

На правах рукописи

ШОПЫРЕВА Софья Витальевна

РГБ ОД

22 МАЯ 2003

***VIBRIO CHOLERAЕ* НЕ O1/НЕ O139: ГЕНЕТИЧЕСКОЕ
КАРТИРОВАНИЕ ХРОМОСОМЫ И ИЗУЧЕНИЕ
ВОЗМОЖНОСТИ ОБМЕНА ГЕНАМИ O-АНТИГЕНА
МЕЖДУ ХОЛЕРНЫМИ ВИБРИОНАМИ РАЗНЫХ СЕРОГРУПП**

03.00.07 - микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Саратов - 2000

Работа выполнена в Российском научно-исследовательском противочумном институте "Микроб" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Смирнова Н.И.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

Щербаков А.А.

кандидат медицинских наук, старший

научный сотрудник

Саяпина Л.В.

Ведущая организация:

Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт

Защита состоится "31" мая 2000 г. в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д074.32.01 при Российском научно-исследовательском противочумном институте "Микроб" Министерства здравоохранения Российской Федерации (410005 Саратов, Университетская, 46)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке института "Микроб"

Автореферат разослан "21" апреля 2000г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор биологических наук, профессор

Корнеев Г.А.

Е 441.136, 0

9 1267.009

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ. *Vibrio cholerae* является гетерогенным видом, состоящим из штаммов, относящихся к 200 различным серогруппам, каждая из которых характеризуется своим собственным О-антигеном (Beltran et al., 1999). До недавнего времени холерные эпидемии вызывались лишь токсигенными штаммами *V. cholerae* серогруппы О1. Холерные вибрионы других серогрупп, не агглютинирующиеся холерной видоспецифической О1-сывороткой (неагглютинирующиеся или НАГ-вибрионы), вызывали лишь локальные вспышки или отдельные случаи гастроэнтеритов, энтеритов, энтероколитов и т.д. (Дунаев, 1974; Щуркина И.И., 1982; Воронежская Л.Г., 1994; Bask et al., 1974; Finch et al., 1987; Kamal, 1971; Karer et al., 1986; Morris et al., 1981; Safrin et al., 1988; Holl et al., 1993). Однако к настоящему времени установлено, что существует по крайней мере два эпидемически опасных штамма, имеющих не О1-антиген: *V. cholerae* О139 (Бенгал) и *V. cholerae* О37. Результаты молекулярно-генетических исследований указанных возбудителей холеры свидетельствуют о возможном их происхождении от холерных вибрионов О1-серогруппы, у которых собственные гены О1-антигена в процессе горизонтального переноса генов были замещены генами О139- или О37-антигена (Bik, 1995).

Появление эпидемически опасных штаммов среди *V. cholerae* не О1-серогруппы обусловило большой интерес исследователей к этим вибрионам, которые были обозначены как *V. cholerae* не О1/не О139. К настоящему времени известно о присутствии в их хромосоме мобильных генетических элементов, с которыми могут быть связаны события, приводящие к формированию штаммов с новыми свойствами. Так, в 1994 году A. Baker et al. впервые обнаружили в хромосоме *V. cholerae* не О1/не О139 большое число копий (60-100 копий) прямо повторяющихся последовательностей VCR, которые являются интегрон-подобными структурами, обеспечивающими интеграцию чужеродной ДНК в хромосому вибрионов. (Mazel et al., 1998). Особый интерес представляют данные о том, что некоторые штаммы *V. cholerae* не О1/не О139 содержат в хромосоме гены двух умеренных нитевидных фагов СТХф и VP1ф с ключевыми генами вирулентности возбудителей холеры О1- и О139-серогрупп *ctxAB* и *tcp*, кодирующими биосинтез холерного токсина и ток-

син-корегулируемых пилей адгезии (Karaolis et al., 1999, Novais et al., 1999). Обнаружение таких штаммов с фагами СТХф и VPIф среди природных штаммов *V. cholerae* не O1/не O139, которые в более чем 90,0 % случаев не имеют структурных генов холерного токсина, может, видимо, указывать на существование формальной возможности переноса генов *ctxAB* и *tcp* от возбудителей холеры в ранее нетоксигенные штаммы неагглютинирующихся вибрионов.

Второй путь формирования токсигенных штаммов *V. cholerae* не O1/не O139 может, видимо, состоять в приобретении вирулентными штаммами *V. cholerae* O1 и O139 генов *rfb*, контролирующих биосинтез O-антигенов других серогрупп, от *V. cholerae* не O1/не O139 в процессе конъюгации или трансдукции. Однако прямых доказательств наличия указанных процессов в природе пока нет. Что касается сведений, полученных в модельных опытах *in vivo* и *in vitro*, то их очень мало. Лишь в работах К. Bhaskaran (1971) и Е.А. Журавлевой, Н.И. Смирновой (1992) показано, что *V. cholerae* O1 могут быть реципиентами *rfb* генов *V. cholerae* не O1/не O139. Однако донором этих генов был штамм, являющийся производным холерного вибриона эльтор, спонтанно утратившим способность продуцировать O1-антиген. В этой связи существует принципиальная необходимость дальнейшего экспериментального исследования вопроса о генетических связях природных штаммов *V. cholerae* не O1/не O139 с возбудителями холеры O1- и O139-серогрупп. Одним из основных путей его решения является генетическое картирование хромосомы *V. cholerae* не O1/не O139 и сопоставление полученных данных с ранее построенными генетическими картами хромосом *V. cholerae* O1 и O139. Но проведение таких исследований невозможно без предварительного создания конъюгационной системы, состоящей из эффективных донорных и полимаркированных реципиентных штаммов *V. cholerae* не O1/не O139. Разработка конъюгационной системы переноса генетической информации у этих вибрионов, которая до сих пор отсутствует, позволит также получить важные сведения о возможности перехода эпидемически опасных штаммов O1- и O139-серогрупп в *V. cholerae* не O1/не O139, сохранившие их вирулентные свойства.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ - генетическое картирование хромосомы природного авирулентного штамма *Vibrio cholerae* не O1/не O139 с помощью конъюгационных скрещиваний и изучение возможности обмена генами O-антигена между холерными вибрионами разных серогрупп.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:

1. На модели природного авирулентного штамма *V. cholerae* O2-серогруппы разработать конъюгационную систему, состоящую из донорных и реципиентных штаммов.

2. На основе конъюгационных скрещиваний построить генетическую карту двух хромосомных участков природного авирулентного штамма *V. cholerae* O2; сопоставить генетические карты *V. cholerae* различных серогрупп для выявления сходства или различий между ними.

3. Изучить возможность обмена генами O-антигена между *V. cholerae* разных серогрупп; выяснить влияние чужеродных генов O-антигена на экспрессию собственных генов вирулентности в клетках нового хозяина.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Для генетического анализа природных штаммов *V. cholerae* не O1/не O139-серогруппы впервые создана конъюгационная система, состоящая из изогенных реципиентных и донорных штаммов. В хромосому штамма *V. cholerae* O2-серогруппы введено 36 мутаций в гены, контролирурующие биосинтез различных аминокислот, оснований и витаминов, а также O-антигена и термолабильного гемолизина. Донорные штаммы, сконструированные с помощью бинарной системы Tn5-Mob-pRP4-4, соответствуют Hfr-типу и имеют различные точки начала переноса хромосомы.

В результате использования разработанной конъюгационной системы впервые построена генетическая карта двух участков хромосомы природного авирулентного штамма *V. cholerae* не O1/не O139, включающая 22 генетических маркера. Сравнительный анализ генетических карт холерных вибрионов разных серогрупп (O1, O139, не O1/не O139) выявил их значительное сходство. Установлена также локализация на хромосоме *V. cholerae* не O1/не O139 *rfb*-генов, контролирующих биосинтез O-антигена, вблизи генов *ura*, *ilv*, *pur*. Эти

данные в сравнении с результатами работ по картированию генов O1- и O139-антигенов дают основание заключить, что независимо от серогруппы и эпидемической значимости различных штаммов холерных вибрионов гены O-антигенов расположены в одной и той же области хромосомы.

Новыми являются данные о переносе и экспрессии генов, контролирующих синтез O-антигена, от природных авирулентных штаммов *V. cholerae* не O1/не O139 к токсигенным штаммам *V. cholerae* O1-серогруппы биоваров классического и эльтор в условиях *in vivo* и *in vitro*, а также к возбудителю холеры новой O139-серогруппы. Установлено, что чужеродные гены O-антигена не влияют на экспрессию собственных генов вирулентности в клетках нового хозяина. Полученные результаты вносят существенный вклад в изучение механизма формирования токсигенных неагглютинирующихся вибрионов, позволяя полагать, что в природных условиях источником таких штаммов могут быть вирулентные штаммы *V. cholerae* O1 и O139, поскольку последние могут приобретать гены O-антигенов других серогрупп.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Депонирована в Государственной Коллекции Патогенных Бактерий РосНИПЧИ "Микроб" созданная коллекция изогенных штаммов *V. cholerae* не O1/не O139, состоящая из двух Hfr-доноров с различными точками начала переноса хромосомных маркеров и восьми реципиентов, несущих мутации в генах, контролирующих различные факторы роста, O-антигена, термолабильного гемолизина.

Созданная уникальная коллекция штаммов является основой для последующего генетического анализа хромосомы неагглютинирующихся вибрионов и конструирования штаммов с заданными свойствами.

Сконструированные на основе вирулентных штаммов *V. cholerae* O1 и O139 токсигенные штаммы *V. cholerae* не O1/не O139 применяются в молекулярно-эпидемиологических исследованиях ряда лабораторий РосНИПЧИ "Микроб" для выяснения их роли в эпидемическом процессе при холере.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. На модели природного авирулентного штамма *V. cholerae* O2-серогруппы создана конъюгационная система переноса хромосомных генов, состоящая из донорных и реципиентных штаммов. Донорные

штаммы типа Hfr имеют разные точки начала переноса хромосомы. Полимаркированные штаммы несут мутации не только в генах, контролирующих биосинтез различных факторов роста (аминокислот, оснований, витаминов), но и в генах, определяющих биосинтез O-антигена и термолабильного гемолизина.

2. Построена генетическая карта двух участков хромосомы природного авирулентного штамма *V. cholerae* O2-серогруппы, на которой определена локализация 22 генов, участвующих в биосинтезе различных факторов роста, а также O-антигена.

3. Хромосомные гены *rfbO2*, контролирующие синтез O2-антигена природного авирулентного штамма *V. cholerae* O2, могут передаваться при конъюгации *in vitro* и *in vivo* в клетки токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 классического и эльтор биоваров. Эффективная экспрессия генов *rfbO2* в новом хозяине не влияет на его вирулентные свойства, что приводит к формированию патогенных штаммов *V. cholerae* не O1/не O139.

4. Возбудитель холеры новой O139-серогруппы, содержащий гены холерного токсина *ctxAB*, может приобретать гены *rfb* *V. cholerae* не O1/не O139 в конъюгационных скрещиваниях. В клетках нового хозяина чужеродные гены *rfb* не влияют на экспрессию изученных факторов вирулентности.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ. Материалы диссертации доложены на Российской научной конференции, Волгоград, 1992; на научно-практической конференции, посвященной 100-летию образования противочумной системы, Саратов, 1997.

ПУБЛИКАЦИИ. По теме диссертации опубликовано 8 научных работ.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ. Диссертация изложена на 173 страницах машинописного текста, состоит из введения, двух глав обзора литературы, четырех глав собственных исследований (в т.ч. одной главы с описанием материалов и методов), заключения и выводов. Работа иллюстрирована 8 рисунками и 23 таблицами. Список литературы включает 67 отечественных и 173 зарубежных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы бактерий. Использовали природные и генетически маркированные штаммы, производные *E.coli*, *V. cholerae* O1 (569B, Дакка35, RV79), *V. cholerae* O139 (P16064), *V. cholerae* не O1/не O139 (19306). Часть штаммов получена из отечественных и зарубежных лабораторий, многие штаммы сконструированы в процессе работы.

Методы. В разделе содержится описание бактериологических методов, использованных при исследовании свойств холерных вибрионов O1- и не O1- серогрупп; иммунологических - иммуноферментного метода G_{M1} ELISA; генетических методов - индуцированного нитрозогуанидином мутагенеза, конъюгации, картирования хромосомных генов; молекулярно-биологических - скрининг плазмидной ДНК, ДНК-ДНК гибридизация. Вирулентность и холерогенность определяли путем внутрикишечного заражения крольчат-сосунков и взрослых кроликов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Создание системы конъюгационного переноса хромосомных генов *Vibrio cholerae* не O1/не O139

Отсутствие к настоящему времени сведений о генетической организации природных штаммов *V. cholerae* не O1/не O139 обусловлено, в первую очередь, тем, что до сих пор не создана эффективная система конъюгационного переноса хромосомных генов для этого вибриона. В этой связи основная задача состояла в конструировании эффективных донорных штаммов типа Hfg и получении набора полимаркированных штаммов, которые могли быть использованы как штаммы-реципиенты. В качестве модельного был взят авирулентный штамм O2-серогруппы *V. cholerae* 19306 pur, Hly⁺, выделенный из внешней среды в 1971 г. в Астрахани, у которого, как было показано методом ДНК-ДНК гибридизации с СТ-зондом, отсутствовали структурные гены холерного токсина *ctxAB*. В результате многоэтапной обработки клеток штамма 19306 pur-Hly⁺Str^R нитрозогуанидином (НГ) по методу Adelberg et al. (1965), получено 35 штаммов, несущих 3-7 мутаций в генах, контролирующих

интез различных аминокислот, оснований и витаминов, а также гермолабильного гемолизина. Частота реверсии к прототрофности не превышала 10^{-8} - 10^{-9} .

Кроме того, одним из важных результатов явилось выделение клонов с мутациями в генах *gfbO2*, контролирующих биосинтез O2-антигена. С получением таких мутантов открывается возможность определения локализации на хромосоме генов, определяющих биосинтез одного из основных факторов иммуногенности. Характеристика некоторых реципиентных штаммов представлена в табл. 1.

Таблица 1

Полиауксотрофные мутанты штамма O2-серогруппы *V. cholerae* 19306 *pur-101* Str^R, полученные с помощью нитрозогуанидина

Штамм	Характеристика
KM1228	<i>pur-101 ile-101 met-102 trp-101 bio-101 Hly⁻</i>
KM1251	<i>pur-101 ile-101 trp-101 asp-103 cys-109 bio-101 Hly⁻</i>
KM1489	<i>pur-101 ile-101 leu-104 thi-105 Hly⁻</i>
KM1480	<i>pur-101 his-103 ile-101 thi-105 leu-104 Hly⁻</i>
KM1509	<i>pur-101 ile-101 thi-105 leu-104 ura-102 arg-102 Hly⁻</i>
KM1468	<i>pur-101 his-102 met-101 ura-101 Hly⁻</i>
KM1451	<i>pur-101 his-102 met-101 lys-102 Hly⁻</i>
KM1461	<i>pur-101 his-102 met-101 ilv-102 Hly⁻</i>
KM1453	<i>pur-101 his-102 met-101 cys-109 Hly⁻</i>
KM1465	<i>pur-101 his-102 met-101 leu-101 Hly⁻</i>
KM759	<i>pur-101 ile-101 val-101</i>
KM1555	<i>pur-101 his-102 met-101 ura-101 B₁₂-101 Hly⁻</i>
KM1551	<i>pur-101 his-102 met-101 ura-101 arg-108 Hly⁻</i>
KM1553	<i>pur-101 his-102 met-101 ura-101 ilv-105 rfb-101 Hly⁻</i>
KM1556	<i>pur-101 his-102 met-101 ura-101 thi-106 Hly⁻</i>
KM1568	<i>pur-101 his-102 met-101 ura-101 B₁₂-101 aro-102 Hly⁻</i>
KM1567	<i>pur-101 his-102 met-101 ura-101 B₁₂-101 trp-103 Hly⁻</i>
KM1573	<i>pur-101 his-102 met-101 ura-101 B₁₂-101 asp-102 Hly⁻</i>

Донорные штаммы были сконструированы не традиционным способом, основанным на интеграции в хромосому конъюгативной плазмиды, а с помощью бинарной системы, состоящей из транспозона Tn5-Mob (Km^R) и плазмиды-помощника pRP4-4 (Ap^RTc^R) с *tra*-опероном, которая требует включения в хромосому лишь указанного Tn-элемента, несущего участок *oriT* из плазмиды pRP4 (Km^RAp^RTc^R) (Simon R., 1984). Вектором для введе-

ния в клетки исходного штамма 19306 pur Str^S и его прототрофного производного KM734 Str^S транспозона Tn5-Mob служила плаزمида pSUP5011, которая была передана конъюгативным путем из штамма *Escherichia coli* S17-1 (pSUP5011). Для внедрения транспозона Tn5-Mob в хромосому НАГ-вибрионов, трансконъюганты были помещены в неблагоприятные условия, при которых бесплазмидные клетки получили бы селективное преимущество по сравнению с клетками, несущими плазмиду pSUP5011 (Вельков, 1983; Кутырев с соавт., 1982). Для этого штаммы 19306 pur (pSUP5011) и KM734 (pSUP5011) выращивали при +4 °C в жидкой минимальной среде с добавлением канамицина, резистентность к которому обуславливает Tn5-Mob. В результате были выделены клоны, утратившие плазмидные маркеры резистентности к антибиотикам (Ap^R Cm^R), но сохранившие устойчивость к канамицину, определяемую транспозоном, что было подтверждено с помощью электрофореза в агарозном геле.

Для дальнейшей работы было произвольно выбрано по 6 Km^R Ap^S Cm^S клонов 19306 pur chr::Tn5-Mob и KM734 chr::Tn5-Mob, несущих независимые внедрения транспозона Tn5-Mob в хромосому. Поскольку Tn5-Mob характеризуется низкой специфичностью транспозиции и может внедряться во многие сайты генома (Simon, 1984), то введение плазмиды-помощника pRP4-4 (Km^S Ap^R Tc^R) в клетки указанных клонов позволяло надеяться на получение донорных штаммов с различными точками начала и направления переноса. Указанная плазмиды-помощник была введена в клетки штаммов 19306 pur chr::Tn5-Mob и KM734 chr::Tn5-Mob путем конъюгационных скрещиваний их с донором плазмиды pRP4-4 штаммом *E. coli* C600 (pRP4-4). Селективной служила среда с добавлением канамицина и ампициллина. Контрselection донора осуществлялась присутствием в среде канамицина. Частота переноса плазмиды в штаммы 19306 pur chr::Tn5-Mob (6 скрещиваний) и KM734 chr::Tn5-Mob (6 скрещиваний) была примерно одинаковой и составляла $5 \times 10^{-3} - 2 \times 10^{-5}$. Все проверенные трансконъюганты (по 100 клонов от каждого скрещивания), помимо маркера транспозона Tn5-Mob (Km^R), несли и маркеры плазмиды pRP4-4 (Ap^R Tc^R). Изучение плазмидного состава некоторых произвольно выбранных трансконъюгантов 19306 pur Km^R Ap^R Tc^R и KM734 Km^R Ap^R Cm^R с помощью электрофореза в агарозном геле показало присутствие у них плазмиды, соответствующей по мол. массе плазмиде pRP4-4.

Итак, в результате проведенных экспериментов на основе двух штаммов *V. cholerae* O2 получен ряд клонов 19306 pur Str^S chr::Tn5-Mob (pRP4-4) и KM734 Str^S chr::Tn5-Mob (pRP4-4), которые могли обладать

донорными свойствами. При этом независимые внедрения транспозона Tn5-Mob в хромосому *V. cholerae* не O1/не O139 позволяли полагать о том, что донорные штаммы могут иметь разные точки начала переноса хромосомы. Для проверки указанного предположения 24 независимо полученных клона 19306 chr.:Tn5-Mob (pRP4-4) проверяли на донорные свойства в скрещиваниях с полиауксотрофным штаммом O2-серогруппы *V. cholerae* KM1467 *pur-101 his-102 met-101 arg-104* Str^R. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что вопреки ожидаемым результатам о внедрении транспозона Tn5-Mob в разные участки хромосомы, что определило бы получение донорных штаммов с различными точками начала переноса, во всех случаях внедрение транспозона произошло, видимо, в одно и то же место вблизи генов *met* и *his*, поскольку эти маркеры наследовались с большей частотой по сравнению с маркером *arg*. Эти данные, противоречащие известным сведениям о низкой сайт-специфичности внедрения транспозона Tn5-Mob в хромосому многих бактерий, можно, вероятно, объяснить тем, что в хромосоме *V. cholerae* не O1/не O139 в отличие от других микроорганизмов имеется предпочтительный сайт интеграции этого мигрирующего элемента вблизи локусов *met* - *his*. Более того, предпочтительность внедрения транспозона Tn5-Mob отмечалась ранее и для хромосом штаммов *V. cholerae* O1- и O139-серогрупп (Журавлева, 1993; Давыдова, 1993; Чеховская, 1997; Щелканова, 1998).

Таким образом, были получены донорные штаммы, осуществляющие направленный перенос хромосомных маркеров и имеющие точку начала переноса бактериального генома вблизи генов *his-met*. Один из штаммов, обозначенный как KM1560, был выбран для дальнейших экспериментов.

Аналогичным образом проверяли донорные свойства четырех независимо полученных клонов KM734 chr.:Tn5-Mob (pRP4-4). Оказалось, что у трех из них точка начала переноса была также локализована вблизи генов *his-met*. В то же время было обнаружено, что один клон, обозначенный как KM2340, имеет, видимо, другую точку начала переноса хромосомы за счет включения транспозона Tn5-Mob в иной ее участок. Наиболее высокая частота образования селективируемых рекомбинантов класса Arg⁺ позволяет полагать о локализации точки начала переноса хромосомы вблизи гена *arg*.

Итак, итогом нашей работы по созданию конъюгационной системы переноса хромосомных генов на модели природного авирулентного штамма O2-серогруппы *V. cholerae* 19306 явилось конструирование эффективных донорных штаммов типа Hfr с двумя различными точками начала переноса хромосомы, а также получение коллекции множественномаркированных штаммов-реципиентов.

2. Генетическое картирование хромосомы природного штамма *V. cholerae* не O1/не O139 с помощью созданных донорных и реципиентных штаммов

Создание донорных и реципиентных штаммов обеспечило реальную возможность генетического картирования хромосомы *V. cholerae* O2. Для проведения этих исследований мы проводили гомологичные скрещивания донорных штаммов KM1560 и KM2340 с 35 полимаркированными штаммами. У полученных рекомбинантов определяли показатели сцепленности селективируемых маркеров с неселективируемыми, на основе которых затем были определены относительные расстояния RD (от англ. relative distans) между генами в условных единицах по описанному ранее способу Parker et al. (1979). Показатели сцепленности генов между собой определялись в каждом скрещивании, однако в табл.2 приведены результаты, полученные лишь в скрещивании донорного штамма KM2340 с реципиентом KM1544.

Таблица 2

Показатели сцепления селективируемых и неселективируемых маркеров донорного штамма O2-серогруппы *V. cholerae* KM2340 при скрещивании его с реципиентным штаммом O2-серогруппы *V. cholerae* KM1544

Реципиентный штамм	Селективируемый маркер	Неселективируемый маркер, с которым устанавливается сцепление	Показатели сцепленности селективируемых маркеров с неселективируемыми			RD***
			Кол-во*	%	LF**	
1	2	3	4	5	6	7
KM1544	<i>pur-101</i>	<i>ilv-102</i>	73/130	56,15	0,56	0,58
		<i>arg-104</i>	43/130	33,08	0,33	1,13
	<i>ilv-102</i>	<i>pur-101</i>	80/120	66,66	0,66	0,42
		<i>arg-104</i>	68/120	56,66	0,56	0,58
	<i>arg-104</i>	<i>pur-101</i>	30/100	30,00	0,30	1,20
		<i>ilv-102</i>	20/100	20,00	0,20	1,61

* В числителе - число рекомбинантов, получивших неселективируемый маркер донора, в знаменателе - число рекомбинантов с селективируемым маркером.

** LF - отношение числа рекомбинантов с неселективируемым маркером к числу рекомбинантов с селективируемым маркером.

*** RD - относительное расстояние между генами, определенное по уравнению Ch.Parker et al. (1979): $RD = \ln(1/LF)$. При определении RD учитывали $LF \geq 0,01$.

Таким образом, в результате анализа более 20000 различных рекомбинантов была впервые построена генетическая карта двух хромосомных участков природного штамма *V. cholerae* O2-серогруппы, на которой определено местоположение 21 гена, кодирующего биосинтез аминокислот, оснований и витаминов (рис.1). Особый интерес, на наш взгляд, представляют данные о локализации на хромосоме *V. cholerae* не O1/не O139 природной мутации *pur-101*, поскольку ранее среди других штаммов *V. cholerae* O1, O139 и не O1/не O139-серогрупп, выделенных из окружающей среды или от больных холерой, были обнаружены штаммы, также имеющие мутации в гене *pur*. Более того, результаты проведенного ранее генетического картирования таких природных мутаций у *V. cholerae* O1 биовара эльтор (штамм RV79) и его производных, а также у *V. cholerae* O139 (штамм PO7) показали, что и у этих штаммов указанная мутация *pur* локализована в хромосоме также вблизи гена *ilv*, контролирующего биосинтез изолейцина и валина (Смирнова, 1989; Журавлева, 1993; Щелканова, 1998). Эти данные, видимо, могут свидетельствовать о том, что возникновение фенотипически одинаковой мутации, локализованной в определенном участке хромосомы у разных штаммов холерного вибриона, отличающихся друг от друга серогруппой, местом и временем выделения, может быть следствием одного и того же генетического события.

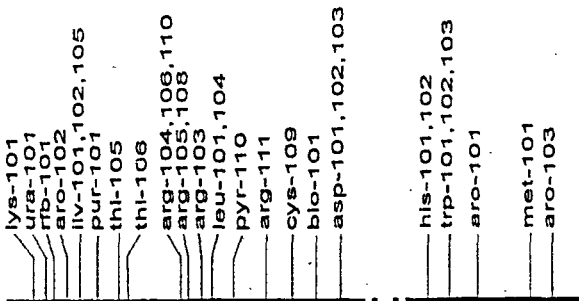


Рис.1. Генетическая карта хромосомы штамма O2-серогруппы *V. cholerae* 19306, составленная на основе результатов конъюгационных скрещиваний донорных и реципиентных штаммов.

Обнаружение эпидемических штаммов холерного вибриона не O1-серогруппы (*V. cholerae* O139 и *V. cholerae* O37), обусловило повышенный интерес исследователей к изучению структуры хромосомной области, содержащей гены *rfb*, кодирующих биосинтез O-антигена. Однако данных о локализации генов *rfb* на генетической карте хромосомы природных штаммов *V. cholerae* не O1/не O139 до сих пор нет.

Для определения местоположения генов *rfb*, контролирующих биосинтез O2-антигена, были проведены конъюгационные скрещивания донорных штаммов KM1560 и KM2340 с реципиентным штаммом KM1553 *pur-101 his-102 met-101 ura-101 ilv-105 rfb-101* Str^R, которые отличались друг от друга по антигенным свойствам. Донорные штаммы имели O2-антиген, агглютинируясь моноспецифической O-агглютинирующей сывороткой против вибрионов O2 серовара. В то же время полнауксотрофный штамм-реципиент KM1553 в результате мутации одного из генов *rfb* приобрел способность продуцировать шероховатый или RO-антиген, поскольку этот штамм, в отличие от доноров, агглютинировался холерной RO-сывороткой. Введенная в хромосому мутация получила обозначение *rfb-101*. Так как *V. cholerae* не O1/не O139 согласно точке зрения ряда исследователей могли возникнуть в результате различных мутаций в *rfb*-локусе *V. cholerae* O1, мы предположили, что гены *rfb* неагглютинирующихся вибрионов могут находиться в том же участке хромосомы, что и гены *rfbO1*, т.е. вблизи генов *ilv*, *pur*, *ura*. Поэтому в скрещиваниях указанных донорных штаммов с реципиентом KM1553 мы анализировали следующие селективируемые классы рекомбинантов: *Ilv*⁺, *Pur*⁺, *Ura*⁺. В каждом из классов рекомбинантов определяли частоту наследования неселективируемых донорных маркеров, в том числе донорного аллеля *rfbO2*. Наследование аллеля *rfbO2* выявляли путем агглютинации рекомбинантов RO-сывороткой на стекле. Рекомбинанты, получившие *rfbO2*, что определялось утратой способности агглютинироваться холерной RO-сывороткой, изучали затем на антигенные свойства в развернутой реакции агглютинации с моноспецифической холерной O2-сывороткой и холерной сывороткой RO в пробирках. На основании данных о наследовании селективируемыми классами рекомбинантов неселективируемого маркера *rfb-101* был сделан вывод о местоположении на хромосоме генов *rfbO2*. Оказалось, что рекомбинанты всех трех изученных классов (*Pur*⁺, *Ura*⁺, *Ilv*⁺), полученных при скрещива-

ниях KM2340 с KM1553, наследуют донорный аллель *rfbO2* с довольно высокой частотой. При этом наиболее высокий показатель сцепления *rfbO2* обнаружен с маркером *ura-101* (74,74 %). В то же время маркер *ura-101* тесно сцеплен с маркером *ilv-105* (44,71-64,14 %). При этом ген *ura-101* является, видимо, дистальным относительно точки начала переноса по сравнению с другими селективируемыми маркерами, поскольку частота наследования Ura^+ рекомбинантами остальных маркеров всегда превышала показатели сцепления *ilv-105* и *pur-101* с маркером *ura-101*.

В целом полученные данные позволяют предположить следующий порядок генов на хромосоме *V. cholerae* не O1/не O139: *ori...pur-101 - ilv-105 - rfb-101 - ura-101*.

Это предположение подтверждают результаты скрещиваний того же реципиента KM1553 с другим донором KM1560, у которого, как уже указывалось, точка начала переноса хромосомы локализована вблизи генов *met* и *his*.

Таким образом, установлено, что гены *rfbO2*, ответственные за биосинтез O-антигена, располагаются в той же хромосомной области (вблизи генов *ilv*, *pur*, *ura*), что и гены *rfb*, контролирующие у *V. cholerae* O1 и *V. cholerae* O139 продукцию O1- и O139-антигенов, соответственно.

3. Обмен генами *rfb*, контролирующими биосинтез O-антигена, между холерными вибрионами разных серогрупп

На основании полученных нами данных о значительном сходстве *rfb*-областей у *V. cholerae* O1-, O139- и не O1/не O139-серогрупп следует, видимо, полагать, что при совместном их обитании в тонком кишечнике человека или животных может происходить перенос генов *rfb* не O1/не O139 в клетки вирулентных штаммов холерных вибрионов O1-серогруппы, приводящий к образованию токсигенных штаммов *V. cholerae* не O1/не O139. В этой связи изучение возможности конъюгационного переноса генов *rfb* от *V. cholerae* O2-серогруппы к эпидемическим штаммам *V. cholerae* O1-серогруппы и *V. cholerae* O139-серогруппы представляют, на наш взгляд, большой интерес.

Первые этапы наших исследований в этом направлении были связаны с выбором модели и методов, с помощью которых могла проводиться работа. В результате анализа серологических, токсигенных и вирулентных свойств различных полнауксотрофных штаммов *V. cholerae*

O1, имеющихся в лабораторной коллекции и полученных при многоступенчатой обработке клеток НГ, в качестве реципиентных были взяты три штамма, относящиеся к разным биоварам и сероварам: KM1937 *his-54 trp-54 pur-54 ilv-64 arg-62* Str^R (производный штамма *V. cholerae* 569В Инаба классического биовара), KM2274 *ura-90 ilv-90* Str^R (производный штамма *V. cholerae* Дакка35 Огава классического биовара) и KM800 *pur-80 his-80 trp-87 ile-80 val-80 ura-80* Str^R (производный штамма *V. cholerae* RV79 Огава биовара эльтор). Донором служил авирулентный штамм O2-серогруппы *V. cholerae* KM1560, не продуцирующий холерный токсин из-за отсутствия в его хромосоме структурных генов *ctxAB*.

Кроме того, была разработана система отбора рекомбинантов, которые получили от донора неселектируемые гены *rfbO2*. Принимая во внимание полученные нами и другими исследователями данные о локализации генов *rfb* в хромосомной области, содержащей строго определенные гены, для решения поставленной задачи мы отбирали и анализировали лишь следующие селективируемые классы рекомбинантов, полученные при скрещивании указанных донорных и реципиентных штаммов: *Ilv*⁺, *Ile*⁺, *Val*⁺, *Arg*⁺, *Pur*⁺, *Ura*⁺. Далее, наследование этими рекомбинантами неселектируемого донорного маркера *rfbO2* определяли путем агглютинации их на стекле холерной диагностической O1-антисывороткой, поскольку этот признак является более легко определяемым по сравнению с другими серологическими свойствами. Рекомбинанты, получившие донорный аллель *rfbO2*, утрачивали способность агглютинироваться холерной O1-сывороткой, но приобретали способность агглютинироваться моноспецифической O2-сывороткой. Затем наследование донорного локуса *rfbO2* рекомбинантами подтверждалось в развернутой реакции агглютинации в пробирках со всеми видо- и серовароспецифическими O1-антисыворотками (O, RO, Инаба, Огава), а также с антисывороткой к неагглютинирующимся вибрионам O2-серогруппы.

В результате конъюгационных скрещиваний между донорным штаммом KM1560 и реципиентным штаммом KM1937 *his-54 trp-54 pur-54 ilv-64 arg-62* Str^R Инаба (классический биовар) было получено два класса рекомбинантов: *Ilv*⁺ и *Arg*⁺. Частота совместного наследования донорных генов *arg*⁺ и *ilv*⁺ в этих гетерологичных скрещиваниях была невысока и составила при отборе рекомбинантов по селективируемому маркеру *arg*⁺ -

0,57 %, а по селективируемому маркеру *ilv*⁺ - 2,87 %. Оба класса рекомбинантов, как и предполагалось, действительно наследовали в качестве неселективируемого маркера донорный аллель *rfbO2*. Среди проверенных 222 рекомбинантов класса Arg⁺ 42 рекомбинанта (18,96 %) не агглютинировались O1-сывороткой, т.е. были O1⁻. Среди 174 рекомбинантов класса Iiv⁺ было обнаружено лишь 7 рекомбинантов Iiv⁺ O1⁻ (4,02 %). Аналогичная картина была получена и при скрещивании донора KM1560 с *V. cholerae* O1 классического биовара серовара Огава.

Таким образом, проведенные эксперименты показали на возможность переноса генов *rfb*, контролирующих биосинтез не O1/не O139-антигена, от природных штаммов неагглютинирующихся вибрионов к *V. cholerae* O1 классического биовара.

С целью получения данных о возможности переноса генов *rfb* O2 к *V. cholerae* O1 биовара эльтор проводили конъюгационные скрещивания донора KM1560 с реципиентным штаммом эльтор KM800 *pur-80 his-80 trp-87 ile-80 val-80 ura-80 Str*^R Огава. Из трех селективируемых классов рекомбинантов, Ura⁺, Ile⁺, Val⁺, лишь два - Ile⁺ и Val⁺ наследовали маркер *rfbO2*. Вследствие, видимо, очень тесной сцепленности маркеров *ile*⁺ и *val*⁺ между собой на хромосоме как *V. cholerae* O1, так и *V. cholerae* не O1/не O139, в проведенных нами гетерологичных скрещиваниях эти два маркера одновременно наследуются рекомбинантами классов Ile⁺ и Val⁺ в 99,0-100 % случаев. Частота наследования рекомбинантами Ile⁺ и Val⁺ *rfbO2* маркера была приблизительно одинаковой и составила в случае рекомбинантов Ile⁺ - 20 %, а в случае рекомбинантов Val⁺ - 17,6 %.

Поскольку холерные вибрионы разных серогрупп могут совместно обитать в организме человека или животных, то можно предполагать, что перенос хромосомных генов из одной клетки холерного вибриона в другие может происходить, видимо, и в условиях *in vivo*. Для подтверждения этого предположения мы ввели белым мышам внутрибрюшинно клетки донорного (KM1560) и реципиентного (KM1937) штаммов в соотношении 1:1. Через 18 часов был сделан высеv из внутрибрюшинной жидкости на селективные чашки. Оказалось, что в условиях *in vivo* также происходит перенос хромосомных генов *rfb* от неагглютинирующихся вибрионов к возбудителю холеры O1-серогруппы. Так, среди 23 рекомбинантов, отобранных по селективируемому маркеру *arg*⁺, 2 Arg⁺ клона наследовали донорный аллель *rfbO2*.

Положительные результаты, полученные нами по передаче генов О-антигена от *V. cholerae* не O1/не O139 к *V. cholerae* O1, позволили предположить возможность переноса указанных генов в обратных скрещиваниях, т.е. от холерных вибрионов O1- к холерным вибрионам не O1/не O139-серогруппы. С целью подтверждения наших предположений были проведены конъюгационные скрещивания. В качестве доноров были выбраны два штамма *V. cholerae* O1, у которых точка начала переноса хромосомы была локализована вблизи гена *ilv*: KM2075 Огава биовара эльтор и KM2251 Инаба классического биовара (Давыдова, 1993). Реципиентами служили два штамма O2-серогруппы, производные *V. cholerae* 19306, несущие мутации в генах *pur*, *ilv*, *ile*, *ura*, локализованных в *rfb*-области его хромосомы : KM1552 *pur-101 his-102 met-101 ura-101 ile-103 Str^R*; KM1553 *pur-101 his-102 met-101 ura-101 ilv-105 rfb-101 Str^R*. Контрselection доноров осуществляли путем добавления в селективную среду стрептомицина.

В результате были получены следующие классы рекомбинантов: Pur⁺, Ura⁺, Ile⁺, Ilv⁺, которые затем проверяли на наследование неселектируемых маркеров. Наследование донорного аллеля *rfbO1* определяли с помощью агглютинации клеток на стекле холерной диагностической O1-антисывороткой.

Оказалось, что наследование рекомбинантами селективируемых маркеров ауксотрофности донора *V. cholerae* KM2075 биовара эльтор происходило примерно с такой же частотой, как и в скрещиваниях донора O2-серогруппы *V. cholerae* KM1560 с реципиентом O1-серогруппы *V. cholerae* KM800 биовара эльтор ($n \times 10^{-6}$ - $n \times 10^{-5}$). Однако, несмотря на довольно высокое сцепление маркеров ауксотрофности *pur⁺* и *ile⁺* (34,66 % и 22,0 %) в скрещиваниях донора *V. cholerae* KM2075 с реципиентом *V. cholerae* KM1552 и маркеров *pur* и *ilv* (41,00 % и 35,97 %) в скрещиваниях донора *V. cholerae* KM2075 с реципиентом *V. cholerae* KM1553, ни один из полученных рекомбинантов не наследовал донорный аллель *rfbO1*.

Неудачной оказалась попытка передачи генов *rfbO1* в *V. cholerae* O2-серогруппы и при использовании в качестве донора штамма O1-серогруппы *V. cholerae* KM2251 классического биовара. Частота возникновения селективируемых классов рекомбинантов ($n \times 10^{-7}$) была заметно ниже таковой при скрещиваниях донора O2-серогруппы с

реципиентом *V. cholerae* O1 классического биовара. Более того, показатели совместного наследования селективируемых и неселективируемых маркеров ауксотрофности были также в целом невысоки. Изучение серологических свойств показало, что и в этих скрещиваниях ни один из полученных рекомбинантов не агглютинировался холерной диагностической O1-антисывороткой. Это указывает на отсутствие переноса генов O1-антигена в штаммы *V. cholerae* не O1/не O139.

Таким образом, использование сконструированного нами эффективного донорного штамма O2-серогруппы *V. cholerae* KM1560 позволило получить данные о том, что по крайней мере в условиях эксперимента происходит перенос хромосомных генов *rfb* от авирулентных штаммов *V. cholerae* не O1/не O139 к токсигенным штаммам *V. cholerae* O1 обоих биоваров. Это событие приводит к формированию штаммов, утративших такое основное свойство возбудителя холеры, как агглютинабельность холерной O1-антисывороткой, но сохранивших в хромосоме гены холерного токсина.

С целью изучения возможности обмена генетической информацией между *V. cholerae* O2 и *V. cholerae* O139 были использованы сконструированные доноры O2-серогруппы KM1560 и KM2340, которые, как указывалось выше, отличались друг от друга разными точками начала переноса хромосомных маркеров. В качестве реципиентов *V. cholerae* O139 были выбраны полученные ранее в лаборатории (Чеховская, 1997) полнауксотрофные токсигенные штаммы, которые несли мутации в определенных генах (*ura*, *lys*, *ilv*, *pur*, *arg*), локализованных вблизи генов *rfbO139*: KM2363 *lys-90 ura-90 ilv-95 Str^R*, KM2364 *pur-90 ura-90 his-90 arg-90 ilv-90 Str^R*.

Наследование маркера *rfbO139* определяли путем агглютинации на стекле клеток различных классов рекомбинантов с поликлональной O139-антисывороткой и с антисывороткой к неагглютинирующимся вибрионам O2-серогруппы.

В результате конъюгационных скрещиваний были получены селективируемые классы рекомбинантов *Lys⁺*, *Ura⁺*, *Ilv⁺*, *Arg⁺*, *Pur⁺*, частота образования которых составляла $n \times 10^{-5}$ - $n \times 10^{-7}$. Изучение серологических свойств указанных рекомбинантов показало, что перенос генов *rfbO2* в клетки *V. cholerae* O139 действительно возможен. Среди *Lys⁺*, *Ura⁺* и *Ilv⁺* клонов были обнаружены рекомбинанты, утратившие

способность агглютинироваться O139-антисывороткой, но агглютинирующиеся O2-антисывороткой. Анализ полученных данных позволил определить примерную область локализации генов *rfbO2* между *ura⁺* и *ilv⁺* маркерами.

Таким образом, показано, что конъюгационный перенос генов, контролирующих биосинтез O-антигена, может происходить, от авирулентных штаммов *V. cholerae* не O1/ не O139 к возбудителям холеры новой O139-серогруппы, в результате чего формируются штаммы неагглютинирующихся вибрионов, содержащие структурные гены холерного токсина.

Для определения возможности обратного переноса генов *rfb* были также проведены конъюгационные скрещивания. Донором служил ранее сконструированный Hfr-штамм O139-серогруппы KM2362 (Чеховская, 1997). Реципиентами были выбраны 3 полимаркированные штамма, производные холерного вибриона O2-серогруппы 19306, которые несли мутации в генах ауксотрофности *ura*, *ilv*, *lys*, *pur*, локализованных в интересующей нас *rfb*-области: KM1553 *pur-101 his-102 met-101 ura-101 ilv-105 Str^R Rif^R*; KM1008 *pur-101 his-101 met-101 ilv-101 lys-101 Str^R Rif^R*; KM1568 *pur-101 his-102 met-101 ura-101 aro-102 Su^R Rif^R*. Контрелекцию донора осуществляли добавлением в селективную среду рифампицина. Селектируемые классы рекомбинантов *Lys⁺*, *Ilv⁺*, *Pur⁺*, *Ura⁺* образовывались с частотой $n \times 10^{-7}$ - $n \times 10^{-5}$, но при их серологическом анализе (изучено всего 676 рекомбинантов) не было обнаружено ни одного клона, агглютинирующегося холерной O139-антисывороткой. Из этого следует, что перенос генов *rfbO139* не происходит. При этом нужно отметить более слабую сцепленность маркеров ауксотрофности между собой по сравнению с этими показателями, полученными в скрещиваниях донорного штамма O2-серогруппы и реципиента O139-серогруппы.

Таким образом, показано, что перенос хромосомных генов *rfb* от авирулентных штаммов неагглютинирующихся вибрионов может происходить не только к традиционным возбудителям холеры O1-серогруппы, но и к возбудителю холеры новой O139-серогруппы. Эти данные, во-первых, свидетельствуют о том, что перенос *rfb* генов может быть одной из причин O-антигенной вариабельности холерных вибрионов. Во-вторых, приобретение генов не O1/ не O139-серогрупп токсигенными штаммами возбудителя холеры как O1-, так и O139-серогрупп, возможно,

является одним из реальных путей формирования природных штаммов неагглютинирующихся вибрионов, содержащих в хромосоме гены холерного токсина *ctxAB*.

ВЫВОДЫ

1. На модели природного авирулентного штамма *V. cholerae* не O1/не O139, относящегося к O2-серогруппе, разработана конъюгационная система переноса хромосомных генов, состоящая из донорных штаммов типа Hfr с различными точками начала переноса хромосомы, а также полимаркированных реципиентных штаммов, несущих мутации в генах, контролирующих синтез различных аминокислот и оснований, O-антигена, термолabileного гемоллизина.

2. В результате использования созданной конъюгационной системы построена генетическая карта двух участков хромосомы природного авирулентного штамма *V. cholerae* не O1/не O139, на которой определена локализация 21 гена, участвующего в биосинтезе различных факторов роста. Показано значительное сходство генетических карт холерных вибрионов O1-, O139- и не O1/ не O139-серогрупп.

3. Установлена локализация на хромосоме природного авирулентного штамма *V. cholerae* не O1/не O139 генов *rfb*, контролирующих биосинтез O2-антигена. Показано, что указанные гены тесно сцеплены с генетическими маркерами *ura*, *ilv*, *pur*, локализованными в той же хромосомной области, что и гены O1- и O139-антигенов у эпидемических штаммов *V. cholerae* O1 и *V. cholerae* O139.

4. Показано, что при конъюгации возможен перенос хромосомных генов *rfb*, контролирующих биосинтез O-антигена, от природного авирулентного штамма *V. cholerae* не O1/не O139 к *V. cholerae* O1 классического и эльтор биоваров. В результате переноса указанных генов формируются токсигенные штаммы неагглютинирующихся вибрионов.

5. Проведенные конъюгационные скрещивания указывают на возможность приобретения токсигенными штаммами возбудителя холеры новой O139-серогруппы генов O-антигена неагглютинирующихся вибрионов. Получение чужеродных генов *rfb* штаммами *V. cholerae* O139 не оказывает влияния на экспрессию ряда собственных генов, кодирующих факторы вирулентности.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Давыдова Н.И., Шопырева С.В., Смирнова Н.И. Генетическое картирование хромосомной мутации, определяющей повышенную продукцию холерного токсина у *Vibrio cholerae* // Генет. и биохим. возбудителей особо опасн. инф. Метер. Рос. науч. конф. - Волгоград, 1992. - С.15.

2. Шопырева С.В., Смирнова Н.И. Создание конъюгационной системы, состоящей из донорных и реципиентных штаммов *Vibrio cholerae* не O1 серогруппы // Пробл. ООИ. - 1994. - N4. - С.173-179.

3. Шопырева С.В., Смирнова Н.И. Построение генетической карты *Vibrio cholerae* не O1 серогруппы // Пробл. ООИ. - 1994. - N4. - С.180-185.

4. Smirnova N.I., Zhuravlyova E.A., Livanova L.F., Shopyreva S.V. // Construction and characterization of recombinant *Vibrio cholerae* strains carrying heterologous genes encoding non-O1 antigens or cholera enterotoxin // Microb. pathogenes. - 1995. - V.19. - P.65-72.

5. Смирнова Н.И., Шопырева С.В., Ливанова Л.Ф., Журавлева Е.А. Возникновение токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* не O1-серогруппы в результате обмена генетической информацией // Генетика. - 1996. - Т.32, №6. - С.744-749.

6. Смирнова Н.И., Ерошенко Г.А., Чеховская Г.В., Ливанова Л.Ф., Давыдова Н.И., Шопырева С.В. Создание системы конъюгационного переноса хромосомы и генетическое картирование хромосомы *Vibrio cholerae* серогруппы O139 // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол. - 1996. - N2. - С.14-18.

7. Шопырева С.В., Смирнова Н.И. Конъюгационный перенос хромосомных генов *gfb*, определяющих биосинтез O-антигена, от авирулентных штаммов *V. cholerae* не O1 к эпидемическим штаммам *V. cholerae* O139 // Мат-лы научно-практ. конф., посвящ. 100-летию обр-я противочумной системы. - Саратов, 1997. - Т.2. - С.153.

8. Шопырева С.В. Локализация генов *gfb*, контролирующих биосинтез O-антигена, на хромосоме природного штамма *Vibrio cholerae* не O1-серогруппы. Федерал. гос. учрежд. Рос. н.- и противочум. ин-т "Микроб". - Саратов, 2000. - 12с. - Библиогр.: 25 назв. - Рус. - Деп. в ВИНТИ 28.03.00, N796 - ВОО.