

N.V.Popov, V.-B.-Kh.Sandzhiev, G.V.Sangadzhieva, A.I.Udovikov,
S.A.Yakovlev, T.B.Karavaeva, A.V.Podsvirov, V.V.Kutyrev

**The Impact of the Present-Day Climate Warming
upon the Evolution of the New Inter-Epidemic Period
in the Pre-Caspian North-Western Steppe Natural Plague Focus**

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov;
Elista Plague Control Station, Elista

The development of two deep depressions in the numbers of small
sousliks, observed in the 50ths – 60ths and 80ths – 90ths of the twentieth

century, was shown to be significantly contributed to by the climatic factors
in the North-Western Pre-Caspian region. The important role of the present-
day climate warming upon the evolution of the inter-epidemic period in the
North-Western Pre-Caspian steppe natural plague focus was ascertained, too.
Search for *Yersinia pestis* strains in the rodent burrows soil in the areas of
stable plague manifestations was recognized as a perspective surveillance
measure to be practiced.

Key words: Small sousliks, number dynamics, climatic factors, inter-
epizootic period, climate warming, rodent burrow soil.

Поступила 06.03.07.

МИКРОБИОЛОГИЯ И ДИАГНОСТИКА

УДК 616.981.452+576.8.097.21:599.323.4

**И.В.Бахтеева, С.В.Дентовская, Е.А.Панферцев, Т.Э.Светоч, Т.Б.Кравченко, М.Е.Платонов,
Г.М.Титарева, Т.И.Комбарова, С.А.Иванов, А.П.Анисимов**

ВИРУЛЕНТНОСТЬ ДЛЯ МЫШЕЙ РН 6⁺ И РН 6⁻ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS*

ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск

С помощью сайт-направленного мутагенеза оперона *psa*, кодирующего синтез рН 6 антигена (пилей адгезии), и последующей транс-комплементации получено два изогенных набора штаммов *Yersinia pestis*, включающих штаммы дикого типа 231 и И-1996, их рН 6⁻ неполярные мутанты с делециями структурного гена *psaA* или всего оперона, и штаммы, восстановившие способность к температурно- и рН-зависимому синтезу пилей адгезии или конститутивной продукции рН 6 антигена. Показано, что утрата способности к синтезу или конститутивная продукция рН 6 антигена не оказывают влияния на вирулентность и средние сроки жизни зараженных мышей при подкожном способе заражения.

Ключевые слова: вирулентность, *Yersinia pestis*, рН 6 антиген.

Поверхностный белок рН6 антиген синтезируется в клетках *Y. pestis* в диапазоне температур 35–41 °С и кислых условиях среды [7]. рН 6 антиген образует на клеточной поверхности *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* гомополимерные пилей адгезии [3, 13]. С одной стороны, рН 6 антиген обладает адгезивной активностью в отношении эритроцитов [6, 7] и культивируемых эпителиальных клеток млекопитающих за счет связывания с фосфатидилхолином [11]. С другой – он препятствует фагоцитозу [6], вероятно, путем экранирования бактериальной поверхности за счет способности связывать аполипопротеин В-содержащие липопротеины плазмы крови [14], фибронектин, муцин и ганглиозид [2], фосфатидилхолин легочного сурфактанта [11]. Была показана цитотоксичность рН 6 антигена для перитонеальных [7] и альвеолярных макрофагов [6], но рН 6 антиген не токсичен при подкожном введении кроликам (1000 мкг), морским свинкам (625 мкг) и мышам (100 мкг) [6].

Установлено, что *psa* оперон *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* устроен подобно другим оперонам, кодирующим пилевые адгезины, субъединицы которых секретируются на поверхность бактерий с помощью системы секреции IV типа [15], и состоит из двух регуляторных генов *psaE* и *psaF*, отвечающих за температурную (37 °С) и рН (5,8–6,0) регуляцию транскрипции, а также структурного гена *psaA* и генов *psaB* и *psaC*, кодирующих соответственно периплазматиче-

ский шаперон и молекулярный ашер [12]. Методом сайт-направленного мутагенеза показано, что вирулентность *psaE* или *psaA* мутантов аттенуированного Pgm⁻ штамма *Y. pestis* KIM5 при внутривенном заражении мышей снижалась на два порядка [12], а *psaF* мутанты штамма 231 «дикого» типа полностью утрачивали вирулентность для мышей и морских свинок при подкожном способе заражения [5].

В настоящей публикации описано получение Δ *psaA* и Δ *psaEFABC* мутантов вирулентных штаммов, последующая транскомплементация этих мутаций с помощью рекомбинантных плазмид, несущих полный (*psaEFABC*) или неполный опероны (локус *psaABC*), а затем сравнительная оценка вирулентности изогенных штаммов *Y. pestis*, отличающихся по способности синтезировать рН 6 антиген.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. Исползованные в работе штаммы *Y. pestis* и плазмиды представлены в таблице. Бактерии выращивали на питательной среде на основе сердечно-мозговой вытяжки (ВНМ), рН 7,2 или 5,8.

В случае необходимости в питательные среды добавляли антибиотики: ампициллин – 100 мкг/мл, канамицин – 40 мкг/мл, хлорамфеникол – 10 мкг/мл, полимиксин В – 100 мкг/мл.

Мутагенез. Нокаутные мутанты получали с по-

Вирулентность экспериментальных штаммов возбудителя чумы при подкожном заражении мышей

Штаммы <i>Y. pestis</i>	Характеристика	LD ₅₀ , КОЕ *	Средние сроки жизни, сут
231	Fra ⁺ Ymt ⁺ Lcr ⁺ pH 6 ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺ **	1 (1–2)	5,4 ± 0,54
231ΔpsaEFABC	Fra ⁺ Ymt ⁺ Lcr ⁺ pH 6 ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺	2 (1–5)	4,7 ± 0,95
231ΔpsaEFABCpJG428	Fra ⁺ Ymt ⁺ Lcr ⁺ pH 6 ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺	3 (1–10)	4,9 ± 0,66
231ΔpsaEFABCpIG924Cm	Fra ⁺ Ymt ⁺ Lcr ⁺ pH 6 ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺	3 (1–10)	5,5 ± 1,50
И-1996	Fra ⁺ Ymt ⁺ Lcr ⁺ pH 6 ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺	1 (1–2)	6,2 ± 0,90
И-1996ΔpsaA	Fra ⁺ Ymt ⁺ Lcr ⁺ pH 6 ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺	4 (1–16)	5,7 ± 1,10
И-1996ΔpsaEFABC	Fra ⁺ Ymt ⁺ Lcr ⁺ pH 6 ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺	3 (1–13)	4,9 ± 1,20
И-1996ΔpsaEFABCpIG924Cm	Fra ⁺ Ymt ⁺ Lcr ⁺ pH 6 ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺	1 (1–5)	7,1 ± 0,90

* В круглых скобках представлен 95 % доверительный интервал.

** Способность к продукции: Fra – капсульного антигена, Ymt – мышинного токсина, Lcr – Yop белков и V антигена, р Н6 – р Н6 антигена, Pla – активатора плазминогена; Pgm – сочетанная способность к сорбции гемина и чувствительности к пестицину.

мощью технологии одноэтапной инактивации хромосомных генов [8] или плазмид на основе суицидного вектора pCVD442 [9]. Верификацию замены генов проводили с помощью полимеразой цепной реакции. Отсутствие продукции рН 6 антигена подтверждали методом иммуноблоттинга.

Комплементацию нокаутных мутаций проводили с помощью плазмиды pJG428 (Ap^RTc^R), включающей полный оперон *psaEFABC*, клонированный в составе вектора рНС79 [14] или плазмиды pIG-B924Cm (Cm^R), несущей гены *psaABC* и ген *cat* из плазмиды pBR325 в составе вектора pBluescriptIIKS (MBI Fermentas).

Оценку вирулентности проводили на 6–8-недельных самках линейных мышей Balb/c. По пять мышей на одну дозу заражали подкожно введением 10-кратных разведений 28-градусных культур *Y. pestis* в изотоническом растворе NaCl в объеме 0,1 мл на животное. Наблюдение за зараженными животными проводили в течение 21 сут. Погибших животных вскрывали и подвергали бактериологическому исследованию. Выделенные культуры *Y. pestis* проверяли на наличие маркеров лекарственной устойчивости и способность к продукции рН 6 антигена. Вычисление величин LD₅₀ проводили по методу Kärber в модификации И.П.Ашмарина и А.А.Воробьева [1].

Результаты и обсуждение

Учитывая значительное несовпадение данных по влиянию на вирулентность мутаций по различным генам *psa* оперона, полученных с использованием отличающихся по вирулентности и выделенных в географически удаленных природных очагах чумы штаммов *Y. pestis* при различных способах заражения [5, 12], мы выбрали для наших экспериментов два высоковирулентных штамма *bv. antiqua*, 231 и И-1996. Первый из них был ранее использован в аналогичных экспериментах [5], а нуклеотидная последовательность его *psa* оперона (номер доступа в GenBank – EF079883) полностью соответствует таковым в секвенированных геномах других штаммов *Y. pestis* (<http://www.ericbr.org/portal/eric/yersiniapestis?id=enteropathogens&subid=yersiniape>

stis). Сайт-направленный мутагенез позволил получить на основе обоих штаммов производные с делециями полного оперона и вариант штамма И-1996, лишенный структурного гена *psaA*. Мутанты *Y. pestis* 231Δ*psaA* получить не удалось.

Передача плазмид pJG428 или pIG924Cm в штамм *Y. pestis* И-1996Δ*psaA* не приводила к восстановлению продукции рН 6 антигена. Передача плазмид pJG428 или pIG924Cm в клетки мутантов обоих штаммов чумного микроба, полностью лишенных *psa* оперона (Δ*psaEFABC*), обеспечивала восстановление синтеза рН 6 антигена. Аналогичные результаты были получены в серии предварительных экспериментов (данные не приводятся) – при передаче указанных плазмид в клетки Δ*psaEF* и Δ*psaA* мутантов аттенуированных штаммов *Y. pestis* и Δ*psaA* мутантов *Y. pseudotuberculosis* продукция рН 6 антигена не восстанавливалась. Однако экспрессия полного или укороченного *psa* оперона выявлена в клетках *Y. enterocolitica* с интактным *myfF* опероном. Как и в клетках *E. coli* (данные не приводятся), плаزمида pIG924Cm, лишенная регуляторных генов *psaE* и *psaF*, обеспечивала в клетках Δ*psaEFABC* мутантов *Y. pestis* конститутивный синтез рН 6 антигена в диапазоне исследованных температур выращивания от 28 до 37 °С при рН питательной среды от 5,8 до 7,2.

Двукратная анимализация штаммов *Y. pestis* 231Δ*psaEFABC*pJG428, 231Δ*psaEFABC*pIG924Cm и И-1996Δ*psaEFABC*pIG924Cm путем подкожного заражения мышей 10⁸ КОЕ без их лечения антибиотиками позволила получить от некоторых животных культуры исследуемых штаммов, 100 % клонов которых сохранили маркеры лекарственной устойчивости и способность к продукции рН 6 антигена. Известно, что рекомбинантные плазмиды на основе репликона ColE1 (рНС79, pBR322) не способны стабильно наследоваться в клетках *Y. pestis* без селективного давления [10]. Однако аналогичную нашим данным картину стабилизации наследования плазмиды pFS1, кодирующей синтез другого пилевого адгезина *Y. pestis* – капсульного антигена F1 и сконструированной на основе того же космидного вектора – рНС79, наблюдала Т.А.Гремякова при пассировании через организм

мышей штамма *Salmonella enterica* bv. Typhimurium SL3261pFS1 [4]. Поскольку отбор рН 6⁺ и/или F1⁺ клонов в организме теплокровного хозяина свидетельствует о селективных преимуществах бактериальных клеток, продуцирующих пилевые адгезины, это послужило основанием для оценки вирулентности всех рекомбинантных штаммов без введения экспериментально зараженным животным антибиотиков.

Сравнительная оценка вирулентности исследуемых штаммов *Y. pestis* для лабораторных животных при подкожном способе заражения не выявила различий в величинах LD₅₀ штаммов «дикого» типа, а также всех сконструированных нами рН 6⁻ и рН 6⁺ вариантов (таблица). Средние сроки жизни мышей, погибших в результате заражения штаммами 231 и И-1996 или их изогенными производными, практически не отличались. Эти данные согласуются с результатами изучения влияния на вирулентность другого антигена *Y. pestis* – F1, который так же, как и рН6 антиген, относится к семейству пилевых адгезинов и обладает антифагоцитарной активностью. Сайт-направленные мутации, нарушающие продукцию капсульного F1 антигена не снижали вирулентность *Y. pestis* в отношении мышей и морских свинок [10]. Вероятно, в случае утраты любого из этих антигенов мутации функционально комплементировались усилением продукции одного или нескольких из восьми других пилевых адгезинов, опероны которых выявлены в геноме *Y. pestis*.

Представленные в настоящей работе данные о необязательности наличия рН 6 антигена в клетках чумного микроба для «полной» вирулентности *Y. pestis* противоречат данным более ранних исследований по оценке вирулентности рН 6⁻ вариантов возбудителя чумы [5, 12]. Использование Lindler *et al.* [12] Pgm⁻ штамма KIM5 позволяет нам предположить, что 200-кратное снижение вирулентности его рН 6⁻ производного при внутривенном заражении мышей может быть связано именно со сниженной вирулентностью исходного штамма, способного вызывать генерализованную инфекцию с летальным исходом только при внутривенном заражении. На наш взгляд, накопление в штамме дикого типа мутаций, потенциально снижающих его способность эффективно размножаться в организме хозяина, до какого-то времени компенсируется наличием широкого набора факторов патогенности *Y. pestis*. Поэтапная элиминация этих факторов из микробной клетки на определенной стадии приводит к невозможности компенсации их утраты за счет сверхпродукции оставшихся, что проявляется в значительном снижении вирулентности.

Что же касается разительных отличий в вирулентности рН 6⁻ мутантов, полученных на основе вирулентного штамма 231, то здесь возможно два объяснения. Не исключено, что в экспериментах Панферцева и соавт. [5] был использован субклон исходного штамма 231, в популяции которого вследствие неоднократных пересевов на искусственных

питательных средах без периодической анимализации произошло накопление неидентифицированных мутаций, потенциально снижающих его способность эффективно размножаться в организме хозяина. Утрата еще одного фактора патогенности привела к полной потере вирулентности при подкожном способе заражения. Также возможно, что мутация по гену *psaF* приводила не только к прекращению продукции рН 6 антигена [5], но и оказывала полярный эффект на опероны других пилевых адгезинов *Y. pestis*, что могло стать причиной угнетения их продукции и соответствующей утраты вирулентности. В пользу этого предположения свидетельствует невозможность транскомплементации $\Delta psaeF$ и $\Delta psaa$ мутаций *Y. pestis* с помощью генов *psaABC* или полного *psa* оперона (настоящая работа).

Таким образом, утрата способности продуцировать рН 6 антиген не влияет на вирулентность $\Delta psaeF$ и $\Delta psaeFABC$ мутантов *Y. pestis* при подкожном способе заражения мышей, что свидетельствует о неперспективности использования рН 6 антигена в качестве молекулярной мишени для терапии чумы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях – Л.: Гос. изд-во мед. лит-ры, 1962. – С. 85–104. – 2. Водопоьянов С.О., Атарова Г.Т., Олейников И.П. и др. // ЖМЭИ. – 1993. – № 3 – С. 6–12. – 3. Водопоьянов С.О., Попова Г.О., Васильева Г.И. и др. // ЖМЭИ. – 1990. – № 3. – С. 3–6. – 4. Гремякова Т.А. Структурно-функциональная variability антигенов *Yersinia pestis* и методология конструирования противочумных иммунопрофилактических препаратов: Дис. ... докт. мед. наук. – М., 2004. – 320 с. – 5. Панферцев Е.А., Черепанов П.А., Каримова Г.А. // Матер. XIV науч.-практ. конф.: Тез. докл. (21–23 мая 1991 г. Оболенск). – Оболенск, 1991 – С. 22–24. – 6. Степаншина В.Н., Гремякова Т.А., Анисимов А.П. и др. // ЖМЭИ. – 1993. – № 3. – С. 12–17. – 7. Bichowsky-Slomnicki L., Ben-Efraim S. // J. Bacteriol. – 1963. – Vol. 86. – P. 101–111. – 8. Datsenko K.A., Wanner B.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 6640–6645. – 9. Donnenberg M.S., Kaper J.B. // Infect. Immun. – 1991. – Vol. 29. – P. 4310–4317. – 10. Drozdov I.G., Anisimov A.P., Samoilo-va S.V. *et al.* // J. Med. Microbiol. – 1995. – Vol. 42. – P. 264–268. – 11. Galván E.M., Chen H., Schifferli D.M. // Infect. Immun. – 2007. – Vol. 75. – P. 1272–1279. – 12. Lindler L.E., Klempner M.S., Straley S.C. // Infect. Immun. – 1990. – Vol. 58. – P. 2569–2577. – 13. Lindler L.E., Tall B.D. // Mol. Microbiol. – 1993. – Vol. 8. – P. 311–324. – 14. Makoveichuk E., Cherepanov P., Lundberg S. *et al.* // J. Lipid. Res. – 2003. – Vol. 44. – P. 320–330. – 15. Pizarro-Cerda J., Cossart P. // Cell. – 2006. – Vol. 124. – P. 715–727.

I.V. Bakhteyeva, S.V. Dentovskaya, E.A. Panfertsev, T.E. Svetoch,
T.B. Kravchenko, M.E. Platonov, G.M. Titareva, T.I. Kombarova,
S.A. Ivanov, A.P. Anisimov

Virulence for Mice of pH6⁺ and pH6⁻ *Yersinia pestis* Strains

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

The technique of site-directed mutagenesis of *psa* operon encoding the synthesis of pH6 antigen (adhesion pili), followed by the trans-complementation procedure were used to construct two sets of isogenic *Yersinia pestis* strains including wild type strains 231 and I-1996, their non-polar pH6⁻ mutants containing deletions in the structural *psaA* gene or in the entire operon, as well as the strains which could recover their capability for temperature- and pH-dependent synthesis of the adhesion pili or the constitutive pH6 antigen production. The loss of the ability to synthesize the pH6 antigen and its constitutive production was shown to affect neither their virulence characteristics nor mean lifetime assessments for the subcutaneously infected mice.

Key words: virulence, *Yersinia pestis*, pH6 antigen.

Поступила 29.10.07.