использование для тестирования природных и экспериментальных штаммов иерсиний //Микробиол., лаб. диагност. и спец. профилакт. карантин. инф. - Саратов, 1989. – С.44-49.
102. Бичуль О.К., Лебедева С.А., Алексеева Л.П. и др. Диагностика капсульной и бескапсульной форм чумного микроба с помощью моноклональных антител //Сост. проб.и перспект. развит. диагност. бактер. инф.: Матер. раб. совещ. – Оболенск, 1990. – С. 71.

103. Бобров А.Г. Изучение распространенности и локализации мобильных элементов IS285 и IS100 в геномах иерсиний: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Саратов, 1995. - 18 с.
104. Бобров А.Г., Филиппов А.А. Распространённость IS285 и IS100 в геномах *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis* // Мол. генетт., микробиол., вирусол. - 1997. - №2. - С.36-40.
105. Бобров А.Г., Филиппов А.А. Структурный анализ плазмид кальцийзависимости штаммов *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis* различного происхождения // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1998. – С.111-116.
106. Божко Н.В. Получение диагностических препаратов на основе антигенов чумного микроба, выделенных поверхностно-активными веществами: Дис. ... канд. биол. наук. – Ростов-на-Дону, 1972. – 162 с.
107. Божко Н.В., Король В.В., Лысова Л.К., Барабаш Г.П. Диагностические препараты на основе фракции V чумного микроба // Диагност., лечение и профилактика опасных инф. забол. Биотехнология: Ветеринария: Матер. юбил. научн. конф., посвящ. 70-лет. НИИ микробиол. МО РФ. – Киров, 1998. – С.57-58.
108. Божко Н.В., С.А.Лебедева, О.К. Бичуль и др. Первичная характеристика свойств и диагностической ценности антигенного комплекса «фракция V» чумного микроба // Клин. лаб. диагностика. – 2005. - №6. – С.45-49.
109. Божко Н.В., Лебедева С.А., Лысова Л.К. и др. Изучение возможности конструирования чумного диагностикума для реакции коаггутинации на основе иммуноглобулинов к антигену «фракция V» и выяснение его диагностической ценности // Клин. лаб. диагностика. – 2006. - № 7 – С.49-51.
110. Бондаренко М.Ф. Материалы к эпизоотологии чумы в Зааралье // Матер. науч. конф. по природ. очагов. и профилактик. чумы. – Алма-Ата, 1963. – С.29-30.
111. Бочко Г.М., Гончарова Н.С., Некляев В.Н. и др. Перекрестно реагирующие антигены, сходные для возбудителей особо опасных инфекций и тканей человека // Иммунол. и иммунопрофилактик. чумы и холеры : Тез. докл. Всесоюз. конф. – Саратов, 1980. – С.28-29.

112. Брюханов А.Ф., Еременко Е.И., Брюханова Г.Д. и др. Генотипирование штаммов *Yersinia pestis* из коллекции института по вариабельному числу тандемных повторов //Актуал. пробл. эпидемиол. безопасности: Матер. юбил. конф. «Эпидемиол. безопас. на Кавказе. Итоги и перспективы», посвящ. 50-лет. Ставропольск. НИПЧИ - Ставрополь, 2002. – С.39-42.
113. Будыка Д.А. Изучение иммуногенности противочумных профилактических препаратов в феномене «переживания» //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 2001. – Вып.2. – С.128-132.
114. Булгакова Е.Г. Генетическая детерминированность гемолитической активности чумного микроба //Матер. науч.-практ. конф., посвящ. 100-лет. образования противочум. службы России. – Саратов, 1997. – Т.2. – С.17-18.
115. Булгакова Е.Г., Кутырев В.В. Генетическая детерминированность гемолизина чумного микроба //Матер. VIII Всерос съезда. об-ва эпидемиол., микробиол. и паразитол. – М., 2002. – Т.1. – С.142.
116. Булгакова Е.Г., Попов Ю.А. Рекомбинантная плазмидная ДНК рЕК-7-ДНК зонд для идентификации штаммов чумного микроба, несущих плазмиду пестициногенности, способ её конструирования и штамм бактерий *E.coli*, содержащий плазмиду – продуцент зонда для идентификации штаммов чумного микроба, несущих плазмиду пестициногенности //Авт. свид-во №1615181. Заявлено 07.12.1988. Опубл. 23.12.90 в Бюлл. изобрет. – 1990. - №47.
117. Булгакова Е.Г., Филиппов А.А., Кутырев В.В., Проценко О.А. Разработка технологии получения компонентов химических противочумных и противохолерных вакцин на основе рекомбинантных штаммов //Мол. генет., микробиол., вирусол. - 1994. - № 4. – С.31.
118. Бургасов П.Н., Коробкова Е.И., Лобанов В.Н. и др. Критерии по отбору новых вакцинных штаммов чумного микроба //Профилактикт. чумы в природ. очагах.: Матер. конф. – Саратов, 1973. – С.139-143.
119. Бухарин О.В. Биомедицинские аспекты персистенции бактерий //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1994 (Приложение). – С. 4-13.

120. Бухарин О.В., Гриценко В.А.. Экологическая детерминированность внутривидового разнообразия патогенных бактерий //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 2000. - №1. – С.103-106.
121. Бывалов А.А., Евстигнеев В.И., Пименов Е.В. Васильев Н.Т. Использование комплексного препарата, включающего антигены Ф1 и Б, для иммунизации экспериментальных животных против чумы //Матер. науч.-практ. конф., посвящ. 100-лет. образования противочум. службы России. – Саратов, 1997. – Т.1. – С.194.
122. Бывалов А.А., Паутов В.Н., Чичерин Ю.П. и др. Эффективность ревакцинации павианов гамадрилов чумной живой сухой вакциной НИИС и фракцией 1 чумного микроба //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1984. - №4. – С.74-76.
123. Быкова З.И. Биологические свойства чумных бактериофагов: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Саратов, 1964. – 15 с.
124. Вальков Б.Г. Длительность сохранения чумного микроба и антител при экспериментальной чуме у малых сусликов //Сб. науч. работ Элистинской ПЧС. – Элиста, 1961. – Вып. 2. – С.215-220.
125. Вартамян А.А., Михайлова Р.С., Сукиасян М.Л., Шехикян М.Т. Об основных свойствах штаммов *P.pestis*, выделенных в 1962 г. на территории Армении //Тр. Армянской ПЧС. – Ереван, 1964. - Вып.3. - С.45-49.
126. Васенин А.С. О корреляции показателей иммуногенной активности и «латентной» вирулентности у субкультур вакцинного штамма ЕВ //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1971. – Вып. 5. – С.83-86.
127. Васильева Г.И., Дорошенко Е.П., Киселёва А.К. Изменение «латентной» вирулентности у вакцинного штамма *Yersinia pestis* при размножении внутри макрофагов //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. - 1988. - №9. – С.63-65.
128. Васильева Г.И., Киселёва А.К., Мишанькин М.Б. и др. Апоптоз фагоцитов как один из возможных механизмов патогенетического действия «мышинного» токсина возбудителя чумы //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 2005. - №2. – С.49-52.

129. Васильева Г.И., Козловский В.Н., Мишанькин Б.Н. и др. Апоптоз Т-лимфоцитов, индуцированный «мышинным» токсином чумного микроба //Иммунология. – 2003. - №1. – С.6-9.
130. Васильева Г.И., Мишанькин М.Б., Козловский В.Н. и др. Апоптоз как один из возможных механизмов патогенетического действия суперантигенов возбудителей чумы и холеры //Актуал. пробл. эпидемиол. безопасности: Матер. юбил. науч.-практ. конф. «эпидемиол. безопасн. на Кавказе. Итоги и перспективы», посвящ. 50-лет. Ставропольск. НИПЧИ. – Ставрополь, 2002. - С.71-72.
131. Васильева Г.И., Пустовалов В.Л., Дорошенко Е.П. Влияние антигена F1А чумного микроба на рецепторы Т-лимфоцитов. //Пробл. мед. и сан. микробиологии города: Тез. областной конф. - Ростов-на-Дону, 1987. – С.39-40.
132. Васильева Г.И., Пустовалов В.Л., Киселёва А.К. и др. Оценка вирулентности штаммов *Yersinia pestis* по индексу завершённости фагоцитоза //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1987. - №6. – С.117.
133. Васильева Г.И., Пустовалов В.Л., Таранова В.Н. Киселёва А.К. «Остаточная» вирулентность вакцинных штаммов чумного микроба, многократно пассированных через организм экспериментальных животных //Соврем. аспекты профилактик. зооноз. инф.: Тез. докл. к Всесоюз. науч. конф. специалистов противочум. учрежд. – Иркутск, 1984. – Ч.2. – С.5-6.
134. Вахрушева З.П., Моисеева Г.П. О формах чумного микроба, выделяемых из организма иксодовых клещей, заражённых типичными штаммами в условиях эксперимента //Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилак.: Матер. межгос. науч.-практ. конф. – Алма-Ата, 1992. – Ч.1. – С.91-94.
135. Вейнблат В.И. Влияние условий культивирования на синтез чумным микробом некоторых антигенов: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Саратов, 1968. – 16 с.
136. Вейнблат В.И. Антигены *Yersinia pestis* (Биохимические и иммунологические аспекты): Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. – Саратов, 1974. - 36 с.
137. Вейнблат В.И. Конструирование диагностикумов на основе энтеротоксина холерного вибриона и фибринолизина возбудителя чумы, их и значение в

- системе эпидемиологического надзора //Бактериальные токсины: 2-ая Всесоюз. конф. – Юрмала, 1989. – С.22.
138. Вейнблат В.И., Адамов А.К. Получение из чумных микробов токсина, лишённого примеси фракции 1 //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1969. – Вып.1. – С.80-81.
139. Вейнблат В.И., Бахрах Е.Э. Влияние отдельных компонентов питательной среды на синтез чумным микробом некоторых антигенов. Сообщение 2. Влияние условий культивирования на начальную скорость образования чумным микробом фракции 1 //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1968, Вып. 2 – С.126-130.
140. Вейнблат В.И., Веренков М.С., Васенин А.С. Получение капсульного антигена из живых чумных микробов //Иммунол. и иммунопрофилактик. чумы и холеры: Тез. докл. Всесоюз. конф. – Саратов, 1980. – С.36-39.
141. Вейнблат В.И., Гусева Н.П., Ананьев В.В., Самыгин В.М. Липид препаратов капсульного антигена чумного микроба //Микробиол., лаб. диагност., спец. профилактик. карантин. инф. - Саратов, 1989. - С.90-93.
142. Вейнблат В.И., Никифоров В.В., Кормилицын А.В. Гидродинамическая характеристика капсульного антигена возбудителя чумы //Вопр. генетики, мол. биол. и микробиол. чумы и холеры. – Саратов, 1985. - С. 37-42.
143. Вейнблат В.И., Титенко М.М., Веренков М.С. и др. Видоспецифический поверхностно-соматический антиген возбудителя чумы //Мол. биол., генет. и иммунол. возб. особо опас. инф.: Тез. докл. Всесоюз. конф. – Ростов-на-Дону, 1984. – С. 94-96.
144. Вельнер Е.И., Николаев Н.И., Адамов А.К. и др. Перспективы применения специфических противочумных флуоресцирующих глобулинов для идентификации бактерий чумы //Вопр. микробиол. и лаб. диагност. особо опас. инф.: Сб. научн. работ противочум. учрежд. – Саратов, 1965. – С.132-137.
145. Вельнер Е.И., Николаев Н.И., Адамов А.К. К вопросу о повышении специфичности противочумных флуоресцирующих антител //Вопр. микробиол. и лаб. диагност. особо опас. инф.: Сб. научн. работ противочум. учрежд. – Саратов, 1965а. – С.140-145.

146. Веренков М.С., Вельнер Е.И. Получение люминесцирующих антител из адсорбированных противочумных агглютинирующих сывороток //Производство бактериальных препаратов для профилакт. и диагност. особо опас. инф.: Сб. науч. работ противочум. учрежд. – Саратов, 1966. – С.163-168.
147. Вержуцкий Д.Б., Окунев Л.П., Чумаков А.В., Фёдоров С.В. О степени участия разных видов мелких млекопитающих в эпизоотическом процессе в Тувинском очаге чумы //Актуал. аспекты природноочаговых болезней: Матер. межрегион. науч.-практ. конф., посвящ. 80-лет. Омского НИИПИ. - Омск,2001. - С.165-166.
148. Вершинина Т.И. О популяционной гетерогенности возбудителя чумы из природных очагов Горного Алтая и Север-Западной Монголии: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Саратов, 1986. – 18 с
149. Видяева Н.А., Кутырев В.В., Проценко О.А. и др., Экспрессия антигенов чумного микроба, кодируемых плазмидой Ca^{2+} -зависимости //Мол.генет., микробиол., вирусол. - 1990. - №6. – С.17-21.
150. Видяева Н.А., Кутырев В.В., Шанина Л.Н., Проценко О.А. Перекрестнореагирующие антигены возбудителя чумы и человека //Генетика и биохимия вирулент. возб. особо опас. инф.: Тез. докл. Рос.науч. конф. – Волгоград, 1992. – С.80.
151. Витинский Ю.И., Куклик Г.В., Обридко Н.Н. Об основных фазах солнечного цикла //Солнечные данные. – 1986. - №3. – С.53-56.
152. Витинский Ю.И., Милецкий Е.В. О внутренних закономерностях 11-летних циклов плотности потока радиоизлучения Солнца на частоте 2800 МГц //Солнечные данные. – 1985. - №4. – С.86-91.
153. Владимирский Б.М., Волынский А.М., Виноградов С.А. и др. Экспериментальное исследование влияния элетромагнитных полей сверхнизкой частоты на теплокровных животных и микроорганизмы //Влияние солнечной активности на атмосферу и биосферу Земли. – М., 1971. – С.224-233.
154. Власьянц О.В., Михайлова Р.С., Лалазарова И.Г. К вопросу о патогенности полевочьих штаммов чумного микроба //Особо опас.инф. на Кавказе: Матер. науч. конф. противочум. учрежд. Кавказа по эпидемиол., эпизоотол., профилакт. особо опас. инф. - Ставрополь,1966. - С.44-47.

155. Водопьянов С.О., Рыбкин В.С., Родионова А.В и др. Пили (фимбри) возбудителей чумы и псевдотуберкулёза: обнаружение в реакции гемагглютинации и в системе иммуноферментного анализа //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. - 1988. - №8. – С.7-10.
156. Волковой К.И. Факторы вирулентности и иммуногенности *Y.pestis* //Пробл. мед. и экологич. биотехнол.: Тез. докл. юбил. конф., посвящ. 25-лет ГНЦ приклад. микробиол. – Оболенск, 1999. – С.277.
157. Волосивец А.И. Изучение чумных фагов и фагоустойчивых мутантов бактерий. Сообщение 1. Биологические свойства чумных фагов //Бюлл.эксперим. биол. и медицины. – 1963. - №9. – С.81-84.
158. Волосивец С.И. Изучение свойств устойчивых к ним мутантов возбудителя чумы //Тез. X науч. конф. противочум. учрежд. Ср.Азии и Казахстана. – Алма-Ата, 1979. - Вып.І. – .25-28.
159. Воронцов Е.Д., Барсуков А.А., Годков М.А. и др. Подавление кислородного метаболизма фагоцитов капсульным белком //Актуал. вопр. теоретич. и приклад. инфекц. иммунол. Механизмы противoinфекц. иммунитета: Тез. докл. II Всесоюз.конф. – М., 1987. – С.36.
160. Галузо И.Г., Шунаев В.В., Афанасьева О.В. и др. Высокогорный природный очаг чумы в Казахстане //Природно-очагов. трансмисс. болезни в Казахстане. – Алма-Ата, 1951. – Вып.1. – С.13-167.
161. Гальцева Г.В., Ерохин Е.П, Брудный Р.А. и др. Иммуносуспензионные препараты для диагностики природно-очаговых и других инфекций //Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилактики: Матер. межгосуд. науч.-практ. конф. – Алма-Ата, 1992. Ч.І. – С.91-94.
162. Гармазова А.Д. О свойствах чумного микроба, длительно хранившегося в воде //Докл. Иркутск. н.-и. противочумн. ин-та Сибири и Дальнего Востока – Иркутск, 1971. – Вып.9. – С.51-52.
163. Гармазова А.Д., Константинова М.А., Якубовская Т.В. и др. О сохраняемости возбудителей некоторых особо опасных инфекций в воде //Докл. Иркутск. противочум. ин-та. – 1961. – Вып.2.. – С.39-40.

164. Гаузштейн Д.М., Куницкий В.Н., Гаузштейн Л.Д. и др. О длительности регистрации инфицированных возбудителем чумы блох и зверьков в норе большой песчанки //Матер. V науч. конф. противочум. учрежд. Ср. Азии и Казахстана. – Алма-Ата, 1967. – С.19-21.
165. Гвозденко Н.А., Валенцев В.Е., Рублёв Б.Д. и др. Корреляция чувствительности полёвочьих штаммов чумного микроба к нормальной сыворотке человека с наличием плазмиды пестициногенности //Бактериал. плазмиды: Тез. докл. Всесоюз. совещ. по программе «Плазида». – Нальчик, 1990. – С.37.
166. Гвозденко Н.А., Валенцев В.Е., Рублев Б.Д., Рыжков В.Ю. Чувствительность штаммов бактерий *Yersinia pestis*, выделяемых от полевок, к нормальной сыворотке человека. //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. - 1992. - №11-12. - С.8-10.
167. Герасюк Л.Г., Гамлешко Х.П., Канчух А.А. Сенсibilизация эритроцитов токсином и анатоксином чумного микроба //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1970. – Вып. 3. – С.187-189.
168. Герасюк Л.Г., Гриценко А.Н., Гамлешко Х.П. Сенсibilизация эритроцитов поликонденсированными белками противочумных сывороток //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1970. – Вып. 2. – С.171-174.
169. Гинцбург А.Л. Плазмиды и мобильные генетические элементы патогенных бактерий рода *Yersinia* //Генетика. - 1987. – Т.23, №4. - С.581-595.
170. Гинцбург А.Л., Романова Ю.М. Некультивируемые формы бактерий и их роль в сохранении возбудителей сапронозов во внешней среде //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. - 1997. - №3. – С116-121.
171. Гинцбург А.Л., Романова Ю.М. Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний //Клин. лаб. диагностика. – 1998. - №2. – С.35-39.
172. Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Алексеева Н.В. и др. Механизм действия и природа факторов, индуцирующих образование некультивируемых форм у *Salmonella typhimurium* //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1999. - №6. – С.3-8.

173. Глухов А.И., Гордеев С.А., Альтшулер И.Е. и др. Применение гнездовой ПЦР в детекции возбудителя чумы //Клин. лаб. диагностика - 2003. - №7. – С.48-50.
174. Голов Д.А., Иофф И.Г. Влияние различных условий на сохранение чумного микроба в организме блох в различных стадиях их развития //Тр. Первого Всесоюз. противочумн. совещ. – Саратов, 1927. - С.158-175.
175. Головачёва С.Н. Лиофильная сушка эритроцитарных диагностикумов //Вопр. приклад. иммунол. – Л.,1967. – Т.6. – С.129-131.
176. Головки Э.Н., Пейсахис Л.А., Дерлятко К.И. и др. К вопросу о природной очаговости чумы в Западной части Гиссарского хребта //Пробл. особо опас. инф. - Саратов, 1973. - Вып.2. - С.31-37.
177. Головлёв Е.Л. О старых проблемах новой систематики бактерий //Микробиология. – 1998. – Т.67, №2. – С.281-286.
178. Головлёв Е.Л. Другое состояние неспорулирующих бактерий //Микробиология. – 1998. - Т.67, №6. – С.725-735.
179. Голубева В.К., Анисимова Т.И. О наличии «феномена переживания» у белых мышей при одновременном введении вакцинного и вирулентных штаммов чумного микроба //Вопр. микробиол., лаб. диагност. особо опас. инф. – Саратов, 1965. – С.248-251.
180. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия. – М.,1961. – 298 с.
181. Гольдфарб Л.М., Плотников О.П., Александрова Н.М. и др Чувствительность штаммов возбудителя чумы, выделенных в различных природных очагах чумы, к фагу *M1* //Генетика и микробиол. природ.-очаг. инф. - Саратов,1984. - С.10-13.
182. Гольдфарб Л.М., Плотников О.П., Шехикян М.Т. и др. О двух фаговарах возбудителя чумы, циркулирующих в Закавказском высокогорном очаге //Вопр. генетики, мол.биол. и микробиол. чумы и холеры. – Саратов, 1985. – С.27-29.
183. Гольдфарб Л.М., Шанина Л.Н. О связи между пестициногенностью, фибринолитической активностью и плазмокоагулирующей способностью возбудителя чумы. //Генетика, биохимия и иммунохимия особо опас. инф.- Ростов-на-Дону, 1967. – Вып.1. - С. 10-12.
184. Гонтарь И.П. Ефременко В.И., Фарбер С.М. Антигенная общность возбудителей чумы, холеры, псевдотуберкулёза, туляремии, бруцеллёза, сапа,

- мелиоидоза //Иммунол. и иммунопрофилактик.. чумы и холеры: Тез. докл. Всесоюз. конф. – Саратов, 1980. – С.27-28.
185. Гончаров Е.К. Конструирование штамма кишечной палочки продуцента пестицина : Автореф. дис. ... канд. мед. наук.- Ростов-на-Дону, 1987. – 20 с.
186. Гончарова Н.А., Иванова В.С., Лебедева С.А., Заренков М.И. Генетический анализ высокомолекулярных плазмид полевоочьих штаммов чумного микроба //Эпидемиол., микробиол., иммунол. бактериал. и вирус. инф.: Тез. докл. обл. науч. конф. молодых учёных. - Ростов-на-Дону, 1989. - С.145-147.
187. Гордейко В.А. Пути циркуляции и эпидемиологическое значение иерсиний в агроценозах : Автореф. дис. ... канд. мед. наук – М.,1990. – 32 с.
188. Гордейко В.А. Цепь циркуляции иерсиний в агроценозе и эпидемиологическое её проявление //Потенц. патогенные бактерии в природе. – М., 1991. - С.75-85.
189. Горелик Л.С., Каган А.Ф. Влияние уретана на рост асцитной карциномы Эрлиха мышей разного генотипа //Пробл. эксперимент. генетики. - Минск, 1972. - С.259-261.
190. Горшков О.В. Геномный полиморфизм коллекционных штаммов *Yersinia pestis*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. - Саратов, 2000. – 25 с.
191. Горшков О.В., Савостина Е.П., Попов Ю.А. и др. Генотипирование штаммов *Yersinia pestis* из различных природных очагов //Мол. генет., микробиол., вирусол. - 2000. - №3. – С.12-16.
192. Грабар П., Буртен П. Иммунофоретический анализ. Применение для исследования биологических жидкостей человека / Пер. с франц. – М.,1963. – 206 с.
193. Грамотина Л.И. О методике выявления пестицинов полёвоочьих штаммов чумного микроба из Закавказского нагорья //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1974. – Вып.1. – С.12-14.
194. Грамотина Л.И., Проценко С.Л., Лопаткин О.Н. Характеристика штаммов чумного микроба из очагов Кавказа и Закавказья и других регионов по плазмидному составу //Особо опас. инф. на Кавказе: Тез. докл. к VI краевой науч. конф. – Ставрополь, 1987. – С.11-13.

195. Гребцова Н.Н., Лебедева С.А., Чернявская А.С. Мутагенный эффект при трансдукции маркеров (*Gm-Km*)^R плазмиды R323 в *Yersinia pestis* // Мол. генет., микробиол., вирусол. - 1985. - №3. - С.22-27.
196. Гребцова Н.Н., Чернявская А.С., Лебедева С.А., Иванова В.С. Изучение фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов в отношении *Yersinia pestis* с дефектными и полноценными *fra*-генами // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. - 1990. - №5. - С.7-11.
197. Гребцова Н.Н., Лебедева С.А., Чернявская А.С. и др. Изменчивость бактерий чумы (*Yersinia pestis*), сопутствующая появлению устойчивости к диагностическому фагу // Изв. Сев.-Кавк. науч. центра Высш. школы. Естест. науки. - 1998. - №4. - С.79-86.
198. Гремякова Т.А., Анисимов А.П. Серологическая активность антигена «фракция 1» *Yersinia pestis* определяется его белковым компонентом // Гомеостаз и инфекционный процесс: Тез. докл. междунар. конф. - Саратов, 1996. - Т.2. - С.319.
199. Гремякова Т.А., Благодатских А.Я., Жиленков Е.Л. Взаимодействие псевдомонадного бактериофага Ø05 с липополисахаридами иерсиний // Матер. VII съезда Всерос. об-ва эпидемиол., микробиол. и паразитол. - М., 1997. - Т.1. - С.190-191.
200. Гремякова Т.А., Волковой К.И., Степанов А.В. и др. Температуропосредованное изменение иммунохимической специфичности липополисахаридов *Yersinia pestis* и чувствительности клеток к R-специфическим фагам // Матер. науч.-практ. конф., посвящ. 100-лет. образов. противочум. службы России. - Саратов, 1997. - Т.2. - С.28.
201. Гремякова Т.А., Степаншина В.Н., Коробова О.В., Анисимов Г.А. Протективная активность рекомбинантного штамма *Salmonella minnesota R595/GSA*, синтезирующего капсульный антиген чумного микроба, при экспериментальной чуме у мышей // Мол. генет., микробиол., вирусол. - 1994. - №1. - С.23-26.

202. Грицюте Л.А. К вопросу об активности щелочной фосфатазы в лёгких мышцей разных инбредных линий //Вопр. медицинск. генетики и генетики человека. - Минск, 1971. – С.214-220.
203. Губарев Е.М., Пустовалов В.Л., Коннова А.М. и др. Изучение количественного содержания и свойств фракции 1А и 1В вирулентных и авирулентных штаммов чумного микроба //Профилакт. особо опас. болезней: Тез. докл. межинститут. научн. конф. – Ростов-на-Дону, 1963. – С.28-29.
204. Гуревич Г.К. Взаимодействие бактериофагов *P1 vir* и *P1 cml clr 100 ts* с бактериями *Yersinia pestis* и трансдукция хромосомных генов : Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Саратов, 1985. – 21 с.
205. Гуревич Г.К., Валенцев В.В., Кахраманова Т.Т. Генетическое изучение хромосомных мутаций чумного микроба с помощью *P1*-трансдукции //Изв.Сев.-Кавк. науч. центра Высш. школы: Естест. науки. - 1991. - №3. - С.120-124.
206. Гуревич Г.К., Дегтярёв Б.М., Лебедева С.А. Литическая активность бактериофага *P1 cml clr 100 ts* в отношении *Yersinia pestis* //. Рук. депонир. во ВНИИТИ МЗ СССР №Д 6725-83 (РЖБ. - 1983. – Раздел III, №12. – С.3712).
207. Гуревич Г.К., Лебедева С.А. Особенности поведения кишечного бактериофага *P1* в бактериях возбудителя чумы //Молек. биол. и генет. возб. особо опас. инф. – Саратов, 1982. – Ч.1. – С.18-20.
208. Гуревич Г.К., Лебедева С.А., Стыценко Т.М., Дегтярёв Б.М. Трансдукция и котрансдукция хромосомных генов у *Yersinia pestis* //Изв. Сев.-Кавк. науч. центра Высш. школы. Естест. науки. – 1987. - №1. – С.100-107.
209. Гуревич Г.К., Лебедева С.А. Способ передачи плазмидной ДНК и хромосомных маркеров у чумного микроба: А.с. №1751986 по заявке Ростовск.-н/Д противочум. ин-та №4498022. Приоритет от 05.03.1990.
210. Гуревич Г.К., Некляев В.Н., Бичуль О.К., Лебедева С.А. Выявление и попытки идентификации хромосомного локуса, связанного с экспрессией вирулентности и иммуногенности у *Yersinia pestis* //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. - 1996. - №6. – С.21-24.
211. Гурлева Г.Г. О специфичности чумного бактериофага //Тр. РПЧИ и Сталинградской ПЧС. – Сталинград, 1959. – Т.ХIV. – С.99-108.

212. Гурлева Г.Г. Неполные агглютинины при чуме : Автореф. дис. ... канд.мед. наук. – Ростов-на-Дону, 1964. – 22 с.
213. Давтян Г.Г., Акопян А.К. Патоморфологические изменения у обыкновенных полевок при чумной интоксикации //Особо опас. инф. на Кавказе: Матер. науч. конф. противочум. учрежд. Кавказа по эпидемиол., эпизоотол., профилакт. особо опас. инф. - Ставрополь, 1966. - С.67-69.
214. Дальвадянц С.М. Характеристика соматического антигена чумного микроба, изолированного из авирулентного, бескапсульного, атоксичного варианта методом Буавена //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1968. – Вып.2. – С.134-138.
215. Дальвадянц С.М. Характеристика соматических антигенов чумного микроба, изолированных по методу Буавена и Вестфал-Людерица: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Саратов, 1968. – 16 с.
216. Дальвадянц С.М. Химическая чумная вакцина: конструирование, экспериментальное и клиническое обоснование применения для ревакцинации людей: Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. – Саратов, 1991. – С.18.
217. Дальвадянц С.М. Величко Л.Н., Князева Т.В. и др. Использование соматического эритроцитарного диагностикума для обнаружения возбудителя чумы в блохах //Актуал. вопр. лаб. диагност. и биохимии возб. чумы. - Саратов, 1984. – С.11-14.
218. Дальвадянц С.М., Мартенс Л.А., Тараненко Т.М., Джапаридзе М.Н. Некоторые свойства компонентов, выделенных из препарата «основного» соматического антигена бактерий чумы //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1972. – Вып. 4. – С. 17-20.
219. Дальвадянц С.М., Попов А.А., Буркина М.А. Иммуноэлектрофоретический анализ соматического антигена чумного микроба //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1969. – Вып.5. – С. 9-12.
220. Дармов И.В., Маракулин И.В., Янов С.Н. и др. Конструирование штаммов-продуцентов антигенов *F1* и *T* чумного микроба //Биотехнология. – 1992. - №6. – С.59-62.
221. Девдариани З.Л., Веренков М.С., Федорова В.А., Вейнблат В.И. Получение и диагностическая значимость моноклональных антител к возбудителям чумы и

- псевдотуберкулеза //Иерсиниозы (микробиол., эпидемиол., клиника, патогенез, лаб. диагност.): Тез. докл. Всесоюз. науч.-практ. конф. – Владикавказ, 1989. - Ч. II. – С. 93-94.
222. Девдариани З.Л., Мартиневский И.Л., Веренков М.С. и др. Результаты изучения активности, чувствительности и специфичности моноклональных диагностических чумных антикапсульных люминесцирующих иммуноглобулинов //Механизмы формирования иммунитета к особо опас. инф. - Саратов, 1986. – С. 3-7.
223. Девдариани З.Л., Фёдорова В.А., Ермаков Н.М. и др. Перспектива использования линейных мышей для производства диагностических иммуноглобулиновых препаратов //Диагност., лечение и профилактик. опасных. инф. забол.: Биотехнология. Ветеринария: Матер. юбил. науч. конф., посвящ. 70-лет. НИИ микробиол. МО РФ – Киров, 1998. – С.81-82.
224. Девдариани З.Л., Фёдорова В.А., Солодовников Н.С. и др. Иммуноферментная тест-система для идентификации типичных и атипичных штаммов чумного микроба //Мед. паразитол. – 1997. - №1. – С.31-33.
225. Демидова Г.В., Зюзина В.П., Тынянова В.И. Попытка выявления систем хозяйской специфичности у бактерий возбудителя чумы //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. - 1983. - №11. – С.33-36.
226. Демин Е.П. Эпизоотия чумы у плоскочерепных полёвок //Изв. Иркутск. н.-и. противочум. ин-та Сибири и Дальнего Востока. - Улан-Удэ, 1959. - Т. XXI. - С.68-69.
227. Денесюк А.И., Завьялова Г.А., Абрамов В.М, Завьялов В.П.. Компьютерный анализ структуры и иммунобиологической активности Ф1-антигена чумного микроба //Актуал. вопр. профилактик. опасных инф. забол.: Тез. докл. Межведомст. науч. конф. – Киров, 1991. – С. 175-176.
228. Дентовская С.В., Бахтеева И.В., Титарева Г.М. и др. Структурное разнообразие и эндотоксическая активность липополисахарида *Yersinia pestis* //Биохимия. – 2008. – Т.73., №.2. – С.237-246.
229. Дерлятко К.И., Головкин Э.Н., Слудский А.А. Основные итоги изучения Гиссарского природного очага //Организация эпиднадзора при чуме и меры её

- профилактики: Матер. межгосуд. науч.-практ. конф. - Алма-Ата, 1992. - Ч.II. - С.211-213.
230. Дертева И.И., Веренков М.С., Вельнер Е.И. Сравнительное изучение методов приготовления люминесцирующих антител против фракции 1 чумного микроба //Производство бактериальных препаратов для профилакт. и диагност. особо опас. инф. – Саратов, 1966. – С.153-162.
231. Дертева И.И., Кондрашкина К.И., Веренков М.С. Возможность обнаружения капсулообразующих и бескапсульных вариантов чумного микроба в инфицированных блохах иммуно-флюоресцентным методом //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1970. – Вып.3– С.143-147.
232. Диденко Л.В., Константинова Н.Д., Романова Ю.М. и др. Ультраструктурная организация клеток *Salmonella typhimurium* при длительном голодании и переходе в некультивируемое состояние //Мол.генет., микробиол., вирусол. - 2000. - №3. – С.21-26.
233. Дмитриевская М.Е. О миграции сурочьих блох в Сыртах Сары-джаса и ее практическом значении //Тр. Средне - Азиат. противочум. ин-та. – Алма-Ата, 1961. – Вып.7. – С.357-359.
234. Домарадский И.В. Возбудители пастереллёзов и близких к ним заболеваний. - М., 1971. – 288с.
235. Домарадский И.В. Чума: современное состояние гипотезы, проблемы. – Саратов, 1993. - 130.с.
236. Домарадский И.В. Чума. - М., 1998. – 175 с.
237. Домарадский И.В., Голубинский И.В., Лебедева С.А., Сучков Ю.Г. Биохимия и генетика возбудителя чумы. - М., 1974. - 168 с.
238. Домарадский И.В., Колесник Р.С., Клец Э.И., Тимофеева Л.А. _Материалы к вопросу о неспецифической иммунизации против чумы псевдотуберкулёзными микробами //Профилакт. особо опас. б-ней: Тез. докл. межинститутск. науч. конф. – Ростов-на-Дону, 1963. – С.45-48.
239. Домарадский И.В, Яромюк Г.А., Калмыкова А.П. Новый метод получения токсических, иммуногенных и фибринолитически активных фракций чумного

- микроба //Докл. Иркутск. н.-и. противочум. ин-та Сибири и Дальнего Востока – Чита, 1961. – Вып.2. – С. 43-44.
240. Дорожко О.В. Современное состояние вопроса о бактерионосительстве //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1975. – Вып.3-4 (43-44). – С.122-127.
241. Дорожко О.В., Адамов А.К., Белобородов Р.А. Некоторые морфологические аспекты моделирования фарингеального бактерионосительства при чуме у больших песчанок //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1976. – Вып 1– С.45-49.
242. Дорошенко Е.П., Васильева Г.И., Кислелёва А.К. Восстановление свойств вирулентных штаммов чумного микроба при пассировании в перитонеальных макрофагах морских свинок //Профилактик. и меры борьбы с чумой: Матер. межгосуд. науч. конф., посвящ. 100-лет. открытия возб. чумы. – Алматы, 1994. – С.89.
243. Дробков В.И., Абдуллин Т.Г., Дармов И.В. Использование иммуноферментного анализа при лабораторной диагностике чумы //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1991. - №10. - С.40-42.
244. Дроздов И.Г., Костюкова Т.А., Кондрашин Ю.И. Анисимов П.И.. Передача плазмиды СКΔ11 при слиянии протопластов *Yersinia pestis Harbin* //Мол. биол., генет. и иммунол., возб. особо опас. инф.: Тез. докл. Всесоюз. науч.конф. – Ростов-на-Дону, 1984. – С.18-20.
245. Дроздов О.А., Григорьева А.С. Многолетние циклические колебания атмосферных осадков на территории СССР. - Л., 1971. -
246. Дружинина И.П., Наумшина М.С., Князевская Э.С. К вопросу специфичности чумного поливалентного бактериофага //Тр. ин-та «Микроб». – Саратов, 1960. – Вып.4. – С.235-239.
247. Дрыгин Ю.Ф., Воробьёв И.И., Сахурия И.Б. и др. Конструирование нерадиоактивных ДНК-зондов для визуальной детекции бактерий рода *Yersinia* (возбудителей чумы, псевдотуберкулёза, кишечного иерсиниоза) //Генная и клеточная инженерия: Тез. докл. II Всесоюз. планово-отчёт. конф. – М., 1994. – С.17-18.
248. Дубровский Ю.А., Шустрова Н.М., Кузнецова Г.Г. Ассоциация энтеробактерий и не ферментирующих микроорганизмов зимних гнёзд

- общественных полёвок и поверхности почвы в бесснежную половину года //Бюлл. МОИП, отд. биол. – 1990. – Т.95, Вып.4. – С.28-35.
249. Дубянский М.А. Сохранение чумных блох в колониях больших песчанок //Бюлл. МОИП, отд. биол. - 1963. – Т.68, Вып.4. – С.157.
250. Дубянский М.А., Богатырёв С.К. К вопросу о механизме воздействия солнечной активности на интенсивность эпизоотий чумы //Тез. X науч. конф. противочум. учрежд. Сред. Азии и Казахстана. - Алма-Ата, 1979. – Вып.1. - С.185-187.
251. Дубянский М.А., Дубянская Л.Д., Турулина Г.К. и др. Типы атмосферной циркуляции как предвестники эпизоотической обстановки в некоторых районах Казахстана //Тез. X науч. конф. противочум. учрежд. Сред. Азии и Казахстана. - Алма-Ата, 1979б. – Вып.1. – С. 189-192.
252. Дубянский М.А., Казаков В.В., Пеньков В.Н. и др. О цикличности эпизоотического процесса в среднеазиатском очаге чумы в связи с геомагнитной активностью //Тез. X науч. конф. противочум. учрежд. Сред. Азии и Казахстана. - Алма-Ата, 1979а. – Вып.1. – С.187-189.
253. Дубянский М.А., Классовский Л.Н., Казаков В.З. и др. Колебания геомагнитного поля как один из возможных факторов, влияющих на рост микроба чумы на плотных питательных средах //XII Межреспубл. науч.-практ. конф. противочум. учрежд. Сред. Азии и Казахстана по профилакт. чумы : Тез. докл. – Алма-Ата, 1985. – С.14-16.
254. Дунаев Г.С., Зыкин Л.Ф., Метлин В.Н, Костюковский В.М.. Предварительные результаты исследований по Л-формам чумного микроба //Особо опасные и редко встречающиеся троп. инф. – Волгоград,, 1980. – С.26-28.
255. Дунаев Г.С., Зыкин Л.Ф., Черченко И.И. и др. Выделение Л-форм чумного микроба от диких грызунов в природном очаге //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1982. - №8. – С.50-54.
256. Душкин В.А. Характеристика чувствительности мышей инбредных линий к *S. typhimurium* // Матер. конф. по биологии лаб. животных. – М.,1967. – С.27-29.
257. Д'Эрелль Ф. Бактериофаг и его значение для иммунитета. - М.:Л., 1926. - 223 с.

258. Д'Эрелль Ф. Бактериофаг и феномен выздоровления. - Тифлис, 1935. – 262 с.
259. Дятлов А.И. Методологические основы исследования популяционных различий в чувствительности грызунов к чуме //Особо опас. инф. на Кавказе : Тез. докл. науч.-практ. конф. противочум. учрежд. Кавказа по природ.-очагов., эпидемиол., профилакт. особо опас. инф. - Ставрополь,1974. – Вып.1. - С.80-83.
260. Дятлов А.И. О непаразитарном механизме энзоотий чумы //Экология возб. сапронозов : Сб.науч. тр. - М., 1988. – С.105-117.
261. Дятлов А.И. Эволюционные аспекты в природной очаговости чумы. – Ставрополь,1989. – 197 с.
262. Дятлов А.И. На путях разгадки тайн энзоотий чумы //Занимательные очерки о деятельности и деятелях противочум. системы России и Сов. Союза – М., 1995. – Вып.3. – С.138-224.
263. Дятлов И.А., Волох О.А. Получение S-слоя чумного микроба и возможности его применения //Биотехнология. – 2004. - №1. – С.20-25.
264. Дятлов И.А., Кутырев В.В. Исследование влияния экспрессии плазмид и некоторых хромосомных генов на электроповерхностные свойства возбудителя чумы //Генетика и биохимия вирулент. возб. особо опас. инф.: Тез. докл. Рос. науч. конф. – Волгоград, 1992. – С.37.
265. Дятлов И.А., Филиппов А.Ф., Бондаренко Л.Н. и др. Использование изогенной системы штаммов чумного микроба в технологии получения антигенов //Генетика, микробиол. и совершенст. методов лаб. диагност. особо опас. инф. – Саратов, 1991. – С.71-77.
266. Евсеева В.Е., Фирсов И.П. Блохи как хранители чумного вируса в зимнее время //Вестник. микробиол., эпидемиол. и паразитол. – Саратов, 1932. – Т. XI, Вып.4. – С.281-283.
267. Ежов И.Н., Ляпин М.Н., Пчелинцева М.В. Уточнение понятия «аттенуированный штамм микроорганизма» //Международ. медико-санитар. правила и реализац. глобальной стратегии борьбы с инф. бол. в госуд.-участ. СНГ: Матер. VIII межгосуд.. науч.-практ. конф. госуд.-участ. СНГ. – Саратов, 2007. – С.201-203.

268. Елюбаева А.М. Устойчивость к УФ-лучам мутантов чумного микроба и их свойства //Матер. V науч. конф. противочум. учрежд. Сред. Азии и Казахстана. - Алма-Ата, 1967. –С. 200-201.
269. Емельяненко Е.Н, Аксенов М.Ю., Горовникова Ю.С. и др. Выявление и оценка численности «некультивируемых» форм псевдотуберкулёзного микроба в почве с помощью полимеразной цепной реакции //Патоген. бактерии в сообществах. (Механизмы и формы существования) : Сб. науч. тр. – М., 1994. – С.139-142.
270. Емельяненко Е.Н., Троицкая В.В., Четина Е.В. и др. Покоящиеся (некультивируемые) формы *Yersinia pseudotuberculosis*: экспериментальное изучение и выявление в почвах очага методом ПЦР //Матер. VII съезда Всерос. об-ва эпидемиол., микробиол. и паразитол. – М., 1997. – Т.1. – С.338-339.
271. Ермакова Г.В., Тараненко Т.М., Меркулов Т.К., Щербаков А.А. Липид А-ассоциированный протеин чумного микроба //Генетика и биохимия вирулент. возб. особо опас. инф.: Матер. Рос. науч. конф. – Волгоград, 1992. – С.93.
272. Ермакова Г.В., Тараненко Т.М., Наумов А.В. и др. Изучение протективной активности различных по химическому составу препаратов капсульного антигена чумного микроба //Микробиол., биохимия и спец. профилакт. карантин. инф. – Саратов, 1990. – С.84-89.
273. Ерохин Е.П., Фомичёва А.С. Использование лиофилизированных эритроцитарных диагностикумов для выявления возбудителей чумы и туляремии в органах экспериментально заражённых животных //Физиология и генетика микроорг.: Матер. конф. микробиол. Сев. Кавказа. – Ростов-на-Дону, 1969. – С.195-197.
274. Ефременко В.И., Грижебовский Г.М., Суворова А.Е. и др. О заболеваниях людей чумой на Кавказе. //Организация. эпиднадзора при чуме и меры её профилактики: Матер. межгосуд. науч.-практ. конф. - Алма-Ата, 1992. - Ч.1. - С.18-21.
275. Ёлкин Ю.М., Лалазарова И.Г., Чепурная Л.И. Вирулентность штаммов чумного микроба полёвочьей разновидности для лабораторных животных при

- подкожном введении //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1972. – Вып.3. – С.128-132.
276. Жаринова Н.В., Брюханов А.Ф., Зарубин В.В. и др. Свойства штаммов, выделенных в Центрально-Кавказском природном очаге чумы в 1999-2001 гг. //Эпидемиол. безопасн. на Кавказе. Итоги и перспективы :Актуал. пробл. эпидемиол. безопасности: Матер. юбил. науч.-практ. конф., посвящ. 50-лет. Ставропольск. НИПЧИ. - Ставрополь, 2002. – С. 99-100.
277. Желтенков А.И. О чумном токсине, анатоксине, противочумной антитоксической сыворотке и методах стандартизации их на белых мышах //Вестн. микробиол., эпидемиол. и паразитол. – Саратов, 1939. – Т.ХVII. – С.272-301.
278. Жуков–Вережников Н.Н., Адамов А.К., Анисимов П.И. и др. Гетерогенные антигены чумного и холерного микробов, сходные с антигенами тканей человека и животных //Бюлл. exper. биол. и мед. – 1972. - №4. – С.63-65.
279. Жуков-Вережников Н.Н., Гусева Г.П. Иммунология чумы. Сообщение XVIII. Новый довод в пользу существования антигена, общего для эритроцитов человека и чумного микроба //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1944. - №3. – С.14-16.
280. Жуков-Вережников Н.Н., Липатова Т.И. Иммунология чумы. 1. О сравнительной оценке противочумных сывороток в связи с изучением с помощью феномена Schwarzman значения отдельных фракций *V.pestis* в патогенезе чумы //Вестник микробиол., эпидемиол. и паразитол. – Саратов, 1933. – Т. XII., Вып. 4. – С.257-267.
281. Журавлёв И.Я., Ротшильд Е.В., Ермилов А.П. и др. Случай выделения чумного микроба из глотки полуденной песчанки, заразившейся в естественных условиях //Пробл. особо опас.инф. – Саратов, 1979. – Вып. 3. – С.65-66.
282. Зайцев А.А. Экспресс-диагностика возбудителя чумы с использованием диагностикумов чумных полиакролеиновых на основе поли- и моноклональных антител //Актуал. вопр. профилакт. чумы и др. инф. заболеваний. – Ставрополь – 1994. – С.42-43.

283. Зайцев А.А. Теоретическое и научно-методическое обоснование использования белковых фракций чумного микроба при создании новых диагностических препаратов и тест-систем: Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. – Ставрополь, 2006. – 39с.
284. Зайцев А.А., Зацепин В.И., Евченко Ю.М. и др. Серодиагностика чумы с помощью диагностикума чумного полиакролеинового иммуноглобулинового //Актуал. вопр. профилакт. чумы. и др. инф. забол. :Матер. межгос. науч.-практ. конф., посвящ. 100 лет. открытия возб. чумы. – Ставрополь, 1994. – С.44-45.
285. Залыгина Н.И. Опыт применения реакции пассивной гемагглютинации в условиях острой эпизоотии чумы на больших песчанках в весенне-летний сезон 1961 г. на территории Северных Кзыл-Кумов //Тез. докл. науч.конф. по природ. очагов. и профилакт. чумы и туляремии. – Ростов-на-Дону, 1962. – С.116.
286. Залыгина Н.И. Специфичность реакции нейтрализации антител при чуме в применении к исследованию трупов грызунов //Матер. юбил. конф. Уральской ПЧС – Уральск, 1964. – С.359-362.
287. Залыгина Н.И. Эффективность реакции нейтрализации антител при чуме и сохраняемость специфического антигена в трупах грызунов //Матер. юбил. конф. Уральской ПЧС. – Уральск, 1964. – С.363-367.
288. Заплатина С.И., Хохлова А.М. Об иммунологическом родстве *P.pestis* и *P.pseudotuberculosis* //Тр. Ростовского н/Д н.-и. противочум. ин-та. – Ростов-на-Дону, 1959. – Т.XVI. – С.97-104.
289. Заренков М.И. Транспозоны в анализе генома чумного микроба: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Саратов, 1984. – 22с.
290. Заренков М.И., Лебедева С.А., Гребцова Н.Н. Транслокация транспозонов Tn10 и Tn5 в хромосому *Yersinia pestis* //Генетика. - 1983. - Т.19, №10. – С. 1593-1603.
291. Заренков М.И. Лебедева С.А., Гребцова Н.Н. и др. Способ трансдукции хромосомных маркеров и плазмид у чумного микроба: А.с. №1304406 СССР: Заявка Ростовского-на-Дону противочумного института №3858282/28-14. Приоритет от 25.02.1985.

292. Заренков М.И., Саямов С.Р., Гончаров Е.К. Влияние ионов Mg^{2+} на свойства некоторых штаммов чумного микроба //Мол. генетика , микробиол., вирусол. - 1989. – №12 – С.17-22.
293. Збарский Б.И. Адсорбция эритроцитами продуктов распада белка и дифтерийного токсина //Журн. эксперим. биологии и медицины. – 1925. - №1. – С.121-150.
294. Земскова З.С., Дорошкова И.Р. Морфологические реакции у вакцинированных детей при L-трансформации микобактерий БЦЖ //Морфол. аспекты. приобретен. резист. при туберкулёзе. – М, 1978. – С.13-19.
295. Земцова И.Н., Константинова Н.С., Дальвадянец С.М. и др. Определение активности чумных токсинов методом культуры ткани //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1975. – Вып.6. – С.23-26.
296. Зильбер Л.А. Об адсорбции кровью нормальных и иммунных животных дифтерийного токсина //Тр. X Всесоюз. съезда бактериол., эпидемиол. и санитар. врачей. – Харьков, 1927. – Т.1. – С.100-101.
297. Знаменский В.А., Лебедев Н.Ф., Агеров Д.Л. К вопросу об ускоренной идентификации чумного микроба методом флуоресцирующих антител //Тр. Владивосток. н.-и. ин-та эпидемиол., микробиол. и гигиены. – 1962. – Вып. 2. – С.191-198.
298. Зыкин Л.Ф. Итоги 15-летнего изучения персистенции L-форм *Yersinia pestis* //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1994. – Приложение - С.68-71.
299. Зудина И.В., Булгакова Е.Г., Кутырев В.В. Изучение взаимосвязи мутаций по *Hms*- и *Psn*- признакам у штаммов *Yersinia pestis* пяти подвидов //Матер.науч.-практ. конф., посвящ. 100-лет. образования противочум. службы России. - Саратов, 1997. - Т.2. - С.53-54.
300. Зундуй Чимит, Апарин Г.П., Головачева В.Я. и др. О биологических свойствах культур чумного микроба, выделенных в Монгольской Народной республике //Докл. Иркутску. н.-и. противочум. ин-та Сибири и Дальнего Востока. - Кызыл, 1966. - Вып.7. - С.103-105.
301. Иванов С.И, Лисицин А.А. Изменчивость *P.pestis* и некоторые вопросы энзоотии чумы //Матер. юбил. конф. Уральской ПЧС. – Уральск, 1964. – С.49-54.

302. Иванов Ю.В., Коровкин С.А. Флуоресценция с временным разрешением и её применение для диагностики особо опасных инфекций //Матер. VII Всерос. съезда эпидемиол., микробиол. и паразитол. – М., 1997. – Т.1. – С.442-444.
303. Иванова В.С. Влияние пестицина на свободное и фосфорилирующее дыхание чувствительных и устойчивых к нему вариантов чумного микроба //Матер. III Сев.-Кав. биохим. конф. – Ростов-на-Дону, 1976. – С.179-180.
304. Иванова В.С. Характеристика пестицина 1 и изучение механизма его действия: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 1981. - 23с.
305. Иванова В.С., Божко Н.В. Экспрессия детерминанты пестициногенности *Pst*-плазмиды в различных бактериях носителях //Внехромосомные генетические элементы. Значение для науки и практики: Тез. докл. VI раб.совещ. по прогр. «Плазмида». – М., 1981. – С.70-71.
306. Иванова В.С., Лебедева С.А., Гончарова Н.А., Гурлева Г.Г. Скрининг плазмид у музейных штаммов чумного микроба, выделенных из разных природных очагов //Мол. генет., микробиол., вирусол. - 1990. - №3. - С.16-18.
307. Иванова В.С., Трухачёв А.Л., Лебедева С.А. Отбор атипичных рамнозопозитивных штаммов основного подвида *Yersinia pestis* принятыми методами идентификации //Клин. лаб. диагностика. – 2007. – №11. – С.50-54.
308. Илюхин В.И., Лихолетов С.М., Мельников Б.И. Диффузионные камеры при работе с возбудителями особо опасных инфекций //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1978. – Вып.4.– С.21-24.
309. Инжеватова М.В., Алексеев А.Ф. К вопросу о роли блох рода *Xenopsilla* в проносе инфекции через зимний межэпизоотический сезон //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1968. – Вып. 3. – С.129-132.
310. Иофф И.Г., Каганова Л.С. О сравнительной восприимчивости некоторых видов грызунов к чумной инфекции //Изв. Иркутского. гос. н.-и. противочум. ин-та Сибири и Дальнего Востока. – Иркутск, 1949. – Т.УП. – С.107-113.
311. Иофф И.Г., Наумов Н.П., Фолитарек С.С., Абрамов Ф.И. Высокогорный природный очаг чумы в Киргизии //Природная очагов. трансмис. болезней в Казахстане. – Алма – Ата, 1951. – Вып. I. – С. 173 – 182

312. Иофф И.Г., Покровская М.П. Опыты с блохами человеческого жилища, как носителями чумной инфекции //Изв. госуд. микробиол. ин-та в Ростове-н/Д. – Ростов-на-Дону, 1929. – Вып. 9. – С.126-136.
313. Исин Ж.М. Влияние капсульного антигена чумного микроба на функциональную активность макрофагов перитонеального экссудата мышей в тесте восстановления нитросинего тетразолия //XII межреспубл. науч.-практ. конф. противочум. учрежд. Сред. Азии и Казахстана по профилакт. чумы: Тез. докл. – Алма-Ата, 1985. – С.64-65.
314. Исин Ж.М., Тугамбаев Т.И. Структурно-функциональные свойства и биологическая активность капсульного антигена, «мышинного» токсина и эндотоксина *Yersinia pestis* //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1987. - №4. – С.91-98.
315. Исупов И.В., Лобанов В.Н., Самойлова Л.В., Свистунов В.М. Патоморфология вакцинального процесса при чуме //Профилакт. чумы в природ. очагах: Матер. конф. – Саратов, 1973. – С.155-159.
316. Каган Г.Я. Проблема патогенности L-форм бактерий (Обзор) //Клин. медицина. - 1961. - №3. – С.12-18.
317. Каган Г.Я., Вульфович Ю.В., Гросман Б.С. и др. L-формы стрептококков в патогенезе хронических инфекций и постинфекционных осложнений //Вестн. АМН СССР. – 1976. - №5. – С.41-49.
318. Каган Г.Я., Шмитт-Сломска Ж.И., Коптелова Е.И. и др. Экспериментальная инфекция у обезьян, вызванная L-формами стрептококка группы А. Сообщение I. Подострая экспериментальная инфекция у обезьян //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1971. - №12. – С.50-54.
319. Казаков А.М., Мозлоев Г.А., Мамедов З.Л., Божко Н.В. Использование коаггулинирующих диагностикумов в период эпизоотии чумы среди горных сусликов в Центрально-Кавказском природном очаге в 1997 году //Инф. болезни: Новое в диагност. и терапии: Тез. докл. III съезда Итало-Рос. об-ва по инф. бол. – С-Пб., 1998. – С.37.

320. Калабухов Н.И. Явление длительных перерывов эпизоотической активности природных очагов чумы и его вероятные причины //Зоологич. журнал. – 1969. - Т.48, Вып.2. – С.165-178.
321. Калмыкова Л.И. Биологические свойства и белковый спектр водорастворимых фракций штаммов чумного микроба, выделенных в очагах Кавказа: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Саратов, 1984. - 22 с.
322. Канатов Ю.В. Условия сенсibilизации формализированных эритроцитов гамма-глобулином иммунной сыворотки //Матер. V науч. конф. противочум. учрежд. Сред. Азии и Казахстана. – Алма-Ата. – 1967. – С.206-208.
323. Канатов Ю.В. Система серологических реакций для исследования грызунов при эпизоотологическом обследовании на чуму //Матер. конф., посвящ. 50-лет. ин-та «Микроб». – Саратов, 1968. – С.61-63.
324. Канатов Ю.В., Леви М.И., Шмутер М.Ф. и др. Использование моноклональных антител для производства чумного антительного эритроцитарного диагностикума //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1985. - №8. – С.73-78
325. Канатов Ю.В., Сагатовский В.Н. Сублимация как метод консервирования эритроцитарных диагностикумов //Матер. межинститут. науч. конф. памяти Л.А.Тарасевича. – М., 1967. – С. 228-229.
326. Кантарбаева Ж.К. Развитие L-форм возбудителя чумы, полученных под влиянием пенициллина //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1976. - Вып. 4. – С.86-87.
327. Канчух А.А. Модификация техники постановки реакции микропреципитации в агаре //Лаб. дело. – 1965. - №4. - С.245-248.
328. Канчух А.А., Герасюк Л.Г. Количественное определение токсина чумного микроба по реакции микропреципитации //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1970. – Вып.2. – С.146-149.
329. Канчух А.А., Иванова В.С. Очистка токсина чумного микроба хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе солевого экстракта //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1971. – Вып.3. – С.100-106.

330. Караваева Т.Б., Остроумова Н.М., Мороз В.П., Коровкина Г.И. Метод дифференциации эпидемических (vct^+) и неэпидемических (vct^-) вибрионов по типу их иммунитета к умеренным фагам //Холера: Вопр. эпидемиол., микробиол. и лаб. диагност.: Матер. Рос. науч. конф. - Ростов-на-Дону, 1992. –С.168-169.
331. Карлышев А.В., Красильников В.М., Кравченко В.И. и др. Рекомбинантная плазмидная ДНК, кодирующая капсульный белок – антиген *F1* чумного микроба и штамм бактерий *E.coli* – продуцент белка антигена *F1* чумного микроба //А.с. №327782, кл. С 12 N 15/00. Заявка №4525100. Приоритет изобретения 28.12.1989, Зарегистрировано в Госуд. реестре изобретений СССР 09.07.91.
332. Касаткин Н.Ф. Методы изучения клеточного состава возбудителя чумы (анализ штаммов полёвочьей разновидности): Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Ростов-на-Дону, 1964. – 18 с.
333. Касаткин Н.Ф. Ферментация рамнозы, глюкозы и арабинозы изолированными колониями чумного микроба полёвочьей разновидности //Вопр. микробиол. и лаб. диагност. особо опас. инф.: Сб. научн. работ противочум. учрежд.– Саратов, 1965. – С.76—79.
334. Кац Л.Н. О субмикроскопической структуре *Pasteurella pestis Holland* //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1966. - №8. – С.84-86.
335. Кац Л.Н. Субмикроскопическая структура микроорганизмов с дефектной клеточной стенкой //Успехи микробиологии. – М., 1980. – Т.15. – С.180-196.
336. Кац Л.Н., Константинова Н.Д., Прозоровский С.В. Некоторые особенности в структуре бактерий при потере клеточной стенки //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1981. - №7. – С.8-15.
337. Киреев М.Н., Наумов А.В., Стукова Н.Ю. и др. Возможность применения белковых компонентов чумного микроба для конструирования профилактических препаратов //Генетика и биохимия. вирулент. возб. особо опас. инф.: Тез докл. Рос. науч. конф. - Волгоград, 1992. – С. 98.
338. Кирилличева Г.В., Пронин А.В., Батурина И.Г. и др. Особенности влияния псевдотуберкулёзной инфекции на иммунную систему у мышей различных линий //Иммунол. и специф. профилактикт. особо опас. инф.: Матер. Рос. науч. конф. – Саратов, 1993. – С.34-35.

339. Киселёв Ю.К., Мусагалиев Ж.М., Айкимбаев А.М. Действие клинических штаммов чумного микроба на эукариотические клетки //Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилактики: Матер. межгосуд. науч.-практ. конф. – Алма-Ата, 1992. - Ч.1. – С.98-99.
340. Кишеневский А.М. Некоторые биологические и серологические свойства литиевых сферопластов чумного микроба //Пробл. особо опас. инф. –Саратов, 1969. –Вып.5. –С.29-32.
341. Кишеневский А.М. К вопросу о бактериолизе при чуме *in vitro* //Пробл. особо опас. инф. –Саратов, 1970. –Вып.1. – С.123-126.
342. Классовский Л.Н., Бибикова В.А. Влияние повышенного содержания сахара в крови грызунов на процесс блокообразования у блох //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1970. – Вып.2. – С.220-222.
343. Классовский Л.Н., Степанов В.М., Шмуцер М.Ф. и др. О некоторых особенностях питания аргининзависимых форм возбудителя чумы //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1976. – Вып.3. – С.5-7.
344. Клец Э.И. О дифференциальной диагностике чумной палочки от палочки ложного туберкулеза грызунов при помощи рамнозы //Изв. Иркутского. н.-и. противочум. ин-та Сибири и Дальнего Востока. – Иркутск, 1934. - Т.1. - С.41-42.
- 345.** Клец Э.И., Колесник Р.С. Безвредность бивалентной живой чумной вакцины из штаммов 17 и EV для морских свинок //Изв. Иркутск. Гос. НИПЧИ Сибири и Дальнего Востока. – Улан-Удэ, 1957. – Вып. 15. - С.143-148.
- 346.** Клец Э.И., Колесник Р.С. Экспериментально-морфологические данные о действии на организм бивалентной чумной вакцины //Изв. Иркутск. Гос. НИПЧИ Сибири и Дальнего Востока. – Улан-Удэ, 1957а. – Вып.15. - С.143-146.
347. Клец Э.И., Щекунова З.И. О длительности сохранения чумного микроба в некоторых объектах внешней среды //Докл. Иркутск. противочумн. ин-та – Чита, 1961. – Вып.2. –С.35.
- 348.** Клименко В.С. О чумных эпидемиях в России //Военно-мед. журн. – 1910. – Т. 229. – С. 659-663.
349. Климова Т.К. (цит. по Туманскому В.М., 1958).

350. Клодницкий Н.Н. Чума человека. Краткая монография для студентов и врачей. – Пг., 1922. – 648 с.
351. Ковалева Р.В. О некоторых особенностях штаммов *Pasteurella pestis*, выделенных в Монголии от полевок Брандта и других грызунов //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. - 1958. - №8. - С.30-36.
352. Ковалева Р.В. Монгольские расы чумного бактериофага //Тр.Ростовск. н/Д. н.-и. противочум. ин-та. – Ростов-на-Дону, 1960. - Т.17. - С.115-119.
353. Козлов М.П. О существовании сопряженных природных очагов чумы полевого и сурчиного вариантов на Хангае //Эпидемиол. и профилактик. особо опас. инф. в МНР и СССР. - Улан-Батор, 1978. - С.34-36.
354. Козлов М.П. Чума (природная очаговость, эпизоотология, эпидемические проявления). – М., 1979. - 192 с.
355. Козлов М.П., Розанова Г.Н. Зависимость образования чумного блока у блох от видовых особенностей эритроцитов животных //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1976. – Вып. 5. – С.53-57.
356. Козлов М.П., Розанова Г.Н., Савельев В.Н., Белокопытова А.М. К механизму образования чумного блока у блох //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1975. – Вып.5. – С.29-33.
357. Козлов М.П., Султанов Г.В. Чума (природная очаговость, эпизоотология). - Махачкала, 2000. - Т.3. - 303 с.
358. Кокушкин А.М. Социальные и биологические аспекты эпидемиологии чумы: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. – Саратов, 1983. – 47с.
359. Кокушкин А.М. Закономерности эпидемических проявлений чумы в мире с древнейших времён до конца XX столетия //Матер. науч.-практ. конф., посвящ. 100-лет. образован. противочум. службы России. - Саратов, 1997. – Т.1. – С.69-70.
360. Кокушкин А.М., Величко Л.Н., Князева Т.В. и др. Изучение роли собственных плазмид и признака пигментсорбции в способности бактерий чумы инфицировать блох и вызывать у них блокообразование //Природ.-очаг.. инф. и их профилактик. – Саратов, 1991. – С.110-118.

361. Кокушкин А.М., Величко Л.Н., Князева Т.В., Мокроусова Т.В. Влияние концентрации возбудителя чумы на заражённость блох и блокообразование //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1993. – Вып. 1-2. – С.45-50.
362. Колесник Р.С. К экспериментально-морфологической характеристике вакцинального процесса, вызываемого чумными штаммами с различной остаточной вирулетностью //Пробл. особо опас. инф. - Саратов, 1970. – Вып.1. – С174-180.
363. Колесник Р.С., Колесник В.С., Домарадский И.В. и др. Экспериментальные данные о способности некоторых псевдотуберкулёзных штаммов предохранять против интратрахеального заражения чумой //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1968. – Вып.4 - С. 114-120.
364. Кольцова Е.Г. Некоторые свойства пестицина I и передача пестициногенного фактора *in vitro*: Автореф. дисс ... канд. мед. наук. - Ростов-на-Дону, 1971. - 14 с.
365. Кольцова Е.Г., Сучков Ю.Г., Лебедева С.А. Передача фактора бактериоциногении у чумного микроба //Генетика – 1971. - Т. 7, №4. – С.118-122.
366. Кондрашкина К.И., Ермилов А.П., Величко Л.Н. и др. К вопросу о закономерностях существования микроба чумы в межэпизоотическое время //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1976. – Вып.2. – С.5-9.
367. Кондрашкина К.И., Лапина Н.Ф., Кураев И.И. и др. О возможности циркуляции в природе некоторых атипичных штаммов чумного микроба //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1971. – Вып. 3. – С. 63-69.
368. Кондрашкина К.И., Николаев Н.И., Гольдфарб Л.М. и др. Место атипичных штаммов в механизмах саморегуляции эпизоотического процесса при чуме //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1971. – Вып.4 . – С.5-17.
369. Коннов Н.П. Ультраструктурно-функциональный анализ чумного микроба и его взаимоотношение с организмом блохи: Автореф. дис. ... д=ра. биол. наук. – Саратов, 1990. - 45 с.
370. Коннов Н.П., Анисимов П.И., Синичкина А.А. Субмикроскопическая структура клеточной стенки возбудителя чумы //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1975. – Вып.1. – С.78-82.

371. Коннов Н.П. , Демченко Т.А., Анисимов П.И. и др. Патогенное действие чумного микроба на организм блохи *Xenopsilla cheopis* и ультраструктура возбудителя в различные сроки пребывания в переносчике //Паразитология. – 1986. – Т.20., №1 – С.19-22.
372. Коновалова С.Ф. Нитрозная реакция с культурами *B. pestis* и *B. pseudotuberculosis rodentium (Pfeiferi)* //Вестник микробиол., эпидемиол., и паразитол. – Саратов, 1930. – Т.9., Вып.4. – С.513-516.
373. Коробков Г.Г. Некоторые особенности развития противочумного иммунитета //Докл. Иркутск. н.-и. противочум. ин-та Сибири и Дальнего Востока– Чита, 1963. – Вып.6. – С.94-95.
374. Коробкова Е.И. Действие бактериофага на *R* и *S* варианты чумы и появление авирулентных мутантов //Вестник микробиол., эпидемиол. и паразитол. – Саратов, 1937. – Т.XVI, Вып.1-2. – С.3-16.
375. Коробкова Е.И. Гигантские ядерные формы *Pasteurella pestis* во вторичных культурах и их связь с бактериофагом //Вестник эпидемиол., микробиол. и паразитол. – Саратов, 1937. – Т.XVI, Вып.1-2. – С.18-21.
376. Коробкова Е.И. Живая противочумная вакцина. Теория и практика иммунопрофилактики чумы. – М., 1956. – 207с.
377. Коробкова Е.И. К вопросу о повышении и стабилизации иммуногенных свойств чумных вакцинных штаммов //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1957. - №7.-С.64-68.
378. Коробкова Е.И. Понятие об «остаточной» вирулентности вакцинного штамма чумного микроба //Микробиол., иммунол. особо опас. инф. – Саратов, 1964. – С.102-107.
379. Коровкин С.А., Адамов А.К. Изучение способности чумного и псевдотуберкулезного микробов усваивать альдегиды //Пробл. природной очаговости чумы: Тез. докл. IV Совет.-Монгол. конф. специалист. противочум. учрежд. - Иркутск, 1980. - Ч.2. - С.63.
380. Косилко С.А., Иннокентьева Т.И. Специфичность показателя повреждения нейтрофилов и лейкоцитоллиза при чуме //Организация. эпиднадзора при чуме и

- меры её профилактики: Матер. межгосуд.науч.-практ.конф. – Алма-Ата, 1992. – Ч.2. – С.99-101.
381. Косицина Л.А., Свиная О.В., Бобровникова А.Я. Микробиологическая характеристика Л-форм листерий //Биол. препараты и иммунол. реактивность организма: Матер. XIII итоговой науч. конф. Томского НИВС – Томск, 1972. – С.152-155.
382. Коссе Л.В. Характеристика препаратов капсульного антигена чумного микроба, выделенных из генетически различающихся штаммов-продуцентов: Автореф. дис. ... канд.биол.наук. – Саратов, 1992. - 26с.
383. Коссе Л.В., Заренков М.И., Лебедева С.А., Алутин И.М. Адьювантное действие препаратов из *Klebsiella pneumoniae* на антительный ответ к антигенам возбудителей особо опасных инфекций //Иммунодиагностика и иммунотерапия : Тр. 1-ой Международ. конф. – Витебск, 1995. – С.210-211.
384. Коссе Л.В., Лебедева С.А. Проблемы специфической диагностики чумного микроба при использовании капсульного антигена и антител к нему //Инфекц. болезни: новое в диагност. и терапии: Тез. докл. науч. конф. III съезд Итало-Рос.об-ва по инф. бол. – С-Пб., 1998. – С.46.
385. Коссе Л.В., Лебедева С.А., Кузнецова Л.С. Рекомбинантные штаммы *Klebsiella pneumoniae* и *Citrobacter freundii*, продуцирующие капсульный антиген *Yersinia pestis* //Иммунол. и спец. профилакт. особо опас. инф.: Матер. Рос. науч. конф. - Саратов, 1993. - С.290-291.
386. Коссе Л.В., Лебедева С.А., Кузнецова Л.С. и др. Новые данные, относящиеся к специфичности и генетическому контролю капсульного антигена (F1) *Yersinia pestis* //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1997. - №2. – С.29-33.
387. Коссе Л.В., Лебедева С.А., Титенко М.М. и др. Изучение протективного антигена F1 оболочки чумного микроба, экспрессированного в трансконъюганте нетипичного хозяина //Эпидемиол., микробиол., иммунол. бакт. и вирус. инф.:Тез. докл. обл. науч. конф. молодых учён. – Ростов-на-Дону, 1989. – С.29-30.
388. Коссе Л.В., Лебедева С.А., Чернявская А.С. и др. Влияние различных компонентов препарата капсульного антигена F1 возбудителя чумы на клеточные

- факторы иммунитета //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 2006. - №1. – С.33-39.
389. Коссе Л.В., Лебедева С.А., Чернявская А.С. и др. Некоторые аспекты биологической активности компонентов, составляющих препарат капсульного *F1*-антигена *Yersinia pestis* //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 2006а. - №3. – С.76-81.
390. Коссе Л.В., Некляев В.Н., Лебедева С.А. и др. Компоненты капсульного антигена *Yersinia pestis*: генетический контроль и биологические свойства //Матер. VII съезда Всеросс. об-ва эпидемиол., микробиол. и паразитол. – М., 1997. – Т.1. – С.296-297.
391. Коссе Л.В., Некляев В.Н., Лебедева С.А., Заренков М.И. Генетический контроль *F1*-специфических компонентов капсульного антигена *Yersinia pestis* //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1999. - №5. – С.81-85.
392. Коссе Л.В., Чернявская А.С., Лебедева С.А. Некоторые аспекты серодиагностики чумы //Матер. межгосуд. науч. конф. «Профилакт. и меры борьбы с чумой», посвящ. 100-лет. открытия возб. чумы. - Алматы, 1994. – С.104.
393. Костюковский В.М. Разработка методов лабораторной диагностики Л-форм чумного микроба: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Саратов, 1989. – 20 с.
394. Котлярова Р.И. Псевдотуберкулёзный бактериофаг и его свойства //Тр. НИПЧИ Кавказа и Закавказья. – Ставрополь, 1956. – Т.1. – С.234-241.
395. Котурга Л.Н. К патоморфологии спонтанной чумы у больших песчанок, выловленных в местах активных эпизоотий //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1969. – Вып.1. – С.101-104.
396. Котурга Л.Н., Узбеков Б.К., Шаймерденова А.К. К изучению патогенности Л-форм чумного микроба на малых сусликах (патоморфологическое исследование) //Соврем. аспекты профилакт. зоонозных инф.: Тез.докл. Всесоюз. науч. конф. специальн противочумн. учрежд.– Иркутск, 1984. – Ч.2. – С.45-46.
397. Кочкарёва А.В., Голковский Г.М. Образование чумного блока и заражающая способность блох большой песчанки, инфицированных бскапсульным штаммом чумного микроба //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1977. – Вып.2. – С.56-58.

398. Кравцов А.Л., Кирилличева Г.Б., Ермакова Г.В., Ломова Т.М. Результаты сравнительного цитофлуориметрического анализа клеток перитонеального экссудата беспородных мышей и мышей генетически чистых линий. Дегрануляция макрофагов под действием «мышинного» токсина //Иммунол. и спец. профилактикт. особо опас. инф.: Матер. Рос. науч. конф. – Саратов, 1993. – С.41-42.
399. Кравцов А.Л., Щуковская Т.Н., Шмелькова Т.П., Ключева С.Н.. Экспериментальная система для изучения антифагоцитарных свойств возбудителей особо опасных инфекций //Международ. медико-санитар. правила и реализац. глобальной стратегии борьбы с инф. бол. в госуд.-участ. СНГ: Матер. VIII Межгосуд. науч.-практ. конф. госуд.-участ. СНГ. – Саратов, 2007. – С.232-234.
- 400.** Кравцов А.Н. Влияние нормальной сыворотки крови человека на некоторые свойства возбудителя чумы и его способность утилизировать железо: Автореф. дис. ... канд мед. наук. – Ростов-на-Дону, 1989. – 16 с.
401. Кравцов А.Н., Новосельцев Н.Н., Сорокин В., Марченков В.И. Родство чумных и кишечных вирулентных фагов //Актуал. вопр. бактериофагии и приклад. иммунол.: Матер. Всесоюз. симпоз., посвящ. 60-лет. Тбил.НИИВС. – Тбилиси, 1984. – С.50-53.
402. Кравцов А.Н., Рублев Б.Д., Ходова В.А. и др. Изучение чувствительности чумного микроба к бактерицидному действию нормальной сыворотки человека //Извест. Сев.-Кавк. науч. центра Выс.школы. Естест. науки. - 1987. - №1. – С.117-121.
403. Кравцов А.Н., Тынянова В.И., Зюзина В.П. и др. Повышение вирулентности и иммуногенности бактерий возбудителя чумы с помощью нормальной сыворотки крови человека. //Генетика. и биохимия вирулент. возб. особо опас. инф.: Тез.докл. Рос. науч. конф. - Волгоград,1992. - С.104-105.
404. Кравченко А.Н., Мишанькин Б.Н. Изучение чувствительности к триметоприму у штаммов *Yersinia pestis*, выделенных из различных природных очагов чумы //Антибиотики и химиотерапия. – 1989. - №1. - С.42-46.

405. Кравченко А.Т., Соколов М.И. Адсорбция специфических полисахаридов бактерий эритроцитами человека //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1946. - №12. – С.10-16.
406. Кривиский А.С. Проблемы бактериофагии //«Итоги науки». – 1960. – Вып.4. – С.35-129.
407. Крылова М.Д. Адаптационная способность типовых брюшнотифозных Vi-фагов //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. - 1954. - №2. – С.12-16.
408. Кудинова Т.П. О свойствах атипичных штаммов микроба чумы, выделенных в Балхашском районе осенью 1963 года. Сообщение 5. О влиянии некоторых детерминант вирулентности на степень патогенности чумного микроба для больших и гребенчиковых песчанок //Матер. V науч. конф. противочум. учрежд. Сред. Азии и Казахстана. – Алма-Ата, 1967. – С.217-218.
409. Кудинова Т.П. Свойства штаммов чумного микроба, выделенных осенью 1963 года в Или-Каратальском междуречье: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Алма-Ата, 1968. – 18 с.
410. Кудрякова Т.А, Македонова Л.Д., Мишанькин Б.Н. и др. Типирование фагами штаммов чумного микроба, выделенных в различных очагах //Актуал. вопр. особо опас. инф.: - Нальчик, 2000. - С.32-33.
411. Кузнецова Л.С., Коссе Л.В, Лебедева С.А. Штамм *Citrobacter freundii* KM1-продуцент антигена “фракция 1” чумного микроба. Патент Ростовского-на-Дону н.-и. противочумн. ин-та: Заявка №5024172/13. Положительное решен. от 06.05.1992. Приоритет 03.07.1991.
412. Кузнецова Л.С., Лебедева С.А. Активность некоторых пневмоцинов в отношении чумного микроба //Пробл. переноса генетич. информ.: Тез. докл. X Всесоюз.совещ. по программе ”Плазмида”. - М., 1985. – С.97-99.
413. Куклев В.Е., Портенко С.А., Ящечкин Ю.И. и др. Метод детекции и характеристики по признакам патогенности штаммов *Yersinia pestis* с помощью мультилокусной ПЦР //Чрезвыч. ситуации международ. значения в обществ. здравоохран. в решениях Санкт-Петербургского Саммита «Группы восьми» и санитар. охр. террит. государств - участников Содружества Независимых

- Государств: Матер. VII Межгосуд. науч.-практ. конф. госуд.-участников СНГ. – Оболенск, 2006. – С.214-215.
414. Куклев В.Е., Сухонос И.Ю., Осина Н.А. и др. Применение мультилокусной ПЦР для ускоренной идентификации *Y.pestis* //Генодиагностика инф. болезней – 2007 (молекулярная диагностика – 2007): Сб. трудов.– М., 2007. – Т.1. – С.376-377
415. Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Куклев В.Е. и др. Использование вариабельности нуклеотидной последовательности генов *rha* локуса для дифференциации штаммов *Yersinia pestis* с различной вирулентностью и эпидемической значимостью //Молекул. диагностика – 2007. Сб. трудов VI Всерос. науч.-практ. конф. с междунаро. участием. – М.,2007. – Т.1. - С. 378-379.
416. Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Куклев В.Е. и др. Сравнение полной нуклеотидной последовательности гена *rhaS* у штаммов возбудителя чумы основного и неосновного подвидов //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 2008. – Вып 3. – С.38-42.
417. Куклева Л.М., Карасёва З.Н., Кондрашин Ю.И. Фагоцитоз штаммов чумного микроба перитонеальными макрофагами интактных и иммунизированных животных //Вопр. генетики, молекул. биологии и микробиол. чумы и холеры – Саратов, 1985. – С.42-49.
418. Куклева Л.М., Кузьмиченко И.А., Проценко О.А., Кутырев В.В. Сравнительная характеристика биохимических свойств штаммов разных подвидов *Yersinia pestis* и штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* //Пробл. особо опас. инф. - Саратов, 2001. – Вып.1. - С.105-110.
419. Куклева Л.М., Проценко О.А. Фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов по отношению к штаммам чумного микроба с разным плазмидным составом //Иммуноморфол., аллергол. и иммунол. особо опас. инф. – Саратов, 1985. – С.33-40.
420. Кулеша Г.С. К патологической анатомии лёгочной чумы //Лёгочная чума в Манчжурии в 1910-1911гг. - Пг., 1915. - Т.2. – С.1-121.

421. Куличенко А.Н., Норкина О.В., Гинцбург А.Л. и др. Оптимизация способа детекции штаммов чумного микроба при помощи полимеразной цепной реакции //Генетика. – 1994. - Т. 30, № 2. - С. 167-171.
422. Куличенко А.Н., Норкина О.В., Попов Ю.А., Дроздов И.Г. Конструирование видоспецифичного ДНК-зонда на основе хромосомной ДНК возбудителя чумы //Генетика, микробиол., и совершенст. методов лаб. диагност. особо опас. инф. – Саратов, 1991. – С.86-88.
423. Куница Н.К. Случай заболевания чумой и выделение от больного культур, трансформирующихся в L-формы чумного микроба в организме белых мышей, после длительного хранения //Пробл. сан.-эпид. охраны территории стран СНГ: Тез. докл. науч.-практ. конф. – Саратов, 1998. – С.131-132.
424. Куница Н.К. К вопросу о патогенности трансформирующихся в L-формы культур чумного микроба //Карантин. и зооноз. инф. в Казахстане. – Алматы, 1999. – Вып.1 (юбилейный) – С. 201-202.
425. Кураев И.И. К вопросу о раннем выявлении чумного микроба методом заражения лабораторных животных //Тр. ин-та «Микроб». – Саратов, 1960. – Вып. 4. – С.369-376.
426. Курбатова Е.А., Лазарева Е.С., Гладус М.А. Влияние гидроксиламиновой клебсиеллёзной вакцины на скорость элиминации возбудителя и некоторые показатели гуморального иммунитета //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1988. - №9. – С.75-79.
427. Кутырев В.В., Генетический анализ факторов вирулентности возбудителя чумы: Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. – Саратов, 1992. – 38 с.
428. Кутырев В.В., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Павлова А.И. Комплексный подход к молекулярному типированию штаммов *Yersinia pestis* //Матер. IX съезда Всеросс. науч.-практ. об-ва эпидемиол., микробиол. и паразитол. – М., 2007. – Т.3. – С.57.
429. Кутырев В.В., Проценко О.А. Классификация и молекулярно-генетические исследования *Yersinia pestis* //Пробл.особо опас. инф. - Саратов, 1998. – С.11-22.
430. Кутырев В.В., Сатыбалдиев Н.А., Веренков М.С. и др. Изменения свойств фагоустойчивых культур чумного микроба и дополнительные тесты в их

- изучении //Тр. рабочего. совещ. мол. учёных. и специал.: «Эпидемиол., мол. биол., генетика., иммунобиол. возб. чумы.» -Саратов, 1987. –Ч.1. –С.172-176.
431. Кутырев В.В., Филиппов А.А., Дроздов Ф.И., Проценко О.А. Идентификация возбудителей чумы, псевдотуберкулёза и иерсиниоза с помощью молекулярного зонда на основе фрагмента *pCad*, кодирующего синтез V-антигена //Иерсиниозы (микробиол., эпидемиол., клиника, патогенез, лаб. диагност.) : Тез. Всесоюз. научно-практ. конф. – Владивосток, 1989. – Ч.2. – С.109-110.
432. Кутырев В.В., Филиппов А.А., Куклева Л.М. Проценко О.А. Значение плазмидных и хромосомных генов возбудителя чумы для вирулентности //Бактериальн. плазмиды: Тез. докл. Всесоюз. совещ. по прогр. «Плазида». – Нальчик, 1990. - С.9-10.
433. Кутырев В.В., Филиппов А.А., Проценко О.А. Изучение плазмидного состава донорного штамма возбудителя чумы //Вопр. генетики, мол. биол. и микробиол. чумы и холеры. – Саратов, 1985. – С.15-21.
434. Кутырев В.В., Филиппов А.А., Шавина Н.Ю. и др. Генетический анализ и моделирование вирулентности *Yersinia pestis* //Мол. генет. микробиол., вирусол. - 1989. - №8. – С.42-47.
435. Кучерук В.В. Вопросы палеогенезиса природных очагов чумы в связи с историей фауны грызунов //Фауна и экология грызунов. – М., 1965. - Вып.7. - С.5-86.
436. Лавровский А.А. О цикличности эпизоотий в природных очагах чумы и причинах, её обуславливающих //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1969. – Вып.1. – С.3-10.
437. Лавровский А.А. О периодической активности природных очагов чумы и причинах её обуславливающих //Влияние солнеч. активности на атмосферу и биосферу Земли. – М., 1971. – С.74-80.
438. Лавровский А.А., Варшавский С.Н., Герасимова Н.Г. и др. Эпизоотии чумы среди малых сусликов в природном очаге Северо-Западного Прикаспия в 1972-1973 гг. //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1974. – Вып.3. – С.5-17.

439. Лавровский А.А., Попов Н.В. Межэпизоотический период как одна из фаз саморазвития экосистемы природного очага чумы //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1978. – Вып.2. – С.5-9.
440. Ларина В.С. Лизогения у чумного микроба //Матер. межинститут. конф. по генетике «Внехромосом. факторы наследственности у бактерий». – М., 1969. – С.53-54.
441. Ларина В.С. Трансдукция стрептомицинорезистентности у чумного микроба с помощью умеренного фага *L-413 «С»* //Пробл. особо опас. инф., Саратов, 1969. – Вып.6. – С.104-106.
442. Ларина В.С. О выделении чумного микроба от почвенных микроорганизмов в Волго-Уральском степном очаге //Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилактики: Матер. межгосуд. науч.-практ. конф. – Алма-Ата, 1992. – Ч.1. – С.113-116.
443. Ларина В.С., Анисимов П.И. Трансдукция сцепленных маркеров у чумного микроба //Профилакт. особо опас. инф. – Саратов, 1977. – Вып.3. – С.40-46.
444. Ларина В.С., Айкимбаев А.М., Степанов В.М. и др. О выделении возбудителей чумы и псевдотуберкулёза от почвенных микроорганизмов в Муюнкумах //Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилактики: Матер. межгосуд. науч.-практ. конф. – Алма-Ата, 1992а. – Ч.1. – С.116-119.
445. Ларина В.С., Айкимбаев А.М., Степанов В.М. и др. О саморегуляции симбиоза чумного микроба с почвенными бактериями (по фактам обнаружения ревертантов почвенных бактерий в штаммах чумного микроба) //Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилактики: Матер. межгосуд. науч.-практ. конф. – Алма-Ата, 1992б. – Ч.1. – С.122-125.
446. Ларина В.С., Степанов В.М., Айкимбаев А.М. О первых фактах, позволивших выдвинуть гипотезу сохранения чумного микроба в *L*-форме в симбиозе с почвенными микроорганизмами //Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилактики : Матер. межгосуд. науч.-практ. конф. – Алма-Ата, 1992. – Ч.1. – С.107-109.
447. Ларина В.С., Степанов В.М., Айкимбаев А.М. О жизнеспособности элементарных тел *L*-форм чумного микроба раннего этапа *L*-трансформации и их

- реверсии на почвенных микроорганизмах. //Организация. эпиднадзора при чуме и меры её профилактики: Матер. межгосуд. науч.-практ. конф. – Алма-Ата, 1992. – Ч.1. – С.110-113.
448. Ларина В.С., Степанов В.М., Айкимбаев А.М. и др. О саморегуляции симбиоза чумного микроба с почвенными бактериями (по фактам выделения ревертантов чумного микроба из его симбионтов) //Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилактики: Матер. межгосуд. науч.-практ. конф. – Алма-Ата, 1992ж. – Ч.1. – С.125-129.
449. Ларина В.С., Степанов В.М., Айкимбаев А.М. и др. О сложном симбиозе чумного микроба, сальмонелл и почвенных микроорганизмов //Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилактики: Матер. межгосуд. науч.-практ. конф. – Алма-Ата, 1992е. – С.119-122.
450. Ларина В.С., Степанов В.М., Айкимбаев А.М. О сущности гипотезы сохранения чумного микроба в скрытой форме в сложном симбиозе с новым хозяином – почвенным микроорганизмом //Организация. эпиднадзора при чуме и меры её профилактики: Матер. межгосуд. науч.-практ. конф. – Алма-Ата, 1992д. – С.129-132.
451. Ларионов Г.М., Пейсахис Л.А. К эпизоотологической роли трансмиссии штаммов возбудителя чумы, не продуцирующих фракцию 1 //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1972. – Вып. 1. – С.23-28.
452. Ларионов Г.М., Погасий Н.И. Экспериментальное изучение возможности трансмиссивной передачи атипичных штаммов чумного микроба среди серых крыс //Природ. очаговость, микробиол. и профилактикт. зоонозов. - Саратов, 1989. – С. 103-109.
453. Лебедева С.А. Гетерологичные плазмиды и фаги в анализе генома возбудителя чумы *Yersinia pestis*: Автореф. дис. ... д-ра.мед.наук – Ростов-на-Дону, 1993. – 45 с.
454. Лебедева С.А. Устойчивые к диагностическому бактериофагу варианты *Yersinia pestis* и проблемы, связанные с ними //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. - 2000. - №3. – С. 99-104.

455. Лебедева С.А. , Гребцова Н.Н., Чернявская А.С. и др. Влияние плазмид чумного микроба на летальность и иммуногенность //Мол.генет., микробиол., вирусол. – 1991. - №3. – С.5-10.
456. Лебедева С.А. Гуревич Г.К., Заренков М.И, Милютин В.Н. Трансдукция у *Yersinia pestis*, осуществляемая бактериофагом *P1 vir* и *P1 cml clr 100 ts* //Мол.генет., микробиол., вирусол. - 1984. - N2. - С.17-19.
457. Лебедева С.А., Гуревич Г.К. Милютин В.Н., Кирдеев В.К. Лизогенизация *Yersinia pestis* бактериофагом *P1 cml clr 100 ts* //Мол.генет., микробиол., вирусол. – 1984.- №1. – С.18-21.
458. Лебедева С.А., Иванова В.С., Трухачев А.Л., Чернявская А.С. Особенности свойств бактерий чумы «полевочьей» разновидности //Актуал. аспекты природно-очагов болезней: Матер. межрегион. науч.-практ. конф., посвящ. 80-лет. Омского НИИПИ. - Омск, 2001. - С.166-168.
459. Лебедева С.А, Коссе Л.В., Морозова И.В. и др. Влияние компонентов капсульного антигена F1 чумного микроба на протективность вакцинного штамма *Yersinia pestis EV76* (линия НИИЭГ) //Иммунология. – 2007. – Т.28., №6. - С.352-357.
460. Лебедева С.А., Кузнецова Л.С., Коссе Л.В. Штамм *Citrobacter freundii* KM1-продуцент антигена “фракция 1” чумного микроба. //Патент Ростовск.-н/Д н.-и. противочум. ин-та: Заявка №5024172/13. Положительное решение от 06.05.1992. - Приоритет 03.07.1991
461. Лебедева С.А., Ракин А.В., Заренков М.И., Взаимодействие бактерий возбудителя чумы с гетерогенными бактериофагами. //Болезни с природ. очаговостью на Кавказе: Тез. докл. краев. науч. конф., посвящ. 60-лет. образов. СССР. – Ставрополь, 1982. – С.89-90.
462. Лебедева С.А., Сучков Ю.Г., Домарадский И.В. Синтрофизм у чумного микроба и возможная биологическая роль этого явления //Бюлл. exper. биол. и медицины. - 1970. - №3. – С.79-81.
463. Лебедева С.А., Трухачев А.Л., Иванова В.С., Чернявская А.С. К вопросу об эволюционном развитии вида *Yersinia pestis* и эпидемиологической значимости его представителей //Актуал. пробл. эпидемиол. безопасности: Матер. юбил.

- науч.-практ. конф.»Эпидемиол. безопасн. на Кавказе. Итоги и перспективы», посвящ. 50-лет. Ставропольск. НИПЧИ. - Ставрополь, 2002. - С.147-149.
464. Леви М.И. О некоторых дополнениях к характеристике основных носителей чумного микроба //Сб. науч. работ Элистинск. противочум. станции. - Шахты, 1959. - Вып.1. - С.119-127
465. Леви М.И. О классификации серологических реакций и об определении реакции нейтрализации //Вопр. вирусологии. – 1961. - №5. – С.630-632.
466. Леви М.И. О классификации серологических реакций и об определении реакции нейтрализации //Вопр. вирусологии. – 1961. - №5. – С.630-632..
467. Леви М.И. Классификация разновидностей возбудителя чумы //Тез. докл. науч. конф. по природ. очагов. и профилакт. чумы и туляремии. - Ростов-на-Дону, 1962. - С.72-74.
468. Леви М.И. Перспективы применения иммунологических методов для эпизоотологического исследования на чуму //Тр. Азербайджанской ПЧС. – Баку, 1962. – Вып.3. – С.239-241.
469. Леви М.И. Анализ дискретной структуры антител по аффинитету и антиген-связывающая способность //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1983. - №10. – С.71-76.
470. Леви М.И. Логическая модель межэпизоотического периода при чуме (синтетическая гипотеза) //Матер. VII съезда Всерос. об-ва эпидемиол., микробиол., паразитол. – М., 1997. – Т.1. – С.79-81.
471. Леви М.И., Басова Н.Н., Сучков Ю.Г. и др. Реакция пассивной гемагглютинации и реакция нейтрализации антител при некоторых инфекциях //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1962. - №10. – С. 40-45.
472. Леви М.И., Венгеров Ю.Ю., Волков Д.В. и др. Использование моноклональных антител в иммуноферментном анализе для доказательства одновалентности антигена //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1984. - №11. – С.84-88.
473. Леви М.И., Канатов Ю.В., Сагатовская Л.А., Канатова Е.А. Новая разновидность чумного микроба //Тр. Ростовск.-н/Д н.-и. противочум. ин-та. – Ростов-на-Дону, 1961. - Т. XVIII. - С.3-23.

474. Леви М.И., Миронов Н.П., Шишкин А.К. и др. Предварительные итоги эпизоотологического обследования на территории деятельности Астраханской, Дагестанской и Элистинской противочумных станций в 1960 г. и задачи работы на 1961 год //Сб. науч. работ Элистинской ПЧС. – Элиста, 1961. – Вып.2. – С.293-307.
475. Леви М.И., Момот А.Г., Сучков Ю.Г. Применение реакции нейтрализации антител для исследования трупов грызунов, павших от чумы //Микробиол. и иммунол. особо опас. инф. – Саратов, 1964. – С. 226-230.
476. Леви М.И., Сагатовская Л.А., Сучков Ю.Г., Момот А.Г. Серологические исследования при чуме. Сообщение VIII. К вопросу о чувствительности и специфичности реакции нейтрализации антител при чуме и туляремии //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1963. - №5. – С.65-68.
477. Левина А.А. К вопросу о латентной чуме у краснохвостых и больших песчанок Туркмении. Сообщение I. Характеристика течения латентного инфекционного процесса //Вопр. природной очагов. и эпизоотол. чумы в Туркмении. – Ашхабад, 1960. – С.241-257.
478. Левина Г.А., Прозоровский С.В., Ягуд С.Л. и др. Образование и персистенция Л-вариантов *Salmonella typhi* в течение экспериментальной брюшнотифозной инфекции и бактерионосительства //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1981. - №7. – С. 27-30.
479. Лежнев А.И., Попов Ю.А., Куличенко А.И., Коровкин С.А. Специфичность гибридизации и структурная организация фрагмента, содержащего область начала репликации плазмиды кальцийзависимости *Yersinia pestis* //Актуал. пробл. и задачи биохимии, диагност. и иммунопрофилакт. особо опас. инф. – Саратов. – 1991. – С.37-44.
480. Ленская Г.Н. Вопросы изменчивости чумного микроба применительно к изучению природной очаговости чумы //Матер. X совещ. по паразитол. пробл. и природноочаговым болезням. – М.-Л., 1959. – Вып.1. – С.207-209.
481. Ленская Г.Н., Соколова Н.М., Кузнецова О.Р. Характеристика двух штаммов чумного микроба, выделенных в высокогорье Нахичеванской АССР //Микробиол. и иммунол. особо опас. инф. – Саратов, 1968. – Вып.3. – С.36-60.

482. Лешкович Н.Л. Свойства чумных умеренных фагов 1701, 1710 и их мутантов: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Алма-Ата, 1974а - 23 с.
483. Лешкович Н.Л. Иммуногенность и некоторые другие свойства фагоустойчивых мутантов штамма *EV* //Пробл. особо опас. инф. –Саратов, 1978. – Вып.5. – С.26-28.
484. Лешкович Н.Л., Арутюнов Ю.И., Токарев С.А., Кирдеев В.К. Морфология чумных умеренных фагов 1701, 1710 и их мутантов //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1975. - №10. – С.31-34
485. Лешкович Н.Л., Ермилова В.П. О диапазоне и специфичности действия чумных фагов 1701, 1710 и их мутантов //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1974. – Вып.2. – С.38-41.
486. Литвин В.Ю. Потенциальная опасность и случайный паразитизм микроорганизмов //Потенциально патоген. бактерии. в природе. – М.,1991. – С.9-30.
487. Литвин В.Ю. Случайный паразитизм микроорганизмов //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1992. - №1. – С.52-55
488. Литвин В.Ю. Механизмы устойчивого сохранения возбудителя чумы в окружающей среде (новые факты и гипотезы) //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол.. 1997. - №4. – С.26-31.
489. Литвин В.Ю., Гинцбург А.Л., Пушкарева В.И. и др. Обратимый переход патогенных бактерий в покоящееся (некультивируемое) состояние: экологические и генетические механизмы //Вестник РАМН. – 2000. - №1. – С.7-13.
490. Литвин В.Ю., Шустрова Н.М., Гордейко В.А. и др. Экспериментальное изучение иерсиний в растениях //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1991. - №9. – с.5-7.
491. Логачёв А.И., Жамьянсурен П., Дополнительные данные к ферментативной характеристике чумного микроба улэгейского подвида //Пробл. природ. очаговости чумы: Тез.докл. к IV Совет.-Монгол. конф. специалистов противочум. учрежд.- Иркутск,1980. - Ч.2. - С.53-54.

492. Логачев А.И., Михайлов Е.П. К характеристике вирулентности штаммов чумного микроба, выделенных в Горном Алтае. //Совр. аспекты профилакт. зоонозных инф. - Иркутск,1984. - Ч.2. - С.50.
493. Логачев Л.И., Тимофеева Л.А. О пестицинах культур чумного микроба //Докл. Иркутск. н.-и. противочум. ин-та Сибири и Дальнего Востока. - Кызыл,1966. - Вып.7. - С.123-126.
494. Ломов Ю.М. Л-формы холерных вибрионов. – Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. – Ростов-на-Дону, 1987. – 39 с.
495. Ломов Ю.М., Голубкова Л.А. Некоторые биологические свойства Л-форм холерных и НАГ-вибрионов //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1979. - №9. – С.95-96.
496. Ломов Ю.М., Голубкова Л.А. Некоторые биологические свойства Л-форм холерных и НАГ-вибрионов //Микробиология – 1980. – Т.42, №4. – С.502-507.
497. Лурье Ю.Ю., Рыбникова А.И. Синтетические поверхностно-активные вещества //Химич. анализ производственных сточных вод. - М.,1974. – С.318-321.
498. Ляшенко В.В., Воробьев А.А. Молекулярные основы иммуногенности антигенов. – М., 1982. – 272 с..
499. Маевский М.П., Асташин Ю.М., Калиновский А.И. и др. Чувствительность монгольской пищухи к возбудителю чумы алтайского подвида при различных методах инфицирования. //Пробл. природ. очаговости чумы:Тез.докл.к IV – Совет.-Монгол. конф. специалистов противочум. учрежд. - Иркутск,1980. - Ч.2. - С.78-81.
500. Маевский М.П., Иннокентьева Т.И., Калиновский А.И. Биологические свойства штаммов чумного микроба, выделенных из почвы в Сайлюгемском очаге //Соврем. аспекты профилакт. зоонозных инф. - Иркутск, 1984. - Ч.2. - С.58-59.
501. Майский В.Г., Куцемакина А.З. Сравнительное использование свободных аминокислот и низкомолекулярных пептидов при синтезе белков у чумного микроба //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1978. – Вып.3. – С.5-8.

502. Макаров А.А., Дорофеев А.Г., Паников Н.С. Форма и размеры клеток голодающих микроорганизмов по данным компьютерного анализа образов //Микробиология. – 1998. – Т.67, №3. – С.320-327.
503. Малинина З.Е., Зубова М.В. Изучение вирулентности чумного микроба и получение живых вакцин против чумы. Сообщение 4. Токсигенность чумного микроба и её связь с вирулентностью и иммуногенностью //Вопр. микробиол. и лаб. диагност. особо опас. инф. – Саратов, 1965. – С. 50-53.
504. Мареев В.И. Морфологические особенности течения чумы у грызунов, обусловленные естественной и природной резистентностью: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Саратов, 1982. – 18 с.
505. Маркова Н.С. Адаптация дизентерийного бактериофага к патогенным серотипам кишечной палочки //Микробиология, инфекц. и инвазион. болезни: Тр. Крымского мед. ин-та. – Симферополь, 1962. – Т. XXXIII. – С.106-108.
506. Мартиневский И.Л. Биология и генетические особенности чумного и близкородственных ему микробов. - М, 1969. – 296 с.
507. Мартиневский И.Л. Lon-подобные мутанты чумного микроба //Генетика. – 1972. – Т. VIII, №2. - С.145 – 148.
508. Мартиневский И.Л., Кусакин А.А. О спектре действия пестицина I и влиянии на его активность некоторых химических и других ингредиентов //Генет., биохим. и иммунохим. особо опас. инф. - Ростов-на-Дону, 1967. - С.18-23.
509. Мартиневский И.Л., Шашаев М.А., Кусакин А.А. Характер отношения чумного и псевдотуберкулёзного микробов к T3 и T7 фагам как один из возможных новых генетических маркеров у этих бактерий //Генет. биохим., иммунохим. особо опас. инф. – Ростов-на-Дону, 1967. – С.99-102.
510. Марченков В.И, Демидова Г.В., Бородина Т.Н. и др. Получение и изучение фагоустойчивых мутантов *Yersinia pestis* //Матер. VIII съезда Всерос. об-ва эпидемиол., микробиол. и паразитол. - М., 2002. – Т.I. - С.200-201.
511. Марьина Ю.Н. О некоторых свойствах чумных бактериофагов, выделенных из организма животных и чистых культур //Тр. Ростовского н/Д. н.-и. противочум. ин-та. – Ростов-на-Дону, 1939. – Т.1. – С.68-77.

512. Марьина Ю.Н. Получение антифаговой сыворотки и изучение антигенной структуры фага //Тр. Ростовского н/Д. н.-и. противочум. ин-та. – Ростов-на-Дону, 1941. – Т.II. – С.3-7.
513. Марьина Ю.Н. Условия подавления чумного фага антифаговой сывороткой //Тр.Ростовского н/Д. н.-и. противочум. ин-та. – Ростов-на-Дону, 1946. – Т.V. – С.11-18.
514. Марьина Ю.Н. Определение типов чумного бактериофага //Тр. Ростовского н/Д. н.-и. противочум. ин-та. – Ростов-на-Дону, 1948. – Т.VII. – С.17-26.
515. Мацелюх Б.П. Адаптация кишечного бактериофага к бактериям капсульной группы. //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1958. - №1. – С.107-109.
516. Меньшикова Е.А., Подосинникова Л.С., Миронова А.В. и др. Гемолитическая активность и токсигенность *Vibrio cholerae* различных серогрупп //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. - 2002. - №5. – С.7-11.
517. Меньшов П.И., Шмутер М.Ф. Формалинизация эритроцитов с помощью мешалки //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1969. – Вып.5. – С.202-203.
518. Меринов С.П., Рудник В.С., Миронова Л.П. Таксономическое значение аспартат-аммиак-лиазной и арабинозоизомеразной активности иерсиний //Пробл. природ. очагов. чумы: Тез.докл. к IV Совет.-Монгол. конф. специалист. противочум.учрежд. - Иркутск,1980. - Ч.2. - С.66-67.
519. Меркулов А.Э. Популяционная динамика легионелл в водных экосистемах и факторы её определяющие: Автореф.дис. ... канд. мед. наук. – М.,1990. – 22 с.
520. Метлин В.Н., Земцова И.Н., Буркина М.А. Иммуноэлектрофоретическое исследование антигенной структуры некоторых атипичных штаммов возбудителя чумы, выделенных из природы //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1970. – Вып. 1. – С. 105-108.
521. Методические рекомендации по методам обследования энзоотичных территорий на формы несбалансированного роста и Л-формы /Сост. Л.Ф. Зыкин, Г.С. Дунаев, С.В. Прозоровский и др. – М, 1986 - 19 с.
522. Методические рекомендации по использованию реакции бластной трансформации (РБТЛ) в определении специфической иммунологической

- реактивности биомоделей /Сост. Н.А.Шикуля, С.А.Лебедева, Л.В.Коссе. – Ростов-на-Дону, 1992. – 11 с.
523. Методические указания по организации проведения эпидемиологического надзора в природных очагах чумы Российской Федерации /Методические указания МУ 3.1.1098 – 2002. - М., 2001. – 112 с.
524. Методы практической биохимии /Ред. Уильямс Б., Уилсон К. – М., 1978. – 268 с.
525. Милин В.М., Исин Ж.М., Кравченко Н.П. и др. Изучение некоторых адаптивных изменений, происходящих в поселениях больших песчанок при чуме //Песчанки – важнейшие грызуны аридной зоны СССР: Матер. III Всесоюз. совещ. – Ташкент, 1989. – С.247-248.
526. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / Пер. с англ. – М., 1976. – 436с.
527. Михайлова Р.С. О систематическом положении штаммов *P. pestis*, выделенных в 1962 г. в Армении //Тр. Армянской ПЧС. - Ереван, 1964. - Вып.3. - С.51-56.
528. Михайлова Р.С. О серологических взаимоотношениях чумного микроба с бактериями кишечной группы //Тр. Армянской ПЧС. – Ереван, 1964. – Вып.3. – С. 143-162.
529. Мишанькин Б.Н. Интегративный характер вирулентности *Yersinia pestis* //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1987. - №2. – С.102-108.
530. Мишанькин Б.Н., Сучков Ю.Г. Псевдолизогения у возбудителя чумы //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1973. – Вып.1. – С.38-40.
531. Мишанькин Б.Н., Сучков И.Ю. Вирулентность «некультивируемых» форм *Yersinia pestis* //Матер. науч.-практ. конф., посвящ. 100-лет. образования противочум. службы России. - Саратов, 1997. - Т.II. – С.89-90.
532. Мишанькин Б.Н., Водопьянов С.О., Сучков И.Ю. Способ выявления ДНК гена «мышинного» токсина *Yersinia pestis* в ПЦР //Матер. науч.-практ. конф., посвящ. 100-лет. образования противочум. службы России. - Саратов, 1997. - Т.2. - С.90.

533. Мишанькин М.Б. Структурно-функциональная характеристика «мышинного» токсина чумного микроба: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Ростов-на-Дону, 1997. – 20 с.
534. Мкртчян С.А., Вартамян А.А. Шехикян М.Т., Шахриманян В.О. Восприимчивость и инфекционная чувствительность малоазийских сусликов к чумной инфекции //Тр.. Армянской ПЧС. - Ереван,1963. - Вып.2. - С.23 -41.
535. Можаров О.Т., Шведун Г.П., Дроздов А.В. и др. Клонирование локуса Ca^{2+} -зависимости возбудителя чумы //Молекул. биол. и микробиол. природноочагов. инф. – Саратов, 1986. – С.63-70.
536. Некипелов Н.В. Эпизоотология чумы в Забайкалье и Монголии: Автореф. докл. ... д-ра. биол. наук (по совокупности. опубликов. работ). - Иркутск,1962. - 42 с.
537. Некипелов Н.В. Основные носители чумы в сибирских очагах и их изучение //Пробл. природ. очаговости чумы: Тез. докл. к IV Совет.-Монгол.конф. специалист. противочум. учрежд. - Иркутск,1980. - Ч.1. - С.75-76.
538. Некляев В.Н. Изучение гетерогенных антигенов чумного микроба штамма ЕВ: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Саратов, 1984. – 18 с.
539. Никитин В.М. Реакция цветных антител //Военно-медицин. журн. – 1966. - №9. – С. 51-55.
540. Николаев Н.И., Гольдфарб Л.М., Земцова И.Н. и др. К вопросу об изучении антигенной структуры чумного микроба //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1969. – Вып.5. – С.5-8.
541. Никульшин С.В., Онацкая Т.Г., Луканина Л.М., Бондаренко А.И. Изучение ассоциаций почвенных амёб *Hartmannella rhysoides* с бактериями-возбудителями чумы и псевдотуберкулеза в эксперименте //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1992. - №9-10. – С.2-5.
542. Новосельцев Н.Н. О выделении умеренных фагов чумного микроба //Генет., биохим. и иммунохим. особо опас. инф. – Ростов-на-Дону, 1967. – С.91-98.
543. Новосельцев Н.Н. Получение стрептомициноустойчивых рекомбинантов чумного микроба методом трансдукции //Пробл.особо опас. инф., - Саратов, 1970. – Вып.1. – С.98-100.

544. Новосельцев Н.Н. К характеристике умеренного чумного *H*-фага //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1970. – Вып.5. – С.74-80.
545. Новосельцев Н.Н. Умеренный фаг чумного микроба //Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. – Саратов, 1973. – 44 с.
546. Новосельцев Н.Н., Арутюнов Ю.И. Одиночный цикл развития чумных *H*-фагов на микробах различной видовой принадлежности //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1974. – Вып.6. – С.43-47.
547. Новосельцев Н.Н., Арутюнов Ю.И., Токарев С.А., Кирдеев В.К. Электронномикроскопическое исследование фагов чумного микроба //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1971. - №3. – С.16-19.
548. Новосельцев Н.Н., Арутюнов Ю.И., Токарев С.А., Кирдеев В.К. Электрономикроскопическое изучение чумных «*H*» фагов //Вопр. теоретич. и приклад. микробиол. – Ростов-на-Дону, 1973. – С.108-109.
549. Новосельцев Н.Н., Кирдеев В.К. Выделение чумных фагов из сточных вод //Пробл. мед. и сан.. микробиологии города: Тез. обл. конф. – Ростов-на-Дону, 1987. – С.63-65.
550. Новосельцев Н.И. Марченков В.И., Фаг *Y.pestis* нового серовара //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1990. - №11. – С.9-12.
551. Новосельцев Н.Н., Марченков В.И., Арутюнов Ю.И. Фаги IVсеровара *Yersinia pestis* //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1994. - №6. – С. 9-10.
552. Новосельцев Н.Н., Марченков В.И., Кирдеев В.К. Электронномикроскопическое изучение чумного фага «*П*» третьего серовара //Вестн. Всесоюз. микробиол. об-ва (Ростовское отд.) – Ростов-на-Дону, 1989. – Вып.1. – С.73-75.
553. Новосельцев Н.И., Марченков В.И., Кравченко А.Н. и др. Литическая активность фага *Yersinia pestis* П 3-го серовара //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1990а. - №12. – С.15-18.
554. Новосельцев Н.Н., Марченков В.И., Сорокин В.М. и др. Родственные связи между чумным и выделенным из внешней среды бактериофагом //Мол.генет., микробиол., вирусол. – 1990б. - №8. – С.18-21.

555. Новосельцев Н.Н., Рыжко И.В., Арутюнов Ю.И. Выделение «чумного» фага из сточных вод и изменение литической активности фага РД при культивировании на микробе чумы //Селекция и генет. возб. особо опас. инф. – Саратов, 1982. – С.62-66.
556. Новосельцев Н.Н., Рыжко И.В., Кирдеев В.К. О происхождении чумных умеренных фагов серотипа 2 //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1977. - №10. – С.111-115.
557. Обухова О.В. Иммунологические сдвиги при иммунизации людей аэрогенной пылевой вакциной против чумы по данным реакции связывания комплемента и агглютинации //Сб. науч.- исслед. работ по аэрогенной иммунизации МО СССР. – М.,1961. – С.241-246.
558. Овасапян О.В., Шехикян М.Т. Случаи заболевания бубонной чумой в высокогорном природном очаге Армении //Эпидемиол., микробиол. и иммунол. бактер. и вирусн. инф. - Ростов-на-Дону,1989. - С.193-195.
559. Огарёв Н.Н. Влияние ультрафиолетовых лучей на свойства чумного микроба //Микробиол. и иммунол. особо опас. инф. – Саратов,1968. – С.207-211.
560. Оловников А.М. Поликонденсированный суспензионный антитело-иммуносорбент и его использование в реакции агглютинации для определения содержания антигенов //Докл. АН СССР. – 1964. – Т.158, №5. - С.1202-1205.
561. Орлова Г.М., Адимов Л.Б., Сивкова О.В. и др. Набор сухих коаггулинирующих диагностикумов для обнаружения и идентификации возбудителей опасных инфекционных заболеваний. //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1992. - №2. – С.71-72.
562. Орлова Г.М., Божко Н.В., Адимов Л.Б. и др. Перспективы использования чумных коаггулинирующих диагностикумов при эпиднадзоре //Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилактики: Матер. межгосуд. науч.-практ. конф. – Алма-Ата, 1992. – Ч. – С.138-139.
563. Орлова Г.М., Леви М.И. Серологические исследования при чуме. Сообщение XVIII. Распределение антигена фракции 1 в различных фракциях чумного микроба //Микробиол. и иммунол. особо опас. инф. - Саратов, 1964. – С.123-125.

564. Осадчая Л.М., Михайлова Л.Д., Куница Н.К., Егорова Р.П. О выделении атипичных штаммов микроба чумы в Или-Каратальском междуречье //Матер. IV науч. конф. по природн. очагов. и профилакт. чумы. – Алма-Ата, 1965. – С.181-182.
565. Основные критерии отбора вакцинных штаммов чумного микроба: Методические указания. – Саратов, 1976. – 34 с.
566. Особенности методических приемов при работе с возбудителями инфекционных болезней человека I и II группы патогенности бактериальной этиологии (Практическое руководство) /Сост. В.С. Уралева, М.М. Гулида, С.А. Лебедева и др. - Ростов-на-Дону, 1989. - 208 с.
567. Павлович Н.В., Сорокин В.М., Благородова Н.С. Устойчивость *Francisella tularensis* к бактерицидному действию нормальной сыворотки как критерий оценки вирулентности бактерий //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1996. - №1. - С. 7-10.
568. Пак Г.Ю. К вопросу о видообразующей изменчивости возбудителя чумы //Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилакт.: Матер. межгосуд. науч.-практ. конф. –Алма-Ата, 1992. –Ч.2 –С.250-252.
569. Пак Г.Ю., Айкимбаев А.М., Степанов В.М. и др. К вопросу об уреазной активности штаммов чумного микроба, выделенных от красных сурков в Западном Тянь-Шане //Биохимия, патофизиол. и микробиол. особо опас. инф. – Саратов, 1983. – С.30-33.
570. Пак Г.Ю., Сатыбалдиев Н.А. О некоторых свойствах фагов, выделенных из штаммов возбудителя чумы горно-алтайского происхождения //Тез. X науч. конф. противочум. учрежд. Сред. Азии и Казахстана. – Алма-Ата, 1979. - Вып. I. – С.59-62.
571. Пак Г.Ю., Сатыбалдиев Н.А., Баканурская Т.Л. и др. О свойствах природного фагоустойчивого мутанта возбудителя чумы //Матер. XI науч.-практ. конф. противочум. учрежд. Сред. Азии и Казахстана по профилакт. чумы. – Алма-Ата, 1981. - С.86-88.

572. Пак Г.Ю., Степанов В.М., Сатыбалдиев Н.А. и др. К роли бактериофагов в саморегулирующейся системе энзоотии чумы //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. - 1990. - №9. – С.97-100.
573. Пашин А.Ю., Пономарёв Н.Г., Джапаридзе М.Н. Чумной видоспецифический коаггулинирующий диагностикум. //Сост. пробл. и перспект. развития диагност. бактер. инф. – Оболенск, 1990. – С.86.
574. Пейсахис Л.А. Реактивность и патогенез при чуме у серых сурков как факторы природной очаговости чумы в Центральном Тяньшане //Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Алма-Ата, 1964. – 24 с.
575. Пейсахис Л.А., Классовский Л.Н. Дополнительные данные по ферментативной активности бактерий чумы из разных природных очагов //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1974. – Вып.5. – С.35-39.
576. Пейсахис Л.А., Ларионов Г.М. К эпизоотологической роли штаммов возбудителя чумы, не продуцирующих пестицин 1 (Pg-) //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1971. – Вып.6. – С.104-107.
577. Пейсахис Л.А., Степанов В.М. Внутривидовая классификация возбудителя чумы по принципу географического районирования //Пробл. особо опас. инф. - Саратов, 1975. – Вып.2. - С.5-9.
578. Петров Р.В. Генетические основы иммунного ответа. //Тез. науч. докл. XXXIV сессии общего собрания АМН СССР. – М., 1973. – С.10-13.
579. Петров Р.В., Манько В.М., Пантелеев Э.И. Межлинейные различия антителогенеза у инбредных мышей, иммунизированных одним или двумя антигенами //Бюлл. эксперим. биол. и медицины. – 1966. - №8. – С.70-74.
580. Петров П.А., Эйгелис Ю.К., Адамян А.О. Экологические особенности обыкновенных полевок Закавказского нагорья как носителей чумы //Особо опас. инф. на Кавказе: Матер. науч.конф. противочум. учрежд. Кавказа по эпидемиол., эпизоотол., профилакт. особо опас. инф. - Ставрополь, 1966. - С.143-146.
581. Петрова Б.Ю., Шалаева А.Ф. Роль капсулы в иммуногенности живой противочумной вакцины //Спец. профилакт. особо опас. инф. – Саратов, 1964. – С.133-138.
582. Петровская В.Г. Проблема вирулентности бактерий. – Л., 1967. – 263 с.

583. Петрунина О.М. К вопросу о прорастании авизуальных форм чумного микроба //Тр. Средне.-Азиатск. н. и. противочум. ин-та. –Алма-Ата, 1951. –Вып.І. –С.166.
584. Плетнёва Н.А. К вопросу течения чумного процесса у краснохвостых песчанок //Тр. Туркменской ПЧС. – Ашхабад, 1958. – Т.1. – С.49-52.
585. Плотников О.П. Трансдуцирующая система на модели чумного и псевдотуберкулёзного микробов //Мол.биол. и генетика возб. особо опас. инф. – Саратов, 1982. – Ч.2. – С.52-55.
586. Плотников О.П., Лизогенная конверсия *Y. pestis*, обусловленная гетерогенными фагами //Мол. биол. и генетика возб. особо опас. инф. – Саратов, 1982. – Ч.1. – С.55-58.
587. Плотников О.П., Александрова Н.М., Коннов М.П. и др. Поиски фагов с дифференцирующим действием в отношении штаммов чумного микроба, циркулирующих на территории Закавказского высокогорного очага чумы //Лаб. диагност. и генетика вирулентности. возб. особо опас. инф. - Саратов,1990. - С.39-42.
588. Подосинникова Л.С., Ломов Ю.М., Власов В.П. и др. Вирулентность холерных вибрионов различного происхождения //Холера: Вопр. эпидемиол., микробиол. и лаб. диагност.: Матер. Рос. науч. конф. - Ростов н/Д, 1992. – С.75-78.
589. Погасий Н.И., Ларионов Г.М. Вирулентность чумного микроба при сочетанной утрате детерминант этого признака //Особо опас. и редко встречающиеся тропические инф. – Волгоград, 1980. – С.58-59.
590. Погорелов В.И., Пинигин А.Ф., Марамович А.С. и др. Холерные вибрионы и инфузории: анализ взаимодействий //Патоген. бактерии в сообществах(механизмы и формы существования): Сб. науч. тр. - М.,1994. – С.42-48.
591. Подладчикова О.Н., Диханов Г.Г. Родоспецифический ДНК-зонд для детекции иерсиний //Мол. биология. – 1990. – Т.24, №4. – С.1010-1016.
592. Подладчикова О.Н. Иванова В.С., Еременко Н.С., Лебедева С.А. Характеристика мутантов возбудителя чумы, различающихся по признаку пигментсорбции //Мол. генет., микробиол., вирусол.. - 2003. - №1. – С.26-31.

593. Подладчикова О.Н., Рыкова В.А., Иванова В.С. и др. Изучение механизма возникновения *Pgm^r* мутаций у вакцинного штамма возбудителя чумы *Yersinia pestis EV76* //Мол. генет., микробиол., вирусол. - 2002. - №2. - С.14-19.
594. Покровская М.Н. Чумной бактериофаг в трупах сусликов //Гигиена и эпидемиол. – 1929. - №12. – С.31-34.
595. Покровская М.П. Чумной бактериофаг в трупах сусликов //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1932. – Т.IX (приложение). – С.88-89.
596. Покровская М.П. К изучению чумного бактериофага //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1933. - №6. – С. 1-16.
597. Покровская М.П. Изменчивость культур *B.pestis* //Изв. Азово-Черноморского ИМиЭ. – 1935. – Вып.1. – С.33-43.
598. Полосмаков В.Э., Шиманюк Н.Я., Мишанькин М.Б., Мишанькин Б.Н. Участие уреазы штаммов *Yersinia pestis* из Центрально-Кавказского природного очага чумы в усвоении азота мочевины //Актуал. пробл. эпидемиол. безопасности: Матер. юбил. науч.-практ. конф. «Эпидемиол. безопасн. на Кавказе. Итоги и перспективы», посвящ. 50-лет. Ставропольского НИПЧИ. – Ставрополь, 2002. – С.212-213.
599. Пономарёв Н.Г. Селекция высокоиммуногенных вариантов из популяции вакцинных штаммов чумного микроба EV(НИИЭГ) и 1 по признаку «латентной» вирулентности //Пробл. особо опас. инф.. – Саратов, 1968. – Вып. 2. – С.69-74.
600. Пономарёв Н.Г., Гиззатуллина С.К. Определение величины «остаточной» вирулентности штаммов чумного микроба, предлагаемых в качестве вакцинных //Генетика, биохим. и иммунохим. особо опас. инф. - Саратов, 1967. – С.365-372.
601. Пономарёв Н.Г., Кузнецова О.Р., Гиззатуллина С.К. Изучение безвредности и иммуногенности вариантов 331, 358 и 708 штаммов чумного микроба //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1968а. – Вып.2. – С.75-79
602. Попов Ю.А., Проценко О.А., Анисимов П.И. и др. Обнаружение плазмид пестициногенности чумного микроба методом электрофореза в агарозном геле //Профилактикт. особо опас. инф. - Саратов, 1980. - С. 20-25.

603. Попов Ю.А., Федотов Э.А., Кокушкин А.М. и др. Детекция бактерий *Yersinia pestis* в органах животных и блохах методом генетического зондирования //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1994. - №5. – С.80-82.
604. Постников Г.Б. Течение эпизоотии в междуречье Урала и Эмбы //Матер. IV научн. конф. по природ. очаговости и профилакт. чумы. – Алма-Ата, 1965. – С.207-209.
605. Прозоровский С.В. Значение процесса Л-трансформации в экологии патогенных бактерий //Тр. ин-та экологии растений и животных. – Свердловск, 1975. – Вып.98. – С.23-30.
606. Прозоровский С.В. Кац Л.Н., Каган Г.Я. L-формы бактерий. – М., 1981. – 240 с.
607. Прозоровский С.В. , Ломов Ю.М., Кац Л.Н. и др. Получение и биологическая характеристика Л-форм холерных вибрионов //Вестн. АМН СССР. – 1976. - №5. – С.17-21.
608. Прокопьева Е.Д., Прокопьев А.А., Дальвадянц С.Н. и др. Изучение индукции интерлейкина-1 и фактора некроза опухоли мышиными макрофагами под воздействием капсульного антигена возбудителя чумы //Микробиол., биохим. и спец. профилакт. карантин. инф. – Саратов, 1990. – С.77-84.
609. Проценко О.А., Анисимов П.И., Можаров О.Т. и др. Выявление и характеристика плазмид чумного микроба, детерминирующих синтез пестицина 1, антигена фракция 1 и экзотоксина «мышинного» токсина //Генетика. – 1983. – Т.19. - №7. – С.1081-1090.
610. Проценко О.А., Кутырев В.В. Влияние F¹lac на выражение признака Ca²⁺-зависимости чумного микроба //Селекция и генет. возб. особо опас. инф. – Саратов, 1982. – С.3-7.
611. Проценко О.А., Филиппов А.А., Кутырев В.В. Некоторые свойства плазмиды, детерминирующей синтез «мышинного» токсина и антигена фракция 1 возбудителя чумы //Бактериальные токсины. - 2-ая Всесоюз. конф.: Тез. докл. - Юрмала, 1989. – С.105.
612. Прядкина М.Д., Басова Н.Н., Гавриленкова В.Ю. Кожно-аллергическая реакция и антитела к фракции 1 у морских свинок, иммунизированных

- вакцинами из разных штаммов чумного микроба. //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1968. – Вып.2 – С.158-161.
613. .
614. Пустовалов В.Л., Васильева Г.И., Киселёва А.К. Определение антифагоцитарной активности антигенов чумного микроба //Патол. физиол., иммунол. и аллергол. особо опас. инф. – Саратов, 1984. – С.8-12.
615. Пустовалов В.Л., Васильева Г.И., Киселёва А.К. и др. Антигенный состав и антифагоцитарные свойства чумного и псевдотуберкулезного микробов //Мол. биол. и микробиол. природноочаговых инф. – Саратов, 1986. – С. 50-56.
616. Пустовалов В.Л., Таранова В.Н., Попкова Л.В. и др. Питательная среда для выращивания чумного микроба. //Авт. свид-во № 738398(СССР). – МКИ. С12 К1/06 1984а
617. Пунский Е.Е., Левина А.А., Волошина И.И. и др. Потеря способности возбудителя чумы синтезировать фракцию I при длительном нахождении его в организме большой песчанки //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1972. – Вып.2. – С.20-24.
618. Пушкарёва В.И., Емельяненко Е.Н., Литвин В.Ю. и др. Патогенные листерии в почве и в ассоциации с водорослями: обратимый переход в некультивируемое состояние //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1997. - №3. – С.3-10.
619. Пушкарёва В.И., Литвин В.Ю., Тартаковский И.С. Популяционная динамика *Yersinia pseudotuberculosis* в ассоциации с инфузориями *Tetrahimena pyriformis* //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1989. - №1. – С.17-21.
620. Пшеничная Л.А. Сравнительное изучение некоторых методов ускоренного обнаружения возбудителя чумы в объектах внешней среды //Особо опас. инф. на Кавказе: Матер. II науч. конф. противочум. учрежд. Кавказа по эпидемиол. эпизоотол. и профилакт. особо опас. инф. – Ставрополь, 1970. – Вып. 2. – С.44-49.
621. Ракин А.В. Генетический анализ чумного микроба с помощью бактериофага *Mu*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. - Ростов-на-Дону, 1984. – 24 с.
622. Ракин А.В., Гуревич Г.К., Лебедева С.А. Чувствительность *Yersinia pestis* к кишечным умеренным бактериофагам *P1 cml clr 100 ts* и *Mu cts62*

- //Внехромосомные генетические элементы: значение для науки и практики. VI Всесоюз. рабоч. совещ. по программе «Плазмида»: Тез. докл. – М, 1981. – С.123.
623. Ракин А.В., Казаченко Л.К. Изучение плазмидного состава как дополнительный тест для дифференциации видов иерсиний и выявления патогенных штаммов //Соврем. аспекты профилактик. зоонозных инф. - Иркутск, 1984. - Ч.3. - С.49-50.
624. Ракин А.В., Лебедева С.А., Алёшкин Г.И. Взаимодействие бактерий *Yersinia pestis* с бактериофагом *Mu* //Мол.генет., микробиол., вирусол. – 1985. - №9. – С.6-11.
625. Ракин А.В., Рыкова В.А. Использование мини-*Mu*-репликонов для клонирования некоторых структурных генов чумного микроба //Мол. генет., микробиол., вирусол. – 1990. - №5. – С.24-27.
626. Ралль Ю.М. Лекции по эпизоотологии чумы. – Ставрополь – 1958. – 243 с.
627. Ралль Ю.М. Грызуны и природные очаги чумы. - М., 1960.– 224с.
628. Ралль Ю.М. Природная очаговость и эпизоотология чумы. – М., 1965. – 363 с.
629. Ривкус Ю.З., Козлов И.А., Данилова К.Я., Адунц Н.А. Опыт применения серологических реакций при эпизоотологическом обследовании на чуму //Матер. V науч. конф. противочум. учрежд. Сред. Азии и Казахстана. – Алма-Ата, 1967. – С.56-58.
630. Родионова А.В. Лиофилизация как метод консервации эритроцитов, sensibilizированных антигенами //Диагност. особо опас. инф. – Ростов-на-Дону, 1968. – С.7-10.
631. Розанова Г.Н., Грамотина Л.И., Сучков Ю.Г. и др. Питательные потребности возбудителя чумы из очагов полёвочьего типа //Селекция и генет. возб. особо опас. инф. – Саратов, 1982. – С.73-76.
632. Розанова Г.Н., Пилипенко В.Г., Елкин Ю.М. и др. Передача обыкновенным полёвкам из Закавказского нагорья чумы и туляремии блохами, заражёнными смесью возбудителей этих инфекций //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1977. – Вып.5. – С.51-54.

633. Розанова Г.Н., Сердюкова Т.В., Шехижян М.Т. и др. Возбудитель чумы из очагов полёвочьего типа на Кавказе //Рук. депонир. во ВНИИТИ 06.11.87. - №7811.
634. Романова Ю.М. Некультивируемое состояние у патогенных бактерий на модели *Salmonella typhimurium*: феномен и генетический контроль //Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 1997. - 43с.
635. Романова Ю.М. Выявление некультивируемых форм бактерий с помощью ПЦР //Генодиагностика в современной медицине: Тез докл.3-ей Всерос. науч.-практ. конф. - М., 2000. – С.12.
636. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Есть ли сходство в механизмах образования «некультивируемых форм» у грамотрицательных бактерий и спор у бацилл //Мол. генет. микробиол., вирусол. – 1993. - №6. – С.34-37.
637. Романова Ю.М., Кириллов М.Ю., Терехов А.А. и др. Идентификация генов, нарушающих процесс перехода в «некультивируемое» состояние у *Salmonella typhimurium* //Генетика.- 1996. – Т.32, №9. – С.1184-1190.
638. Романова Ю.М., Терехов А.А., Гинцбург А.Л. Выделение и характеристика мутантов *Salmonella typhimurium* с нарушенным процессом образования некультивируемых форм //Генетика – 1995. – Т.31, №8. – С.1073-1078.
639. Романова Ю.М., Чегаева Е.В., Гинцбург А.Л. Некультивируемое состояние у патогенных бактерий: известные и возможные факторы индукции обратимого процесса //Мол. генет., микробиол., вирусол. – 1998. - №3. – С3-8.
640. Ромашова Е.А. К вопросу о методах обнаружения и выделения чумного бактериофага из органов диких грызунов и их эктопаразитов //Сб. науч. трудов. Ростовского н/Д. н.-и. противочум. ин-та и Дагестанской ПЧС. – 1961. – С.52-54.
641. Руднев М.М. О вероятности заболевания людей ангинозно-бубонной чумой в очагах Кавказа //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1977. - Вып.5. - С.20-23.
642. Рудник М.П. Разработка и применение иммуноферментного метода для диагностики чумы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 1985. – 18 с.
643. Рудник М.П., Голубинский Е.П., Меринов С.П. и др. Применение энзимсвязанного иммуносорбентного определения (ELISA) для диагностики чумы //Иммунология. – 1983. - №6. – С.74-76.

644. Руководство по профилактике чумы (Методы исследования). – Саратов, 1992. – 278 с.
645. Рыбкин В.С., Кулаков М.Я., Волков Е.А., Свистунов В.М. Антигенный эритроцитарный диагностикум на основе фракции II Бекера возбудителя чумы //Соврем. пробл. серологич. исслед. при эпиднадзоре в природ.очагах чумы: Тез. докл. Всесоюз. конф. – Саратов, 1982. – С.72-73.
646. Рыцай Т. Специфическая агглютинация эритроцитов, покрытых антителами //Бюлл. Польской АН. – 1956. – Т.4, №9. – С.335-339.
647. Сагимбеков У.А., Рапопорт Л.П., Ветров Ф.Е. и др. О выделении возбудителя чумы в Таласском Алатау (Западный Тянь-Шань). //Профилакт. особо опас. инф. - Саратов, 1980. - С.11-14.
648. Сагимбеков У.А. Механизм появления и значение атипичных штаммов в эпизоотии чумы //Матер. науч.-практ. конф., посвящ. 100-лет. образован. противочум. службы России. - Саратов,1997. - Т.1. - С.138.
649. Сагимбеков У.А., Пошевина Г.О. К вопросу о механизме саморегуляции эпизоотии чумы в Муюнкумах //Пробл. изучения механизма энзоотии чумы: Тез.докл. Всесоюз. конф – Саратов, 1980. – С.39-44.
650. Сагимбеков У.А., Раппопорт Л.А. Об особенностях штаммов возбудителя чумы, выделенных в различных популяциях больших песчанок в Муюнкумах //Микробиол., генетика и иммунол. чумы и холеры. – Саратов, 1983. – С.11-13.
651. Сагимбеков У.А., Рапопорт Л.П., Меняйкин А.К., Морозов Ю.А. Изучение роли субстрата нор *Rhombomys opimus licht* в энзоотии чумы //Экология возб. сапронозов: Сб. науч. тр.. – М, 1988.. – С.131-140.
652. Самойлова Л.В., Донская Т.Н., Вейнблат В.И. и др. Чума //Лаб. диагност. возб. опасных. инф. болезней. - Саратов, 1998. – Т.1. – С.3-49.
653. Самойлова Л.В., Овсяников В.И. Василенко М.В. и др. Изучение свойств вирулентных штаммов чумного микроба после инкубирования в диффузионных камерах в организме морских свинок //Микробиол., лаб. диагност., и спец. профилакт. карант. инф. – Саратов, 1989. – С.58-63.
654. Самойлова Л.В., Плотников Е.А., Овсяников В.И. и др. Использование диффузионных камер для ускоренной лабораторной диагностики чумы //Лаб.

- диагност. и генет. вирулентности. возб. особо опас. инф. – Саратов, 1990. – С.29-33.
655. Самойлова Л.В., Попов А.А., Кремлёв Г.И. Изменение белковых фракций сывороток крови после вакцинации людей против чумы //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1974. – Вып.5. – С.69-71.
656. Сатыбалдиев Н.А., Алимходжаев Е.А. Причины затруднений в диагностике фагоустойчивых мутантов чумного микроба //Молекул. биол., генет. и иммунол. возб. особо опас. инф.: Тез. докл. Всесоюз. науч. конф. – Ростов н/Д, 1984. – С.191-192.
657. Саямов С.Р. L-трансформация вакцинного штамма ЕВ микроба в диффузионных камерах //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. - 1984. - №1. – С.113-114.
658. Саямов С.Р. Ультраструктура Л-форм чумного и мелиоидозного микробов в процессе L-трансформации и взаимодействия с фагоцитами: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - М., 1985. - 24 с.
659. Свиридова Л.С. Рамнозопозитивные варианты вакцинного штамма ЕВ //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1970. – Вып. 3. - С.119-123/
660. Северин С.Е. Моноклональные антитела и диагностика специфических антигенов //Пробл. соврем. биохимии и биотехнол.: Тез. докл 8-го объедин. симпоз. биохим. обществ СССР-ГДР. – Рига, 1985. – С.15.
661. Сердобинцев Л.Н. Полиморфизм капсульного антигена чумного микроба //Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Саратов, 1984. – 19 с.
662. Сердобинцев Л.Н., Карпунина Л.В., Коннов Н.П. и др. Изучение гемагглютинирующей активности препаратов капсульного белка чумного микроба //Биотехнол., иммунол. и биохим. особо опас. инф. – Саратов, 1989. – С.25-31.
663. Сергиев В.П., Фёдоров Ю.М., Леви М.И., Канатов Ю.В. Результаты испытания чумного антительного моноклонального эритроцитарного диагностикума //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1985. - №11. – С.82-87.
664. Сибиряк С.В., Курчатова Н.Н., Юсупова Р.Ш. и др. Влияние различных по составу липополисахаридов (ЛПС) грамотрицательных бактерий на активность

- макрофагов, метаболическую функцию и процессы перекисного окисления липидов печени //Матер. VII съезда Всерос. об-ва эпидемиол., микробиол. и паразитол. –М., 1997. –Т.1. –С.241-242.
665. Сивкова О.В. Коаггулинирующий диагностикум для идентификации возбудителя туляремии //Лаб дело. – 1988. - №10. – С.64-65.
666. Синицин В.А., Шварцман Я.С. Реакция непрямой гемагглютинации с презервированными эритроцитами (предарительное сообщение) //Лаб. дело. – 1962. - №2. – С.30-35.
667. Синицкий А.А., Дьяков С.И., Михайлов И.Ф. и др. Использование непрямого метода окраски *P. pestis* флуоресцирующими антителами. Сообщение I. Специфичность окраски и морфологические особенности флуоресценции клеток чумных вакцин //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. - 1960. - №11. – С.35-39.
668. Скородумов А.М. Очерки по эпидемиологии чумы в Забайкалье и Монголии. - Верхнеудинск, 1928. - 110 с.
669. Слудский А.А. Природные очаги чумы полевого типа (структура и функционирование): Автореф. дис ... д-ра мед. наук. - Саратов, 1998. - 43 с.
670. Смирнова Л.А., Олькова Н.В., Нерадовский В.А. Изучение чувствительности мышей различных линий к возбудителю чумы //Лаб. животные в мед. исслед.: Тез. докл. конф. – М., 1974. – С.54-60.
671. Соколов П.Н., Дунаев Г.С. Биологические свойства гетероморфных форм и L-подобных мутантов чумного микроба //Генетика и микробиол. природно-очагов. инф. – Саратов, 1984. – С.36-38.
672. Соколов П.Н., Дунаев Г.С., Волосивец С.И. и др. Изучение трансформации чумного микроба в L-форму в опытах на больших песчанках //Актуал. вопр. лаб. диагност. и биохимии возб. чумы и холеры. – Саратов, 1984. – С.31-34.
673. Соколов П.Н., Дунаев Г.С., Зыкин Л.Ф. Патоморфологические и иммунологические изменения у больших песчанок в процессе L-трансформации чумного микроба //XII Межреспубл. науч.-практ. конф. противочум. учрежд. Сред. Азии и Казахстана по профилакт. чумы: Тез. докл. – Алма-Ата, 1985. – С.82-83.

674. Соколов П.Н., Ларина В.С., Степанов В.М. и др. К вопросу о продолжительности сохранения микроба чумы в клещах и почве в экспериментальных условиях //Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилактики: Матер. межгосуд. науч.-практ. конф. – Алма-Ата, 1992ж. – Ч.II. – С.269-272.
675. Соколов П.Н., Свиридов Г.Г., Степанов В.М. и др. К вопросу об использовании серодиагностики клещей при эпизоотическом обследовании на чуму //Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилактики: Матер. межгосуд. науч.-практ. конф. – Алма-Ата, 1992ж. – Ч.II. – С.272-273.
676. Соколова Е.П., Тынянова В.И., Демидова Г.В. и др. Образование комплекса «мышинный» токсин - липополисахарид у *Yersinia pestis* //Биотехнология. – 2000. - №5. – С.25-30.
677. Соколова Н.М. К вопросу о диагностике чумной инфекции у грызунов методом выделения бактериофага //Тр. ин-та «Микроб». – Саратов, 1959. – Вып.3. – С.85-92.
678. Солдаткин И.С., Руденчик Ю.В. Эпизоотический процесс в природных очагах чумы (ревизия концепции) //Экология возб. сапронозов: Сб. науч. тр. – М.,1988. – С.117-131.
679. Солдаткин И.С., Руденчик Ю.В. Неожиданные загадки энзоотий чумы. //Занимательные очерки о деятельности и деятелях противочум. системы России и Сов. Союза. – М.,1995. – Вып.2. – С.28-59.
680. Соловьева В.Е. Восприимчивость плоскочерепной полевки (*Alticola strelzovi*) к экспериментальной чуме. //Изв. Иркутск. н.-и. противочум. ин-та Сибири и Дальнего Востока. – Улан-Удэ, 1957. - Т.15. - С.89-94.
681. Солодкая А.Д., Плетникова Г.П., Колесник Р.С., Апарин Г.П. О сезонной восприимчивости тарбаганов к чумной инфекции //Докл. Иркутск. н.-и. противочум. ин-та Сибири и Дальнего Востока. – Чита, 1963. – Вып.6. – С.37-39.
682. Сомов Г.П. Ещё раз о сапронозах //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1985. - №5. – С.98-103.
683. Сомов Г.П., Литвин В.Ю. Сапрофитизм и паразитизм патогенных бактерий – Новосибирск, 1988.

684. Сомов Г.П., Виноградов В.Я. Методика приготовления сухого эритроцитарного диагностикума для непрямой реакции агглютинации //Матер. юбил. конф., посвящ. 25-лет. Владивостокск. н.-и. ин-та эпидемиол. и микробиол. - Владивосток, 1966. - С. 72-73.
685. Сомова Н.М. Гурьянова Л.И. Обнаружение возбудителей чумы и туляремии в органах животных методом люминесцентной микроскопии //Микробиол. и иммунол. особо опас. инф. – Саратов, 1964. – С.240-242.
686. Сомова Н.М., Сергеева Н.А. Получение естественных псевдотуберкулёзных фагов из органов грызунов //Матер. межинститут. науч. конф. по вопр. микробиол., лаб.диагн. и терапии особо опас. инф. и производ. бакт. препаратов. – Саратов, 1955. – Вып.1. – С.54-56.
687. Сомова Н.М., Сергеева Н.А. Изучение распространённости псевдотуберкулёзного бактериофага в природе. Сообщение 1. Выделение бактериофага из органов грызунов //Тр. Ростовского н/Д. н.-и. противочум. ин-та. – Ростов-на-Дону, 1959. – Т.XV, Вып.1. - С.173-181.
688. Сомова Н.М., Сергеева Н.А. Бодина Л.Т. Изучение распространённости псевдотуберкулёзного бактериофага в природе. Сообщение 2. Выделение псевдотуберкулёзного фага из воды и эктопаразитов //Тр. Ростовского н/Д. н.-и. противочум. ин-та. – Ростов-на-Дону, 1960. – Т.XVII. – С.131-135.
689. Специфическая индикация патогенных биологических агентов: практическое руководство /Под. ред. акад. РАМН Г.Г.Онищенко. – М., 2006. – 288 с.
690. Спирин А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот //Биохимия.-1958.-Т.23, Вып.5. -С.656-662
691. Стенкова А.М., Исаева М.П., Рассказов В.А. Разработка многопраймерной ПЦР для идентификации бактерий рода *Yersinia* и дифференциации патогенных видов (*Y.pestis*, *Y.pseudotuberculosis*, *Y.enterocolitica*) //Мол. генет., микробиол., вирусол. – 2008. - №3. – С.18-23.
692. Стент Г. Молекулярная биология вирусов бактерий. Пер. с англ. – М., 1965. – 467 с.
693. Степанов В.М. Свойства некоторых ауксотрофных и гипотрофных мутантов чумного микроба //Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Алма-Ата, 1968. – 18 с.

694. Степанов В.М., Узбеков Б.К. Получение и свойства L-форм *Y.pestis* //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1983. - №12. – С.93-94.
695. Степанов В.М., Кондратьева О.В., Темиралиева Г.А. и др. О трансформации возбудителя чумы в L-форму //Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1980. - №5. – С.58-60.
696. Степанов В.М., Лухнова Л.Ю., Казакбаева Р.А. Характеристика бактериемии у больших песчанок, зараженных штаммами чумного микроба различных подвигов //Тез. X науч. конф. противочум. учрежд. Сред. Азии и Казахстана. - Алма-Ата, 1979. - Вып.1. - С.158-161.
697. Степанов В.М., Некрасова Л.Е., Баканурская Т.Л. и др. О выделении гладкого штамма чумного микроба в очаге чумы //Матер. межгосуд. науч. конф. «Профилактика и меры борьбы с чумой», посвящ. 100-лет. открытия возб. чумы. – Алматы, 1994. –С.188-189.
698. Степаншина В.Н., Гремякова Т.А., Коробова О.В., Анисимов Г.А. Взаимосвязь между составом капсульного антигена *Yersinia pestis* и его протективной активностью //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1995. - №2. – С.124.
699. Степаншина В.Н., Кудрявцева Т.Ю., Негрий В.Ф., Потапов В.Д. Сравнительная характеристика капсульных антигенов, выделенных из вакцинного штамма *Y.pestis* и рекомбинантного штамма *E.coli* //Генетика, микробиол. и совершенст. методов лаб. диагност. особо опас. инф. – Саратов, 1991. – С.65-68.
700. Стручкова Э.Н., Степанов В.М., Айкимбаев А.М., Стручкова О.В. Характеристика ревертантов из атипичных культур чумного микроба //Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилактик.: Матер. межгосуд. науч.-практ. конф. – Алма-Ата, 1992. –Т.1. –С.155-157.
701. Стукова Н.Ю., Ледванов М.Ю., Шведун Г.П. и др. Влияние капсульного антигена и «мышинного» токсина чумного микроба на функцию кислород-зависимых бактерицидных систем макрофагов //«Бактериальн. токсины»: Тез. 2-ой Всесоюз. конф. – Юрмала, 1989. – С.124.

702. Стыщенко Т.М., Лебедева С.А. Чувствительность к УФ-лучам некоторых штаммов возбудителя чумы //Мол. биол., генет., иммунол. возб. особо опас. инф.: Тез. докл. Всесоюз. науч. конф. - Ростов-на-Дону, 1984. – С.61-63.
703. Суворова А.Е., Акиев А.К., Бейер А.П. К реактивации фракции I чумного микроба //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1977. – Вып. 2. – С.49-51.
704. Султанов Г.В., Козлов М.П. Чума. Микробиология, патогенез, диагностика. - Махачкала, 1995. - Т.1. - 146 с.
705. Султанов Г.В., Козлов М.П. Современные взгляды на изучение эпизоотии чумы: гипотезы и факты //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1998. - №3. – С.115-119.
706. Сунцов В.В. Эволюция очагов чумы: методология зоолого-паразитологических исследований //Матер. науч.-практ. конф., посвящ. 100-лет. образов. противочум. службы России. - Саратов, 1997. - Т.1. - С.145-146.
707. Сунцов В.В, Сунцова Н.И. Чума. Происхождение и эволюция эпизоотической системы (экологические, географические и социальные аспекты). - М., 2006 – 247 с.
708. Сучков И.Ю. Молекулярно-генетическое изучение *recA* гена *Yersinia pestis*: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Саратов, 1990. – 18 с.
709. Сучков И.Ю., Мишанькин Б.Н., Водопьянов С.О. и др. Генотипирование *Yersinia pestis*: вариабельность локуса $(CAAA)_N$ у природных штаммов, выделенных на территории бывшего СССР //Мол. генет., микробиол., вирусол. – 2002. - №4. – С. 18-21.
710. Сучков Ю.Г. Реакции пассивной гемагглютинации и нейтрализации антител в эпизоотологическом обследовании на чуму: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Ростов-на-Дону, 1963. – 20 с.
711. Сучков Ю.Г., Голубинский Е.П. Инактивирующее и мутагенное действие некоторых агентов на чумной микроб //Физиол. и генетика микроорг.: Матер. конф. микробиол. Сев. Кавказа. – Ростов-на-Дону, 1969. – С.5-8.
712. Сучков Ю.Г., Домарадский И.В., Мишанькин Б.Н., Ряпис И.В. Индуцированный мутагенез у чумного микроба и локализация некоторых генов

- на его хромосоме //Матер. 15-го Всесоюз. съезда эпидемиол., микробиол., инфекцион. – Тбилиси, 1970. – Ч.1. – С.230-232
713. Сучков Ю.Г., Канатов Ю.В. Сенсibilизация формализированных эритроцитов иммунными гамма-глобулинами //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1965. - №8. – С.63-67.
714. Сучков Ю.Г., Леви М.И. «Видит око, да зуб неймет» («некультивируемые» формы возбудителя чумы) //Занимательные. очерки о деятельности и деятелях противочум. системы России и Сов. Союза. – 1997. – Вып.5. – С.131-140.
715. Сучков Ю.Г., Леви М.И., Мишанькин Б.Н. и др. Современное состояние проблем чумной эпизоотии //Пробл. биомедицины на рубеже XXI века: М., 2000. – С.180-196.
716. Сучков Ю.Г., Мишанькин Б.Н., Лебедева С.А. О возможных путях генетического картирования хромосомы чумного микроба //Пробл. особо опасн. инф. – Саратов, 1974. – Вып.2. – С.152-157.
717. Сучков Ю.Г., Розанова Г.Н., Елкин Ю.М., Грамотина Л.И. Естественная генетическая маркировка штаммов чумного микроба из природных очагов Кавказа //Пробл. природ. очагов. чумы. - Иркутск, 1980. - Ч.2. - С.35-36.
718. Сучков Ю.Г., Худяков И.В., Емельяненко Е.Н. и др. О возможности сохранения возбудителя чумы в почве в покоящейся (некультивируемой) форме //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1997. - №4. – С. 42-46.
719. Табаков П.К., Чибрикова Е.В., Щуркина И.И., Вельнер Е.И. Быстрый способ получения меченых флуоресцентными красителями антител //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1962. - №10. – С.26-30.
720. Табаков П.К., Щуркина И.И. Усовершенствование быстрого способа получения меченых флуоресцентными красителями антител //Биохимия микробов и иммунохимия. – Горький, 1966. – С.172-173.
721. Тараненко Т.М., Вейнблат В.И. Современные представления о структуре О-соматического антигена чумного микроба //Иммунохимия и лаб. диагност. особо опас. инф. – Саратов, 1985. – С. 10-17.

722. Тараненко Т.М., Денисова Е.П., Боровикова Т.П. Химическая характеристика термостабильного антигена //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1968. – Вып.2. – С.162-166.
723. Тарасов М.П. Некоторые факторы, определяющие интенсивность некрофагии среди мелких млекопитающих в степной зоне Предкавказья //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1979. – Вып.6. - С.65-67.
724. Тарасова В.Е. О некоторых дискуссионных вопросах природной очаговости чумы в Горном Алтае //Пробл. природ. очаговости чумы:Тез. докл. к IV Совет.-Монг. конф. специалист. противочум. учрежд. - Иркутск,1980. - Ч.1. - С.36-38.
725. Тарасова В.Е., Еремицкая Г.Н., Бейер А.П., Лунина Е.А. О некоторых свойствах штаммов чумного микроба из Америки и Африки //Соврем. аспекты профилактикт. зооноз. инф. - Иркутск, 1984. - Ч.2. - С.83–84.
726. Тарасова В.Е., Еремицкая Г.Н., Кураев И.И, Лалазарова И.Г.. Характеристика коллекции штаммов чумного микроба, эталонных для очагов Кавказа //Микробиол., генетика и иммунол. чумы и холеры. – Саратов, 1983. – С.3-7.
727. Темералиева Г.А., Аракелян И.С., Лухнова Л.Ю. Апсатарова Р.А. Иммуноферментная моноклональная тест-система для обнаружения возбудителя чумы //Лаб. дело. – 1988. - № 8. – С. 61-63.
728. Темиралиева Г.А., Казакбаева Р.А., Давлетов Н.Д. Реактивность серых сурков при заражении штаммами чумного микроба различных подвидов //Тез. X науч. конф. противочум. учрежд. Сред. Азии и Казахстана. - Алма-Ата, 1979. – Вып.1. - С.161-165.
729. Тимаков В.Д., Гольдфарб Д.М. Изменчивость фага, контролируемая бактериальным хозяином //Вопр. вирусологии. – 1961. - №1. – С.95-102.
730. Тимаков В.Д., Каган Г.Я. Биология L-форм бактерий. – М., 1961. – 234с.
731. Тимаков В.Д., Каган Г.Я. L-формы бактерий и сем. *Mycoplasmataceae* в патологии. – М., 1973. – 392 с.
732. Тимофеева Л.А. О таксономии чумного микроба //Пробл. особо опас. инф.-Саратов, 1972.- Вып.1.- С.15-22.
733. Тимофеева Л.А., Апарин Г.П., Головачёва В.Я. и др. Особенности культур чумного микроба, выделенных в Горном Алтае //Докл. Иркутск. н.-и.

- противочум. ин-та Сибири и Дальнего Востока. – Кызыл, 1966. – Вып.7. – С.112-115.
734. Тимофеева Л.А., Головачёва В.Я., Смирнова Л.А. Сохранение чумного микроба в почве, взятой из нор грызунов //Докл. Иркутск. н.-и. противочум. ин-та Сибири и Дальнего Востока. – Кызыл, 1966. – Вып.7. – С.46-48.
735. Тимофеева Л.А., Головачёва В.Я. Экспериментальное изучение роли почвы в сохранении и передаче чумного микроба //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1975. - Вып.1. - С.40-44.
736. Тимофеева Л.А., Головачёва В.Я., Смирнова Л.А., Олькова Н.В. и др. О контактном заражении грызунов чумой через почву. //Докл. Иркутск. н.-и. противочум. ин-та Сибири и Дальнего Востока. – Кызыл, 1966. – Вып.7. –С.48-51.
737. Тимофеева Л.А., Логачев А.И. *Yersinia pestis ulegeica* – новый подвид чумного микроба, выявленный в МНР //Эпидемиол. и профилактик. особо опас. инф. в МНР и СССР. - Улан-Батор,1978. - С.64-67.
738. Тинкер А.И. К вопросу о механизме снижения иммуногенных свойств чумной живой сухой вакцины ЕВ в процессе её хранения //Матер. конф., посвящ. 50-лет. ин-та «Микроб». - Саратов, 1968. – С.143-144.
739. Тинкер А.И., Печникова И.В., Гончарова М.Н., Харьковская Н.М. Величины «остаточной» и «латентной» вирулентности как показатели иммуногенности чумных вакцинных штаммов //Иммунол., иммунопрофилактик. чумы и холеры. - Саратов, 1980. – С.8-11.
740. Тинкер И.С. Эпизоотология чумы на сусликах. – Ростов-на-Дону, 1940. – 97 с.
741. Тинкер И.С. К вопросу о причинах укоренения чумы в природных ее очагах //Тр. Ростовского н/Д. н.-и. противочум. ин-та. – Ростов-на-Дону, 1957. – Т.13. – С.199-206.
742. Тинкер И.С., Алёшина Е.Н., Дрожжевкина М.С. и др. Экспериментальное изучение иммунологической эффективности некоторых фракций чумного микроба //Профилактик. особо опас. болезней: Тез. докл. межинститут. науч. конф. - Ростов-на-Дону, 1963. – С.10-12.

743. Тинкер И.С., Алёшина Е.Н., КанчухА.А. и др. Об антимикробном и антитоксическом иммунитете при экспериментальной чуме //Профилактик. особо опас. болезней: Тез. докл. межинститут. науч. конф. - Ростов-на-Дону, 1963. – С.9.
744. Тинкер И.С., Макаровская Л.Н., Алёшина Е.Н. Чума //Диагност. особо опас. и малоизвестных инф. – Ростов-на-Дону, 1970. – С.32-66.
745. Тинкер И.С., Миронов Н.П. Осолинкер Б.Е. и др. Экологические условия существования природной очаговости чумы в Северо-Восточном и Восточном Прикаспии //Десятое совещание по паразитологич. пробл. и природноочагов. болезням. – М.-Л., 1959. – Вып.1. – С.230-231.
746. Титенко М.М., Вейнблат В.И., Веренков М.С., Васенин А.С. Препаративный метод выделения и очистки капсульного антигена возбудителя чумы при помощи изоэлектрической преципитации //Диагностика и профилактик. особо опас. инф. – Саратов, 1983. – С.34-39.
747. Титенко М.М., Веренков М.С., Солодовников Н.С. К вопросу об усовершенствовании препарата для люминесцентно-серологической диагностики возбудителя чумы //Актуал. вопр. иммунодиагност. особо опас. инф.: Тез. докл. Всесоюз. науч.-практ. конф. – Ставрополь, 1986. – Ч.II. – С.130-132
748. Титенко М.М., Коссе Л.В., Тюменцев С.Н. и др. О природе эпитопов капсульного антигена возбудителя чумы //Эпидемиол., микробиол., иммунол. бактериал. и вирус. инф.: Тез. докл. обл. научн. конф. молод. учёных. – Ростов-на-Дону, 1989. – С. 98-99.
749. Титенко М.М., Новохатский А.С., Коссе Л.В. и др. Новые данные по характеристике препарата F1A капсульного антигена //Вест. Всесоюз. микробиол. об-ва. Ростовское отд. – Ростов-на-Дону, 1989. – С.118-123.
750. Титенко М.М., Сидорова И.В., Новохатский А.С. и др. Некоторые свойства компонентов оболочечного вещества чумного микроба //Эпидемиол., микробиол., иммунол. бактериал. и вирус. инф.: Тез. докл. обл. науч. конф. молод. учёных. – Ростов-на-Дону, 1989а. – С.48-50.
751. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. – М., 1968. – 90 с.

752. Тихонов С.Н. Влияние экспрессии чумным микробом железо-регулируемых высокомолекулярных белков внешней мембраны на функциональное состояние макрофагов: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Саратов, 1995. – 18 с.
753. Ткаченко В.В., Домарадский И.В. Гемолитические свойства липидов чумного микроба //Изв. Иркутск. н.-и. противочум. ин-та Сибири и Дальнего Востока. - Иркутск, 1963 – Т.25. – С.129-134.
754. Топорков В.П., Величко Л.Н., Шиянова А.Е. Кедрова О.В. Заболеваемость чумой в мире с 1984 по 2006 год //Международ. медико-санитар. правила и реализац. глобальной стратегии борьбы с инф. бол. в госуд.-участ. СНГ: Матер. VIII Межгосуд. науч.-практ. конф. госуд.-участ. СНГ. – Саратов, 2007. – С.122-124.
755. Топорков В.П., Величко Л.Н., Шиянова А.Е. Кедрова О.В. Динамика заболеваемости чумой в мире //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 2008. – Вып.3. – С.22-25.
756. Топорков В.П., Леви М.И., Белобородов Р.А. и др. Результаты комплексного исследования больших песчанок в фазу завершения эпизоотии чумы //Соверш. методов диагност. и профилакт. чумы и холеры. – Саратов, 1987. – С.23-29.
757. Трауб Л.А., Пунский И.Е., Пунский Е.Е., Самойлова Л.В. Диагностика чумы у морских свинок по антигенурии //Лаб. диагност. и генет. вирулентности возб. особо опас. инф. – Саратов, 1990. – С.33-36.
758. Трифонова А.А. Реакция термореципитации при чуме //Тр. ин-та «Микроб». – Саратов, 1951. – Вып.1. – С.295-297.
759. Троицкая В.В., Четина Е.В., Аляпкина Ю.С. Некультивируемые формы *Yersinia pseudotuberculosis* в почвах природного очага псевдотуберкулёза //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. - 1996. - №5. – С.13-15.
760. Трухачёв А.Л., Васильева Е.А., Иванова В.С. и др. Набор праймеров для детекции и внутривидовой дифференциации штаммов возбудителя чумы //Диагност., лечение, и профилакт. опас. и особо опас. инф. забол. Биотехнология: Матер. Всерос. науч. конф., посвящ. 80-лет. основ. ФГУ «48 ЦНИИ МО России». – Киров, 2008. – С. 139-144.
761. Трухачёв А.Л., Иванова В.С., Арсеньева Т.Е. и др. Поиск праймеров на основе

- хромосомной ДНК *Yersinia pestis* для эффективной ПЦР – идентификации типичных и атипичных штаммов возбудителя чумы //Клин. лаб. диагностика. – 2008. – №12. – С.49-52.
762. Трухачёв А.Л., Лебедева С.А., Иванова В.С. и др. Изучение возможности внутривидовой таксономической дифференциации *Yersinia pestis* с помощью ПЦР //Генодиагностика инф. болезней 2007: VI Всерос. науч.-практ. конф.: Сб. трудов. – М., 2007. – Т.1. – С.405-407.
763. Тугамбаев Т.И., Сулейменов Б.М., Атчабаров Б.Б. и др. Иммуноглобулиновый эритроцитарный диагностикум к липополисахариду возбудителя чумы //Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилактики: Матер. межгосуд. науч.-практ. конф. – Алма-Ата, 1992. – Ч.1. – С.166-168.
764. Туманский В.М. Микробиология чумы. – М., 1958. -265с
765. Туманский В.М. Микробиология чумы (Микробиологические основы диагностики чумы). Изд. 2-ое дополненное. - М., 1968. – 268 с.
766. Тынянова В.И., Демидова Г.В., Зюзина В.П. и др. Что такое токсин чумного микроба (Факты и предположения) //Занимательные очерки о деятельности и деятелях противочум. системы России и Сов. Союза. – М., 1998. – Вып.8. – С.179-206.
767. Тюлембаев М.А., Атчабаров Б.Б., Соорбеков О.С., Бегалина Г.Х. Влияние аминокислот, витаминов, урацила и некоторых солей на синтез фракции 1 чумного микроба //Пат. физиол., иммунол. и аллергол. особо опас. инф. – Саратов, 1984. – С.27-30.
768. Тюлембаев М.А, Соорбеков О.С., Якунин Б.М. и др. О выявлении эпизоотии чумы среди мышевидных грызунов в Таласском автономном очаге. //Вопр. природ. очагов. зоонозов. - Саратов, 1982. - С.40-41.
769. Узбеков Б.К. Микробиологическая характеристика Л-форм чумного микроба: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Саратов, 1984 - 22с.
770. Узбеков Б.К. Биохимические особенности Л-форм чумного микроба, находящихся на различных этапах Л-трансформации //XII межреспуб. науч.-практ. конф. противочум. учрежд. Сред. Азии и Казахстана по профилакт. чумы: Тез. докл. – Алма-Ата, 1985. – С.45-47.

771. Фаворисова Б.Ю. Изменчивость чумного микроба под воздействием различных факторов: Автореф. дис. ...канд. мед. наук –Саратов, 1950. – 14с.
772. Фёдоров В.Н. К вопросу о механизме сохранения чумного микроба в межэпизоотические сезоны //Вестн. микробиол., эпидемиол. и паразитол.: Сб. науч. трудов, посвящ. 25-лет. юбил. ин-та «Микроб». – Саратов, 1944. – С.27-39.
773. Фенюк Б.К. Экологические факторы очаговости и эпизоотологии чумы грызунов. 1.Эндемия чумы как экологическая проблема. //Вестник микробиол., эпидемиол. и паразитол. – Саратов, 1944. – С.40-48.
774. Фёдоров В.Н., Рогозин И.И., Фенюк Б.К. Профилактика чумы. М., 1955. – 290 с.
775. Фёдорова В.А. Получение и научно-прикладное значение моноклональных антител к липополисахариду *Yersinia pestis*: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Саратов, 1994. – 23 с.
776. Фёдорова В.А. Теоретико-экспериментальные аспекты изучения белковых и углеводосодержащих антигенов возбудителей чумы и холеры с использованием поли- и моноклональных антител: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Саратов, 2004. – 41 с.
777. Фёдорова В.А., Бобров А.Г., Девдариани З.Л. и др. Капсульный антиген (фракция 1) чумного микроба у дефектных по гену *cafIM* штаммов локализован внутриклеточно //Chinese J.Control of Endemic Dis. – 1999. - Vol.14 (special issue). - P.180-181 (in russ.).
778. Фёдорова В.А., Девдариани З.Л. Изучение антигенных детерминантов липополисахарида *Yersinia pestis* с помощью моноклональных антител //Мол. генет., микробиол., вирусол. – 1998. - № 3. – С. 22-26.
779. Фёдорова В.А., Девдариани З.Л. Иммунохимическая характеристика фракции 1 штаммов *Yersinia pestis*, дефектных по гену *CafIM* //Мол. генет., микробиол., вирусол. – 2002. - №1. – С.11-17.
780. Филимонова Ю.А. Получение варианта ЕВ-1290, лишённого фракции I //Генетика, биохимия и иммунохимия особо опас. инф. – Ростов-на-Дону, 1967. – С.172-175.

781. Филимонова Ю.А. Видовые особенности фагоцитарной активности нейтрофилов крови экспериментальных животных //Особо опас. инф. на Кавказе: Тез. III науч.-практ. конф. противочум. учрежд. Кавказа. – Ставрополь, 1974. – Вып.1. – С.111-112.
782. Филиппов А.А., Солодовников Н.С., Куклева Л.М., Проценко О.А. Изучение плазмидного состава штаммов возбудителя чумы из разных природных очагов //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1992. - №3. - С.10-13.
783. Филиппов А.А., Бобров А.Г., Кутырев В.В., Проценко О.А. Влияние IS285 на функции плазмидных генов вирулентности возбудителей чумы и псевдотуберкулеза //Матер. VII съезда Всерос. общ-ва эпидемиол., микробиол. и паразитол. - М, 1997. - Т.1. - С. 315-316.
784. Филиппов А.Ф., Николаев Н.И., Пономарёв Н.Г. и др. Сравнительное изучение иммуногенности фракции 1 чумного микроба и чумной живой вакцины для морских свинок. //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1973. – Вып.4. – С.57-61.
785. Флегонтова А.А. Экспериментальное изучение инфекционного потенциала некоторых видов блох, паразитирующих на сусликах и песчанках //Тр. ин-та «Микроб». – Саратов, 1951. – Вып.1. – С.192-205.
786. Фурсов В.В., Попов Ю.А. Исследование штаммов микроба чумы полевочьей разновидности методом электрофореза в агарозном геле. //Профилакт. природноочагов. инф. - Ставрополь, 1983. - С.326-327.
787. Фурсова Н.К. Поиск штаммов чумного микроба. имеющих систему рестрикции-модификации //Молекул. биол. и генетика особо опас.инф. – Саратов, 1982. – Ч.1. – С.72-76.
788. Хабаров А.В. Значение плазмиды кальцийзависимости для вирулентности и инвазии возбудителя чумы: Автореф. дис. ...канд. мед. наук. – Саратов, 1990. – 22 с.
789. Хлебцов Н.Г., Никифоров В.В., Мельников А.Г. и др. Спектроскопия упругого рассеяния растворов капсульного белка чумного микроба //Биополимеры и клетки. – 1990. – Т.6, №2 – С.81-87.
790. Ходаковская В.Н., Мишанькин Б.Н. Совершенствование диагностики чумы. Новый иммуно-суспензионный тест для контроля достоверности результата

- экспрессной детекции возбудителя //Природно-очагов. особо опас. инф. на юге России, их профилакт. и лаб. диагност.: Сб. науч. трудов , посвящ. 100-лет. Астраханской ПЧС. – Астрахань, 2001. – С.242-244
791. Ходаковская В.Н., Мишанькин Б.Н. Влияние нормальной кроличьей сыворотки на эффективность реакции непрямой гемагглютинации при детекции возбудителя чумы в пробах сложного бактериального состава //Актуал. пробл. эпидемиол. безопасности: Матер. юбил. науч.-практ. конф. «Эпидемиол. безопасн. на Кавказе. Итоги и перспективы», посвящ. 50-лет. Ставропольск. НИПЧИ. – Ставрополь, 2002. – С.282-284.
792. Хрущелевская Н.М., Бибикова В.А. О возможном значении слабовирулентных штаммов *Pasteurella pestis* в природной очаговости чумы //Матер.IV науч. конф. природн. очагов и профилакт. чумы. – Алма-Ата, 1965. – С. 274-276.
793. Хрущелевская Н.М., Сержанов О.С. Взаимоотношения бактерий чумы и чумного бактериофага в организме блох //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1978. – Вып. I. –С.26-29.
794. Хрущелевский В.П., Хрущелевская Н.М. О роли штаммов чумного микроба разной вирулентности в энзоотии чумы //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1968. – Вып.4. –С.186-193.
795. Цыбин Б.П. , Таран И.Ф., Крылова А.А. Сравнительная оценка методов индукции Л-форм бруцелл и изучение приживаемости в организме животных //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1979. - №4. – С.66-70.
796. Чайка Н.А. Реакции иммунодиффузии в геле (научный обзор) //Соврем. методы иммунологич. диагност. вирусных инфекций. – М., 1981. – С.37-55.
797. Чекомасова А.В., Кирдеев В.К. Иммуногенность пассированных штаммов 1 и EV //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1973. - №6. – С.69-73.
798. Черепанов П.А., Михайлова Т.Г., Каримова Г.А. и др. *Fra*-оперон: полная нуклеотидная последовательность. //Новые технологии и биосистемы. Достижения и перспективы.: Матер. XIV науч.-практ. конф. – Оболенск, 1991. – С.17-20.

799. Черепанов П.А., Михайлова Т.Г., Каримова Г.А. и др. Клонирование и детальное картирование fra-ymt-области плазмиды pFra *Yersinia pestis*. //Мол. генет., микробиол., вирусол. – 1991. - №12. – С.19-26.
800. Черкасова Т.Д. Циклические нуклеотиды, простагландины и агрегация тромбоцитов крыс при интоксикации «мышинным» токсином *Yersinia pestis* // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. - 1991. - №5. – С.9-11.
801. Чернов В.С. Основные этапы слияния протопластов патогенных бацилл //Молекул. биол., генет., иммунол., возб. особо опас. инф.: Тез. докл. Всесоюз. конф. – Ростов-на-Дону, 1984. – С.69-71.
802. Чернявская А.С., Лебедева С.А., Гребцова Н.Н., Кузнецова Л.С. Значимость некоторых плазмидных и хромосомных детерминантов вирулентности чумного микроба для специфического иммуногенеза //Бактериальные плазмиды: Тез. докл. – Нальчик, 1990. – С. 44-46.
803. Черченко И.И., Филимонова Ю.А., Калмыкова Л.И., Онацкая Т.Г. Возможности применения в диагностике чумы внутрипечёночного инфицирования лабораторных животных //Пробл. особо опас. инф., Саратов, 1978. – Вып.5. – С.33-36.
804. Чеснокова А.А. Выделение Л-форм клебсиеллы от больных склеродермой //Журн. ушных, носовых и горловых б-ней. – 1975. - №2. – С.66-69.
805. Четина Е.В., Грижебовский Г.М., Брюханов А.Ф. и др. О возможном механизме эндемичности современной холеры (роль некультивируемых форм *Vibrio cholerae* O1) //Мол. генет., микробиол., вирусол. – 1993. - №6. – С.18-22.
806. Чибрикова Е.В., Бабунова Л.П., Табаков П.К. и др. Получение флуоресцирующих сывороток и выяснение возможности применения их для быстрой идентификации возбудителей чумы и холеры //Особо опас. и природно-очагов. инф.. – М., 1962а. – С.212-219.
807. Чибрикова Е.В., Кузнецова Н.И., Табаков П.К., Вельнер Е.И. Быстрая идентификация чумного микроба в мазках из органов животных, посредством люминесцирующей противочумной сыворотки //Особо опас. и природно-очагов. инф. – М., 1962б. – С.219-225

808. Чибрикова Е.В., Кузнецова Н.И., Табаков П.К. и др. Быстрая идентификация чумного микроба в мазках из органов животных посредством люминесцирующей противочумной сыворотки //Тез. докл. науч. конф. Ростовского н/Д. противочум. ин-та, Дагестанской ПЧС, каф. инф. б-ней Дагест. медин-та и Дагест. республ. СЭС, посвящ. 40-лет. Совет. власти в Дагестане. – Махачкала, 1960. – С.63-64.
809. Шаймерденова А.К., Котурга Л.Н., Мартынова Н.В. К изучению чувствительности малых сусликов из Волго-Уральского степного очага к штаммам возбудителя чумы от полевок и пищух (патоморфологическое исследование) //Матер. обл. науч.-практ. конф. Гурьевской ПЧС. - Гурьев, 1989. - С.264-267.
810. Шайхутдинова Р.С. Структурно-функциональная организация и генно-инженерная модификация липополисахарида *Yersinia pestis*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Москва, 2008. – 32 с.
811. Шайхутдинова Р.З., Дентовская С.В., Книрель Ю.А. Анисимов А.П. Влияние структуры кора липополисахарида *Yersinia pestis* на чувствительность бактерий к литическому действию бактериофагов //Международ. медико-санитар. правила и реализац. глобальной стратегии борьбы с инф. бол. в госуд.-участ. СНГ: Матер. VIII межгосуд. науч.-практ. конф. госуд.-участ. СНГ. – Саратов, 2007. – С.311-312.
812. Шамова А.М. Характеристика культур возбудителя чумы, выделенных в Горно-Алтайской автономной области в 1961г. //Изв. Иркутск. противочум. н.-и. ин-та Сибири и ДВ. - 1961. - Т.ХХV. - С.25-33.
813. Шарец А.С., Берендяев С.А., Красильникова Л.В. Тристан Д.Ф. Эпизоотологическая эффективность разового истребления сурков //Тр. Средне-Азиат. противочум. ин-та. – Алма-Ата, 1958. – Вып.4. – С.145-147.
814. Шашаев М.А. Материалы к биологии псевдотуберкулёзного бактериофага //Матер. науч. конф. по природной очагов. и профилакт. чумы. Средне-Азиат. н.-и. противочум. ин-т. – Алма-Ата, 1963. – С.256-258.
815. Шашаев М.А. Дифференциальная характеристика фагов чумного и псевдотуберкулёзногомикробов: Автореф. дис. ... канд.мед.наук. – Алма-Ата, 1965. – 15 с.

816. Шашаев М.А. Биология чумного и близкородственных ему бактериофагов: Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. – Рязань, 1972. – 27 с
817. Шашаев М.А., Осадчая Л.М. Случай выделения псевдотуберкулёзного бактериофага от кишечной палочки //Матер. науч. конф. по природной очагов. и профилакт. чумы. Сред.-Азиат. н.-и. противочум. ин-т. – Алма-Ата, 1963. – С.258-259.
818. Шварц С.С. Экологические закономерности эволюции. – М.,1980. – 278 с.
819. Шварц Е.А., Шиляев Л.Ф. К вопросу о сохранении возбудителя чумы в природе //Матер. науч. конф. по природной очагов. и профилакт. чумы Сред.-Азиат. н.-и. противочум. ин-т. – Алма-Ата, 1963. – С.259-261.
820. Шведун Г.П., Можаров О.Т., Проценко О.А., Анисимов П.И. Определение степени гомологии плазмид рCad, выделенных из возбудителей чумы и псевдотуберкулёза //Пробл. биотехнол., микробиол. и иммунол. особо опас. инф. – Саратов, 1984. - С.79-83.
821. Шевченко В.Л., Каймашников В.И., Андреева Т.А. О механизме сохранения природной очаговости чумы в Волго-Уральских песках //Зоол. журнал. – 1969. – Вып.2. – С.270-281.
822. Шехикян М.Т., Зильфян В.Н., Сукиасян М.Л. Характеристика штаммов чумного микроба, выделенных в Армении //Тр. Армянской ПЧС. - Ереван, 1963. - В.2. - С.15-21.
823. Ширанович П.И., Чумакова Т.В. Об экспериментальном изучении переноса птицами блох грызунов //Зоологич. журнал. – 1961. – Т.40, Вып.4. – С.577-582.
824. Шмит-Сломска Ж.М. Персистенция и индукция L-форм стрептококков группы А *in vivo* //Вестн. АМН СССР. – 1969. - №5. – С. 80-84.
825. Шмурыгина А.А. Изменчивость типовых Vi и O брюшнотифозных бактериофагов в зависимости от условий культивирования //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1953. - №3. – С.57-62.
826. Шмутер М.Ф. Вакцинный штамм чумного микроба Кызылкумский I (К-1) //Профилакт. чумы в природ. очагах. – Саратов, 1973. – С.222-225.

827. Шмутер М.Ф Об иммуногенности сухой живойчумной вакцины из штамма кызылкупский I (K-1) //Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 1974. – Вып.2. – С.57-60.
828. Шмутер М.Ф., Липатова Е.С., Абрамова Г.Ф. Чумной эритроцитарный антителный диагностикум. III. Диагностика чумы у павших экспериментальных лабораторных животных //Матер. VI научн конф. противочум. учрежд. Сред. Азии и Казахстана. – Алма-Ата, 1969. – 139-142.
829. Шустрова Н.М., Гордейко В.А., МисуренкоЕ.Н. и др. Иерсинии в растениях //Потенциально патоген. бактерии в природе. – М.,1991. – С.30-42.
830. Щастный С.М. Агглютинация и реакция Bordet-Gengou при бубонной чуме. //Чума в Одессе в 1910 г. – С-Пб., 1912. - С. 135-141.
831. Щербаков А.А., Анисимов П.И., Кондрашин Ю.И., Солодовникова Т.Н. Диагностикум эритроцитарный антигенный на основе мембранных белков чумного микроба //Генетика и микробиол. природно-очагов. инф. – Саратов, 1984. – С.22-27.
832. Эпидемические аспекты экологии бактерий / В.Ю. Литвин, А.Л. Гинцбург, В.И. Пушкарёва и др. – М.,1998.
833. Эссель А.Е., Рассудов С.М., Ерохин Е.П. Использование лиофилизированных эритроцитарных диагностикумов в реакции непрямой гемагглютинации при чуме //Физиол. и генетика микроорг. – Ростов-на-Дону, 1969. – С.187-190.
834. Юзвик Л.Н., Тимофеева Л.А., Кирпичникова Н.А. и др. О биологических свойствах культур чумного микроба, выделенных в Забайкалье в 1966 г. //Докл. Иркутск. н.-и. противочум. ин-та Сибири и Дальнего Востока. - Кызыл, 1966. - С.110-112.
835. Ян Гуйжун Биологические особенности штаммов чумного микроба из природных очагов России и Китая: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Ставрополь, 2000. – 23 с.
836. Яфаев Р.Х. Дифференциация микробов чумы и псевдотуберкулёза грызунов //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1963. - №5. – С.23-26.

837. Яфаев Р.Х., Чепелев С.А. Применение реакции непрямой гемагглютинации для определения ботулинового токсина в колбасных изделиях //Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1961. - №11. – С.21-25.
838. Achtman M. Age, descent and genetic diversity within *Yersinia pestis* //Carniel E, Hinnebusch B (eds). *Yersinia: molecular and cellular biology*. Wymondham, UK: Horizon Bioscience, 2004.
839. Achtman M., Morelli G., Zhu P. *et al.* Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis* //Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 2004. – Vol.101, No.51. – P.17837-17842.
840. Achtman M., Zurth K., Morelli G. *et al.* *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis* //Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1999. – Vol.96, No.24. – P.14043-14048.
841. Adair D.M., Worsham P.L., Hill K.K. *et al.* Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis* //J. Clin. Microbiol. – 2000. - Vol.38. – P.1516-1519.
842. Adams M., Wade T. Classification of bacterial viruses: relation-ship of two *Serratia* phages to coli-dysentery phages *T3*, *T7* and *D-44* //J. Bacteriol. – 1954. - Vol.68, No.3. – P.320-325.
843. Advier M. Caractère d'un principe lysant le *Bacille pesteux* retiré du sang humain //C.R. Soc. Biol. – 1932. – Vol.110. – No.18.
844. Amies C.R. The envelope substance of *Pasteurella pestis* //Brit. J. Exp. Pathol. – 1951. – Vol.32. – P.259-273.
845. Andersen G.L., Radnedge L., Argon P *et al.* Genomic plasticity within biovars of *Yersinia pestis* //8th Intern. Sympos. on *Yersinia*: Abstracts –Finland, Turku, 2002. - P-1. – P.47.
846. Anderson J.G.W., Leary S.E.C., Williamson E.D. *et. al.* Recombinant V antigen protects mice against pneumonic and bubonic plague caused by FI-capsule-positive and -negative strains of *Yersinia pestis* //Infect. Immun. -1996. –Vol. 64. –P. 4580-4585.
847. Andrews G.P., Heath D.G., Anderson G.W. *et al.* Fraction 1 capsular antigen (*FI*) purification from *Yersinia pestis* CO92 and from *Escherichia coli* recombinant strain and efficacy against lethal plague challenge //Infect. Immun. – 1996. – Vol.64. – P.2180-2187.

848. Anisimov A.P. Factors promoting persistence of *Yersinia pestis* //7th Int. Congr. on Yersinia – Nijmegen, 1998 / Ned. Tijdschr. voor Medische Microbiol. - 1998. - Vol.6 (Suppl II). - Abstr. K4. - S.4.
849. Anisimov A.P., Dentovskaya S.V., Titareva G.M. *et al.* Intraspecies and temperature-dependent variations in susceptibility of *Yersinia pestis* to the bactericidal action of serum and to polymyxin B //Infect. Immun. – 2005. – Vol.73, No.11. – P.7324-7331.
850. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis* //Clin. Microbiol. Rev. – 2004. – Vol.17. – P. 434-464.
851. Anisimov A.P., Panfertsev E.A., Svetoch T.E. Dentovskaya S.V. Variability of the protein sequences of *lcrV* between epidemic and atypical rhamnose-positive strains of *Yersinia pestis* //Adv. Exp. Med. Biol. – 2007. – Vol. 603, No.1. – P.23-27.
852. Arana I., Muela A., Iriberry J. *et al.* Role of hydrogen peroxide in loss of culturability mediated by visible light in *Escherichia coli* in freshwater ecosystem //Appl. Environ. Microbiol. – 1992. – Vol.58. – P.3903-3907.
853. Asheshov I., Khan S., Lahiri M. Studies on cholera bacteriophages: Part 1. General technique //Ind. J. med. Res. – 1933. – Vol.20. – P.1101-1188.
854. Aussel L., Therisod H., Karibian D. *et al.* Novel variation of lipid A structures in strains of different *Yersinia* species //FEBS Lett. - 2000. – Vol.465, No.1. – P.87-92.
855. Bach J.F., Dardenne M. Studies on thymus products. II. Demonstration and characterization of a circulating thymic hormone //J. Immunol. – 1976. – Vol.116. – P.353-366.
856. Bail O. Versuche über die Vielheit von Bakteriophagen //Zeitschr. Immunol. Exper. Therapie: T. Orig. – Jena, 1923. – No.38. – P.157.
857. Baker E.E., Sommer Y., Foster L.T. *et al.* Antigen structure of *Pasteurella pestis* and the isolation of crystalline antigen //Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1947. – Vol.64. – P.139-141.
858. Baker E.E., Sommer Y., Foster L.T. *et al.* Studies on immunization against plague. I. The isolation and characterization of the soluble antigen of the *Pasteurella pestis* //J. Immunol. – 1952. – Vol.68. – P.131-145.

859. Baltazard M. La conservation de la peste en foyer invétéré //Med. Hyg. (Geneve). - 1964. – Vol. 22. - P.172-174.
860. Barcina J., Gonzales J.M., Iribers J. Survival strategy of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in illuminated fresh and marine systems //J. Appl.Bacteriol. – 1990. - Vol. 68. - P.189-198.
861. Bard F.M., Shire G.M., Spickett S.G. Genetic variation in adrenal weight: strain differences in the development of the adrenal glands of mice. //Acta Endocrinol. – 1968. – Vol.58. – P.191-201.
862. Baumler A.J., Heffron F. Identification and sequence analysis of *lpf* ABCDE, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* //J. Bacteriol. – 1995. – Vol. 177. – P.2087-2097.
863. Bayliss J.H. The extinction of bubonic plague in Britain //Endeavour. – 1980. – No.4. - P.58-66.
864. Bearden S.W., Sexton C., Pare J. et al. Attenuated enzootic (*pestoides*) isolates of *Yersinia pestis* express active aspartase //Microbiology. – 2009. – Vol. 155, Part 1. – P.198-209.
865. Bei Li, Jiang L., Song Q. *et al.* Protein microarray for profiling antibody responses to *Yersinia pestis* live vaccine //Infect.Immun. – 2005. – Vol. 73, No.6. – P.3734-3739.
866. Bej A.K., Mahbubani M.H. Application of the polymerase chain reaction in environmental microbiology //PCR Methods appl. – 1992. – Vol.1. – P.151-159.
867. Bej A.K., Mahbubani M.H., Jones D.D. Detection of viable *Vibrio cholerae* by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) //Mol. Biotechnol. – 1996. – Vol. 5, No.1. – P.1-10.
868. Benner G.E., Andrews G.P., Byrne W.R. *et al.* Immune response to *Yersinia* outer proteins and outer *Yersinia pestis* antigens after experimental plague infection in mice //Infect. Immun. – 1999. – Vol.67, No.4. – P.1922-1928.
869. Bennett L.D., Tornabene T.G. Characterization of the antigenic subunits of the envelope protein of *Yersinia pestis*. //J. Bacteriol. – 1974. – Vol.117. – P.48-55.
870. Bercovier H., Mollaret H.H., Alonso J.M. *et al.* Intra- and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and its relationship to *Yersinia pseudotuberculosis* //Curr.Microbiol. - 1980. – Vol.4, No.4. – P.225-229.

871. Berlin H. Die Serodiagnose der Pest mit Hilfe der Precipitations Methode nach Ascoli //Ztschr.Hyg. – 1915. – Vol.75. – S.467.
872. Bertin Y., Girardeau J.-P., Der Vartanian M. *et al.* The *ClpE* protein involved in biogenesis of the CS31A capsule-like antigen is a member of a periplasmatic chaperon family in Gram-negative bacteria //FEMS Microbiol. Lett. 1993. – Vol.108. – P.59-68.
873. Bichovsky-Slomnicki L., Ben-Efraim S. Biological activities in extracts of *Pasteurella pestis* and their relation to the «pH6 antigen» //J. Bacteriol. – 1963. – Vol.86. – P.101-111
874. Biraben J.N. Les Hommes et la peste en France et dans les pays européens et méditerranéens. – Paris, 1975. – Vol.1.
875. Birnboim Y.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA //Nucl. Acids Res. – 1979. – Vol.7. – P.1513-1523.
876. Blackman L.P. A variable number tandem repeat in *Y.pestis*: strain differentiation and possible mechanism of formation //8th Intern. Sympos. on *Yersinia*: Abstracts – Finland, Turku, 2002. - Abstr. P-2. – P.47.
877. Bobrov A.G., Kirillina O., Perry R.D. Regulation of biofilm formation in *Yersinia pestis* //«Yersinia - 2006»: Abstracts 9th Intern. Sympos. on *Yersinia*. – Lexington, Kentucky, 2006. – S2:3. – P.16.
878. Bölin I. Temperature-inducible and calcium regulated proteins encoded by the virulence plasmid of *Yersinia*: Fil. Cand. diss: Eds.Umea Univ. – 1987. - 67 p.
879. Bölin I., Norlander L., Wolf-Watz H. Temperature inducible outer membrane protein of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* is associated with the virulence plasmid //Infect. Immun. – 1982. – Vol.37. – P.506-512.
880. Bölin I., Portnoy D, Wolf-Watz H. Expression of the temperature inducible outer membrane proteins of *Yersinia* //Infect. Immun. – 1985. –Vol.48, N1. – P.234-240.
881. Bordet J., Gengou O. Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des serums antimicrobiens //Ann. Inst. Pasteur. – 1901. – V.15, No.5. – S.289.
882. Borel J.F. Comparison of the immune response to sheep eritrocytes, tetanus toxoid and endotoxin in different strains of mice //Agents a. Actions. – 1974. – Vol.4. – P.277-285.

883. Boyd T.F., Brussow H. Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved //Trends Microbiol. – 2002. – Vol.10. – P.521-529.
884. Boyden S.V. The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera //J. Exp. Med. 1951. – Vol. 93., No.2. – P.107-120.
885. Boyer H.W. The genetic control of restriction and modification in *Escherichia coli* //J.Bacteriol. – 1964. – Vol.88, No.6. – P.1652-1660.
886. Bradbeer C.M., Woodrow M., Khalifah L.L. Transport of vitamin *B12* in *E.coli*: common receptor system for vitamin *B12* and bacteriophage *BF-23* on the outer membrane of the cell envelope //J. Bacteriol. – 1976. – Vol.125. – P.1032-1039.
887. Brade H., Galanos C., Rietschel E. *et al.* Common lipopolysaccharide specificity: a new type of antigen in LPS of gram-negative bacteria //J. Immunol. – 1983. – Vol.165, No.3-4. – P.245-249.
888. Bradley I. The most famous of all English plagues: a detailed analysis of the plague at Eaym 1665-6 //Plague reconsidered. – Matlock, 1977. –
889. Braun V., Hantke K. Bacterial receptors for phages and colicins as constituents of specific transport systems //Microbial Interactions /Ed.Reissing J.L. – London, 1977.
890. Braun D.G., Kindred B., Jacobson E.B. Streptococcal group A carbohydrate antibodies in mice: evidence for strain differences in magnitude and restriction of the response, and thymus dependence //Europ. J. Immunol. – 1972. – Vol.2. – P.138-143.
891. Brown S.D., Montie T.C. Beta-adrenergic blocking activity of *Yersinia pestis* murine toxin //Infect. Immun. - 1977. - Vol.18, No.1. - P.85-93.
892. Brubaker R.R. The genus *Yersinia*: Biochemistry and genetics of virulence //Curr. Top. Microbiol. Immunol. - 1972. - Vol.57. - P.111-158.
893. Brubaker R.R.. Molecular biology of the Dread Black Death //ASM News. - 1984. - Vol.50. - P. 240-245.
894. Brubaker R.R. Mechanisms of bacterial virulence //Ann. Rev. Microbiol. – 1985. – Vol.39. – P.21-50.
895. Brubaker R.R. Factors promoting acute and chronic diseases caused by yersiniae //Clin. Microbiol. Rev. – 1991. – Vol.4. – P.309-324.

896. Brubaker R.R., Surgalla M.J., Beesley E.D. Pesticinogeny and bacterial virulence //Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. – 1965. – Vol. 196. – P.302-315.
897. Brüssow H., Canchaya C., Hardt W.D. Phages and evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. //Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2004. – Vol.68. – P.560-602.
898. Bullen J.J., Spalding P.B., Ward C.G., Rogers H.J. The role of *Eh*, *pH* and iron in bactericidal power of human plasma //FEMS Microbiol. Lett. - 1992. – Vol.94, No.1-2. – P.47-53.
899. Burnet F. The classification of dysentery-coli bacteriophages: II The serological classification of coli-dysentery phages //J. Pathol. Bacteriol. – 1933. – Vol.36, No.1. – P.307.
900. Burnet F. The classification of dysentery-coli bacteriophage. III. A correlation of the serological classification with certain biochemical tests //J. Pathol. Bacteriol. – 1933a. - Vol.37, No.2. – P.179.
901. Burrows T.W. Virulence of *Pasteurella pestis* //Nature. – 1957. – Vol. 179. – P.1246-1247.
902. Burrows T.W. Genetics of virulence in bacteria (*P.pestis*) //Brit. Med. Bull. –1962.- Vol. 18 – P.69-73.
903. Burrows T.W. Virulence of *Pasteurella pestis* and immunity to plague //Ergeb. Mikrobiol. Immunitätsforsch. Exp. Ther. – 1963, Vol. 37. – P.59-113.
904. Burrows T.W. A possible role of pesticin in virulence of *Pasteurella pestis* //Zbl. Bakteriolog. Parasit. Infect. Hyg. – 1965. – Vol. 196, No.2/3. – P.315-317.
905. Burrows T.W. Observations on the pigmentation of *Yersinia pseudotuberculosis* //Contr. Microbiol., Immunol. –Karger, Basil, 1973. –Vol.2. –P.184-189.
906. Burrows T.W., Bacon G.A. The basis of virulence in *Pasteurella pestis*: an antigen determining virulence //Brit. J. Exp. Pathol. -1956. –Vol.37. –P.481-493.
907. Burrows T.W., Bacon G.A. The effects of loss of different virulence determinants on the virulence and immunogenicity of strains of *Pasteurella pestis* //Brit.J. Exp.Pathol. – 1958. – Vol.39. – P.278-291.
908. Butler T. Plague and other *Yersinia* infections. – NY: Plenum Medical Book Co, 1983. – 220 p.

909. Butler T., Moller G. Mitogenic response of mouse spleen cells and gelation of limulus lysate by lipopolysaccharide of *Yersinia pestis* and evidence for neutralization of the lipopolysaccharide by polymixin B //Infect. Immun. - 1977. – Vol.18, No.2. – P.400-404.
910. Campbell J., Lowe J., Walz S., Ezzell J. Rapid and specific identification of *Yersinia pestis* by using a nested polymerase chain reaction procedure //J. Clin. Microbiol. – 1993. - Vol.31, No.3. - P.758-759.
911. Cao L.K., Anderson G.P., Ligler F.S. *et al.* Detection of *Yersinia pestis* fraction 1 antigen with a fiber optic biosensor //J. Clin. Microbiol. – 1995. – Vol.33, No.2. – P.336-341.
912. Carniel E., Mazigh D., Mollaret H. Expression of iron-regulated proteins in *Yersinia* species and their relation to virulence //Infect. Immun. –1987. –Vol.55, No.1. –P.277-280.
913. Carter C., Leise J. Specific straining of various bacteria with a single fluorescent antiglobulin //J. Bacteriol. – 1958. – Vol.76, No.2. – P.152-154.
914. Cavanaugh D.C., Randall R. The role of multiplication of *Pasteurella pestis* in mononuclear phagocytes in the pathogenesis of flea-borne plague //J. Immunol. – 1959. – Vol.83. – P.348-363.
915. Cellini L. Allocati N., Angelucci D. *et al.* Coccoid notculturable in vitro reverts in mice //Microbiol. Immunol. – 1994. – Vol.38. – P.834-850.
916. Chai Ch.K., Dickie M. Endocrine variation. //Biology of the laboratory mouse. - Ed. E.L.Green. N.-Y.: McGraaw-Hill., 1966. – P.387-404.
917. Chain P.S.G., Carniel E., Larimer F W. *et al.* Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis* //Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 2004. – Vol.101, No.38. – P13826-831.
918. Chain P.S.G., Hu P., Malfatti S.A. *et al.* Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strains Antiqua and Nepal 516: evidence of gene reduction in an emerging pathogen //J. Bacteriol. – 2006. – Vol. 188, No.12. – P.4453-4463.
919. Chapman D.A.G., Zavialov A.V., Chernovskaya T.V. *et al.* Structural and functional significance of the FGL sequence of the periplasmic chaperon Caf1M of *Yersinia pestis* //J. Bacteriol. – 1999. – Vol.181. – P.2422-2429.

920. Charnetzky W.T., Shuford W.W. Survival and growth of *Yersinia pestis* within macrophages and an effect of the loss of the 47-megadalton plasmid on growth in macrophages //Infect. Immun. – 1985. – Vol.47. – P.234-241.
921. Chart H., Cheasty T., Rowe D. Differentiation of *Yersinia pestis* and *Y. pseudotuberculosis* by SDS-PAGE analysis of lipopolysaccharide //Lett. Appl. Microbiol. – 1995. – Vol. 20. – P.369-370.
922. Chase C.J., Ulrich M.P., Wasielovski L.P.*et al.* Real-time PCR assays targeting a unique chromosomal sequence of *Yersinia pestis* //Clinical Chemistry. – 2005. – Vol.51. – P.1778-1785.
923. Chauvaux S., Rosso M.-L., Frangeul L. *et al* Transcriptome analysis of *Yersinia pestis* in human plasma: an approach for discovering bacterial genes involved in septicaemic plague //Microbiology. – 2007. – Vol.153. - P.3112-3124.
924. Cheers C., McKenzie I., Pavlov H. *et al.* Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: course of listeriosis in resistant or susceptible mice //Infect. Immun. – 1978. – Vol.19. – P.763-770.
925. Chen T.H., Elberg S.S. Scanning electron microscopic study of virulent *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* type I. //Infect. Immun. – 1977. – Vol.15. – P.972-977.
926. Chen T.H., Elberg S.S., Boyles J., Velez M. *Yersinia pestis*: correlation of ultrastructure and immunological status //Infect. Immun. – 1975. – Vol. 11. – P.1382-1390.
927. Cherepanov P.A., Rosquist R., Forsberg A. Regulation of *pH6* expression in *Yersinia pestis* //7th Int. Congr. on Yersinia. Nijmegen, 1998 / Abstracts. – Ned. Tijdschr. Voor Med. Microbiol. – 1998– Vol.6 (Suppl II). - Abstr. O-10. - S.8.
928. Chromy B.A., Choi M.W., Murphy G.A. *et al.* Proteomic characterization of *Yersinia pestis* virulence //J. Bacteriol. – 2005. – Vol.187, No.23. – P.8172-8180.
929. Chu M.C., Dong X.Q., Zhou X., Garon C.F. A cryptic 19-kilobase plasmid associated with U.S. isolates of *Yersinia pestis*: a dimer of the 9,5–kilobase plasmid //Am. J. Trop.Med. Hyg. – 1998. – Vol.59, No.5. – P.679-686.
930. Cipolla C.M. Fighting the plague in seventeenth century Italy //Madison: Univ. Winsconsin press, 1981.

931. Colwell R.R., Brayton P.R., Grimes D.J. *et al.* Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms //Bio/Technol. – 1985. – Vol.3. – P.817-820.
932. Coons A.H., Greech H.J., Jones R.N. *et al.* The demonstration of pneumococcal antigens in tissue by the use of fluorescent antibody //J. Immunol. – 1942. – Vol.45, No3. – P.159-170.
933. Coons A.H., Leduc E.H., Connolly J.M. Studies an antibody production. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit //J. Exp. Med. – 1955. – Vol.102. - P.49-60.
934. Cornelis G.R. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors //J. Cell. Biol. - 2002. – Vol.158. – P.401-408.
935. Corradi F. Annali delle Epidemie occorse in Italya. - Bologna, 1865. – Vol.1.
936. Couvy L. Sur le bacteriophage du bacille de Yersin //C.R. Soc. Biol. – 1932. – Vol.109. – No.15.
937. Cramer M., Braun D.G. Genetics of restricted antibodies to streptococcal group polysaccharides in mice. I. Strain differences of isoelectric focusing spectra of group A hyperimmune antisera.//J. Exp. Med. – 1974. – Vol. 139. – P. 1513-1528.
938. Csizmas L. Preparation of formalinized erythrocytes //Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1960. – Vol.103, No.1. – P.157-160.
939. Darveau R.P., Charnetzcky W.T., Hurlbert R.E., Hancock R. Effects of growth temperature, 47-megadalton plasmid, and calcium deficiency on the outer membrane protein porin and lipopolysaccharide composition of *Yersinia pestis* EV76 //Infect. Immun. 1983. – Vol.42, No.3. - P.1092-1101.
940. Datta D.B., Arden B., Henning U. Major proteins of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors //J.Bacteriol. – 1977. – Vol.131. – P.821-829.
941. Day E.J., Vasli K.K. Russel R.J. *et al.* A simple method for the study of in vivo bacterial growth and acomplaning host response //J. Infect. – 1980. - Vol. 2. – P.39-51.
942. Debris A., Chenal-Francisque V., Pouillot F. *et al.* An infectious filamentous phage associated with the transformation of *Yersinia pestis* from an enteropathogen into the

- deadly plague bacillus //«Yersinia - 2006»: Abstracts Book of 9th Intern. Sympos. on *Yersinia*. – Lexington, Kentucky, 2006. – A.61. – P.54
943. Deng W., Burland V., Plunkett G. *et al.* Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM1 //J. Bacteriol. – 2002. – Vol.184. – 4501-4611.
944. Devdariani Z.L., Verenkov M.S., Feodorova V.A. *et al.* Identification of *Yersinia pestis* with varied plasmid composition using monoclonal and polyclonal fluorescent immunoglobulins //FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 1993. – Vol.6. – P. 31-35.
945. Devignat R. Variétés de l'espèce *Pasteurella pestis*. Nouvelle hypothèse //Bull. World. Hlth Org. - 1951. – Vol.4, No.2. – P.247-263.
946. Dias J.M., Than M.E., Humm D. *et al.* Crystal structure of the first dissimilatory nitrate reductase at 1.9 Å° solved by MAD methods //Structure. – 1999 – No.7. – P.65–79.
947. Dienes L. L-type cultures isolated from *Streptococci* //Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1953. – Vol.83., No.3. – P.579-583.
948. Dienes L, Weinberger H. The L-forms of bacteria //Bacteriol. Rev. – 1951. – Vol. 15. – P.245-288.
949. Di Pauli R. Genetics of the immune response. 1. Differences in the specificity of antibodies to lipopolysaccharides among different strains of mice. //J. Immunology. – 1972. – Vol.109. – P.394-400.
950. Di Rienzo J.M., Nakamura K., Inouye M. The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis , assembly, and functions //Ann. Rev. Biochem. – 1978. – Vol.47. – P.481-532.
951. Dodin A., Richaud J., Brigoo E. La reaction d'hemagglutination conditionnée dans de la peste chez differents hotes. Rapport entre les anticorps precipitants et hemagglutinants. II. Les antigenes proteiques //Ann. Inst. Pasteur. – 1969. – Vol.117, No. 3. – P. 369-377.
952. Dong X.Q., Lindler L.E., Chu M.C. Complete DNA sequence and analysis of an emerging cryptic plasmid isolated from *Yersinia pestis* //Plasmid. – 2000. – Vol. 43, No.2. – P.144-148.

953. Dongzheng Yu., Zhang Wei, Ma Ye Plague natural foci in China //7th Int. Congr. on *Yersinia*: Abstracts. – Neder. Tijdschr. Med. Microbiol. - 1998. — Vol.6 (Suppl II.). - Abstr. S.42. - P-127.
954. Drace R., Darby C. The *C.elegans* gene *BAH-1* is necessary for *Y.pestis* biofilm attachment //«*Yersinia*» - 2006»: Abstract Book 9th International Symposium on *Yersinia*. – Lexington, Kentucky, 2006. – C78. – P.60.
955. Drancourt M, Aboudharam G., Signoli M. *et al.* Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol.95. – P.12637-12640.
956. Drancourt M., Riux V., Dang L. V. *et al.* Genotyping, orientalis-like *Yersinia pestis*, and plague pandemics //Emerg. Infect. Dis, 2004. - Vol.10. – No.9. – P.1585-1592.
957. Drancourt M., Signoli M., Dang L.V. *et al.* *Yersinia pestis* orientalis in remains of ancient plague patients //Emerg. Infect.Dis. – 2007. – Vol.13, No.2. – P. 332-333.
958. Eckert E.A. Spatial and temporal distribution of plague in a region of Switzerland in the years 1628 and 1629 //Bull. Hist. Med. – 1982. – Vol.56. – P.175-194.
959. Eichner R.D., Mulbacher A. Hypothesis: fungal toxins are involved in aspergillosis and AIDS //Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. – 1984. – Vol.62., Pt.4. – P. 479-484.
960. Ellis E., Delbrück M. The growth of bacteriophage //J. Gen. Physiol. – 1939. – Vol.22, No.3. – P.365-384.
961. Ellis S.R. Interhuman transmission of medieval plague //Bull. Hist. Med. – 1961. – Vol.54. – P.497-510.
962. Englesberg E. Physiological basis for rhamnose utilization by mutant of *Pasteurella pestis*. I. Experiments with resting cells: the isolation of lactic aldehyde //J. Bacteriol. – 1957. – Vol.74, No.1. – P.8-11
963. Englesberg E. Mutation to rhamnose utilization in *P.pestis* //J. Bacteriol. - 1957a. - Vol.73, No.5. – P.641-648.
964. Englesberg E., Levy J.B. Studies on immunization against plague. VI. Growth of *Pasteurella pestis* and the production of the envelope and other soluble antigens in a casein hydrolysate mineral glucose medium //J. Bacteriol. 1954. – Vol.67. – P.438-449.

965. Fan Zhenya., Luo S., Wang S. *et al.* *Microtus brandii* plague ubn the Xilin Gol Glassland was inoffensive to human (in Chinese) //J. Control. Epidemic Dis. – 1995. – Vol.10. – P56-57.
966. Fan Zhenya, Xiang Zhou, Yunnheng Luo. *et al.* The plague of vole (*Microtus brandti*) is harmless to human being //7th Int. Congr. on Yersinia/ - Nijmegen, 1998 / Abstracts. – Ned. Tijdschr. voor Med. Microbiol. - 1998. –Suppl II. – Vol.6. - Abstr. S.42. – P.127.
967. Fass R.J., Prior R.B. Light, scanning and transmission electron microscopy of stable staphylococcal L-forms //Ann. NY Acad. Sci. – 1974. – Vol.236, No.1. – P.76-95.
968. Feodorova V.A., Devdariani Z.L. Development, characterization and diagnostic application of monoclonal antibodies against *Yersinia pestis* fibrinolysin and coagulase //J. Med. Microbiol. – 2000. – Vol.49, No.3. – P.261-269.
969. Feodorova V.A., Devdariani Z.L. New genes involved in *Yersinia pestis* fraction I biosynthesis //J. Med. Microbiol. – 2001. – Vol.50, No.11. – P.969-978.
970. Feodorova V.A., Pan'kina L.N., Savostina E.P. *et al.* A *Yersinia pestis* *lpxM*-mutant live vaccine induces enhanced immunity against bubonic plague in mice and guinea pigs //Vaccine. - 2007. – Vol.25, No.44. – P.7620-7628.
971. Ferber D.M., Brubaker R.R. Mode of action of pesticin: *N*-acetylglucosaminidase activity //J. Bacteriol. – 1979. – Vol.139, No.2. – P.495-501.
972. Ferber D.M., Brubaker R.R. Plasmids in *Yersinia pestis* //Infect. Immun. – 1981. – Vol.31, No.2. – P.839-841.
973. Fields K.A., Nilles M.L., Cowan C., Straley S.C. Virulence role of V antigen of *Yersinia pestis* at the bacterial surface //Infect. Immun. – 1999. – Vol. 67, No.10. – P.5395-5408.
974. Filippov A.A., Solodovnikov N.S., Kookleva L.M., Protsenko O.A. Plasmid content in *Yersinia pestis* strains of different origin //FEMS Microbiol. Lett. – 1990. - Vol. 67, No.1-2. - P.45-48.
975. Finlay B.B., Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited //Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1997. – Vol. 61. - P. 136-169.
976. Flinn M.W., Biraben J.N. Plague in Europe and the Mediterranean countries //J. Eur. Econ. Hist. – 1979. – No.8, No.1. – P.131-148.

977. Flu P. Die Natur des Bacteriophagen //Zbl. Bakt. Abt. 1. Orig. – 1929. – Bd.113, H.3/4. – S.284-290.
978. Folch T., Ascol L., Lus.M. *et al.* Preparation of lipide extracts from brain tissue //J. Biol. Chem. – 1951. – V.191, No.2. – P.833-841.
979. Fomsgaard A., Freundenberg M., Galanos C. Modification of the silver staining technique to detect lipopolysaccharide in polyacrylamide gels //J. Clin. Microbiol. - 1990. – Vol.28, No.12. – P.2627-2631.
980. Forman S., Craig S., Abney J. *et al.* *Yersinia pestis* – site-directed mutagenesis of Hms biofilm proteins //«Yersinia - 2006»: Abstracts 9th Intern. Sympos. on *Yersinia*. – Lexington, Kentucky, 2006. – D063. – P.60.
981. Forsberg A., Bölin I., Norlander L., Wolf-Watz H. Molecular cloning and expression of calcium-regulated, plasmid-coded proteins of *Y. pseudotuberculosis* //Microbial Pathogenesis. – 1987. – Vol.2. – P.123-137.
982. Forsman M., Hennigton E.W., Larson E. *et al.* *Francisella tularensis* does not manifest virulence in viable but non-culturable state //FEMS Microbiol. Ecol. – 2000. – Vol.31, No.3. – P.217-224.
983. Fournie G.J., Lambert P.H., Miescher P.A. Features of the immune response to DNA in mice. I. Genetic control //Clin. Exp. Immunol. - 1976. – Vol.26, No.1. – P.46-51.
984. Fredericq P., Bets-Bareau M. Transfert genetique de la propriété de produire un antibiotique //C.R. Soc. Biol. – 1953. – Vol. 147. – P.1653-1657.
985. Friedman M., Cowles Ph. The bacteriophages of *Bacillus megaterium*. 1. Serological, physical and biological properties //J. Bacteriol. – 1953. – Vol.66, No.4. – P.379-385.
986. Galyov E.E., Smirnov O.Yu., Karlishev A.V. *et al.* Nucleotide sequence of the *Yersinia pestis* gene encoding *F1* antigen and the primary structure of the protein. Putative *T* and *B* cell epitopes //FEBS Lett. – 1990. – Vol.227, No.1-2. – P.230-232.
987. Galyov E.E., Karlishev A.V., Chernovskaya T.V. *et al.* Expression of envelope antigen *F1* of *Yersinia pestis* is mediated by the product of *cafIM* gene having homology with the chaperone protein PapD of *Escherichia coli* //FEBS Lett. – 1991. – Vol.286, No.1-2. – P.79-82.

988. Garcia E., Worsham P., Bearden S. *et al.* *Pestoides F*, an atypical *Yersinia pestis* strain from the former Soviet Union //Adv. Exp. Med. Biol. – 2007. – Vol.603. - P.17-22.
989. Garcia E., Chain P., Elliott J.M *et al.* Molecular characterization of L-413C, a P2-related plague diagnostic bacteriophage //J.Virology. – 2008. – Vol.372, No.1. - P.85-96.
990. Garcia-Lara J., Martinez J., Vilamú M., Vives-Rego J. Effect of previous growth conditions on the starvation-survival of *Escherichia coli* in seawater //J.Gen.Microbiol. – 1993. – Vol.139, No.7. – P.1425-1431.
991. Gilbert M.T., Cuccui J., White W. *et al.* Absence of *Yersinia pestis*-specific DNA in human teeth from five European excavations of putative plague victims //Microbiology. – 2004. – Vol.150, Pt.2. – P.341-354.
992. Girard G. Présence d'un principe lytique tres actif vis-a-vis du bacille de Yersin, isolé chez les rats de Tananarive //C.R.Soc. Biol. – 1934. – Vol.115.
993. Girard G. Présence d'une bacteriophage antipesteux chez la *X.cheopis* au cours d'une petite epidemie de peste a Tananarive //C.R.Soc.Biol. – 1935. - Vol.120, No.31.
994. Girard G. A quelle époque remonte la présence du rat (*Rattus rattus*) en Europe //Bull. Soc. Pathol. Exot. – 1974. – Vol.67. – P.601-616
995. Girardon Ph., Gouges Y., Amen I. Procédé de production d'un vaccine biochimique anti-pesteux. Заявка 2517966, Франция. Заявлено 10.12.81. -№ 8123668. Опублик. 17.06.83. МКИ А61 К 39/10.2
996. Glosnicka R., Gruszkiewicz E. Chemical composition and biological activity of the *Yersinia pestis* envelope substance //Infect Immun. 1980. – Vol.30, No.2. - P.506-512.
997. Goguen J.B., Wheker W., Hatch T. *et al.* Plasmid-determined cytotoxicity in *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* //Infect. Immun. - 1986. - Vol.51, No.3. – P.788-794.
998. Goldstein B.D., Lai L.Y., Ross S.R., Cuzzi-Spada R. Susceptibility of inbred mouse strains to ozone. //Arch. Environ. Health. – 1973. – Vol.27, No.6. – P.412--413.
999. Golubinsky E.P., Dubrovina V.I., Borsuk G.L. Mechanism of L-form *Yersinia pestis* phagocytosis //7th Int. Congr. on Yersinia: Abstracts. – Neder. Tijdschr. Med. Microbiol. - 1998. –Suppl II. – Vol.6. - Abstr.. S.22. - P.30.

1000. Golubov A., Neubauer H., Nolting Ch. *et al.* Structural organization of the pFra virulence-associated plasmid of rhamnose-positive *Yersinia pestis* //Infect. Immun. - 2004. - Vol.72, No.10. - P.5613-5621.
1001. Gomes-Solecki M.J., Savitt A.G., Rowe R. *et al.* LcrV capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Yersinia pestis* from human samples //Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 2005. – Vol.12, No.2. – P.339-346.
1002. Gonzalez M.D., Lichtensteiger C A, Caughlan R., Uimr E.R. Conserved filamentous prophage in *Escherichia coli* O18:K1:H7 and *Yersinia pestis* biovar *orientalis* // J. Bacteriol. – 2002. - Vol.184, No.21. – P.6050–6055.
1003. Gordon D., Isaacson M., Taylor P. Plagut antibody in large African mammals //Infect. Immun. – 1979. – Vol.26, No.3. – 767-769.
1004. Gorzynski E., Neter E., Ambrus J.L. Differences in antibody responses of mouse strains to enterobacterial common antigen //Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 1970. – Vol.134., No.3. – P.776-779.
1005. Grasset E. Observations compares sur la productions *in vivo* et *in vitro* de formes L de *Proteus vulgaris* et *Klebsiella pneumoniae* sous l'influence d' anticorps spécifiques //Ann. Inst. Pasteur. – 1955. – Vol.89. – P.111-115.
1006. Gratia A. Des relation numerique entre bacteries lysogenes et particules de bacteriophage //Ann. Inst. Pasteur., - 1936. – Vol.57, No.6. – P.652.
1007. Green M.T., Heidger P.M., Dominique G. Demonstration of the phenomena of microbial persistence and reversion with bacterial L-forms in human embryonic kidney cells //Infect. Immun. – 1974. – Vol.10. – No.4. – P.889-914.
1008. Gremyakova T.A., Titareva G.M., Bakhteeva I.V. *et al.* AroA *Salmonella typhimurium* SL3261 expressing *Yersinia pestis* capsular F1 antigen: plasmid maintenance and protectivity //7th Int. Congr. on Yersinia. – Nijmegen, 1998.- Abstracts. / Ned. Tijdschr. voor Med. Microbiol. - 1998. – Vol.6 (Suppl II). - Abstr. S.17 – P.7.
1009. Gremyakova N.A., Vinogradov E.V., Lindner B. *et al.* //The core structure of the lipopolysaccharide structure of *Yersinia pestis* strain KM218. Influence of growth temperature //Adv. Exp. Med. Biol. – 2003. – Vol. 529, No.2. – P.229-231.

1010. Gribbon L.T., Barer M.R. Oxidative metabolism in nonculturable *Helicobacter pylori* and *Vibrio vulnificus* studied by substrate enhanced tetrasolium reduction and image processing //Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – Vol.61. – P.3379-3384
1011. Grothnes D., Tummler B. Genome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* by field inversion gel electrophoresis //FEMS Microbiol. Lett. - 1987. – Vol.48. – P.419-422.
1012. Guinet F., Carniel E. A technique of intradermal injection of *Yersinia* to study *Y.pestis* physiopathology //Advances in experimental medicine and biologiae. The genus *Yersinia* / Ed. M.Skurnic, J.Bengoecher, K.Gransfors. - Turku, Finland, 2002. – Vol.529. - P.73-78.
1013. Guiyoule A., Grimont F., Iteman I. *et al.* Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains //J. Clin. Microbiol. – 1994. – Vol.32. – P.634-641.
1014. Guiyoule A., Rasoamanana B., Buchrieser C. *et al.* Recent emergence of new variants of *Yersinia pestis* in Madagascar //J. Clin. Microbiol. – 1997. – Vol.35. – P.2826-2833.
1015. Gunnison J., Lazarus A. Alteration of *P.pestis* bacteriophage following successive transfer on *P.pseudotuberculosis* and on *Shigella* //Proc. Soc. Exptl. Biol.Med. - 1948. – Vol.69, No.2. – P.294.
1016. Hallet A.F., McNeill D., Meyer R.F. A serological survey of the small mammals for plague in southern Africa //S. Afr. Med. J. – 1970. – Vol.44, No.29. – P.831-837.
1017. Han Y., Zhou D., Pang X. *et al.* Comparative transcriptome analysis of *Yersinia pestis* in response to hyperosmotic and high-salinity stress //Research in Microbiol. – 2005. – Vol. 156. – P. 403-415.
1018. Hancock R.E.W., Braun V. The colicin I receptor of *E.coli* K12 has a role in enterochelin –mediated iron transport //FEBS Lett. - 1976. – Vol.65. – P.208-210.
1019. Harrison's principles of internal medicine /Isselbacher C.J. (ed.) - 9th ed. NY., 1980.
1020. Havkins D. The Black Death and new London cemeteries 1348 //Antiquity 1990. – N60. – P.637-642.
1021. Hengge-Aronis R. Survival of hunger and stress: the role of rpoS in early stationary phase gene regulation in *E.coli* //Cell. - 1993. – Vol.72. – P.165-178.

1022. Herliny D. Klapisch-Zuber C. Local Population studies and S.S.R.C. Cambridge Group for the History of population and Social structure. Les Toscans et leurs familles. - Paris: Fondation nationale des sciences politiques, Ecole des hautes études en sciences sociales., 1978.
1023. Hertman J. Bacteriophage common to *Pasteurella pestis* and *Escherichia coli* //J. Bacteriol. – 1964. – Vol.88, No.4. – P.1002-1005.
1024. Higuchi K., Smith J.L. Studies on the nutrition and physiology of *Pasteurella pestis*: VI. A differential plating medium for the estimation of the mutation rate to avirulence //J. Bacteriol. – 1961. – Vol.81, No.4. – P.605-608.
1025. Hill E.W., Folks T., Kwon-Chung K.G. *et al.* Cyclosporin immunosuppression as the possible cause of AID's //N. Engl. J. Med. – 1983. – Vol 309. – P.1065.
1026. Hinnebusch B.J. Interactions of *Yersinia pestis* with its flea vector that lead to the transmission of plague //Osbourne A. (ed.). - Microbe-vector Interactions in Vector-borne Diseases. - 2004, Cambridge. - P. 331–343.
1027. Hinnebusch B.J., Cherepanov P., Du Y.*et al.* Murine toxin of *Yersinia pestis* shows phospholipase *D* activity but is not required for virulence in mice //Int. J. Med. Microbiol. – 2000. – Vol. 290. – P.483–487.
1028. Hinnebusch B.J., Perry R.D., Schwan T.G. Role of the *Yersinia pestis* hemin storage (*hms*) locus in the transmission of plague by fleas //Science. - 1996. – Vol.273. – P.367-370.
1029. Hinnebusch, B.J., Rudolph, A.E., Cherepanov, P. *et al.* Role of *Yersinia* murine toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector //Science. - 2002. – Vol. 296. - 733–735.
1030. Hinnebusch B.J., Schwan T.G. New method for plague surveillance using polimerase chain reaction to detect *Yersinia pestis* in fleas //J. Clin. Microbiol. - 1993. - V. 31, No.6. - P.1511-1514.
1031. Hitchen P.G., Prior J.L., Oyston P.C.F. *et al.* Structural characterization of lipooligosaccharide (LOS) from *Yersinia pestis*: regulation of LOS structure by PhoPQ system //Mol. microbiol. – 2002. – Vol. 44. – P.1637-1650.

1032. Hofstra T., Kulurus R., Schroeder M. Serological evidence of *Yersinia pestis* infection in small mammals and bears from a temperate rainforest of north coastal California //J. Wild. Dis. – 1989. – Vol. 25, No.1 – P.52-60.
1033. Hollingsworth M.F., Hollingsworth T.H. Plague mortality rate by age and sex in the parish of St.Botolph's without Bishopsgate, London, 1603 //Popul.Stud. – 1971. – Vol.146. – P.131-146.
1034. Hu P., Elliott J., McCready P.*et al.* Structural organization of virulence-associated plasmids of *Yersinia pestis* //J. Bacteriol. – 1998. – Vol.180, No.19. – P.5192-5202.
1035. Huang X.-Z., LinlderL.E. The pH6 antigen is an antiphagocytic factor produced by *Yersinia pestis* independent of *Yersinia* outer proteins and capsule antigen //Infect. Immun. - 2004. - Vol.72. - P.7212-7219.
1036. Hudson B.W., Quan S.F. Use of fluorescent antibody technique for detection of *P. pestis* in rodents //Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. – 1960. - Vol.54, No.6. – P.599-600.
1037. Hudson B.W., Kartman L., Prince F.M. *Pasteurella pestis* detection in fleas by fluorescent antibody staining //Bull. Wld. Hlth. Org. – 1966. – Vol.34. – P.709-714.
1038. Hudson B.W., Quan S.F., Kartman L. Efficacy of fluorescent antibody methods for detection of *P.pestis* in carcasses of albino laboratory mice stored for various periods //J.Hyg. – 1962. – Vol. 60, No.4. – P443-450.
1039. Hultgren S.J., Jones C.H. Utility of the immunoglobulin-like fold of chaperones in shaping organelles of attachment in pathogenic bacteria. The chaperone/usher pathway is a paradigm of certain facets of organelle development //ASM News. – 1995. – Vol.61. – P.457-464.
1040. Hussong D., Colwell R.R., O'Brien *et al.* Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar medium //Bio/Technol. – 1987. – Vol.5. – P.947-950.
1041. Ingraham J. The preparation and use of formalinized erythrocytes with attached antigens or haptens to titrate antibodies //Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 1958. – Vol.99, No.2. – P.452-459.
1042. Iteman I., Baril C., Saint G.J., Carniel E. Pulse field electrophoresis of the chromosome of the pathogenic *Yersinia* //Contrib. Microbiol. Immunol. – 1991. – Vol.12. - 198-202.

1043. Iteman I., Najdensky H., Carniel E. Subtyping of *Yersinia pseudotuberculosis* by PFGE //Proc. of the 6th Int. Sympos. on Yersinia. – Rome, Italy. - 1994. – P.32. – Abstr.No.12.
1044. Iwasaki Y., Nacano Y., Yamane T. Phospholipase D from *Streptomyces antibioticus*: cloning, sequencing, expression and relationship to other phospholipases //Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1994. – Vol.42, No.2-3. – P.290-299.
1045. Jackson S., Burrows T.W. The pigmentation of *Pasteurella pestis* on a defined medium containing haemin //Brit. J. Exp. Pathol. – 1956. – Vol. 37. – P.570-576.
1046. Janssen W.A., Lawton W.D., Fukui G.M. *et al.* The pathogenesis of plague. I. A study of the correlation between virulence and relative phagocytosis resistance of some strains of *Pasteurella pestis* //J. Infect. Dis. – 1963. – Vol.113. – P.139-143.
1047. Jermin M.A. A new method for determining ketohexoses in the presence of aldohexoses //Nature. – 1956. – V.177, No.4497. – S.38-39;
1048. Johnson, J. R., Delavari P., Kuskowski M. *et al.* Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli* //J. Infect. Dis. – 2001. – Vol.83. - P. 78-88.
1049. Josselin R. The diary of Ralf Josselin, 1616-1683. - London: Oxford Univ. Press, 1976.
1050. Kadis S., Ajl S.J., Rust J.Y. Action of plague murine toxin on mitochondria from resistant and susceptible animals //J. Bacteriol. – 1963. – Vol.86, No.4. – P.757-765.
1051. Kado C.I., Liu S-T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids //J. Bacteriol. - 1981. - Vol.145. - P.1365-1373.
1052. Kagan B.L., Selsted M.E., Ganz T., Lehrer R.I. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1990. – Vol.87. – P.210-214.
1053. Kano H., Ito Y., Matsuoka K. *et al.* Role of T cells and gamma interferon in *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen (YPM)-induced toxicity in mice. //The genus *Yersinia*: Entewring the functional Genomic Era. /Ed. M. Skurnik, J.A. Bengoechea, K.Granfors: Advances in Experimental Medicine and Biologiy. – 2003. – Vol.529. – P.137-139.

1054. Kaprelyants A.S., Gottschal J.C., Kell D.B. Dormancy in non-sporulating bacteria //FEMS Microbiol. Rev. – 1993. – Vol. 140. –P.271-286.
1055. Karlishhev A.V., Galyov E.E., Abramov V.M. *et al.* Caf1R gene and its role in the regulation of capsule formation of *Yersinia pestis* //FEBS Lett. – 1992. – Vol.305, No.1. – P.37-40.
1056. Karlishhev AV., Galyov E.E., Smirnov O.Yu.*et al.* A new gene of the f1 operon of *Yersinia pestis* involved in the capsule biogenesis //FEBS Lett. – 1992. – Vol.297., No.1. – P.77-80.
1057. Karlishhev A, Galyov E., Smirnov O. *et al.* Structure and regulation of a gene cluster involved in capsule formation of *Y.pestis* //Biological membranes: structure, biogenesis and dynamics. NATO ASI Series. Series H: Cell Biology/ Jos A.F. Op den Kamp (ed.)- Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1994. – Vol.82. – P.321-330.
1058. Karrer Y., Meyer K., Eddie B. The complement fixation inhibition test and its application to the diagnosis of ornitosis in chickens and ducks //J. Infect. Dis. – 1950. – Vol.87. – P.13-19.
1059. Kartman L., Quan S.F. Notes about the fate of avirulent strains *Pasteurella pestis* in fleas //Trans Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. – 1964. – Vol.58. – P.363-365.
1060. Kawahara K., Tsukano H., Watanabe H. *et al.* Modification of the structure and activity of lipidA in *Yersinia pestis* lipopolysaccharide by growth temperature. //Infect. Immun. – 2002. – Vol. 70. – P. 4092-4098.
1061. Kawaoka Y., Otsuki K., Tsubokura M. Temperature dependent variation in the synthesis of the receptor for *Yersinia enterocolitica* bacteriophage //Zbl. Bakt.Hyg. I Abt. Orig.A.253. – 1982. – P.364-369.
1062. Kekelidze M.G., Solomonina R.O., Zhgenti E.G. *et al.* Molecular typing and characterization of *Yersinia pestis* strains isolated in Caucasus and Middle Asia region //«Yersinia - 2006»: Abstracts 9th Intern. Sympos. on *Yersinia*. – Lexington, Kentucky, 2006. – A104. – P.59.
1063. Kersley J.E., Zavialov A.V., Moslehi E. *et al.* Mutagenesis elucidates the assembly pathway and structure of *Yersinia pestis* F1 polymer //Advances in experimental medicine and biologiae. The genus *Yersinia* / Ed. M.Skurnic, J.Bengoecher, K.Gransfors. - Turku, Finland, 2002. – Vol.529. - P.113-116.

1064. Kilbourne-Matossian M. Did mycotoxins play a role in bubonic plague epidemics //Perspectives in Biology and Medicine. – 1986. – Vol. 29, No.2. – P.244-256
1065. Kim N.W., Bingham H., Khawaja R. *et al.* Physical map of *Campilobacter jejuni* TGH9011 and localization of 10 genetic markers by use of pulsed-field gel electrophoresis //J. Bacteriol. – 1992. – Vol.174, No.11. – P.3494-3498
1066. Klevytska A.M., Price L.B., Schupp J.M. *et al.* Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome //J. Clin. Microbiol.-2001.– Vol. 39.– P. 3179-3185.
1067. Knirel Y.A., Dentovskaya S.V., Bystrova O.V. *et al.* Relationship of the lipopolysaccharide structure of *Yersinia pestis* to resistance to antimicrobial factors //Adv. Exp. Med. Biol. – 2007. – Vol.603. – P.88-96.
1068. Knirel Y.A., Dentovskaya S.V., Senchenkova S. *et al.* Structural features and structural variability of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*, the cause of plague //J. Endotox. Res. – 2006. – Vol.12, No.1 – P.3-9.
1069. Knirel Y.A., Lindner B., Vinogradov E.V. *et al.* Temperature-dependent variations and intraspecies diversity of the structure of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis* //Biochemistry. – 2005. – Vol. 44. – P. 1731-1743.
1070. Kochler G., Milstein C. Derivation of specific antibody – producing lines by cell fusion //Eur. J. Immunol. – 1976. – Vol. 6. – P. 511-519.
1071. Köning-Ward T.F. de, Robins-Browne R.M. Analysis of the urease gene complex of members of the genus *Yersinia* //Gene. – 1996. – Vol.182, No.1-2. – P.225-228
1072. Kotera K., Asurin I., Ogonuki H. *et al.* Isolation of the *L*-form of *Vibrio cholerae* from clinical specimens in the Philippines //Biken J. – 1972. – Vol.15, No.3. – P.115-121
1073. Kragelund L., Nibro O. Culturability and expression of outer membrane proteins during carbon, nitrogen or phosphorus starvation of *Pseudomonas putida* DF14 //Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – Vol.60. – P.2944-2948.
1074. Krüger D.N., Presber W., Hansen S. *et al.* Different restriction of bacteriophages T3 and T7 by *P1* lysogenic cells and role of T3-coded SAM-ase //Zeitschr. Allgem. Mikrobiol. – 1974. – Vol.17, No.8. – S.581-587.

1075. Kuttyrev V.V., Filippov A.A., Oparina O.S., Protchenko O.A. Analysis of *Yersinia pestis* chromosomal determinants *Pgm+* and *Pst^s* associated with virulence //Microbial. Pathogenesis. - 1992. - Vol.12. - P.177-186.
1076. Lachica R.V., Zink D.L. Plasmid-associated cell surface charge and hydrophobicity of *Yersinia enterocolitica* //Infect. Immun. - 1984. - Vol.44, No.2. – P.540-543.
1077. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage *T4* //Nature. - 1970. – Vol.227, No. 3. – P.680-685.
1078. Laird W. J., Cavanaugh D. C. Correlation of autoagglutination and virulence of *Yersiniae* //J. Clin. Microbiol. - 1980. - Vol.11, No.4. - P.430-432.
1079. Lathem W.W., Crosby S.D., Miller V.L. *et al.* Progression of primary pneumonic plague: a mouse model of infection, pathology, and bacterial transcriptional activity //Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 2005. – Vol.102, No.49. – P.17786-17791.
1080. Lawton W.D., Fukui G.W., Surgalla M.G. Studies on the antigens of *Pasteurella pestis* and *Pasteurella pseudotuberculosis* //J.Immunol. - 1960. – Vol.84., №5. – P.475-479.
1081. Lawton W.D., Molnar D.M. Lysogenic conversion of *Pasteurella* by *Escherichia coli* bacteriophage PICM //J.Virology. – 1972. – Vol.9, N4. – P.708-709.
1082. Le Fleche Ph., Hauck Y., Onteniente L. *et al.* A tandem repeats database for bacterial genomes application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis* //BMC Microbiology. - 2001. – Vol.1-2.
1083. Leal N.C., Almeida A.M. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR //Rev Inst Med Trop Sao Paulo. – 1999. – Vol.41, No.6. – P.339-342
1084. Leal N.C., Almeda A.M., Ferreira L.C. Plasmid composition and virulence-associated factors of *Yersinia pestis* isolates from a plague outbreak at the Paraiba State, Brazil. //Rev. Inst. Med. Trop. Sao-Paulo. – 1989. – Vol.31, No.5. – P.295-300.
1085. Leary S., Rauchenberg R., Titball R. Development of an oral plague vaccine: co-delivery of protective antigens in attenuated salmonella //7th Int. Congr. on Yersinia: Abstracts. / Neder. Tijdschr. Med. Microbiol. - 1998. — Vol.6.(Suppl II.) - Abstr. P. 90.

1086. Lee J.J., Smith H.O. Sizing of the *Haemophilus influenzae* Rd genome by pulsed-field agarose gel electrophoresis //J. Bacteriol. – 1988. – Vol.170, No.9. – P.4402-4405.
1087. Li Tan, Creg Darby A movable surface: formation of *Yersinia* sp. biofilms on motile *Caenorhabditis elegans* //J.Bacteriol. – 2004. - Vol.186, No. 15. - P.5087–5092.
1088. Lindler L.E. Klempner M.S., Straley S.C. *Yersinia pestis* pH6 antigen: genetic, biochemical and virulence characterization of a protein involved un the pathogenesis of bubonic plague //Infect. Immun., 1990. - Vol.58 - P.2569-2577.
1089. Lindler, L.E., Plano, G.V., Burland, V. *et al.* Complete DNA sequence and detailed analysis of the *Yersinia pestis* KIM5 plasmid encoding murine toxin and capsular antigen //Infect. Immun. - 1998. - Vol. 66. – P.5731–5742.
1090. Lindler L.E., Tall B.D. *Yersinia pestis* pH6 antigen forms fimbriae and is induced by intracellular association with macrophages //Mol. Microbiol. – 1993. – Vol.8. – P.311-324.
1091. Liu F., Chen H., Galvan E.M. *et al.* Effect of Psa and F1 on the adhesive and invasive interactions of *Yersinia pestis* with human respiratory tract epithelial cells //Infect. Immun. - 2006. – Vol.74. – P.5636-5644.
1092. Lleo del M.M. Tati M.C., Canepari P. Nonculturable *Enterococcus faecalis* are metabolically active growth //Syst. Appl. Microbiol. – 1998. – Vol.21. – P.333-339.
1093. Lowell J.L., Wagner D.M., Atshbar B. *et al.* Identifying sources of human exposure to plague //J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol.43, No.2. – P.650-656.
1094. Lowell J.L., Zhansarina A., Yockey B. *et al.* Phenotypic and molecular characterizations of *Yersinia pestis* isolates from Kazakhstan and adjacent regions //Microbiology. – 2007. – Vol.153. – P.169-177.
1095. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J.Biol.Chem, - 1951. – Vol.193. – P. 265-275
1096. Lucier T.S., Brubaker R.R. Determination of genome size, macrorestriction pattern polymorphism and nonpigmentation specific deletion in *Yersinia pestis* by pulsed-field gel electrophoresis //J. Bacteriol. -1992. –Vol.174, No.7. –P.2078-2086
1097. MacArthur W.P. The identification of some pestilences recorded in Irish annals //Ir. Hist.Stud. – 1949. – Vol. 63. – P.179.

1098. MacIntyre S., Knight S.D., Fooks L.D. Structure assembly and applications of the polymeric F1 antigen *Yersinia pestis* // *Yersinia*. Molecular and cellular biology /Eds. E.Carniell, B.J.Hinnebusch. – Paris-Hamilton, 2005. - Capter 18. – P.363-407.
1099. MacIntyre S., Zyrianova I.M., Chernovskaya N.V. *et al.* An extended hydrophobic interactive surface of *Yersinia pestis* CafM1 chaperone is essential for subunit binding and f1 capsule assembly // *Mol. Microbiol.* – 2001. – Vol. 39. – P.12-25
1100. Madoff S. The L-forms of bacteria. The *Procariotes*. // *Isolat. Identific. of Bacteria*. - Berlin, 1981. – Vol.2. – P.2225-2237.
1101. Mahesh S., Shukla J., Tuteja U., Batra H.V. Molecular detection of *Yersinia pestis* isolates of Indian origin by using Pla specific monoclonal antibodies // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* – 2005. – Vol.28, No.2. – P.131-144.
1102. Mann J.M., Shandler L., Cusning A.H. Pediatric plague // *Pediatrics*. - 1982. - Vol.69. – P.762-767.
1103. Martin C. Beiträge zur Chronologie und Ätiologie der Pest. - Weimar:R.Wagner, 1879.
1104. Martinez R.J. Plasmid-mediated and temperature-regulated surface properties of *Yersinia enterocolitica* // *Infect. Immun.* - 1983. – Vol.41. – P.921-930.
1105. McCutchen-Maloney S. Proteomic characterization *Yersinia pestis* host—pathogen interactions // «*Yersinia - 2006*»: Abstracts 9th Intern. Sympos. on *Yersinia*. – Lexington, Kentucky, 2006. – A7. – P.32.
1106. McKenna J.M. A stable preparation of antigen-sensitized erythrocytes // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1957. – Vol.95, No.3. – 591-593.
1107. Mecsas J., Franklin G., Kuziel W.A. *et al.* Evolutionary genetics: CCR5 mutation and plague protection // *Nature*. – 2004. – Vol.427. – P.606.
1108. Medina S., Van S.L., Robson H.G. Effect of nonspecific stimulation on the defense mechanisms of inbred mice // *J. Immunol.* – 1975. – Vol.114. – P.1720-1725.
1109. Meier Y., Fuller J.L. Responses to drug. // *Biology of the laboratory mouse*./Ed.L.Green. N.-Y.:Mc Graw-Hill,1966. – P.447-456.

- 1110.** Meka-Mechenko T. Molecular characteristics of natural S-forms of *Yersinia pestis* // 8th Intern. Sympos. on *Yersinia*: Abstracts – Finland, Turku, 2002. - P-49. - P.69.
1111. Melo A.C., Almeida A.M.P., Leal N.C. Retrospective study of a plague outbreak by multiplex-PCR //Lett. Appl. Microbiol. – 2003. – Vol.37, No.5. – P.361-364.
1112. Mishankin M.B., Kozlovsky V.N., Mishankin B.N. et al. Proliferative response of T-lymphocytes stimulated in vitro with “murine” toxin of *Yersinia pestis* //Joint Congr: FAIS/SAIS/SASFRR/ALLSA. Cape Town, South Africa, March 1997. – P.55.
1113. Mollaret H.H. Conservation experimentale de la peste dans de le sol //Bull. Soc. Pathol. Exot. – 1963. – Vol. 56, No.6. – P.1168-1182.
1114. Mollaret H.H., Nguyen van ba., Vandekerkove M. *et al.* Sur l’uréase du bacille Yersin //Ann. Inst. Pasteur. – 1964. – Vol.107, No.3. – P.424-429.
1115. Mollaret H.H., Nicolle P. Sur la frequence de la lysogenie dans l’éspece nouvelle *Yersinia enterocolitica* //C.R. Acad. Sci. – 1965. – Vol.260. – P.1027-1029.
1116. Monola B.J., Hiller S.L., Charnetzky W.T. Constitutive uptake and degradation of fatty acids by *Yersinia pestis* //J. Bacteriol. – 1983. – Vol.153., No.1. – P.340-344.
1117. Montgomery R.R., Lustitani D., de Boisfleury Cevance A. *et al.* Tick saliva reducts adherence and area of human neutrophils //Infect. Immun. – 2004. – Vol.72. – P.2884-2989
1118. Montie T.C. Properties and pharmacological action of plague murine toxin //Pharmacol. Ther. - 1981. - Vol.12, No.3. – P.491-499
1119. Moody M.D., Winter C.C. Rapid identification of *Pasteurella pestis* with fluorescent antibody. III. Staining of *Pasteurella pestis* in tissue impression smears //J. Infect. Dis. – 1959. – Vol.104, No.3 – P.288-299.
1120. Moore R.L Biological effects of magnetic field: studies with microorganisms //Can. J. Microbiol. – 1979. – Vol.25, No.10. – P.1145-1151.
1121. Morton M., Garmory H.S., Perkins S.D. *et al.* A *Salmonella enterica* serovar Typhi vaccine expressing *Yersinia pestis* F1 antigen on its surface provides protection against plague in mice //Vaccine. – 2004. – Vol.22. – P.2524-2532.

1122. Motin, V.L., Georgescu A.M., Elliott J.M. *et al.* Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol- 3-phosphate dehydrogenase (glpD) //J. Bacteriol.- 2002. – Vol.184. – P.1019–1027.
1123. Motin V.L., Pokrovskaja M.S., Telepnev M.V. *et al.* The difference in the lcrV sequences between *Y.pestis* and *Y.pseudotuberculosis* and its application for characterization of *Y.pseudotuberculosis* strain //Microbial. Pathogenesis. – 1992. – Vol. 12, No.3. – P.165-175.
1124. Müller K.H., Trast T.G., Kay W.W. Unmasking of bacteriophage Mu lipopolysaccharide receptors in *Salmonella enteritidis* confers sensitivity to Mu and permits Mu mutagenesis //J. Bacteriol. -1988. – Vol.170, No.3. –P.1076-1081.
1125. Müller-Eberhard H.J. Complement //Ann. Rev. Biochem. – 1975. – Vol.44. – P.695-724.
1126. Munro P.M., Flatau G.N., Clément R.L., Gauthier M.J. Influence of RpoS (KatF) sigma factor on maintenance of viability and culturability of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in seawater //Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – Vol.61., No.5. – P.1853-1858.
1127. Mutoh N., Furukawa Y., Mizushima Sh. Role of lipopolysaccharide and other membrane protein of *Escherichia coli* K-12 in the receptor activity for bacteriophage T4 //J. Bacteriol. -1978. –Vol.136, No.2. –P.693-699.
1128. Neubauer H., Meyer H., Prior J. *et al.* A combination of different polymerase chain reaction (PCR) assays for the presumptive identification of *Yersinia pestis* //J. Vet. Med. B. Infect Dis Vet. Public Health. – 2000. – Vol.47.,No.8. – P.573-580
1129. Ng L.-Ch., Forslung O., Wong L.S. *et al.* The response of murine macrophages to infection with *Yersinia pestis* as revealed by DNA microarray analysis //Advances in experimental medicine and biologiae. The genus *Yersinia* / Ed. M.Skurnic, J.Bengoecher, K.Gransfors. - Turku, Finland, 2002. – Vol.529. - P.155-160.
1130. Nikaido H., Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability //Microbiol. Rev. - 1985. – Vol. 49, No.1. – P.1-32
1131. Nilsson L., Oliver J.D., Kjelleberg S. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state //J. Bacteriol. – 1991. – Vol.173, No.16. – P.5054-5059.

1132. Norkina O.V., Kulichenko A.N., Gintsburg A.L. *et al.* Development of a diagnostic test for *Yersinia pestis* by the polymerase chain reaction //J. Appl. Bacteriol. - 1994. – Vol.76. – P.240-245.
1133. O’Bryant D.M., Doll J.R., Nilles M.L. *et al.* Significant resistance to *Yersinia pestis* in HLA-DQ 8AB transgenic mice: influenced by age and gender //«Yersinia - 2006»: Abstracts Book of 9th Intern. Sympos. on *Yersinia*. – Lexington, Kentucky, 2006. – A73. - P.58.
1134. Ochman, H., Lawrence J.G., Groisman E.A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation //Nature. – 2000. – Vol.405., No. 6784. – P.299-304.
1135. Oliver J.D. The viable but non-culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus* //FEMS Microbiol. Lett. – 1995. – Vol.133., No.3. – P.203-208.
1136. Oliver J.D., Brockian R. *In vivo* resuscitation and virulence towards mice of viable but non-culturable cells of *Vibrio vulnificus* //Appl. Environ. Microbiol. – 1995a. – Vol.61. – P.2620-2623.
1137. Oliver J.D., Nilsson L., Kjelleberg S. Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state //Appl. Environ. Microbiol. – 1991. - Vol.57. – P.2640-2664.
1138. O’Neal C.R., Gabriel W.M., Turk A.K. *et al.* RpoS is necessary for both the positive and negative regulation of starvation survival genes during phosphate, carbon and nitrogen starvation in *Salmonella typhimurium* //J. Bacteriol. – 1994. – Vol.176. – P.4610-4616.
1139. Onkelinx E., Meuldermans W., Joniau M., Lontie R. Glutaraldehyde as a coupling reagent in passive hemagglutination //Immunology. - 1969. – Vol.16., No.1. – P.35-43.
1140. Ouchterlony O. Antigen-antibody reaction in gels //Acta Pathol. Microbiol. Scand. – 1949. – Vol.26, No. 4. – P.507-515.
1141. Ouchterlony O., Erisson H., Neumüller C. Immunological analysis of diphtheria antigens by the gel diffusion method. A preliminary report //Acta Med. Scand. - 1950. – Vol.138., No.1. – P.76-79.
1142. Oyston P.C.F., Isherwood K.E. The many and varied niches occupied by *Yersinia pestis* as an arthropod-vectored zoonotic pathogen //Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.. - 2005. – Vol.87. – P.171-177.

1143. Oyston P., Russel P., Williamson E.D., Titball R.W. An *aroA* mutant of *Yersinia pestis* is attenuated in guinea-pigs, but virulent in mice. //Microbiology. – 1996. - V.142. - P.1847-1853
1144. Pavlovich N.V., Sorokin V.M. Role of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide in the host parasite interaction //First. Int. Conf. on Tularemia: Abstracts. – Sweden, Umea, 1995. – P.27
1145. Parkhill J., Wren B.W., Thompson N. *et al.* Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague //Nature. – 2001. – Vol.413, No.6855 – P.523-526.
1146. Perry R.D., Fetherstone J.D. *Yersinia pestis* - etiologic agent of plague. //Clin. Microbiol. Rev. - 1997. – No.10. – P.35-66.
1147. Perry R.D., Harmon P.A., Bowmer W.S., Straley S.C. A low Ca^{2+} response operon encodes the V antigen of *Yersinia pestis* //Infect. Immunity. – 1986. – Vol.54. – P.428-434.
1148. Perry R.D., Straley S.C., Fetherson J.D. *et al.* DNA sequencing and analysis of the low Ca^{2+} response plasmid pCD1 of *Yersinia pestis* KIM5 //Infect. Immun. – 1998. – Vol.66. – P.4611-4623.
1149. Pierson V.L., Worsham P.L., Strachan S.D. F1-negative variants of *Y.pestis* CO92 //7th Intern Congr. on Yersinia. – Nijmegen., 1998. / Abstracts. - Ned. Tijdschrift voor Medische Microbiologie. - 1998. – Vol.6, (Suppl II). – Abstr. S.9, (O-17).
1150. Piras L. Die Präcipitinreaction als diagnostische Mittel der Pest.//Zbl. Bakt. – 1 Abt. Orig. – 1913. – Vol.71, No.1. – S.69-79.
1151. Pirt S.T., Thackerey E.T. Harris-Smith R. The influence of environment on antigen production by *Pasteurella pestis* studied by means of the continuous flow culture technique //J. Gen. Microbiol. - 1961. – Vol.25, No.1. – P.119-130.
1152. Plant J., Glynn A.A. Natural resistance to *Salmonella* infection delayed hypersensitivity and Ir genes in different strains of mice //Nature. – 1974. – Vol.248. – P.345-347.
1153. Plant J. Glynn A.A. Genetics of resistance to infection with *Salmonella typhimurium* in mice //J. Infect Dis. – 1976. – Vol.133. – P.72-78.

1154. Podladchikova O., Dikhanov G.G. Identification of *Yersinia pestis* pigment receptor //Advances in experimental medicine and biologiae. The genus *Yersinia* / Ed. M.Skurnic, J.Bengoecher, K.Gransfors.- Turku, Finland, 2002. – Vol.529. – P.121-124.
1155. Podladchikova O., Rykova V., Eremenko N., Dirhanov G. Characterization of *Yersinia pestis* pigment receptor //Advances in experimental medicine and biologiae. The genus *Yersinia* / Ed. M.Skurnic, J.Bengoecher, K.Gransfors. - Turku, Finland, 2002. – Vol.529. - P.62-63.
1156. Politzer R. Plague. - Geneva, WHO, 1954. – 137p.
1157. Pollack C., Straley S.C., Klempner M.S. Probing the phagolysosomal environment of human macrophages with a Ca^{2+} responsive operon fusion in *Yersinia pestis* //Nature. -1986. –Vol.322, No. 6080. –P.834-836.
1158. Ponting C.P., Kerr I.D. A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid syntases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues //Protein Sci. – 1996. – No. 5. – P.914-922.
1159. Poos L.R. Plague mortality and demographic depression in later medieval England //Yale J. Biol. Med. – 1981. – Vol. 54. – P.227-234.
1160. Portnoy D.A., Blank H.F., Kingsbury D.T. *et al.* Genetic analysis of essential plasmid determinants of pathogenicity in *Yersinia pestis*. //J. Infect. Dis. – 1983. – Vol. 148, No.2. – P297-304.
1161. Portnoy D.A., Falkow S. Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis* //J. Bacteriol. – 1982. – Vol. 148. – P. 877-883.
1162. Portnoy D.A., Wolf-Watz H., Bölin I *et al.* Characterization of common virulence plasmids in *Yersinia* species and their role in the expression of outer membrane proteins //Infect. Immun. - 1984. - Vol.43, No.1. – P.108-114.
1163. Pourcel C., Andre-Mezeaud F., Neubauer H. *et al.* Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* //BMC Microbiology. - 2004. - Vol.4, No.22.- P.1-17.
1164. Prentice M.B. James K.D., Parkhill J. *et al.* *Yersinia .pestis* pFra shows biovar-specific differences and recent common ancestry with a *Salmonella enterica* serovar *Typhi* plasmid //J. Bacteriol. – 2001. – Vol. 183. – P.2586-2594.
1165. Prentice M.B., Rahalison L. Plague //Lancet. – 2007. - Vol.369. – P.1196-1207.

1166. Price S.B., Cowan C., Perry R.D., Straley S.C. The V-antigen is a regulator protein necessary for the Ca²⁺-dependent growth and the maximal expression of low Ca²⁺ response virulence genes in *Yersinia pestis* //J.Bacteriol. – 1991. – Vol.173. – No.8. – P.2649-2657.
1167. Prior J.L., Hitchen P.G., Williamson E.D. *et al.* Characterization of the lipopolysacchride of *Yersinia pestis* //Microbial. Pathogen. – 2001. – Vol.30., No.1. – P. 49-57.
1168. Protsenko O.A., Filippov A.A., Kuttyrev V.V. Integration of the plasmid encoding the synthesis of capsular antigen and murine toxin into *Yersinia pestis* chromosome //Microbial. Pathogen. – 1991. – Vol.11. – P. 123–128.
1169. Pruzzo C., Debbia E., Satta G. Identification of the major adherence ligand of *Klebsiella pneumoniae* in the receptor for coliphage T7 and alteration of *Klebsiella* adherence properties by lysogenic conversion //Infect. Immun. – 1980. – Vol.30, No.2. – P.562-571.
1170. Rachman L., Shahamat M., Kichman P.A. *et al.* Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type I //Appl. Environ. Microbiol. - 1994. – Vol.60. – P.3573-3578.
1171. Rackham J. *Rattus rattus*: the introduction of the black rat into Britain //Antiquity. – 1979. – Vol.53. – P.112-120.
1172. Radnedge L., Gamez-Chin S., McCready P.M. *et al.* Identification of nucleotide sequences for the specific and rapid detection of *Yersinia pestis* //Appl. Environ. Microbiol. - 2001. – Vol. 67, No.8. - P. 3759-3762.
1173. Radnedge L., Agron P.G., Worsham P.L., Andersen G.L. Genom plasticity in *Yersinia pestis* //Microbiology. - 2002. - Vol.148. - P.1687-1698.
1174. Rahalison L, Vololonirina E., Ratsitorahina M., Chanteau S. Diagnosis of bubonic plague by *PCR* in Madagascar under field conditions //J.Clin. Microbiol. – 2000. – Vol. 38, No.1. – P.260-263.
1175. Rakin A., Noelting C., Golubov A. *et al.* Enemy of my enemy, phage attacks *Yersinia pestis* //«Yersinia - 2006»: Abstracts 9th Intern. Sympos. on *Yersinia*. – Lexington, Kentucky, 2006. – A1. – P.30.

1176. Rakin A., Saken E., Harmsen D., Heesemann J. The pesticin receptor of *Yersinia enterocolitica*: a novel virulence factor with dubb function. //Mol. Microbiol. – 1994. – No.13. - P.253-263.
1177. Raoult D, Aboudharam G., Crubezy E. *et al.* Molecular identification by “suicide PCR” of *Yersinia pestis* as the agent of medieval black death //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – No.97. – 12800-12803.
1178. Raoult D, Drancourt,M. Cause of Black Death //Lancet Inf. Dis. - 2002 – No.2. – P.459.
1179. Ravel J., Knight J.T., Monahan C.E. *et al.* Temperature-induced recovery of *V.cholerae* from the viable but nonculturable state: growth or resuscitation //Microbiology (UK). – 1995. – Vol.141. – P.377-383.
1180. Rebeil R., Ernst R.K., Gowen B.B. *et al.* Variation in lipid A structure in the pathogenic yersiniae //Mol. Microbiol. – 2004. – Vol. 52. – P. 1363-1373.
1181. Reddin K.M., Easterbrook T.J., Robinson F. *et al.* Large-scale purification of the F1 antigen of *Yersinia pestis* //Contrib. Microbiol. Immunol. - 1995. – Vol.13. – P.329-330.
1182. Richardson, D. J., B. C. Berks, D. A. Russell *et al.* Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases //Cell Mol. Life Sci. – 2001. – Vol.58. – P.165–178.
1183. Rode, C. K., Melkerson-Watson L., Johnson A. T., Bloch C. A. Type-specific contributions to chromosome size differences in *Escherichia coli*. //Infect. Immun. - 1999. – Vol. 67. – P.230-236.
1184. Rodrigues C.G., Carneiro C.V., Barbosa C.T. *et al.* Antigen F1 from *Yersinia pestis* forms aqueous channelis in lipid bilayer membranes //Braz.J. Med. Biol. Res. – 1992. – Vol. 25. – P. 75-79.
1185. Rosner J. цит. по Миллер Дж.,1976 (С.186)
1186. Roszak D.B., Colwell R.R. Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count //Appl. Environ. Microbiol. – 1987. – Vol.53. – P.2889-2883.
1187. Roth W.G., Leckie M.P., Dietzler D.N. Restoration of colony-forming activity in osmotically stressed *Escherichia coli* by betain //Appl. Environ. Microbiol. - 1988. - Vol.54, No.12. – P.3142-3146.

1188. Roumagnac P., Morelli G., Song Y. *et al.* Microevolution of the plague bacillus, *Yersinia pestis* //«Yersinia - 2006»: Abstracts 9th Intern. Sympos. on *Yersinia*. – Lexington, Kentucky, 2006. – C3. – P.18.
1189. Rowland S. The morphology of the plague bacillus.//J. Hyg. – 1914. - Vol.13 (Plague, Suppl.3). – P.418-422.
1190. Rudbach J.A., Reed N. Immunological responses of mice to lipopolysaccharide: lack of secondary responsiveness by C3H/HeJ mice. //Infect.Immun. – 1977. – Vol.16. – P.513-517.
1191. Ruska H. Über ein neues bei der Bacteriophagen Lyse auftretendes Formelement //Naturwissenschaften. – 1941. – Bd.29. – S.367-368.
1192. Salamach A.A., Charnetzky W. A permeability mutants of *Yersinia pestis* with increased susceptibility to phagocytosis which retains potential for intraphagocytic growth and virulence //Acta Microbiol. Hung. - 1986. – Vol.33, No. 3. – P.203-213.
1193. Samoilova S.V., Samoilova L.V., Yezhov I.N. *et al.*. Virulence of pPst+ and pPst- strains of *Yersinia pestis* for guinea-pigs.//J. Med. Microbiol. – 1996. – Vol.45. – P.440-444.
1194. Schoeler G.B., Wikel S.K. Modulation of host immunity by hematophagous arthropods //Ann. Trop. Med. Parasitol. – 2001. – Vol. 95, No.8. – P.755-771.
1195. Schutze H. Studies in *Bacterium pestis* antigens. I. The antigens and immunity reactions of *B.pestis* //Brit. J. Exp. Pathol. – 1932. – Vol.13. – P.284-288.
1196. Schutze H. Studies in *Bacterium pestis* antigens. III. The prophylactic value of the envelope and somatic antigens of *B. pestis* //Brit. J. Exp. Pathol. – 1939. – Vol.19. – P.293-298.
1197. Sebbane F., Devalckenaere A., Foulon J. *et al.* Silencing and reactivation of urease in *Yersinia pestis* is determined by one G residue at a specific position in the ureD gene //Infect Immun. – 2002. – Vol.69, No.1. – P.170-176.
1198. Sertic V., Boulgacow N. Lysines du bacteriophage presentant differentes thermo-resistances //C.R. Soc. Biol. – 1931. – Vol.108. – P.948.
1199. Seto Y.J., Hsieh S.T. Microwave induced growth effects in E.coli //Proc.28th Annu. Conf. Eng. Med. a Biol., New Orleans. La, 1975. – Vol.17. - P. 208.

1200. Sheppard D., Englesberg E. Positive control in the L-arabinose gene–enzyme complex of *Escherichia coli* B/r exhibited with stable merodiploids //Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. - 1966. – Vol.31. – P.345–347.
1201. Shibayama C. Über die Agglutination des Pestbacillus //Zbl. Bakt. – 1 Abt. Orig. – 1905. – Vol.38, No.4. – S.482-491.
1202. Sikkema D.J., Brubaker R.R. Resistance to pesticin, storage of iron and invasion of *HeLa* cells by *Yersinia* //Infect. Immun. – 1987. – Vol.55, No.3. – P.572-578.
1203. Simonet M., Berche P. *In vivo* immunosuppression induced by a virulent strain of *Yersinia pseudotuberculosis* //Ann. Inst. Pasteur (Microbiol.). - 1986. - Vol.138B. – P. 207-210.
1204. Simonet M., Mazigh J., Berche P. Growth of *Yersinia pseudotuberculosis* in mouse spleen, despite loss a virulence plasmid of mol.wt. $47 \cdot 10^6$ //J. Med. Microbiol. – 1984. – Vol.18. – P.371-375.
1205. Simonet M., Riot B., Fortineau N., Berche P. Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an *IS-200*-like element within the *inv* gene //Infect. Immun. – 1996. – Vol. 64. – P.375-379.
1206. Simpson W.J., Thomas R.E., Schwan T.G. Recombinant capsular antigen (fraction 1) from *Yersinia pestis* induces a protective antibody response in BALB/c mice //Am. J. Trop. Med. Hyg. – 1990. – Vol.43. – P. – 389-396.
1207. Skurnik M. Studies on the virulence plasmids of *Yersinia* species //Acta Univ. Ouluen. - 1985. – No.169. – P. 1-61.
1208. Skurnik M., Wolf-Watz H. Analysis of the *yopA* gene encoding the *YopI* virulence determinants of *Yerinia spp* //Mol. Microbiol. – 1989. - V.3(4) .-. P.517-529.
1209. Skurnik M., Peipp A., Ervelä E. Characterization of the O-antigen gene cluster of *Yersinia pseudotuberculosis* and 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 //Mol. Microbiol. – 2000. – Vol.37. - .316-330.
1210. Smith D.A. Absence of lysogeny in *Pasteurella pestis* //Nature. – 1961. – Vol.191, N4787. – P.522-523.
1211. Smith D., Burrows T. Phage and bacteriocin investigations with *P.pestis* and other bacteria //Nature. – 1962. – Vol.193, N4813. – P.397-398.

1212. Sodeinde O.A., Sample A.K., Brubaker R.R., Goguen J.D. Plasminogen activator/coagulase gene of *Yersinia pestis* is responsible for degradation of plasmid-encoded outer membrane proteins //Infect. Immun. -1988. – Vol.56, N 10. – P.2749-2752.
1213. Sodeinde O.A., Goguen J.D. Nucleotide sequence of plasminogen activator gene of *Yersinia pestis*: relationship to *ompT* of *Escherichia coli* and gene *E Salmonella typhimurium* //Infect. Immun. – 1989. – Vol.57. – P.1517-1523.
1214. Soergel M.E., Schaffer F.L., Blank H.F. Solid-phase radioimmunoassay for detection of plague antigen in animal tissues //J. Clin Microbiol. – 1982. – Vol.16. – P.953-956.
1215. Song, Y., Tong, Z., Wang, J. *et al.* Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans //DNA Res. – 2004. – Vol.11, No.3. – P. 179-197.
1216. Sorokin V.M., Pavlovich N.V., Prosorova L.A. *Francisella tularensis* resistance to bactericidal action of human normal serum //First International confer. on Tularemia: Abstr. oral and post. present. (Umea universitet). - Umea,1995. - P.12.
1217. Spector M.P. The starvation-stress response (SSR) of *Salmonella* //Adv. Microb. Physiol. – 1998. – Vol.40. – P.233-279.
1218. Spivack M.Z., Foster L., Larson A. *et al.* The immune response of the guinea pig to the antigens of *Pasteurella pestis* //J. Immunol. – 1958. – Vol.80. – P.132-141.
1219. Staats J. Standardized nomenclature for inbred strains of mice: fifth listing . //Cancer Res. – 1972 – Vol. 32. - P.1609-1646.
1220. Staats J. Standardized nomenclature for inbred strains of mice: seventh listing for the International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice //Cancer Res. – 1980. – Vol.40, No.7. – 2083-2128.
1221. Staggs T.M., Fetherston J.D., Perry R.D. Pleiotropic effects of a *Yersinia pestis fur* mutation //J. Bacteriol. - 1994. – Vol.176, N 24. – P.7614-7624.
1222. Steinert M., Emödy L., Amann R., Hacker J. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii* //Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – Vol.63, No.5. – P.2047-2053.
1223. Storer J.D. Acute responses to ionizing radiation //Biology of the laboratory mouse /Ed. E.L. Green. N.-Y.: McGraw-Hill, 1966. – P. 427-446.

1224. Storer J.D. Longevity and gross pathology at death in 22 inbred mousestrains //J.Gerontol. – 1966. - Vol.21. – P.404-409.
1225. Straley S.C., Bowmer W.S. Virulence genes regulated at the transcriptional level by Ca^{2+} in *Y. pestis* include structural genes for outer membrane proteins //Infect. Immun. – 1986. - Vol. 51. - P.445-454.
1226. Straley S., Cibull M. Differential clearance and host pathogen interactions of YopE⁻ and YopK⁻, YopL⁻ *Yersinia pestis* in *Balb/c* mice //Infect. Immun. - 1989. – Vol.57, - N 4. – P.1200-1210.
1227. Stratton J.M., Brown J.N. Agricultural records in Britain. Yavdden, Conn.: Archon, 1979.
1228. Suleimenov B.M., Atshabar B.B. Mechanism of transmission of *Yersinia pestis* //7th Int. Congr. on Yersinia. – Nijmegen, 1998. - Abstracts / Ned. Tijdschr. voor Med. Microbiol. - 1998. –Suppl II. – Vol.6. - Abstr. S.42. - P.126
1229. Surgalla M.L. Properties of virulent and avirulent strains of *Pasteurella pestis* //Ann. N.Y. Acad. Sci. - 1960. – Vol.88. – P.1136-1145.
1230. Taylor R.K., Hall M.N., Enquist L., Silhavy Th. Identification of OmpR: a positive regulatory protein controlling expression of the major outer membrane matrix porin proteins of *Escherichia coli* K-12 //J. Bacteriol. - 1981. – Vol.147, No. 1. – P.255-258.
1231. Thal E. Relations immunologiques entre *P. pestis* et *P. pseudotuberculosis* //Ann. Inst. Pasteur. – 1956. – Vol.91, No.1. – P.68-74.
1232. Thanassi D.G., Saulino E.T., Hultgren S.J. The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway //Curr. Opin. Microbiol. – 1998a. – Vol.1., No.2. – P.223-231.
1233. Thanassi D.G., Saulino E.T., Lombardo M.J. *et al.* The Pap C usher forms an oligomeric channel: implications for pilus biogenesis across the outer membrane //Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1998b. – Vol.95. – P.3146-3151.
1234. Thomas M, Gilbert P., Cuccui J., *et al.* Absence of *Yersinia pestis*-specific DNA in human teeth from five European excavations of putative plague victims //Microbiology. – 2004. - Vol. 150. - P.341-354.

1235. Thomas X., Destoumieux-Garzón D., Peduzzi J. *et al.* Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity //J. Biol. Chem. – 2004. – Vol.279, No.27. – P.28233-28242.
1236. Thullier P., Guglielmo V., Rajerison M., Chanteau S. Serodiagnosis of plague in humans and rats using a rapid test //Am. J. Trop. Med. Hyg. – 2003. – Vol.69, No.4. – P.450-451.
1237. Titball R.W., Howells A.M., Oyston P.C.F., Williamson E.D. Expression of the *Yersinia pestis* capsular antigen (F1 antigen) on the surface of an *aroA* mutant of *Salmonella typhimurium* induces high levels of protection against plague //Infect. Immun. – 1997. – Vol.65. – P.1926-1930.
1238. Titball R.W., Williamson E.D. Vaccination against bubonic and pneumonic plague //Vaccine. - 2001. – Vol.19. – P.4175-4184.
1239. Tito M.A., Miller J., Griffin K.F. *et al.* Macromolecular organization of the *Yersinia pestis* capsular F1 antigen: insights from time-of-flight mass spectrometry //Protein Sci. – 2001. – Vol. 10. – P.2408-2413.
1240. Tomaso H., Reisinger E.C., Al Dahouk S. *et al.* Rapid detection of *Yersinia pestis* with multiplex real-time *PCR* assays using fluorescent hybridisation probes //FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2003. – Vol.39, No.2. – P117-126.
1241. Tong Z., Zhou D., Song Y. *et al.* Pseudogene accumulation might promote the adaptive microevolution of *Yersinia pestis* //J. Med. Microbiol. – 2005. – Vol.54. – P.259-268.
1242. Torres-Cabassa A.S., Gottesman S. Capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12 is regulated by proteolysis //J. Bacteriol. – 1987. – Vol.169, No.3. – P.981-989.
1243. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1979. - V.76, No.9. - P.4350–4354
1244. Trukhachev A., Lebedeva S., Arsen'eva T., Ivanova V. Detection of typical and atypical strains of *Yersinia pestis* with the help of *PCR* //«*Yersinia* - 2006»: Abstracts 9th Intern. Sympos. on *Yersinia*. – Lexington, Kentucky, 2006. – P.74. - A113.
1245. Tsao S.G., Brunk C.F., Pearlman R.E. Hybridization of nucleic acids directly in agarose gels //Anal. Biochem. – 1983. – Vol. 131, No.2. – P. 365-372.

1246. Tsubokura M., Aleksič S. A simplified antigenic scheme for serotyping of *Yersinia pseudotuberculosis*: phenotypic characterization of reference strains and preparation of O and H factor sera //Contrib. Microbiol. Immunol. Basel, Karger, 1995. – Vol.13. – P.99-105.
1247. Tsukano H., Itoh K., Susuki S., Watanabe H. Detection and identification of *Yersinia pestis* by polymerase chain reaction (PCR) using multiplex primers //Microbiol.Immunol. – 1996. – Vol.40, No.10. – P.773-775.
1248. Tsukano H., Wake A., Sakakibara Y. Plasmid-like properties of the four virulence-associated factors of *Yersinia pestis* //Microbiol. Immunol. – 1986. - Vol.30, No.9. – P. 837-848.
1249. Une T., Brubaker R.R. Roles of V antigen in promoting virulence and immunity in *Yersiniae* //J. Immunol. - 1984. – Vol.133. – P. 2226-2230.
1250. . Valyvaloo V., Jarren C., Sebbane F. *et al.* Gene expression profile of *Yersinia* biofilm in flea vector //«Yersinia -2006»: Abstract 9th Intern. Sympos. on *Yersinia*. – Lexington, Kentucky, 2006. – S8:4. – P.25.
1251. Van Oss C.J. Phagocytosis as a surface phenomenon //Ann. Rev. Microbiol. – 1978. – Vol.32. – P.19-39
1252. Vasilieva G.I., Kozlovsky V.N., Kiseleva A.K. *et al.* Role of apoptosis of phagocytic cells in the development of immunodeficiency in plague //Advances in experimental medicine and biologiae. The genus *Yersinia* / Ed. M.Skurnic, J.Bengoecher, K.Gransfors - Turku, Finland, 2002. – Vol.529. - P.181-183.
1253. Vinogradov E.V., Lindner B., Kocharova N.A. *et al.* The core structure of the lipopolysaccharide from the causative agent of plague, *Yersinia pestis* //Carbohydr. Res. – 2002. – Vol. 337. – P.775-777.
1254. Vorontsov E.D., Dubichev A.G., Serdobintsev L.N., Naumov A.V. Association-dissociation processes and supermolecular organization of the capsule antigen (protein F1) of *Yersinia pestis* //Biomed. Sci. – 1990. – Vol.1., No.4. – P.391-396.
1255. Wake A., Maruyama T., Akiyama K., Yamamoto M. The role of virulence antigens (VW) in the protection of mice against *Yersinia pestis* infection //Curr. Microbiol. – 1983. – Vol.8, No.1. – P.73-77.

1256. Walker R.V. Studies on the immune response of guinea pigs to the envelope substance of *P.pestis*. II Fluorescent antibody studies of cellular and tissue response in mice and guinea pigs to large doses of fraction 1 //J.Immunol. – 1962. – Vol.88. – P.164-173.
1257. Warren J., Walz U., Reedal J.S., Ajl S.J. Studies on plague. II. Immunological properties of purified *Pasteurella pestis* toxin //J. Bacteriol. – 1955. – Vol.70, No.2. – P.170-176.
1258. Wasserburger H.J. Beitrage zur histologic und mikroskopischen Anatomie von *Xenopsilla cheopis Rothschild* (Aphaniptera) //Deutsch. Entomol. – 1961. – No.2. – S.373-414.
1259. Watson J., Riblet R. Genetic control of responses to bacterial lipopolysaccharides in mice. I. Evidence of a single gene that influences mitogenic and immunogenic responses to lipopolysaccharides. //J. Exp. Med. – 1974. – Vol. 140, No.1. – P.1147-1161.
1260. Weinbach R. Die Verwandbarkeit formolbehandelter Erythrocyten als Antigenträger in der indirekten Haemagglutination //Schweiz. Z. Path. Bakt. – 1958. – Vol.21. – S.1043-1052.
1261. Welcos S.L., Andrevs G. Mu d1 insertion mutagenesis of F1-capsule encoding plasmid pFra *Yersinia pestis* //Abstracts of the 95th General Meeting of the American asociety for Microbiology. – Washington, 1995. – P.212.
1262. Welkos S.L., Davis K.M., Pitt L.M. *et al.* Studies on the contribution of the F1 capsule-associated plasmid pFra to the virulence of *Yersinia pestis* //Contrib. Microbiol. Immunol.- 1995. – Vol. 13. – P.299-305.
1263. Whitesides M.D., Oliver J.D. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state //Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – Vol.63. – P.1002-1005.
1264. Williams J.E., Cavanaugh D.C. Potencial for rat plague from nonencapsulated variants of the plague bacillus (*Yersinia pestis*) //Experientia – 1984. – Vol.40. – P.739-740.
1265. Williams J.E, Gentry M.K., Braden C.A. *et al.* Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure antigenaemia during acute plague //Bull. World. Health Org. – 1984. – Vol.62. – P463-466.

1266. Williams J.E., Gentry M.K., Braden C.A. *et al.* A monoclonal antibody for the specific diagnosis of plague //Bull. World. Health Org. – 1988. – Vol.66, No.1. – P.77-82.
1267. Williams J.E., Harrison D.N., Quan T.J. *et al.* Atypical plague bacilli isolated from rodents fleas and man //Am. J. Public Health. - 1978. – Vol.68. – P.262-264.
1268. Williams R.C., Gewürz H., Quie P.G. Effect of fraction I from *Yersinia pestis* on phagocytosis *in vitro* //J. Infect. Dis. - 1972. – Vol.126, No. 3. – P.235-241.
1269. Wimer R.E., Fuller J.L. Patterns behavior //Biology of the laboratory mouse/Ed. T.L. Green. - N.Y.: McGraw-Hill, 1966. – P. 629-654.
1270. Winter C., Cherry W., Moody M. An unusual strain of *Pasteurella pestis* isolated from a fatal human case of plague //Bull. World. Health Org.. – 1960. – Vol.23. – P.408-409.
1271. Winter C.C., Moody M.D. Production of specific antiserum with whole cell *Pasteurella pestis* antigen //J. Infect. Dis. – 1959. – Vol. 104, No.3. – P.274-281
1272. Winter C.C., Moody M.D. Specific identification of *Pasteurella pestis* in dried smears //J. Infect. Dis. – 1959a – Vol. 104, No. 3. – P.281-287.
1273. Woron A.M. Nasarian E.J., Egan C. *et al.* Development and evaluation of a 4-target multiplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection and characterization of *Yersinia pestis* //Diagn. Microbiol. Infect.Dis. – 2006. – Vol.56, No 3. – P.261-268.
1274. Worsham P.L., Hunter M. Characterization of *Pestoides F*, an atypical strains of *Yersinia pestis* //7th Int. Congr. on Yersinia. – Nijmegen, 1998. - Abstracts / Ned. Tijdschr. voor Med. Microbiol. - 1998. –Suppl II. – Vol.6. - Abstr. S.18.-P88.
1275. Worsham P.L., Hunter M., Mou S. *et al.* Virulence of the *Yersinia pestis* strain *Pestoides B* in the mouse and guinea pig models //«Yersinia - 2006»: Abstracts 9th Intern. Simpos. on *Yersinia*. Lexington, Kentucky, 2006. – P.52. – B56.
1276. Worsham P.L., Rosovitz M.J., Rasko D.A. *et al* *Yersinia pestis* Angola, complete genome //Direct Submission. Submitted (29-NOV-2007) The Institute for Genomic Research, 9712 Medical Center Drive, Rockville, MD20850,USA. № регистрации в Gen Bank: хромосома CP000901; pMT – pPCP CP000900.
1277. Worsham P.L., Roy C. *Pestoides F*, a *Yersinia pestis* strain, lacking plasminogen activator, is virulent by the aerosol route //The genus *Yersinia*: Entewring the

- functional Genomic Era /Ed.M.Skurnik, J.A. Bengoechea, K.Granfors: Advances in Experimental Medicine and Biology – 2003. – Vol.529. – P.129-131.
1278. Wortham B.W., Fetherson J.D., Perry R.D. *et al.* The role polyamines in biofilm formation by *Yersinia pestis* //«Yersinia - 2006»: Abstracts 9th Intern. Sympos. on *Yersinia*. – Lexington, Kentucky, 2006. – C15. – P.35.
1279. Wullf C., Uttenbogaard A., Straley S.C. A method to examine bacterial gene expression from whole organ tissues infected with fully-virulent *Yersinia pestis* //«Yersinia - 2006»: Abstracts 9th Intern. Sympos. on *Yersinia*. – Lexington, Kentucky, 2006. – B5. – P.31.
1280. Xiaodi Yu, Ganeshram R.Visweswaran, Zoe Duck *et al.* Caf1A usher possesses a caf1 subunit-like domain that is crucial for Caf1 fibre secretion //Biochem. J. Immediate Published. – 2008. - 25 Nov. – Manusc. BJ20080992
1281. Xu H.Sh., Roberts N., Singleton F.L. *et al.* Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment //Microb.Ecol. – 1982. – No.8. – 313-323
1282. Yamamoto H., Hashimoto J., Ezaki T. Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple-nutrient starvation //FEMS Microbiol. Ecol. – 1996. – Vol. 20, No.3. – P.149-154.
1283. Yersin A. La peste bubonique a Hong-Kong //Ann. Inst. Pasteur. – 1894. – Vol.8. – P.662-667.
1284. Yother J., Chamness T.W., Goguen J.D. Temperature-controlled plasmid regulon associated with low calcium response in *Yersinia pestis* //J. Bacteriol. – 1986. – Vol.165, No.2. – P.443-447.
1285. Youngren B., Radnedge L., Hu P. *et al.* A plasmid partition system of the P1-P7par family from the pMT1 virulence plasmid of *Yersinia pestis* //J. Bacteriol. – 2000. – Vol.182. – No.14. –P.3924-3928.
1286. Zaleska M., Lounatmaa K., Nurminen M. *et al.* A novel virulence- associated cell surface structure composed of 47 kD protein subunits in *Yersinia enterocolitica* //Europ. Mol. Biol. Organiz. J. – 1985. – Vol.4, No.4. – P.1013-1018.

1287. Zav'yalov V.P., Chernovskaya T.V., Navolotskaya E.V. *et al.* Specific high affinity binding of human interleukin 1 β by Caf1A usher protein of *Yersinia pestis* //FEBS Lett. – 1995a. – Vol.371, No.1. – P.65-68.
1288. Zav'yalov V.P., Denesyuk A.I., Zav'yalova G.A., Korpela T. Molecular modeling of the steric structure of the envelope F1 antigen of *Yersinia pestis*//Immunol. Lett. 1995. – Vol.45. – P.19-22.
1289. Zavialov A.V., Kersley J., Korpela T *et al.* Donor strand complementation mechanism in the biogenesis of non-pilus system //Mol. Microbiol. – 2002. – Vol.45, No.4. – P.983-995.
1290. Zhenya Fan, Xiang Z., Yunheng L *et al.* Studies on a new virulence determinant of *Yersinia pestis* //7th Int. Congr. on Yersinia. – Nijmegen, 1998. - Abstracts. / Ned. Tijdschr. voor Med. Microbiol. - 1998. –Suppl II. – Vol.6. - Abstr. S.18. - P.14.
1291. Zhenya Fan, Xiang Z., Yunheng L. *et al.* The plague of vole (*Microtus brandti*) is harmless to human being //7th Int. Congr. on Yersinia. – Nijmegen., 1998 - Abstracts. / Ned. Tijdschr. voor Med. Microbiol. - 1998. –Suppl II. – Vol.6. - Abstr. S.42. - P-127.
1292. Zhou D., Han Y., Dai E. *et al.* Identification of signature genes for rapid and specific characterization of *Yersinia pestis* //Microbiol. Immunol. – 2004a. – Vol.48, No.4. – P.263-269.
1293. Zhou D., Han Y., Song Y. *et al.* DNA microarray analysis of genome dynamics in *Yersinia pestis*: insights into bacterial genome microevolution and niche adaptation //J. Bacteriol. – 2004b. - Vol. 186, No. 15. - P.5138–5146.
1294. Zhou D., Han Y., Song Y., *et al.* Comparative and evolutionary genomics of *Yersinia pestis* //Microbes Infect. – 2004b. – Vol.6. – P.1226-1234.
1295. Zhou D., Han Y., Song Y. *et al.* Genetics of metabolic variants between *Yersinia pestis* biovars and proposal of a new biovar *microtus* //J. Bacteriol. – 2004. - V.186, N15. – P.5147 – 5152.
1296. Zitman D., Ben-Gurion R. Transduction of *Pasteurella pestis* //Virology. – 1972. – Vol.47, N2. – P.513-516.