

Д. Л. Кирик

## СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ГЕНЕТИКИ БАКТЕРИЙ РОДА *SAMPYLOBACTER*

В аналитическом обзоре литературы представлены современные сведения по генетической организации кампилобактерий — возбудителей ОКИ у человека. Обобщены данные по молекулярной основе патогенности кампилобактерий — наличие жгутиков, энтеротоксина, главного наружного мембранного белка и поверхностного белка. Гены, кодирующие резистентность кампилобактерий к антибиотикам (*Kt*, *Tc*, *St*), клонированы, определена их нуклеотидная последовательность. Устойчивость к указанным антибиотикам носит плазмидный характер, и некоторые плазмиды обладают более чем одной детерминантой. Проанализированы механизмы генетического обмена у кампилобактерий (трандукция, трансконъюгация, трансформация). В настоящее время определены размеры генома и сконструированы пары хромосом некоторых штаммов кампилобактерий. За рубежом показана возможность использования методов молекулярной биологии для практических эпидемиологических исследований: гель-электрофореза в электрическом поле, рестрикционно-эндонуклеазного анализа ДНК, многолокусного энзимного электрофореза, иммуноблотинга, риботипирования, плазмидного анализа и полимеразной цепной реакции.

Острые кишечные инфекции (ОКИ) все еще продолжают наносить значительный ущерб здоровью населения многих стран мира. Особое внимание сосредоточено на заболеваниях, этиология которых не поддается расшифровке при помощи общепринятых лабораторных методов исследования. В ряду таких инфекций существенное место принадлежит кампилобактериозу, вызываемому микроорганизмами рода *Sampylobacter* (*S. jejuni*, *S. coli*, *S. laridis* и др.). В отличие от ранее известных бактериальных энтеропатогенов, кампилобактерий являются хемоорганотрофами (утилизируют аминокислоты, но не углеводы), микроаэрофилами (растут при содержании кислорода 3—10 % в культуральной атмосфере), термофилами (оптимальная температура роста 42 °С), а также медленнорастущими микроорганизмами (колонии формируются через 48—72 ч культивирования).

Современные обзоры литературы по проблеме кампилобактериозной инфекции содержат сведения о вопросах таксономии [74], эпидемиологии [72], роли в патологии человека [73] и антибиотикоустойчивости этих возбудителей [55]. Поэтому нам представляется целесообразным более подробно остановиться на генетической организации кампилобактерий — возбудителей ОКИ у человека.

В табл. 1 представлены хромосомные гены кампилобактерий, клонированные и успешно экспрессированные в *Escherichia coli*. В 1985 г. Ли и др. [25] идентифицировали два гена *S. jejuni*, ответственных за синтез пролина, которые клонировали в *proA proB*-мутант *E. coli*. Методом гибридизации рибосомной РНК из *S. jejuni* клонированы гены 16S и 23S рибосомных РНК (рРНК-гены) [23, 44]. Два гена транспортных РНК (тРНК<sup>Ala</sup> и тРНК<sup>Leu</sup>) были клонированы и идентифицированы по их гомологии с геном 16S рРНК [45]. Определена их нуклеотидная последовательность.

До настоящего времени остаются малоизученными молекулярные основы патогенности кампилобактерий. Поэтому определенное значение имеет генетический анализ белковых структур и других продуктов, определяющих особенности патогенеза этой инфекции. В этом ракурсе исследованы жгутики *S. jejuni* и *S. coli*, энтеротоксин и главный наружный мембранный белок (MOMP) *S. jejuni*, поверхностный белок (SAP) *S. fetus*.

Жгутики играют важную роль в вирулентности кампилобактерий, так как обеспечивают колонизацию кишечника. Безжгутиковые мутанты и неподвижные штаммы не могли колонизировать кишечник в животных моделях [1, 30, 37]. В дополнение к этому, жгутик является сильным иммуногеном, и у переболевших кампилобактериозом людей установлена выработка антижгутиковых антител [3, 34, 70].

Генетическая основа наличия жгутиков изучена на штаммах *S. jejuni* 81116 [36, 39, 69], *S. coli* VC167 [20, 63] и в меньшей степени — *S. jejuni* IN1 [14]. Обнаруженные гены были обозначены как *flaA* и *flaB*. Молекулярная масса детерминированного флагеллина находилась в пределах  $(60\,000-62\,000) \cdot 10^6$  [36]. С использованием техники замены гена показано, что *flaA+flaB*-производные обоих штаммов *S. jejuni* 81116 и *S. coli* VC167 содержали нормальные жгутики [24], в то время как *flaA-flaB*-мутанты были безжгутиковыми [20, 69]. Мутанты типа *flaA-flaB+* обоих штаммов имели редуцированную подвижность. Методом ДНК-гибридизации установлено, что гены *flaA* и *flaB* проявляются у большинства штаммов бактерий рода *Campylobacter* [63]. Авторы работы [21] предполагают, что ген *flaB* обеспечивает усиление жгутиковой подвижности, но, по-видимому, не во всех случаях.

Другие исследователи [7] показали возможность переноса генов между флагеллиновыми и афлагеллиновыми фенотипами. Переход *Fla+* → *Fla-* встречается с частотой приблизительно  $3 \cdot 10^{-3}$  клеток на генерацию, а наоборот (*Fla-* → *Fla+*) —  $4 \cdot 10^7$ . Реверсию в *Fla+*-фенотипы проще получить *in vivo*, а в *Fla-* — *in vitro*.

Изучена антигенная вариация, относящаяся к способности различных видов кампилобактерий к экспрессии жгутиков с различными антигенными характеристиками. Так, у штамма *S. coli* VC167 показана продукция двух флагеллинов, отличающихся молекулярными массами, —  $61\,500 \cdot 10^6$  (T1) и  $50\,500 \cdot 10^6$  (T2) [20, 22]. Изоэлектрофокусирование очищенных жгутиковых филаментов из нескольких серотипов *S. jejuni* также продемонстрировало изменчивость заряженных флагеллинов [33]. Молекулярные основы жгутиковой антигенной вариации остаются малоизученными.

Известен ряд работ по экспрессии генов флагеллина кампилобактерий в *E. coli*. Молекулярный анализ генов флагеллина был затруднен ввиду невозможности экспрессии рекомбинантных генов *fla* в клетках *E. coli* [21]. Одной из причин, затрудняющих экспрессию генов флагеллинов кампилобактерий в клетках *E. coli*, является различие в частоте использования кодонов, а также отсутствие посттрансляционных модификаций белков в *E. coli* [51].

Таблица 1

Гены, клонированные у бактерий рода *Campylobacter*

Клонированный ген	Источник информации
γ-Глютамилкиназа ( <i>proA</i> )	[25]
γ-Глютамилфосфатредуктаза ( <i>proB</i> )	[25]
Серингидроксиломethylтрансфераза ( <i>glyA</i> )	[9, 10]
β-Изопропилмалат (IPM) дегидрогеназа ( <i>leuB</i> ), IPM изомеразы ( <i>leuC</i> , <i>leuD</i> )	A. Labigne* D. E. Taylor* V. L. Cian*
Ацетилорнитиназа ( <i>argE</i> )	[21, 26, 39, 40]
Аргиносукиназа ( <i>argH</i> )	[15]
Флагеллин ( <i>flaA</i> , <i>flaB</i> )	[57]
Флагеллин ( <i>flaA</i> )	[23, 44]
Главный наружный мембранный белок ( <i>motp</i> )	[45]
Рибосомная РНК: 16S; 23S	[4]
тРНК (Ala), тРНК (Leu)	[47, 68]
Поверхностно-расположенный белок ( <i>sapA</i> )	[42, 62, 64]
Хлорамфениколацетилтрансфераза ( <i>cat</i> )	[13, 28, 54, 71, 75]
Аминоглюкозидфосфотрансфераза ( <i>aphA-1</i> ; <i>aphA-3</i> ; <i>aphA-7</i> )	
Тетрациклиновая устойчивость ( <i>tetO</i> )	

\* Неопубликованные сообщения.

Установлена хромосомная локализация генов энтеротоксинов у некоторых кампилобактерий [59]. Основываясь на гомологии нуклеотидных последовательностей генов *toxB* из *Vibrio cholerae* и *eltB* из *E. coli*, авторы [8] синтезировали олигонуклеотидные зонды, с помощью которых удалось идентифицировать аналогичную последовательность в геноме *C. jejuni*.

С помощью поликлональных антител против МОМР *C. jejuni* UA580 из библиотеки генов *C. jejuni* на основе *λgt11* были изолированы два фрагмента (147 и 1845 п. н.) *tomr*-гена [57]. При этом первый фрагмент гибридизовался только с ДНК *C. jejuni* и мог быть использован как специфический зонд для *C. jejuni*, в то время как второй — со всеми штаммами *C. jejuni*, *C. coli* и некоторыми *C. laridis* [58].

В настоящее время определена нуклеотидная последовательность гена *sap* *C. fetus*, детерминирующего образование этого белка. *SAP* состоит из 933 аминокислотных остатков и, таким образом, имеет молекулярную массу  $96\,758 \cdot 10^6$  [4]. Дальнейшее изучение *SAP*-белка *C. fetus* будет направлено на анализ его роли во взаимодействии микробов с клетками иммунной системы, в прокоагуляции и в регуляции уровня кальция.

Гены, кодирующие резистентность бактерий рода *Campylobacter* к трем различным антибиотикам, клонированы в *E. coli*, определена их нуклеотидная последовательность. Устойчивость к антибиотикам — канамицину (*Km*), тетрациклину (*Tc*) и хлорамфениколу (*Sm*) носит плазмидный характер, и отдельные плазмиды обладают более чем одной детерминантой [55]. Все детерминанты устойчивости кампилобактерий могут быть переданы в *E. coli*, а некоторые — использованы для конструкций плазмидных векторов грамотрицательных бактерий.

У бактерий рода *Campylobacter* устойчивость к канамицину (*Km*<sup>r</sup>) определяют три различные генетические детерминанты. Однако генетическая детерминация выражена общим процессом продукции 3'-О-аминоглицозидфосфотрансферазы. У штамма бактерии *campylobacter-like organisms* (CLO) BM2196 установлена хромосомная локализация гена *Km*<sup>r</sup> [42]. Последовательность нуклеотидов в этом гене соответствовала гену *IS 15-A*, широко распространенному у грамотрицательных бактерий. Эти результаты подтверждают тот факт, что *Km*<sup>r</sup>-детерминанта получена кампилобактериями от некоторых энтеробактерий.

У *C. coli* *Km*<sup>r</sup>-детерминанта представлена плазмидой *pIP1433* размером 48 тыс. п. н. [60], содержащей ген *aphA-3*, определяющий синтез 3'-аминоглицозидфосфотрансферазы III типа.

Из плазмиды *pS1178* *C. jejuni* размером 14 тыс. п. н. клонирован третий ген *Km*<sup>r</sup>-*aphA-7* [62]. ДНК-последовательность у гена *aphA-7* имела большое сходство с таковой у *Streptococcus faecalis*.

Теновер с соавт. [61] встроили в вектор *pBR322* новый ген канамицинустойчивости, который был экспрессирован в *E. coli*.

Тетрациклинустойчивость (*Tc*<sup>r</sup>) детерминирована конъюгативными плазмидами: у *C. coli* — *pIP1433*, у *C. jejuni* — *pUA466* и *pFKT1025* [52, 54, 75]. *Tc*<sup>r</sup>-детерминанты *C. coli* и *C. jejuni* имели высокую степень гомологии на нуклеотидном уровне [28]. Ген *tet(O)* кодирует синтез белка *Tet(O)* молекулярной массой 69 000, ингибирующего чувствительность к тетрациклину [27]. Тейлор с соавт. [56] описали трансконъюгативную плазмиду *pMAK175* (44,7 тыс. п. н.), детерминирующую *Tc*<sup>r</sup> и содержащую *G*—*C* от 31 до 33 мол. %. Эта плазмиды обеспечивает штаммам *C. jejuni* и *C. coli* высокую степень тетрациклинустойчивости ( $\geq 64$  мг/мл). Было показано полное отсутствие гомологии между *pMAK175*-ДНК и тетрациклинустойчивыми детерминантами энтеробактерий, что свидетельствует об автономном происхождении этой плазмиды у кампилобактерий.

В Японии [47] из штамма *C. coli* изолирована плазмиды (*pNR9589*), определяющая устойчивость к хлорамфениколу (*Sm*<sup>r</sup>). Идентифицирован *cat*-ген, детерминирующий синтез хлорамфениколацетилтрансферазы [66]. Ввиду относительной редкости *Sm*<sup>r</sup> у кампи-

лобактерий предполагается, что *C. coli* получили *cat*-ген от кластридий [2].

Авторы работы [18] обнаружили среди штаммов *C. upsaliensis* 60,7 % плазмидосодержащих. Установлено 16 различных плазмидных паттернов, включающих плазмиды молекулярной массой 52·10<sup>6</sup>; 32·10<sup>6</sup>; 5,5·10<sup>6</sup> и 2,6·10<sup>6</sup>. Авторам не удалось выявить зависимости между наличием антибиотикоустойчивости или других фенотипических маркеров и присутствием этих плазмид.

Встречаются значительные трудности в клонировании и экспрессии генов кампилобактерий. Они обусловлены: а) присутствием у бактерий рода *Campylobacter* необычных последовательностей ряда промоторов, которые трудно распознать; б) большим содержанием А—Т у *C. jejuni* и *C. coli* (32 мол. % G—C), что предопределяет возможность для последовательностей ДНК из этих организмов быть идентифицированными в *E. coli* как сильные промоторы; в) значительным числом участков, содержащих 70—80 % А—Т в статической зоне, что определяет вероятность транскрипции промотора в обратном направлении — 3'—5' [31].

Зарубежными исследователями проведена значительная работа по изучению плазмидных векторов бактерий рода *Campylobacter*. Результаты ее представлены в табл. 2.

Рядом современных авторов описаны механизмы генетического обмена у кампилобактерий. Показано, что частота передачи плазмид находится в пределах 1·10<sup>-5</sup> до 1·10<sup>-3</sup> трансконъюгантов для клетки-реципиента в 24-ч период наблюдения. Эти плазмиды кодируют антибиотикоустойчивость и имеют размер 45—50 тыс. п. н. с содержанием G+C до 31—33 мол. % [53, 56].

Начаты исследования естественной трансформации у кампилобактерий, частота которой по передаче устойчивости к стрептомицину (Str<sup>r</sup>) и налидиксовой кислоте (Nal<sup>r</sup>) была приблизительно 1·10<sup>-3</sup> трансформантов для клетки-реципиента *C. coli* и 1·10<sup>-4</sup>—*C. jejuni* [67]. Миллер с соавт. [29] описали возможность электротрансформации «шатл»-вектора *pILL521* в *C. jejuni* C31 с высокой частотой — 1,2·10<sup>6</sup> трансформантов на 1 мкг ДНК. В то же время с другими штаммами кампилобактерий не удалось получить подобного эффекта [69].

Рядом ученых [19, 46, 48] обнаружены бактериофаги, специфичные для *C. jejuni* и *C. coli*. Научные интересы этих исследователей были определены разработкой схемы бактериофаготипирования для эпидемиологического анализа кампилобактериоза. В связи с этим осуществлена трансдукция маркера стрептомицинустойчивости (Ery<sup>r</sup>) бактериофагами штаммам *C. jejuni* и *C. coli*. Ранее [11] была описана фаготрансдукция маркера стрептомицинустойчивости (Str<sup>r</sup>) между штаммами *C. fetus*. Однако неясными остаются молекулярные механизмы трансдукции.

Применение гель-электрофореза в пульсирующем (электрическом) поле (PFGE) позволило выяснить размеры генома и создать карты хромосом кампилобактерий. У штаммов *C. jejuni* UA580 (NCTC1168) и *C. coli* UA417 размеры генома приближались к 1,7 тыс. п. н. [12]. Размер генома *C. fetus* составил 1,1 тыс. п. н., *C. venerealis* — 1,3 тыс. п. н., что позволяет использовать PFGE в качестве вспомогательного метода при видовой дифференциации кампилобактерий [49]. Малые размеры

Таблица 2

Клонирование векторов у бактерий рода *Campylobacter*

Плаزمида	Размер плазмиды (тыс. п. н.)	Маркер	Источник информации
<i>pUOA 13</i>	8,7	<i>aphA-3, bla, lacZ</i>	[67]
<i>pUOA 14</i>	8,2	<i>aphA-3, bla, cat</i>	[68]
<i>pUOA 15</i>	11,1	<i>bla, lacZ, tet(O)</i>	[67]
<i>pUOA 18</i>	7,4	<i>cat</i>	[65]
<i>pUOA 19</i>	5,0	<i>aphA-3</i>	[65]
<i>pUOA 20</i>	4,8	<i>cat</i>	[65]
<i>pUOA 22</i>	4,1	<i>aphA-3, bla</i>	[66]
<i>pUOA 23</i>	3,8	<i>cat, bla</i>	[66]

гена бактерий рода *Campylobacter* (1/3 часть размера хромосомы *E. coli*) полностью соответствуют их культурально-морфологическим свойствам и слабой биохимической активности.

Геномы *C. jejuni* UA580 и *C. coli* UA417 состоят из одной кольцевой молекулы ДНК. Особенностью геномных карт обоих штаммов является расположение генов рРНК [23, 24, 38]. Гены *flaA flaB* *C. jejuni* 81116 расположены рядом с геном, кодирующим 16S рРНК, имея общий размер (~300 тыс. п. н.), а в случае расположения вместе с другим подобным геном — ~700 тыс. п. н. [38]. Флагеллиновые гены *C. jejuni* UA580 расположены в районе около 700 и 170 тыс. п. н. вблизи от двух генов рРНК. В области 250 тыс. п. н. находятся гены рибосомных белков *rplI* и *rplA*. В целом работы по картированию генома бактерий рода *Campylobacter* проходят лишь начальную стадию.

За рубежом показана возможность использования методов молекулярной биологии для практических эпидемиологических исследований. Авторы [50] применили PFGE для эпидемиологической расшифровки «молочной» вспышки, вызванной *C. hyointestinalis*. Электрофорезом геномной ДНК, выделенной из пяти клинических изолятов кампилобактерий, после обработки рестрикционной эндонуклеазой *Sall* обнаружены идентичные геномные паттерны, что свидетельствовало о едином источнике заражения.

Разработана система молекулярного типирования кампилобактерий на основе анализа полиморфизма рестрикционных фрагментов (RFLP) [35] жгутикового гена (*flaA*) у *C. jejuni*. Указанное типирование коррелировало с серотипированием (по Н. Lior) при эпидемиологическом расследовании вспышек, при этом были дополнительно идентифицированы шесть *flaA*-типов штаммов кампилобактерий.

В работе [41] показана высокая чувствительность молекулярно-биологических методов идентификации кампилобактерий по сравнению с традиционными. Применение синтетического олигонуклеотидного зонда (SNAP), меченого щелочной фосфатазой, позволило обнаружить до 5 нг ДНК *C. jejuni* и *C. coli* и 10<sup>5</sup> КОЕ этих бактерий.

Зоонозная природа кампилобактериозной инфекции подтверждена при эпидемиологическом расследовании внутрививарной вспышки с помощью рестрикционно-эндонуклеазного анализа ДНК [16]. В работе были использованы ферменты *HindIII* и *BamHI*. Указанный метод с помощью эндонуклеазы *HalIII* позволил идентифицировать не только виды, но и биотипы кампилобактерий [6].

Паттон с соавт. [43] оценили пять генотипических методов для различия «эпидемических» штаммов *C. jejuni*, выделенных от животных и людей во время «молочных» и «водных» вспышек. В работе применяли следующие методы: многолокусный энзимный электрофорез (MLEE); рестрикцию ДНК эндонуклеазами *BglIII*, *XhoI*, *PvuII* и *PstI*; иммуноблотинг; гибридизацию ДНК, обработанных энзимами *PvuII* и *PstI*, зондами, комплементарными 16S или 23S рРНК *E. coli* (риботипирование); плазмидный анализ. При этом использование плазмидного анализа и рестрикция ДНК эндонуклеазами *BglI* и *XhoI* не позволили правильно разделить штаммы. В то же время MLEE, рестрикционно-эндонуклеазный анализ с энзимами *PvuII* и *PstI* и риботипирование обнаружили различия внутри серотипов кампилобактерий, что обеспечило уточнение источника кампилобактериозной инфекции. К сожалению, практическое применение этих методов возможно лишь в условиях специализированных научных лабораторий.

Современная таксономия и систематика бактерий основана на совокупности разнообразных фено- и генотипических признаков. Они определяются различными способами, в том числе и современными методами ДНК-реассоциации, рестрикции и гибридизации. Однако ни один из этих методов не дает целостной характеристики генома микроорганизмов. Эту задачу можно решить при помощи способа видоидентификации, базирующейся на полимеразной цепной реакции (PCR) с использованием олигонуклеотидных праймеров [32].

Применение PCR позволяет установить различия между видами и штаммами микроорганизмов. PCR-праймеры, направленные против повторяющегося межгенного палиндрома (REP) или энтеробактериального повторяющегося внутриродового консенсуса (ERIC), использовали для анализа ДНК-паттернов 33 изолятов *C. jejuni*, 30 — *C. coli* и 8 — *C. laridis* [17]. Наилучшие результаты PCR-амплификации ДНК кампилобактерий разных видов получены при применении REP-праймеров.

До настоящего времени в СНГ, в том числе и в Украине, изучение генетической организации бактерий рода *Campylobacter*, а также разработка молекулярно-генетических методов идентификации этих возбудителей не проводились.

Таким образом, анализ новейших публикаций показывает, что за рубежом вопросы генетической организации кампилобактерий активно изучаются. Это позволяет лучше понимать механизмы патогенеза этой инфекции и, как следствие, проводить эффективное лечение. Использование современных методов молекулярной диагностики кампилобактериоза, схем генетического типирования региональных штаммов, выделенных в Украине, будет способствовать созданию эффективной системы эпидемиологического надзора за кампилобактериозной инфекцией.

Д. Л. Кірик

## СУЧАСНІ АСПЕКТИ ГЕНЕТИКИ БАКТЕРІЙ РОДУ CAMPYLOBACTER

### Резюме

В аналітичному огляді літератури представлено сучасні дані про генетичну організацію кампілобактерій — збудників ГКІ у людини. Узагальнено відомості про молекулярні основи патогенності кампілобактерій: наявність жгутиків, ентеротоксина, головного зовнішнього мембранного білка та поверхневого білка. Гени, що кодують резистентність кампілобактерій до антибіотиків (*Km*, *Tc*, *Cm*), клоновано і визначено їх нуклеотидну послідовність. Стійкість до вказаних антибіотиків має плазмідний характер, і деякі плазмиди кодують більше ніж одну детермінанту. Проаналізовано механізми генетичного обміну у кампілобактерій (трансдукція, транскон'югація, трансформація). На сьогодні визначено розміри геному і сконструйовано пари хромосом у деяких кампілобактерій. За кордоном показано можливість використання методів молекулярної біології для практичних епідеміологічних досліджень: гель-електрофореза в електричному полі, рестрикційно-ендонуклеазного аналізу ДНК, багатолукусного ензимного електрофореза, імуноблотинга, риботипування, плазмідного аналізу і полімеразної ланцюгової реакції.

D. L. Kirik

## GENETICS ASPECTS OF BACTERIA GENUS CAMPYLOBACTER

### Summary

Recent information on the genetic organization of *Campylobacteria*, agents of AII in human, is presented in the analytical literature review. The results on molecular biology of *Campylobacteria* pathogenicity are summarized, such as the presence of flagella, enterotoxin, main membrane external and surface proteins. Gene coding for the *Campylobacteria* resistance to antibiotics (*Km*, *Tc*, *Cm*), are cloned and their nucleotide sequence is determined. Resistance to antibiotic has got the plasmide character and some plasmids possess more than one determinant. Mechanism of the genetic exchange of *Campylobacteria* (transduction, transconjugation, transformation) is analysed. Genomic sizes are determined at present time pairs of chromosomes of some strains are constructed. Application of molecular biological methods for practical epidemiological investigations is shown: gel-electrophoresis in the electric field, endonuclease restriction DNA-analysis, multilocus enzyme electrophoresis, immunoblotting, riboidentification, plasmid analysis and the polymerase chain reaction.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agüero-Rosenfeld M. E., Yang X. H., Nachamkin I. Infection of adult syrian hamsters with flagellar variants of *Campylobacter jejuni* // Infect. Immunol.—1992.—58.— P. 2214—2219.
2. Bannam T. I., Rood J. I. Relationship between the *Clostridium perfringens* catQ gene product and chloramphenicol acetyltransferases of other bacteria // Antimicrob. Agents Chemother.—1991.—35.— P. 471—476.
3. Black R. E., Levine M. M., Clements M. L. et al. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans // J. Infect. Dis.—1988.—157.— P. 472—479.
4. Blaser M. J., Gotschlich E. C. Surface array protein of *Campylobacter fetus*: cloning and gene structure // J. Biol. Chem.—1990.—265.— P. 14529—14535.
5. Brosius J. Toxicity of an overproduced foreign gene product in *Escherichia coli* and its use in plasmid vectors for the selection of transcription terminators // Gene.—1984.—27.— P. 161—172.
6. Bruce D., Hookey J. V., Waitkins S. A. Numerical classification of *Campylobacters* by DNA-restriction endonuclease analysis // Zbl. Bakt. Hyg.—1988.—N 269 a.— P. 284—297.
7. Caldwell M. B., Guerry P., Lee E. C. et al. Reversible expression of flagella in *Campylobacter jejuni* // Infect. Immunol.—1985.—50.— P. 941—943.
8. Calva E., Torres J., Vazquez M. et al. *Campylobacter jejuni* chromosomal sequences that hybridize to *Vibrio cholera* and *Escherichia coli* LT enterotoxin genes // Gene.—1989.—75.— P. 243—251.
9. Chan V. L., Bingham H. Complete sequence of the *Campylobacter jejuni glyA* gene encoding serine hydroxymethyltransferase // Ibid.—1991.—101.— P. 51—58.
10. Chan V. L., Bingham H., Kibue A. et al. Cloning and expression of the *Campylobacter jejuni glyA* gene in *Escherichia coli* // Ibid.—1988.—73.— P. 185—191.
11. Chang W. J., Ogg J. E. Transduction in *Vibrio fetus* // Amer. J. Vet. Res.—1970.—31.— P. 919—924.
12. Chang N., Taylor D. E. Use of pulsed-field agarose gel electrophoresis to size *Campylobacter* spp. genomes and to construct a *Sall* map of *Campylobacter jejuni* UA580 // J. Bacteriol.—1990.—172.— P. 5211—5217.
13. Clayton C. L., Pallen M. J., Kleanthous H. et al. Nucleotide sequence of two genes from *Helicobacter pylori* encoding for urease subunits // Nucl. Acids Res.—1989.—18.— P. 362.
14. Evans D. G., Evans D. J. Jr., Moulds J. I., Graham D. Y. N-acetylneuraminyllactose-binding fibrillar hemagglutinin of *Campylobacter pylori*: a putative colonization factor antigen // Infect. Immunol.—1988.—56.— P. 2896—2906.
15. Fischer S. H., Nachamkin I. Common and variable domains of the flagellin gene, *flaA* in *Campylobacter jejuni* // Mol. Microbiol.—1991.—5.— P. 1151—1158.
16. Fox J. G., Penner J. L. Investigation of Zoonotically acquired *Campylobacter jejuni* enteritis with serotyping and restriction endonuclease DNA analysis // J. Clin. Microbiol.—1989.—27, N 11.— P. 2423—2425.
17. Giesendorf B., Belkum A., Koeken A. et al. Development of species-specific DNA probes for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* by polymerase chain reaction fingerprinting // Ibid.—1993.—31, N 6.— P. 1541—1546.
18. Goossens S. H., Pot B., Vlaes L. et al. Characterization and description of «*Campylobacter upsaliensis*» isolated from human feces // Ibid.—1990.—28, N 5.— P. 1039—1046.
19. Grajewski B. A., Kusek J. W., Gelfand H. W. Development of a bacteriophage typing system for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* // Ibid.—1985.—22.— P. 13—18.
20. Guerry P., Alm R. A., Power M. E. et al. Role of two flagellin genes in *Campylobacter* motility // J. Bacteriol.—1991.—173.— P. 4757—4764.
21. Guerry P., Logan S. M., Thornton S., Trust T. J. Genomic organization and expression of *Campylobacter* flagella genes // Ibid.—1990.—172.— P. 1853—1860.
22. Harris L. A., Logan S. M., Guerry P., Trust T. J. Antigenic variation of *Campylobacter* flagella // Ibid.—1987.—169.— P. 5066—5071.
23. Kim N. W., Chan V. L. Isolation and characterization of the ribosomal RNA genes of *Campylobacter jejuni* // Curr. Microbiol.—1989.—19.— P. 247—252.
24. Labigne-Roussel A., Courcoux P., Tompkins L. Gene disruption and replacement as a feasible approach for mutagenesis of *Campylobacter jejuni* // J. Bacteriol.—1988.—170.— P. 1704—1708.
25. Lee E. C., Walker R. I., Guerry P. Expression of *Campylobacter* genes for proline biosynthesis in *Escherichia coli* // Can. J. Microbiol.—1985.—31.— P. 1064—1067.
26. Logan S. M., Trust T. J., Guerry P. Evidence for posttranslational modification and gene duplication of *Campylobacter* flagellin // J. Bacteriol.—1989.—171.— P. 3031—3038.
27. Manavathu E. K., Fernandez C. L., Cooperman B. S., Taylor D. E. Molecular studies on the mechanism of tetracycline resistance mediated by Tet(O) // Antimicrob. Agents Chemother.—1990.—34.— P. 71—77.
28. Manavathu E. K., Hiratsuka K., Taylor D. E. Nucleotide sequence analysis and expression of a tetracycline resistance gene from *Campylobacter jejuni* // Gene.—1988.—62.— P. 17—26.
29. Miller J. F., Dower W. J., Tompkins L. S. High voltage electroporation of bacteria:

- genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—85.—P. 856—860.
30. Morooka T., Umeda A., Amako K. Motility as an intestinal colonization factor for *Campylobacter jejuni* // J. Gen. Microbiol.—1985.—131.—P. 1973—1980.
  31. Morrison D. A., Jaurin B. Streptococcus pneumoniae possesses canonical *Escherichia coli* (sigma 70) promoters // Mol. Microbiol.—1990.—4.—P. 1143—1152.
  32. Mullis K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction // Scientific Amer.—1990.—262, N 4.—P. 56—65.
  33. Nachamkin I., Yang X. H. Isoelectric focusing of *Campylobacter jejuni* flagellin: microheterogeneity and restricted antigenicity of changed species with a monoclonal antibody // FEMS Microbiol. Lett.—1988.—49.—P. 235—238.
  34. Nachamkin I., Yang X. H. Human antibody response to *Campylobacter jejuni* flagellin protein and synthetic N-terminal flagellin peptide // J. Clin. Microbiol.—1989.—27.—P. 2195—2198.
  35. Nachamkin I., Bohachick K., Patton C. M. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis // Ibid.—1993.—31, N 6.—P. 1531—1536.
  36. Newell D. G. Monoclonal antibodies directed against the flagella of *Campylobacter jejuni*: cross-reacting and serotypic specificity and potential role in diagnosis // J. Hyg.—1986.—96.—P. 377—384.
  37. Newell D. G., McBride H., Dolby J. M. Investigations on the role of the flagella in the colonization of infant mice with *Campylobacter jejuni* and attachment of *Campylobacter jejuni* to human epithelial cell lines // Ibid.—1985.—95.—P. 217—227.
  38. Nuijten P. J. M., Bartels C., Bleumink-Pluym N. M. C. et al. Size and physical map of the *Campylobacter jejuni* chromosome // Nucl. Acids Res.—1990.—18.—P. 6211—6214.
  39. Nuijten P. J. M., Bleumink-Pluym N. M. C., Gaastra W., van der Zeijst B. A. M. Flagellin expression in *Campylobacter jejuni* is regulated at the transcriptional level // Infect. Immunol.—1989.—57.—P. 1084—1088.
  40. Nuijten P. J. M., van Asten F. J. A. M., Gaastra W., van der Zeijst B. A. M. Structural and functional analysis of two *Campylobacter jejuni* flagellin genes // J. Biol. Chem.—1990.—265.—P. 17798—17804.
  41. Olive D. M., Johnny M., Sethi I. K. Use of an alkaline phosphatase-labelled synthetic oligonucleotide probe for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* // J. Clin. Microbiol.—1990.—28, N 7.—P. 1565—1569.
  42. Ouellette M., Gerbaud G., Lambert T., Courvalin P. Acquisition by a *Campylobacter*-like strain of *aphA-I*, a kanamycin resistance determinant from members of the family *Enterobacteriaceae* // Antimicrob. Agents Chemother.—1987.—31.—P. 1021—1026.
  43. Patton C. M., Wachsmuth I. K., Evins G. M. et al. Evaluation of 10 methods to distinguish epidemic-associated *Campylobacter* strains // J. Clin. Microbiol.—1991.—29, N 4.—P. 680—688.
  44. Rashtchian A., Abbot M. A., Shaffer M. Cloning and characterization of genes coding for ribosomal RNA in *Campylobacter jejuni* // Curr. Microbiol.—1987.—14.—P. 311—317.
  45. Rashtchian A., Shaffer M. The nucleotide sequences of two tRNA genes from *Campylobacter jejuni* // Nucl. Acids Res.—1986.—14.—P. 5560.
  46. Ritchie A. E., Bryner J. H., Foley J. W. Role of DNA and bacteriophage in *Campylobacter* auto-agglutination // J. Med. Microbiol.—1983.—16.—P. 333—340.
  47. Sagara K., Mochizuki A., Okamura N., Nakaya R. Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* with special reference to plasmid profiles of Japanese clinical isolates // Antimicrob. Agents Chemother.—1987.—31.—P. 713—719.
  48. Salama S., Bolion F. J., Hutchinson D. N. Improved method for the isolation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* bacteriophages // Lett. Appl. Microbiol.—1989.—8.—P. 5—7.
  49. Salama S. M., Garcia M. M., Taylor D. E. Differentiation of subspecies of *Campylobacter fetus* by genomic sizing // Int. J. System. Bac.—1992.—42, N 3.—P. 446—450.
  50. Salama S. M., Tabor H., Richter M., Taylor D. Pulsed-field gel electrophoresis for epidemiologic studies of *Campylobacter hyointestinalis* isolates // J. Clin. Microbiol.—1992.—30, N 8.—P. 1982—1984.
  51. Sharp P. M., Li W. H. The codon adaptation index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications // Nucl. Acids Res.—1987.—15.—P. 1281—1295.
  52. Sougakoff W., Papadopoulou B., Nordmann P., Courvalin P. Nucleotide sequence and distribution of gene *tetO* encoding tetracycline resistance in *Campylobacter coli* // FEMS Microbiol. Lett.—1987.—44.—P. 153—159.
  53. Taylor D. E. Plasmids from *Campylobacter* // *Campylobacter* infection in man and animals / Ed. J. P. Butzler.—Boca Raton: CRC press, 1984.—P. 87—96.
  54. Taylor D. E. Plasmid-mediated tetracycline resistance in *Campylobacter jejuni*: expression in *Escherichia coli* and identification of homology with streptococcal class M determinant // J. Bacteriol.—1986.—165.—P. 1037—1039.
  55. Taylor D. E., Courvalin P. Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter* species // Antimicrob. Agents Chemother.—1988.—32.—P. 1107—1112.
  56. Taylor D. E., Garner R. S., Altan B. J. Characterization of tetracycline resistance



- plasmids from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* // Ibid.—1983.—24.— P. 930—935.
57. Taylor D. E., Hiratsuka K. Use of non-radioactive DNA probes for detection *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in stool specimens // Mol. Cell. Probes.—1990.—4.— P. 261—271.
  58. Taylor D. E., Hiratsuka K., Mueller L. Isolation and characterization of catalase-negative and catalase-weak strains of *Campylobacter* species, including «*Campylobacter upsaliensis*» from humans with gastroenteritis // J. Clin. Microbiol.—1989.—27.— P. 2042—2045.
  59. Taylor D. E., Johnson W. M., Lior H. Cytotoxic and enterotoxic activities of *Campylobacter jejuni* are not specified by the tetracycline resistance plasmids pMAK175 and pUA466 // Ibid.—1987.—25.— P. 150—151.
  60. Taylor D. E., Yan W. Ng. L. K., Manavathu E. K., Courvalin P. Genetic characterization of kanamycin resistance in *Campylobacter coli* // Ann. Inst. Pasteur.—1988.—139.— P. 665—676.
  61. Tenover F. C., Etorum F. M. Detection of two different kanamycin resistance genes in natural occurring isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* // Antimicrob. Agents Chemother.—1988.—32, N 8.— P. 1170—1173.
  62. Tenover F. C., Gilbert T., O'Hara P. Nucleotide sequence of a novel kanamycin resistance gene, *aphA-7*, from *Campylobacter jejuni* and comparison with other kanamycin phosphotransferase genes // Plasmid.—1989.—22.— P. 52—58.
  63. Thornton S. A., Logan S. M., Trust T. J., Guerry P. Polynucleotide sequence relationships among flagellin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* // Infect. Immunol.—1990.—58.— P. 2686—2689.
  64. Trieu-Cuot P., Gerbaud G., Lambert T., Courvalin P. *In vivo* transfer of genetic information between grampositive and gramnegative bacteria // EMBO J.—1985.—4.— P. 3583—3587.
  65. Vieira J., Messing J. The pUC plasmids, an *M13mp7*-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers // Gene.—1982.—19.— P. 259—268.
  66. Wang Y. Transformation and antibiotic resistance in *Campylobacter* species // PhD thesis.—Edmonton: Univ. Alberta, 1991.
  67. Wang Y., Taylor D. E. Natural transformation of *Campylobacter* species // J. Bacteriol.—1990.—172.— P. 949—955.
  68. Wang Y., Taylor D. E. Chloramphenicol resistance in *Campylobacter coli*: nucleotide sequence, expression, and cloning vector construction // Gene.—1990.—94.— P. 23—28.
  69. Wassenaar T. M., Bleumink-Pluym N. M. C., van der Zeijst B. A. M. Inactivation of *Campylobacter jejuni* flagellin genes by homologous recombination demonstrates that *flaA* but not *flaB* is required for invasion // EMVO J.—1991.—8.— P. 2055—2061.
  70. Wenman W. M., Chai J., Louie T. J. et al. Antigenic analysis of flagellar protein and other proteins // J. Clin. Microbiol.—1985.—21.— P. 108—112.
  71. Zithao R., Papadopoulou B., Courvalin P. Occurrence of the *Campylobacter* resistance gene *tetO* in *Enterococcus* and *Streptococcus spp.* // Antimicrob. Agents Chemother.—1988.—32.— P. 1793—1796.
  72. Blaser M. J., Taylor D. N., Feldman R. A. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections // Epidemiol. Rev.—1983.—5.— P. 157—176.
  73. Griffiths P. L., Park R. W. A. *Campylobacters* associated with human diarrhoeal disease // J. Appl. Bacteriol.—1990.—69.— P. 281—301.
  74. Penner J. L. The genus *Campylobacter*: a decade of progress // Clin. Microbiol. Rev.—1988.—1.— P. 157—172.
  75. Taylor D. E., Hiratsuka K., Ray H., Manavathu E. K. Characterization and expression of a cloned tetracycline resistance determinant from *Campylobacter jejuni* plasmid pUA466 // J. Bacteriol.—1987.—169.— P. 2984—2989.