

Таблица 2

Распределение заболеваемости вирусным гепатитом С по гендерному признаку с 2007 по 2011 г.

	HCV		ОВГС		ХГС		ХГС с ЦП		Mixt (C+B)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Мужчины	411	47,2	32	64	226	51	114	37,7	39	51,3
Женщины	461	52,8	18	36	218	49	188	62,3	37	48,7
Итого	872	100	50	5,7	444	51	302	34,6	76	8,7

вили молодые люди и люди активной жизненной позиции, трудоспособного возраста 20-49 лет (табл.2).

Заключение. Необходимо иметь в виду, что данные официальной регистрации не могут отражать истинную картину заболеваемости острым вирусным гепатитом С, так как желтушный вариант болезни встречается редко и в 75-80% случаев ОГС протекает бессимптомно, с минимальной клинической симптоматикой. Если уровень заболеваемости ХГС в РС(Я) до 2002 г. не превышал уровня заболеваемости по РФ, то начиная с 2003 по 2010 г. он был выше российского.

Эпидемиологическая ситуация по ВГС в Республике Саха (Якутия) носит неблагоприятный характер, т.к. заболеваемость гепатитом С регистрируется в основном у трудоспособной части населения в возрасте 20-49 лет. Растет уровень регистрации хронического

гепатита С (51%), а также в стадии ЦП – 34,6%. За анализируемый период, с 2007 по 2011 г. наблюдается повышение ХГС с исходом в ЦП, начиная с 2008 г. идет тенденция снижения ХГВ, Д, (микст), ЦП. По гендерному признаку в последние годы среди больных ВГС наблюдается преобладание женщин – 82,9%, чем мужчин – 17,1%.

При отсутствии специфической профилактики ГС маловероятно в ближайшее время снижение заболеваемости ХГС, что представляет реальную угрозу для здоровья и этнической популяции, проживающей на территории РС(Я).

Литература

1. Официальная информация по материалам аналитической записки, подготовленной Департаментом ГСЭН МЗ РФ для Межведомственной комиссии Совета Безопасности Российской Федерации по охране здоровья,

по вопросу «Распространение вирусных гепатитов как угроза национальной безопасности» / Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2003. – № 2. – С. 20-23.

The official information of the materials of analytical note prepared by GSEN Department of Ministry of Health of the Russian Federation for the Interdepartmental commission of Security council of the Russian Federation on health protection, concerning «Prevalence of Viral Hepatitis as Threat of National Safety» // Epidemiology and Vaccinal Prevention. – 2003. – 2. – P. 20-23.

2. Основные показатели деятельности службы крови России в 2002 / Е.А. Селиванов, Т.Н. Данилов, И.Н. Дегтяренко [и др.]. Трансфузиология. – 2003. – Т.4 (4). – С. 6-28.

The main indicators of the blood service activity in Russia in 2002 / E.A. Selivanov, T.N. Danilov, I.N. Degtyarenko [et al.]. // Transfusiology. – 2003. – V.4 (4). – P. 6-28.

3. Шляхтенко Л.И. Системный подход к изучению эпидемического процесса гепатитов В и С / Л.И. Шляхтенко // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2003. – №4. – С. 29-33.

Shljakhtenko L.I. A systematic approach to the study of the epidemic process of hepatitis B and C / L.I. Shljakhtenko // Epidemiology and Vaccinal Prevention. – 2003. – №4. – P. 29-33.

4. Alberti A. Management of hepatitis C / A. Alberti, L. Benvenuto // Journal of Hepatology. – 2003. – 42. – P.92-97.

5. Armstrong G.L. The past incidence of hepatitis C virus infection: implications for the future burden of chronic liver disease in the United States / G.L. Armstrong, M.J. Alter, G.M. McQuillan, H.S. Margolis // Hepatology. – 2000. – V. 31. – P. 777-782.

6. Berkes J. Global Epidemiology of HCV Infection. / J. Berkes, S.J. Cotler // Current Hepatitis Report. – 2005. – V. 4. – P. 125-129.

Н.М.Тищенко, С.И. Бахолдина, О.Ю. Портнягина, О.Н. Софронова, К.В. Гузев, А.В. Ракин, М.П. Исаева

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА ФОСФОЛИПАЗЫ А ИЗ НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

УДК 579.84; 575.174.015.3 (571.27)

Проведен анализ полиморфизма гена мембранно-связанной фосфолипазы А *Y. pseudotuberculosis*. Выявлена высокая консервативность этого фермента на нуклеотидном и аминокислотном уровнях. Путем экспрессии в клетках *E. coli* получена рекомбинантная фосфолипаза А, которая использована в качестве антигена для выявления специфических антител. Показано, что антитела к этому белку

обнаруживаются в сыворотках крови больных острой кишечной и вторично-очаговой формами псевдотуберкулеза.

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, фосфолипаза А, аллельный полиморфизм, антитела.

The analysis of gene polymorphism of *Y. pseudotuberculosis* membrane-associated phospholipase A was carried out. The high conservation of this enzyme at the nucleotide and amino acid levels was revealed. Recombinant phospholipase A expressed in *E. coli* cells was used as an antigen to detect specific antibodies. Antibodies against this protein were detected in sera of patients with acute intestinal and secondary forms of pseudotuberculosis.

Keywords: *Yersinia pseudotuberculosis*, phospholipase A, allelic polymorphism, antibodies.

ФГБУ науки ТИБОХ им. Г.Б. Елякова ДВО РАН: **ТИЩЕНКО Надия Муссаевна** – аспирант, fayzulina83@gmail.com, **БАХОЛДИНА Светлана Ивановна** – к.б.н., с.н.с., sibakh@mail.ru, **ПОРТНЯГИНА Ольга Юрьевна** – к.б.н., с.н.с., o_vl@piboc.dvo.ru, **ГУЗЕВ Константин Викторович** – м.н.с., k.guzev@gmail.com, **ИСАЕВА Марина Петровна** – к.м.н., с.н.с., issaeva@gmail.com; **СОФРОНОВА Октябрина Николаевна** – зав. лаб. ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в РС (Я)», sofronova56@mail.ru, ooi_sakha@mail.ru; **РАКИН Александр Владимирович** – д.б.н., рук. группы Института гигиены и медицинской микробиологии, rakin@mvr.uni-muenchen.de (Мюнхен).

Введение. Инфекции, вызываемые иерсиниями (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*), встречаются во многих странах мира. В России псевдотуберкулезная инфекция наиболее

актуальна для территорий Сибири и Дальнего Востока, с умеренным и холодным климатом, где ежегодно регистрируется в виде спорадических случаев или эпидемических вспышек.

Здесь циркулирует дальневосточный патогенный тип *Y. pseudotuberculosis* (YPMa+ HPI-, возбудитель системной псевдотуберкулезной инфекции) [8].

Псевдотуберкулез относится к числу инфекций с пищевым путем передачи, реализуемым через сырые овощи, загрязненные выделениями грызунов и длительное время хранившиеся при низкой температуре.

Клинические признаки псевдотуберкулеза у человека характеризуются разнообразием форм и вариантов, что, по-видимому, может быть обусловлено различной ролью тех или иных факторов патогенности *Y. pseudotuberculosis*. Кроме того, характерными особенностями патогенеза иерсиниозов являются длительное сохранение возбудителя в организме, незавершенность патологического процесса и нарушения иммуногенеза, в результате чего наблюдается развитие осложнений или вторично-очаговых форм этой патологии. Ежегодно в России регистрируется около 4,5 тыс. случаев заболевания иерсиниозами (из них более 50% - дети до 14 лет) [4].

Диагностика кишечных инфекций, обусловленных иерсиниями, характеризуется низкой эффективностью средств и способов их выявления. Такое положение определяет устойчивое внимание ученых к совершенствованию бактериологических и разработкам иммунохимических методов лабораторной диагностики псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза. В связи с этим актуальным остается поиск высокоспецифичных бактериальных антигенов для разработки новых эффективных вакцинных препаратов и средств дифференциальной диагностики иерсиниозов от других кишечных инфекций.

В качестве диагностических антигенов наиболее перспективным представляется использование белков наружной мембраны (НМ) бактерий, одним из которых является липолитический фермент – мембранно-связанная фосфолипаза А (PIdA - detergent-resistant phospholipase A, ген *pIdA*) [9]. Этот фермент отщепляет ацильный заместитель в молекулах фосфолипидов с образованием лизофосфолипидов и свободных жирных кислот. PIdA является Ca^{2+} -зависимым ферментом, который находится в НМ бактерий в не активной форме. Активация происходит в результате димеризации белка, вызванной нарушением целостности клеточной оболочки. Установлено, что фосфолипаза А является фактором вирулентности бактерий, однако до настоящего времени остаются неиз-

вестными ее мишени и механизм действия на клетки макроорганизма [10]. Показано, что бактерии *Helicobacter pylori* с высоким содержанием лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭ), являющегося основным продуктом гидролиза мембранной фосфолипазы А, характеризуются высокой патогенностью [15].

Нами было показано, что в условиях недостатка кислорода у *Y. pseudotuberculosis* существенно повышается уровень ЛФЭ, что коррелирует с изменением физических свойств мембран и увеличением инвазивности клеток [1]. Следует отметить, что в литературе описаны единичные исследования структурно-функциональных и антигенных свойств бактериальных фосфолипаз. Для *Y. pseudotuberculosis* подобных исследований ранее не проводилось.

Целью данной работы является генетическая характеристика PIdA *Y. pseudotuberculosis* на основе изучения аллельного полиморфизма *pIdA* гена. Кроме того, в ходе работы была проведена оценка возможности применения рекомбинантной фосфолипазы А в качестве диагностического антигена для верификации псевдотуберкулезной инфекции.

Материалы и методы. Геномную ДНК из штаммов *Y. pseudotuberculosis* выделяли с помощью набора NucleoSpin® Tissue («Macherey-nagel», США) согласно рекомендациям производителя. Определение полиморфных вариантов генов *pIdA Y. pseudotuberculosis* проводили с помощью разработанных праймеров и HSTaq- полимеразы («Евроген», Россия) методом ПЦР с «горячим стартом». ПЦР фрагменты секвенировали на автоматическом ДНК анализаторе 3130xL («Applied Biosystems», США). Поиск гомологичных последовательностей осуществляли на сервере GenBank по алгоритму BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием пакета программ MEGA v.4 [14].

Филогенетические деревья для полученных нуклеотидных последовательностей строили с помощью метода ближайших соседей (Neighbour-Joining), используя алгоритм «Kimura-2parameter» и «bootstrap» тест в 1000 реплик.

Выделение, фолдинг и очистку рекомбинантной фосфолипазы А (rPIdA) проводили согласно методике, описанной в работе [7].

Сыворотки крови больных острой кишечной и вторично-очаговыми формами псевдотуберкулеза были полу-

чены из отделений Городской клинической больницы № 2 (г. Владивосток), стационара Медобъединения ДВО РАН (г. Владивосток) и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Саха (Якутия)» (г. Якутск). Для исследования сывороток крови применяли непрямой вариант ИФА, используя микропланшеты Costar (USA). В качестве антивидовых антител использовали коммерческие иммуноферментные конъюгаты производства НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи (г. Москва). Результаты учитывали на спектрофотометре µQuant, BIO-TEK INSTRUMENTS INC (USA) при 492 нм, в качестве хромогена применяли 0.04% раствор орто-фенилендиамина.

Результаты и обсуждение. Липолитические ферменты (липазы, фосфолипазы, лизофосфолипазы) играют существенную роль у бактерий, обеспечивая фосфолипидный обмен. Эти ферменты могут способствовать формированию патогенного потенциала бактерий. Показано, что фосфолипазы участвуют в адаптации бактерий к условиям среды организма-хозяина, облегчают секрецию факторов вирулентности и бактериоцинов, а также обладают способностью повреждать/разрушать мембраны клеток хозяина [9]. *Y. pseudotuberculosis* содержит две структурно различающиеся фосфолипазы А, одна из которых кодируется геном *pIdA* и является мембранно-связанным ферментом, другая кодируется геном *uplA* и представляет собой секретируемый белок. Показано, что ген фосфолипазы *pIdA Escherichia coli* находится под контролем конститутивного промотора, поэтому в клетке постоянно присутствует около 500 копий неактивного фермента [12]. Однако регуляция экспрессии PIdA *Y. pseudotuberculosis* скорее всего отличается от таковой у *E. coli* и может осуществляться на трансляционном или посттрансляционном уровнях [13]. В литературе нет данных о полиморфизме генов бактериальных фосфолипаз, поэтому анализ генов *pIdA Y. pseudotuberculosis* в сравнении с таковыми *Y. enterocolitica*, представленных в GeneBank и SEED, имеет важное значение для получения представлений о молекулярно-генетической характеристике липолитических ферментов.

В работе использовали 20 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных на территории Российской Федерации в период с 1955 по 2009 г., а также 15 штаммов *Y. pseudotuberculosis*, представляющих другие регионы мира. Все последовательности генов *pIdA* были

ПЦР амплифицированы, секвенированы и проанализированы с использованием программы MEGA v.4 [14].

Сравнение генов *pldA* *Y. pseudotuberculosis* проводилось с аналогичными генами *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis* и *Y. enterocolitica*, геномы которых представлены в GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). В общей сложности в программе ClustalW 2.0.10 [11] было выровнено 47 последовательностей *pldA* гена. Размер анализируемой нуклеотидной последовательности составил 876 н.п. С целью исследования полиморфизма *pldA* были определены аллели для генов фосфолипазы А *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. Для *pldA* гена было получено пять аллелей. Преобладающее большинство (67,6%) штаммов *Y. pseudotuberculosis* принадлежало к 4-му аллелю, 11,8 – к 1-му (вместе с *Y. similis*), 8,8 – к 3-му и 5,9% штаммов ко 2-му аллелю. Штаммы *Y. pestis* в основном относились к 1-му аллелю (данные не показаны), единственный штамм Angola образовывал собственный 5-й аллель. В то же время для девяти штаммов *Y. enterocolitica* было выделено шесть нуклеотидных *pldA* и четыре аминокислотных *PldA* аллелей. Шесть штаммов *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* составляли 3-й аллель *PldA* (4-й и 5-й нуклеотидные *pldA* аллели), два штамма IA принадлежали к 1-му *PldA* аллелю (1-й и 3-й нуклеотидные *pldA* аллели), один штамм *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* (IB) образовывал собственный аллель 2.

Для изучения филогенетической структуры *pldA* было сконструировано дерево. Как видно из рис. 1 внутри вида *Y. pseudotuberculosis* можно выделить три генетические группы. Первая группа, самая многочисленная, была представлена штаммами, относящимися к 4-му аллелю. В эту группу вошли все три штамма *Y. pestis*. Вторая группа была образована тремя штаммами *Y. pseudotuberculosis*, принадлежащими к 3-му аллелю. Пять штаммов *Y. pseudotuberculosis* (1-й и 2-й нуклеотидные аллели) группировались с *Y. similis* и составили третью группу. Штаммы *Y. enterocolitica* формируют отдельный кластер с двумя выраженными группами, что совпадает с современным разделением вида на два подвида: *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* и *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica*. Штаммы биотипа IA группируются вместе со штаммом *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica*. Следует отметить, что между генетическими группами внутривидовая дивергенция для *pldA* *Y. pseudotuberculosis* составила

0,021-0,027, в то время как для *pldA* *Y. enterocolitica* она была в два раза выше (0,057-0,059). Эти данные свидетельствуют о низкой степени полиморфизма гена *pldA* *Y. pseudotuberculosis*, а следовательно, о высоком консерватизме аминокислотной последовательности фосфолипазы А.

Современные поколения диагностических препаратов основаны на последних достижениях в области биотехнологии. Для выявления антител в сыворотках крови широко используются рекомбинантные белки и синтетические пептиды. Применение рекомбинантных белков в диагностических тест-системах имеет целый ряд преимуществ по сравнению с антигенами,

выделенными из клеток микроорганизмов. Прежде всего, это прекращение использования высокопатогенных инфекционных агентов при производстве компонентов тест систем. Другим важнейшим преимуществом данных технологий является стандартизация качества новых иммунодиагностических систем, отсутствие в рекомбинантных белках нежелательных примесей позволяет избежать неспецифической гипердиагностики и снизить процент ложноположительных реакций.

Ранее нами была сконструирована генетическая система для получения рекомбинантной фосфолипазы А *Y. pseudotuberculosis* и получен штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)/mPlidA

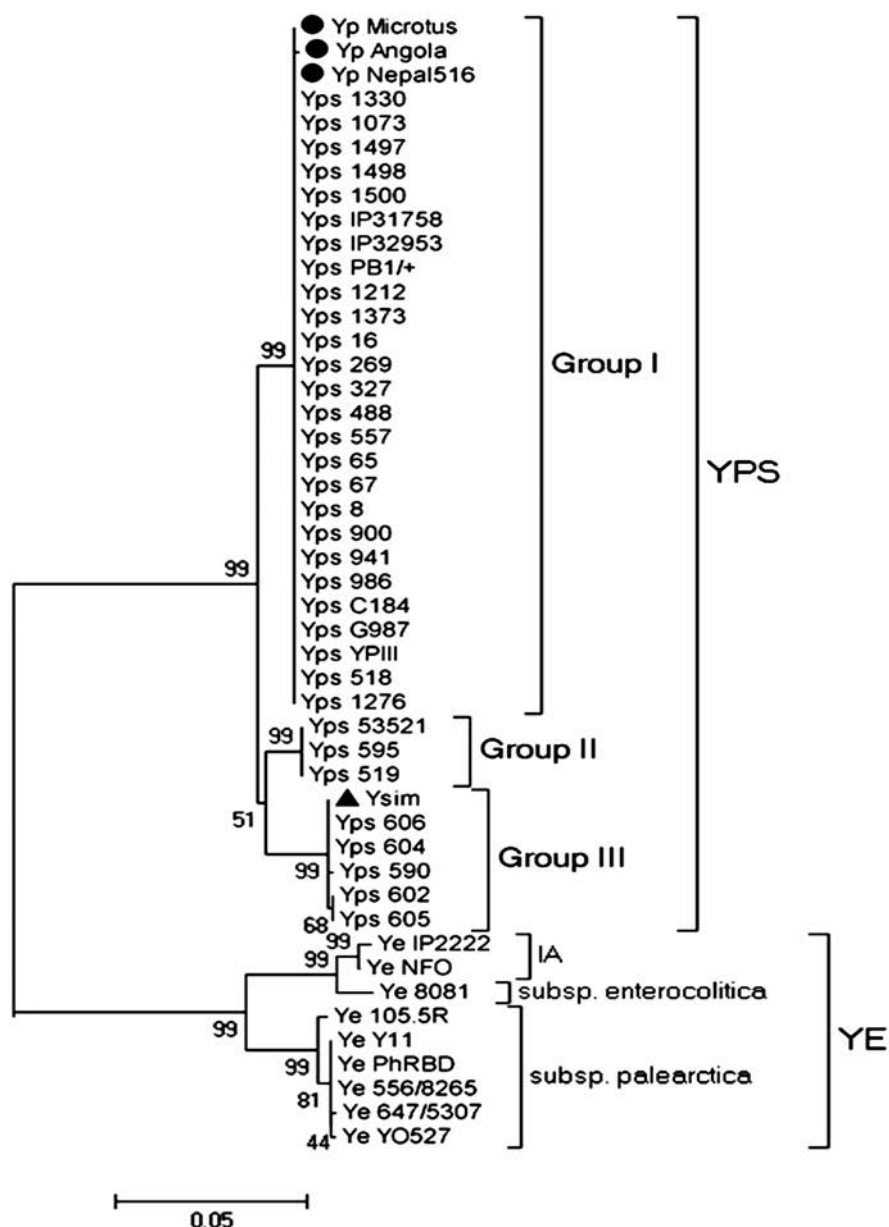


Рис. 1. Филогенетическое дерево иерсиний, построенное методом ближайших соседей на основании *pldA* гена. Шкала отображает количество нуклеотидных замен на нуклеотидный сайт. Числа в узлах дерева показывают величину «bootstrep» поддержки в 1000 реплик. Обозначения: YPS – *Y. pseudotuberculosis*; YE – *Y. enterocolitica*; ● – *Y. pestis*; ▲ – *Y. similis*

[5]. Белок был экспрессирован без сигнальной последовательности и накапливался в цитоплазме в агрегированном состоянии в виде телец включения. Поэтому выделенный белок был растворен в 8 М мочеvine и переведен в нативную конформацию в щелочных условиях в присутствии неионного детергента тритон X-100.

Полученная rPldA была использована в качестве антигена в ИФА тест-системе для обнаружения специфических антител в сыворотках крови людей, больных острой кишечной и вторично-очаговой формами псевдотуберкулеза. Для выявления специфических антител к rPldA были взяты образцы сывороток крови больных, в которых обнаруживалось диагностическое количество антител к OmpF порину, используемому в качестве антигена в ИФА тест-системе для верификации псевдотуберкулеза [2, 3].

Как видно из рис.2, во всех исследованных сыворотках обнаружены антитела к rPldA. Уровень антител к фосфолипазе был ниже по сравнению с таковым к OmpF порину, однако в 50% случаев значения оптической плотности цветной реакции (A_{492}) указывали на наличие антител в диагностическом количестве. Таким образом, нами было показано, что фосфолипаза А из НМ *Y. pseudotuberculosis*, в силу своей локализации на поверхности клетки, является не только одним из факторов вирулентности грамотрицательных бактерий, но и относится к иммуногенным для человека компонентам НМ. Интересно отметить, что антитела к подобным ферментам, выделенным из мембран других патогенных для человека грамотрицательных бактерий, в сыворотках крови больных ранее не обнаруживались [6].

Заключение. Таким образом, установлено, что доминирующим вариантом мембранно-связанной фосфолипазы А является 4-й аллель, кодируемый pldA генами первой генетической группы *Y. pseudotuberculosis*. Выявлена высокая консервативность PldA *Y. pseudotuberculosis* на нуклеотидном и аминокислотном уровнях по сравнению с PldA *Y. enterocolitica*. Путем экспрессии в клетках *E. coli* получена рекомбинантная фосфолипаза А, антитела, специфичные к ней, были обнаружены в сыворотках крови больных острой кишечной и вторично-очаговой формами псевдотуберкулеза. В связи с этим разработана новая эффек-

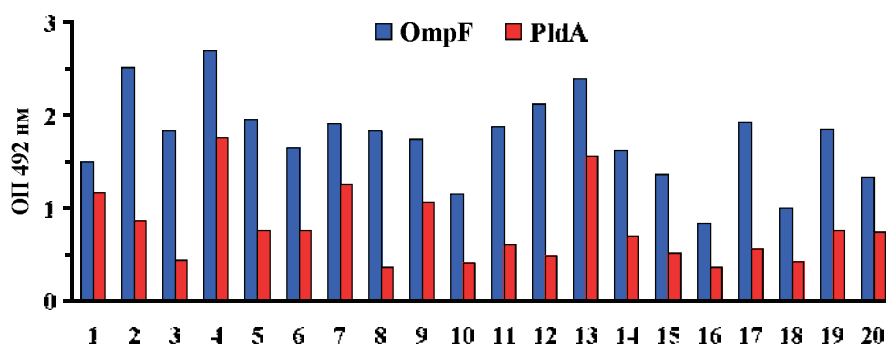


Рис.2. ИФА взаимодействия OmpF порина и rPldA с сыворотками больных острой (1- 4) и вторично-очаговой (5-20) формами псевдотуберкулеза

тивной диагностической тест-системы на основе рекомбинантной фосфолипазы А для верификации псевдотуберкулезной инфекции представляется актуальной задачей и требует дальнейших исследований в данной области.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке грантов программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» № 09-I-U22-05 и гранта Президиума ДВО РАН № 12-III-A-05-054.

Литература

1. Бактерии псевдотуберкулеза с высоким содержанием лизофосфатидилэтанолamina обладают повышенной инвазивностью и устойчивостью к температурному стрессу / С. И. Бахольдина, Ф. Н. Шубин, Н. М. Санина [и др.] // Исследования в области физико-химической биологии и биотехнологии: тез. докл. II регион. науч. конф. – Владивосток: ДВО РАН, 2006. – С. 104. – ISBN5-7442-1436-4.
2. *Yersinia pseudotuberculosis* with high degree of lysophosphatidylethanolamine increases invasiveness and resistance to thermal stress / S.I. Bakholdina, F.N. Shubin, N.M. Sanina [et al.] // Researches in the physics and biology and biotechnology fields: abstr. of the II region. scient. conf. – Vladivostok: FEBRAS, 2006. – P.104. – ISBN5-7442-1436-4.
3. Способ диагностики псевдотуберкулеза: Патент № 2153172 Российской Федерация / А.В. Гордеев, О.Ю. Портнягина, О.П. Вострикова [и др.]. – 1998. – Бюл. № 20.
4. Method of pseudotuberculosis diagnostics // RF Patent № 2153172 / Gordeets A.V., Portnyagina O.Yu., Vostricova O.P. [et al.], 1998. – Byull. № 20.
5. Разработка и апробация высокоэффективных тест-систем для диагностики иерсиниозов / О.Ю. Портнягина, О.П. Вострикова, О.Д. Новикова [и др.] // ТМЖ. – 2010. – №10. – С. 85-90.
6. Development and testing of high-performance test systems for the yersiniosis diagnosis / O.Yu. Portnyagina, O.P. Vostricova, O.D. Novikova [et al.] // Pacific Medical Journal. – 2010. – №10. – P. 85-90.
7. Иерсинии и иерсиниозы / Под ред. д.м.н. Г.Я. Ценовой – М.: ООО «Бастин». – 2006. С. 168.

Yersinia and Yersiniosis / Editor G.Ya. Tseneva [et al.] / – М.: ООО «Бастин». – 2006. – 168 p.

5. Recombinant outer membrane phospholipase A from *Yersinia pseudotuberculosis*: expressing, purification and characterization / S. Bakholdina, M. Issaeva, N. Fayzulina, P. Dmitrenok [et al.] // XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology: final program. – Sapporo, 2011. – P. 127.

6. Function of neisserial outer membrane phospholipase A in autolysis and assessment of its vaccine potential / M.P. Bos, B. Tefsen, P. Voet [et al.] // Infect Immun. – 2005. – V. 73(4). – P. 2222–2231.

7. In vitro folding of *Escherichia coli* outer-membrane phospholipase A / N. Dekker, K. Merck, J. Tomassen [et al.] // J. Biochem. – 1995. – V. 232. – P. 214-219.

8. Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen, and the highpathogenicity island among *Yersinia pseudotuberculosis* strains / H. Fukushima, Y. Matsuda, R. Seki [et al.] // J Clin Microbiol. – 2001. – V. 39. – P. 3541–3547.

9. Phospholipase A in gram-negative bacteria and its role / T.S. Istivan, P.J. Coloe // Microbiology. – 2006. – V. 152. – P. 1263–1274.

10. Application of high-density array-based signature-tagged mutagenesis to discover novel *Yersinia* virulence-associated genes / A.V. Karlyshev, P.C.F. Oyston, K. Williams [et al.] // Infect Immun. – 2001. – V.69. – P. 7810–7819.

11. ClustalW and ClustalX version 2 / M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown [et al.] // Bioinformatics. – 2007. – V. 23(21). – P. 2947-2948.

12. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology / F. C. Neidhardt [et al.]. – Washington, D.C.: ASM Press, 1996. – 2 vols. – 2898 p.

13. Temperature and growth phase influence the outer-membrane proteome and the expression of a type VI secretion system in *Yersinia pestis* / R. Pieper, S. Huang, J. Robinson [et al.] // Microbiology. – 2009. – V. 155. – P. 498-512.

14. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 / K. Tamura, J. Dudley, M. Nei // Molecular Biology and Evolution. – 2007. – V. 24. – P. 1596-1599.

15. High relative content of lysophospholipids of *Helicobacter pylori* mediates increased risk for ulcer disease / T. Tannaes, I.K. Bukholm, G. Bukholm // FEMS Immunol Med Microbiol. – 2005. – V. 44(1). – P. 17-23.