

торов патогенности у энтеробактерий неоднозначно. В таком случае весьма существенным является тот факт, что штаммы, выделенные от больных ОКН детей раннего возраста [3], часто отличаются сочетанным носительством отдельных факторов патогенности. По-видимому, именно такая сочетанность придает штаммам патогенность и не позволяет им выступать в роли эпидемиологического агента [2, 4]. При этом чрезвычайно важно выяснение вопроса о природе такой сочетанности, т. е. носит она хромосомный или плазмидный характер. Выяснению этого вопроса посвящено настоящее исследование.

Материал и методы. Исследовали 6 штаммов энтеробактерий, выделенных нами от больных ОКН детей. Энтеротоксигенность проверяли на инфицированных отрезках тонкой кишки крыс-реципиентов. Адгезивность и гемолитическую активность выявляли на основании соответствующих методических рекомендаций [5].

Плазмидные ДНК выделены по Бирнбойм-Долли [6]. Идентификацию плазмид проводили методом электрофореза в 0,8% -ной агарозе в поле в бифере, содержащем 0,04 M триацетат pH 7,8), 0,02 M Na-ацетат, 0,02 M Na₂ EDTA.

Трансформацию бактерий плазмидными ДНК проводили по экспресс-методу [1]. В качестве реципиента использовали штамм *Escherichia coli* 210 PS (получен из ЦНИИИО им. П. П. Мещерякова). После проверки на стабильность трансформантов на полученных колониях выделяли плазмидную ДНК, которую также анализировали электрофорезом в 0,8% -ной агарозе [2].

Результаты и обсуждение. У выделенных и использованных штаммов энтеробактерий были определены следующие факторы патогенности, приведенные в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика штаммов энтеробактерий

Вид энтеробактерии	Наличие факторов патогенности	Имя энтеробактерии	Наличие фактора патогенности
<i>E. coli</i>	Ent ⁺ , Adh ⁺ , Hly ⁺	<i>S. typhimurium</i>	Ent ⁺ , Adh ⁺ , Hly ⁺
<i>K. oxytoca</i>	Ent ⁺ , Adh ⁺ , Hly ⁺	<i>E. coli</i>	Ent ⁺ , Adh ⁺ , Hly ⁺
<i>Citr. baculifer</i>	Ent ⁺ , Adh ⁺ , Hly ⁺	<i>K. oxytoca</i>	Ent ⁺ , Adh ⁺ , Hly ⁺

Ent⁺—энтеротоксигенная; Adh⁺—наличие адгезивной активности; Hly⁺—цител гемолитичности.

Для выяснения природы патогенности энтеробактерий в культуру необходимо было установить, связана ли адгезивность с наличием плазмиды в клетках бактерий или же она определяется хромосомальными генами. С этой целью был проведен анализ выделенных культур на наличие внехромосомальных генов, определяющих адгезивные свойства микроорганизма.

Анализ включал следующие этапы идентификации ДНК плазмиды: определение функциональной значимости этих плазмид (доказательство наличия экстрахромосомных генов адгезивности).

Электрофоретический анализ выделенной внехромосомной ДНК исследуемых культур выявил наличие как высокомолекулярных, так и относительно низкомолекулярных плазмид (рис. 1). Следует отметить, что наличие плазмид еще не определяет патогенности штамма, так как не всякая плазмиды детерминирует факторы патогенности. Примеча-

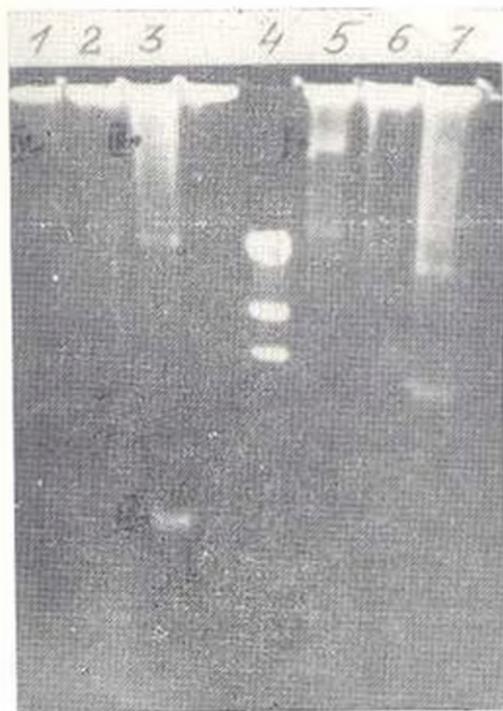


Рис. 1. Электрофорез в 1%-ной агарозе. Плазмидные ДНК выделенных штаммов. 1. *K. oxytoca* E_{n1}^{-} , Adh^{+} , Hly^{-} . 2. *E. coli* E_{n1}^{-} , Adh^{-} , Hly^{+} . 3. *S. typhimurium* E_{n1}^{-} , Adh^{-} , Hly^{+} . 4. *Hind III* рестрикта ДНК флага лябля. 5. *Streptococcus* spp. E_{n1}^{-} , Adh^{+} , Hly^{-} . 6. *K. oxytoca* E_{n1}^{-} , Adh^{-} , Hly^{-} . 7. *E. coli* E_{n1}^{-} , Adh^{-} , Hly^{-} . I, II, III, IV — указаны плазмиды, предназначенные для трансформации.



Рис. 2. Электрофорез в 1%-ной агарозе. Плазмидные ДНК трансформантов, трансформация ДНК а (1), ДНК б (2), ДНК с (3), ДНК д (4). Маркеры — *Hind III* рестрикта флага λ , (5).

тельно, что независимо от вида выделенного микроорганизма выявляемая нами высокомолекулярная ДНК плазмид идентична по размерам во всех культурах, а длины остальных плазмид варьируют в среднем от 2,5 до 50 тпн.

Для выяснения функциональной значимости плазмидных ДНК исследуемых патогенных микроорганизмов проводили трансформацию плазмидами I, II, III, IV (рис. 1) штамма реципиента *E. coli* 200PS Hfr , Ent^- , Hly^- , Adh^- . Фенотип полученных трансформантов показан в табл. 2.

Таблица 2. Фенотип доноров и трансформантов

ДНК плазмиды	Фенотип доноров	Фенотип трансформантов	ДНК плазмиды	Фенотип доноров	Фенотип трансформантов
I	A	EAH	III	EH	AH
II	EII	AH	IV	EAH	AH

E—энгеротоксигенность; II—гемолитическая активность; A—адгезивность (специфическая и общая).

Как видно из табл. 2, плазмиды I, II, III, IV, выделенные из *Citrobacter* spp., *S. typhimurium*, *K. oxytoca* соответственно, содержат одинаковый набор факторов патогенности. Несмотря на функциональную эквивалентность этих плазмид, о чем свидетельствуют фенотипы трансформантов исходных штаммов, экспрессия генов, кодирующих факторы патогенности, различается в оригинальных штаммах. Так, например, плаزمида I, выделенная из штамма *Citrobacter* Ent^- , Adh^+ , Hly^- в *E. coli* экспрессирует сразу три фактора патогенности Ent , Adh , Hly . С другой стороны, плазмиды IV, выделенная из *K. oxytoca* Ent^+ Hly^- , Adh^+ , в трансформантах *E. coli* экспрессирует только два фактора патогенности Adh^+ , Hly^+ .

Эти факты свидетельствуют о том, что экспрессия генов, кодирующих факторы патогенности в исследованных штаммах, зависит от клетки-хозяина, и патогенность всегда может проявиться в благоприятных условиях при смене хозяина, как, например, при естественной циркуляции конъюгативных плазмид в подуляющих кишечных бактериях.

Анализ плазмидного состава трансформантов показал существование в них как высокомолекулярных, так и низкомолекулярных плазмид, что наводит на мысль о возможности диссоциации высокомолекулярной плазмиды на ряд меньших (рис. 2). Оказалось также, что плазмиды I, II, III и IV в трансформантах дают одинаковый профиль диссоциации, в связи с чем становится вероятным их структурное родство.

Таким образом, функциональная эквивалентность и структурная диссоциация плазмид в исследованных штаммах позволяет предположить существование одной или нескольких родственных плазмид, циркулирующих одновременно среди многих видов энтеробактерий. Вероятно, генетическая организация плазмид, несущих гены па-

тогенности, может играть определенную роль в формировании потенциальной патогенности микробов. Так, различного рода генетические структуры (типа повторов ДНК, инвертируемых сегментов и т. п.) могут повышать возможности генетической реорганизации микроорганизмов и существенно изменять экспрессию генов. Основываясь на вышеприведенных результатах, можно сказать, что решающее влияние на проявление генов патогенности могут оказывать внутриклеточные факторы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Казянчи А. Ф.* Вопросы молекулярно-клеточной биологии. Мат-лы научн. конф. ЦЭБ АН АрмССР. 13—14, Ереван, 1983.
2. *Макинташ Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование, 79, М., 1984.
3. *Мтицишвили С. Т.* Автореф. докт. дисс., М., 1984.
4. *Покровский В. И., Полоцкий Ю. Е., Юцук И. Л.* и др. ЖМЭИ, 4, 77—80, 1988.
5. *Рахимов А. Х.* и др. Методические рекомендации, М., 1987.
6. *Тимиков В. Д., Кудлай Д. Г., Петровская В. Г., Ларкина Т. И.* ЖМЭИ, 3, 3—15, 1968.
7. *Verblum H. C., Daly G. A.* Nucl. Acids Res., 6, 1513—1523, 1979.

Поступило 21.VII 1989 г.