

К.А. Собянин, Е.В. Сысолятина,  
Я.М. Чаленко, С.А. Ермолаева

## ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНЫХ ВАРИАНТОВ ФАКТОРА ИНВАЗИИ INLB НА ВИРУЛЕНТНОСТЬ ЛИСТЕРИЙ

К.А. Sobyenin, E.V. Sysolyatina,  
Ya.M. Chalenko, S.A. Yermolaeva

### EFFECTS OF NATURALLY OCCURRING VARIANTS OF INVASION FACTOR INLB ON *LISTERIA MONOCYTOGENES* VIRULENCE

**Собянин К.А.** – мл. науч. сотр. лаб. экологии возбудителей инфекций отдела природно-очаговых инфекций Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения РФ, г. Москва. E-mail: dr.konstsob@yandex.ru

**Сысолятина Е.В.** – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. экологии возбудителей инфекций отдела природно-очаговых инфекций Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения РФ, г. Москва. E-mail: demiurg\_84@mail.ru

**Чаленко Я.М.** – мл. науч. сотр. лаб. экологии возбудителей инфекций отдела природно-очаговых инфекций Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения РФ, г. Москва. E-mail: yaroslavazaka@yandex.ru

**Ермолаева С.А.** – д-р биол. наук, зав. лаб. экологии возбудителей инфекций отдела природно-очаговых инфекций Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения РФ, г. Москва. E-mail: drermolaeva@mail.ru

**Sobyenin K.A.** – Junior Staff Scientist, Lab. of Causative Agents of Infections Ecology, Department of Natural and Focal Infections, Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamalei, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow. E-mail: dr.konstsob@yandex.ru

**Sysolyatina E.V.** – Cand. Biol. Sci., Senior Staff Scientist, Lab. of Causative Agents of Infections Ecology, Department of Natural and Focal Infections, Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamalei, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow. E-mail: demiurg\_84@mail.ru

**Chalenko Ya.M.** – Junior Staff Scientist, Lab. of Causative Agents of Infections Ecology, Department of Natural and Focal Infections, Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamalei, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow. E-mail: yaroslavazaka@yandex.ru

**Yermolaeva S.A.** – Dr. Biol. Sci., Head, Lab. of Causative Agents of Infections Ecology, Department of Natural and Focal Infections, Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamalei, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow. E-mail: drermolaeva@mail.ru

Грамположительная бактерия *Listeria monocytogenes* относится к числу возбудителей сапронозов. Листерии, вызывающие тяжелое заболевание у человека и широкого круга домашних и диких млекопитающих, являются факультативными внутриклеточными паразитами. Фактор инвазии InlB, взаимодействующий с консервативным эукариотическим рецептором c-Met, отвечает за актив-

ную инвазию листерий в эпителиальные клетки. Ранее, исследуя штаммы *L. monocytogenes*, выделенные из клинических случаев листериоза и от диких животных, мы идентифицировали 16 природных вариантов InlB. В рамках данной работы мы клонировали 4 аллели inlB, кодирующих наиболее часто встречающихся варианты InlB. Клонированные аллели inlB были введены в штамм *L. monocytogenes*

EGDe $\Delta$ InIB, лишенный этого гена вследствие сайт-специфической делеции. В результате было получено 4 изогенных рекомбинантных штамма, отличающихся только по последовательности InIB. Сравнение эффективности инвазии рекомбинантных бактерий в культуры эпителиальных клеток человека HEK293 и мыши C26 показало, что, хотя все изученные варианты InIB обеспечивали инвазию в клетки обоих типов, эффективность инвазии была разной. Варианты, обеспечивающие более эффективную инвазию в клетки человека, были менее эффективны на клетках мышей, и наоборот, вариант InIB, обеспечивающий максимальную эффективность инвазии в клетки мышей, был менее эффективен на клетках человека. Штамм с вариантом InIB, обеспечивающим максимальную инвазию в клетки мышей, продемонстрировал максимальную вирулентность на модели интрагастральной инфекции лабораторных мышей. В целом наши данные показывают, что природные варианты InIB различаются по эффективности взаимодействия с клетками разных хозяев, что, в свою очередь, приводит к изменениям в вирулентности бактерий. Полученные результаты важны для понимания механизмов, лежащих в основе полипатогенности *L. monocytogenes* и других возбудителей сапронозов, и могут лечь в основу создания систем мониторинга листерий в окружающей среде.

**Ключевые слова:** *Listeria monocytogenes*, сапронозы, полипатогенность, внутриклеточный паразитизм.

*The facultative intracellular pathogen Listeria monocytogenes is a causative agent of the sapronotic diseases. Listerias, causing a serious illness in the man and a wide range of domestic and wild mammals, are facultative intracellular parasites. InIB is an invasion factor interacting with a conservative eucaryotic receptor with-Met is the cause of active invasion of listeria in epithelial cells. Earlier, investigating L. monocytogenes strains allocated from clinical cases of listeriosis and from wild animals we identified 16 natural InIB options. Within this work we cloned 4 alleles inIB coding the most often meeting InIB options. The cloned alleles of inIB were injected into the strain of L. monocytogenes EGDe $\Delta$ InIB deprived of this*

*gene owing to the site, i.e. a specific deletion. 4 isogene recombinant strains differing only in sequence of InIB were received as a result. Comparison of an invasion efficiency of recombinant bacteria in cultures of epithelial cells of the person of HEK293 and a mouse of C26 showed that though all studied InIB options provided invasion in cells of both types, the efficiency of invasion was different. The variants providing more effective invasion in cells of the person were less effective in cells of mice and vice versa, the InIB variant providing maximum efficiency of an invasion in cells of mice was less effective on human cells. The allele that gave rise to the most effective invasion in mouse cells was less efficient than other alleles in human cells. The strain demonstrating maximal invasion was more virulent on the mouse model of infection. Taken together, our data demonstrated that while all naturally occurred, InIB variants supported invasion in cells of both human beings and mice, some variants seemed to allow better invasion in cells of a certain host. Obtained results might be useful for understanding molecular mechanisms underlying polyathogenecity of sapronotic infectious agents and development of systems for L. monocytogenes control and monitoring.*

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, sapronoses, polyathogenecity, intracellular parasitism.

**Введение.** Листерииоз – сапронозное инфекционное заболевание человека и животных, вызываемое факультативным внутриклеточным паразитом *Listeria monocytogenes*, характеризуется полиморфизмом клинических проявлений и высоким процентом летальных исходов [1]. Листерииоз – эмерджентная инфекция пищевого происхождения, критической точкой развития которой является активная инвазия в энтероциты и последующее пересечение эпителиального барьера кишечника [2]. Характерной чертой листерий, как и других возбудителей сапронозов, является полипатогенность, т.е. способность вызывать заболевание у широкого спектра потенциальных хозяев [3]. Изучение факторов инвазии, ответственных за пересечение эпителиального барьера кишечника и выявление эпидемиологически значимых маркеров *L. monocytogenes*, является актуальной задачей изучения возбудителей сапронозов.

Основную роль в инвазии листерий в эпителиальные клетки, в том числе в энтероциты кишечника, играют два поверхностных белка, относящиеся к семейству интерналинов, InlA и InlB [2, 4]. Эти белки характеризуются наличием так называемого LRR (leucine – rich repeat)-домена. LRR-домен вовлечен во взаимодействие белков семейства интерналинов с эукариотическими рецепторами. Интерналины InlA и InlB взаимодействуют с эукариотическими рецепторами E-кадхерином и с-Met соответственно [2].

Анализ штаммов *L. monocytogenes*, выделенных из клинического материала диких и домашних животных, показал, что специфическим маркером, характерным для штаммов, ответственных за вспышки перинатального листериоза, является определенный вариант InlA [5, 6]. Изучение листерий, выделенных от диких мелких мышевидных грызунов, установило консерватизм другого интерналина – InlB [5, 6]. Из 16 идентифицированных аллелей *inlB* у штаммов, выделенных от мышевидных грызунов, было выявлено только 2 [6]. Нами было выдвинуто предположение, что идентифицированные варианты факторов инвазии InlA и InlB, являющиеся маркерами штаммов, выделенных от определенного хозяина, обеспечивают максимальный уровень инвазии в клетки этого хозяина [7, 8]. Различия в эффективности взаимодействия вариантов InlB с рецепторами клеток определенного вида млекопитающих могут влиять на эффективность инвазии листерий в клетки и, следовательно, на вирулентность возбудителя в отношении этого вида.

**Цель работы.** Экспериментальное изучение роли природных вариантов интерналина InlB в инвазии и вирулентности листерий. Фактор InlB был выбран, поскольку его свойства могут быть изучены как в культурах клеток, так и на экспериментальной модели листериоза у лабораторных мышей. Однако мы полагаем, что закономерности, выявленные для этого фактора, будут актуальны и для InlA, объясняя тем самым причины установленной на основании эпидемиологических данных корреляции между определенным вариантом InlA и вирулентностью штамма для человека.

**Материалы и методы.** В работе использованы штаммы *L. monocytogenes* из коллекции

лаборатории экологии возбудителей инфекций ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России VIMHA004, VIMHA015, VIMHA034, а также типовой штамм EGDe (серовар 1/2a) и его изогенный вариант EGDeΔinlB с делецией гена *inlB*, любезно предоставленные Dr. J.Vazquez-Boland, Univ. Bristol, UK. *L. monocytogenes* культивировали в сердечно-мозговом бульоне или агаре (BHI, BD, США) при 37°C. Рекомбинантные штаммы листерий выращивали на той же питательной среде в присутствии 10 мкг/мл эритромицина (Sigma, США). Штаммы *E. coli* выращивали на среде Лурия-Бертани (LB) (Amresco, США) при 37°C. Культуру для инфицирования эукариотических клеток и мышей готовили, как описано в [9]. Компетентные клетки *E. coli* и *L. monocytogenes* готовили, как в [10]. Трансформацию компетентных клеток проводили методом электропорации с помощью прибора Gene Pulse Xcell (BioRad, США) согласно инструкции. Лизаты *L. monocytogenes* для ПЦР готовили, как описано в [6]. ПЦР проводили в термоциклере Терцик (ДНК-технология, Россия) в условиях, описанных в [6]. Рестрикцию и лигирование проводили стандартными методами. Фрагменты ДНК очищали с помощью набора Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, США).

Для определения эффективности инвазии были использованы человеческие эмбриональные клетки почечного эпителия HEK293 и клетки карциномы кишечника мышей С26. Клетки культивировали в среде DMEM (Пан-Эко, Москва) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (HyClone, Бразилия), при 37°C в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Эффективность инвазии определяли в тесте защиты от гентамицина, как описано в [9].

Для экспериментальной модели листериоза использовали мышей линии BALB/c массой 16–18 грамм, по 5 штук в группе. Бактериальную суспензию, содержащую 1,5x10<sup>8</sup> КОЕ в 200 мкл физиологического раствора, вводили внутрижелудочно зондом. Оценку накопления бактерий в печени и селезенке проводили через 72 часа путем высевов 10-кратных разведений стерильно приготовленных гомогенатов органов. Все высевы проводили в дубликате. Результаты экспериментов обработаны с использованием программного пакета Microsoft Excel 2007.

**Результаты исследования.** Для объективной оценки эффективности природных вариантов InIB необходимо было получить изогенные штаммы *L. monocytogenes*, экспрессирующие эти варианты. Для этого был использован штамм *L. monocytogenes* EGDeΔinIB с делецией гена *inIB*, любезно предоставленный Prof. J.A. Vazquez-Boland. 4 аллели *inIB* были клонированы в штамм EGDeΔinIB, используя плазмиду pInIAB в качестве вектора. Плазмида pInIAB, созданная на основе шаттл-вектора pTRKH2 [11], была сконструирована для того, чтобы штаммы не отличались по уровню экспрессии и представленности InIB на поверхности бактерии (рис. 1). Для создания pInIAB в вектор pTRKH2 были встроены фрагменты оперона *inIAB*, несущие промоторную область оперона и фрагмент гена *inIA* (кодирующего лидерный пептид InIA), соединенные с 3'-концевой частью гена *inIB*, кодирующей B- и GW-домены, ответственные за презентацию InIB на поверхности бакте-

рии [1, 2]. Фрагменты были синтезированы на матрице хромосомной ДНК штамма EGDe, встроены в вектор pTRKH2 по сайтам узнавания рестриктаз XhoI и SmaI. Для удобства в конструкцию был встроены сайт узнавания рестриктазы BamHI.

Фрагменты, кодирующие LRR-домен и фланкирующие его последовательности, были синтезированы в ПЦР на матрице хромосомной ДНК четырех штаммов *L. monocytogenes*, VIMHA004 (вариант 1, кодируемый аллелью 1 в соответствии с номенклатурой, использованной в [6]), VIMHA015 (вариант 9), EGDe (вариант 13) и VIMHA034 (вариант 14). Аминокислотные различия указанных вариантов InIB приведены в таблице 1. Полученные ПЦР продукты, встроены в плазмиду pInIAB, создавали непрерывную рамку считывания, кодирующую белок InIB, у которого лидерный пептид был замещен лидерным пептидом белка InIA, а LRR-домен был представлен одним из природных вариантов.

**Аминокислотные различия между природными вариантами InIB, использованными в данной работе**

| Положение  | 69 | 73 | 91 | 117 | 132 | 138 | 164 | 176 | 181 | 197 | 205 | 246 | 251 | 262 |
|------------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Вариант 9  | L  | S  | I  | A   | I   | L   | L   | L   | I   | E   | S   | S   | M   | I   |
| Вариант 1  | .  | N  | V  | .   | .   | I   | P   | .   | .   | .   | .   | .   | T   | .   |
| Вариант 13 | A  | N  | V  | .   | V   | .   | P   | I   | V   | Q   | A   | P   | S   | T   |
| Вариант 14 | A  | N  | V  | T   | .   | .   | P   | I   | V   | Q   | A   | .   | S   | T   |

Набор изогенных штаммов был получен введением плазмид в штамм EGDeΔinIB. Таким образом, было получено 4 изогенных штамма, отличающихся только по последовательности LRR-домена InIB, т.е. домена, который непосредственно вовлечен во взаимодействие с рецептором c-Met [2]. Полученные рекомбинантные изогенные штаммы были проверены по основным биохимическим свойствам, скорости роста и не отличались по этим показателям от родительского штамма. Вместе с родительским штаммом EGDeΔinIB они составили коллекцию изогенных штаммов для анализа роли природных вариантов InIB во взаимодействии *L. monocytogenes* с клетками человека и мыши *in vitro*.

Бактерии родительского штамма EGDeΔinIB с делецией гена *inIB* очень плохо входили в эукариотические клетки (рис. 2). Особенно это ка-

салось мышинных клеток C26, где внутриклеточно выявлялись буквально отдельные бактерии. Эффективность инвазии всех рекомбинантных штаммов по крайней мере в 100 раз превышала эффективность инвазии штамма EGDeΔinIB. Это свидетельствует, что все природные варианты интерналинового домена InIB функционально активны и способны взаимодействовать с рецептором c-Met как человека, так и мыши.

Попарное сравнение инвазии рекомбинантных штаммов выявило статистически достоверные различия. В частности, эффективность инвазии в клетки HEK293 штаммов «9» и «13» (экспрессирующих варианты InIB 9 и 13), превышала эффективность инвазии штамма «1» в 3,4 и 3,6 раза соответственно. Эффективность инвазии штаммов «1» и «14» достоверно не отличалась. Напротив, в клетки мышей наиболее эффективно входил штамм «14». Эффектив-

ность его инвазии превышала эффективность инвазии штамма «13» в 4,6 раза. Эффектив-

ность инвазии остальных штаммов не сильно отличалась от инвазии штамма «13».

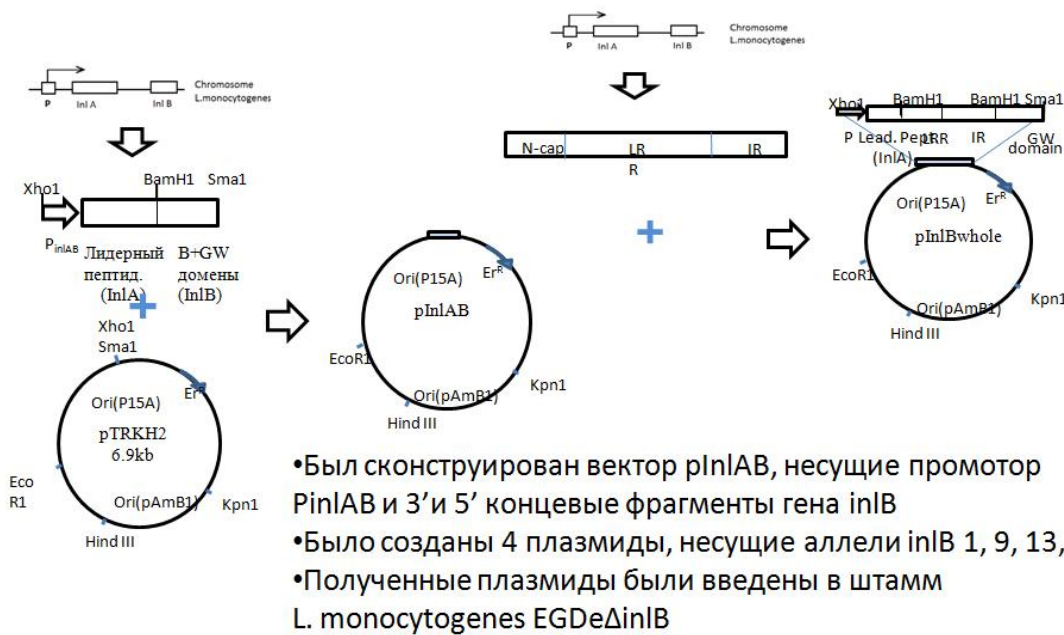


Рис. 1. Схема конструирования рекомбинантных плазмид для экспрессии природных вариантов *InlB* в *L. monocytogenes*

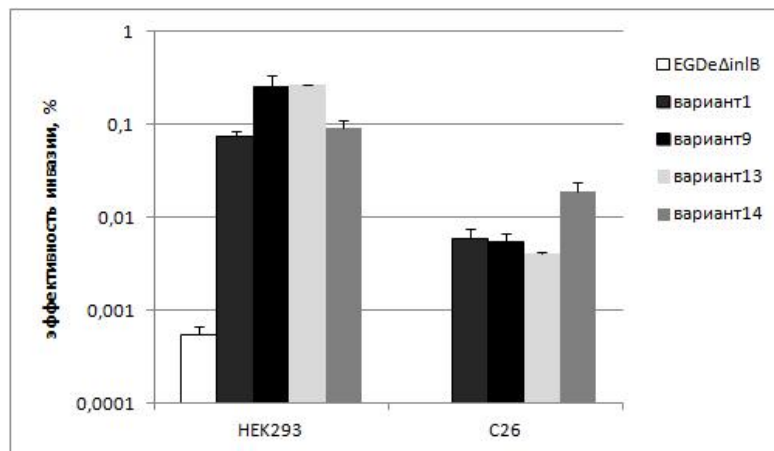


Рис.2. Эффективность инвазии изогенных рекомбинантных штаммов *L. топосутогенес* в клетки почки эмбриона человека HEK293 и карциномы кишечника мыши C26. Эффективность инвазии была определена в опыте по защите от гентамицина и выражена как процент бактерий, вошедших в клетки в течение 1 часа, к числу бактерий, использованных для инфекции

В естественных условиях наиболее вероятным путем инфицирования животных является пищевой. Через 72 часа после интрагастрального введения  $10^8$  КОЕ/животное в печени и селезенке были выявлены бактерии всех штаммов, включая родительский (рис. 3). Максимальная нагрузка в печени была достигнута при инфек-

ции штаммом «14»: количество бактерий превышало показатели штамма EGDeΔinlB в 250 раз ( $p \approx 0$ ). Штамм «9» практически не отличался от родительского штамма EGDeΔinlB. Отличия нагрузки в селезенке были менее выраженными.

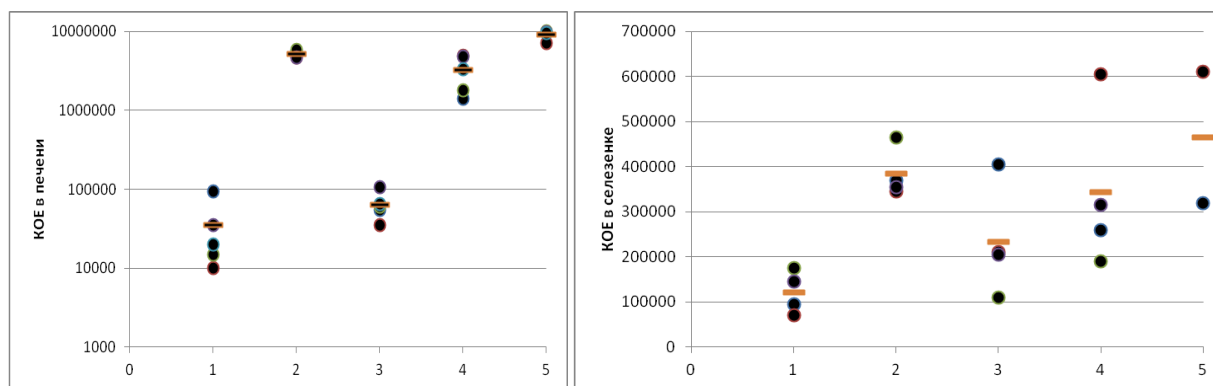


Рис. 3. Накопление бактерий в печени (слева) и селезенке (справа) мышей линии BALB/c через 72 часа после интрагастральной инфекции. Цифрами обозначены штаммы: 1 – EGDeΔinlB; 2 – EGDeΔinlB::pInlBallele1; 3 – EGDeΔinlB::pInlBallele9; 4 – EGDeΔinlB::pInlBallele13; 5 – EGDeΔinlB::pInlBallele14. Черные кружки обозначают значение, полученное для мыши на основании высева трех последовательных десятикратных разведений в дупликате, коричневый штрих – среднее, вычисленное для группы из 5 животных

Таким образом, природные варианты InlB обеспечивали разную вирулентность изогенных штаммов листерий при интрагастральном способе инфицирования лабораторных мышей. Важно отметить, что варианты InlB, обозначенные 1 и 14 (табл.), которые были найдены у штаммов листерий, выделенных от мелких мышевидных грызунов, обитающих в природных очагах листериоза [6], обеспечивали максимальное накопление бактерий во внутренних органах мышей. Вариант 14 также обеспечивал максимальную инвазию в линию клеток мышей C26.

**Выводы.** Полученные данные показывают, что изученные природные варианты InlB функционально активны и обеспечивают инвазию бактерии в клетки млекопитающих. Вместе с тем разные природные варианты InlB по-разному влияют на эффективность инвазии в клетки человека и мышей: варианты InlB, обеспечивающие более эффективную инвазию в клетки человека, уступают другому варианту при взаимодействии бактерии с клетками мышей. Полученные данные экспериментально доказывают, что корреляция между источником выделения листерий и наличием определенного варианта фактора инвазии, которая была ранее установлена на основании эпидемиологических данных [5, 6], связана с более эффективным распространением бактерий, несущих данный

вариант, во внутренние органы конкретного хозяина.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-15-00091.

### Литература

1. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. – М.: Медицина для всех, 2002. – 195 с.
2. Vázquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P. [et al.]. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2001. – Vol.14. – P. 584–640
3. Ряпис Л.А. Биомолекулярные основы патогенности сапрофитов (на примере псевдомонад и буркхолдерий) // *Ветеринарная патология*. – 2004. – № 4. – С. 6–12.
4. Lecuit M. Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2005. – Vol. 11. – P. 430–436.
5. Зайцева Е.А. Система анализа микробиологических и молекулярно-генетических маркеров для выявления высоковирулентных штаммов *Listeria monocytogenes*: дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2010. – 196 с.
6. Adgamov R., Zaytseva E., Thiberge J-M. [et al.]. Genetically related *Listeria monocytogenes* strains isolated from lethal

- human cases and wild animals // Genetic Diversity of Microorganisms. – Croatia: InTech, 2012. – P. 235–250.
7. Ермолаева С.А., Зайцева Е.А., Тимченко Н.Ф. [и др.]. Варибельность функциональных доменов факторов патогенности как молекулярная основа полигостальности возбудителей сапронозов // Тихоокеан. мед. журн. – 2010. – № 4. – С. 24–28.
  8. Адгамов Р.Р., Тимченко Н.Ф., Зайцева Е.А. [и др.]. Эколого-генетические механизмы формирования эпидемически значимых вариантов возбудителей сапронозных инфекций // Успехи современной биологии. – 2012. – Т. 132, № 6. – С. 551–567.
  9. Sysolyatina E., Sobyenin K., Vasiliev M. [et al.]. Non-thermal microwave argon plasma affects interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells but it does not kill the intracellular pathogen // Clinical Plasma Medicine. – 2015. – Vol. 3. – P. 87–92.
  10. Pushkareva V.I., Ermolaeva S.A. *Listeria monocytogenes* virulence factor Listeriolysin O favors bacterial growth in co-culture with the ciliate *Tetrahymena pyriformis*, causes protozoan encystment and promotes bacterial survival inside cysts // BMC Microbiology. – 2010. – Vol.10:26 doi:10.1186/1471-2180-10-26.
  11. O'Sullivan D.J., Klaenhammer T.R. High- and low-copy-number *Lactococcus* shuttle cloning vectors with features for clone screening // Gene. – 1993. – Vol.137. – P. 227–231.
- i burkholderij) // Veterinarnaja patologija. – 2004. – № 4. – С. 6–12.
4. Lecuit M. Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers // Clinical Microbiology and Infection. – 2005. – Vol. 11. – R. 430–436.
  5. Zajceva E.A. Sistema analiza mikrobiologicheskikh i molekularno-geneticheskikh markerov dlja vyjavlenija vysokovirulentnyh shtammov *Listeria monocytogenes*: dis. d-ra ... med. nauk. – M., 2010. – 196 s.
  6. Adgamov R., Zaytseva E., Thiberge J-M. [et al.]. Genetically related *Listeria monocytogenes* strains isolated from lethal human cases and wild animals // Genetic Diversity of Microorganisms. – Croatia: InTech, 2012. – P. 235–250.
  7. Ermolaeva S.A., Zajceva E.A., Timchenko N.F. [i dr.]. Variabel'nost' funkcional'nyh domenov faktorov patogennosti kak molekularnaja osnova poligostal'nosti vozбудitelej sapronozov // Tihookean. med. zhurn. – 2010. – № 4. – С. 24–28.
  8. Adgamov R.R., Timchenko N.F., Zajceva E.A. [i dr.]. Jekologo-geneticheskie mehanizmy formirovanija jepidemicheski znachimyh variantov vozбудitelej sapronoznyh infekcij // Uspehi sovremennoj biologii. – 2012. – Т. 132, № 6. – С. 551–567.
  9. Sysolyatina E., Sobyenin K., Vasiliev M. [et al.]. Non-thermal microwave argon plasma affects interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells but it does not kill the intracellular pathogen // Clinical Plasma Medicine. – 2015. – Vol. 3. – P. 87–92.
  10. Pushkareva V.I., Ermolaeva S.A. *Listeria monocytogenes* virulence factor Listeriolysin O favors bacterial growth in co-culture with the ciliate *Tetrahymena pyriformis*, causes protozoan encystment and promotes bacterial survival inside cysts // BMC Microbiology. – 2010. – Vol.10:26 doi:10.1186/1471-2180-10-26.
  11. O'Sullivan D.J., Klaenhammer T.R. High- and low-copy-number *Lactococcus* shuttle cloning vectors with features for clone screening // Gene. – 1993. – Vol.137. – P. 227–231.

### Literatura

1. Tartakovskij I.S., Maleev V.V., Ermolaeva S.A. Listerii: rol' v infekcionnoj patologii cheloveka i laboratornaja diagnostika. – M.: Medicina dlja vseh, 2002. – 195 s.
2. Vázquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P. [et al.]. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants // Clinical Microbiology Reviews. – 2001. – Vol.14. – P. 584–640
3. Rjapis L.A. Biomolekuljarnye osnovy polipatogennosti saprofitov (na primere psevdomonad