

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-50-54

УДК 616.98:579.842.23

Л.Г. Дудина<sup>1,2</sup>, М.А. Малкова<sup>1,2</sup>, А.В. Чернядьев<sup>1</sup>, С.Г. Литвинец<sup>1</sup>, А.А. Бывалов<sup>1,2</sup>**ВЛИЯНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ И ГЕНТАМИЦИНА НА МОРФОЛОГИЮ И ВЕЗИКУЛООБРАЗОВАНИЕ БАКТЕРИЙ *YERSINIA PESTIS* EV**<sup>1</sup>Вятский государственный университет, Киров, Российская Федерация; <sup>2</sup>Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Российская Федерация

**Цель** – оценить влияние специфических бактериофагов и гентамицина на морфо-функциональные свойства бактерий вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV. **Материалы и методы.** В работе использовали вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, бактериофаги чумной Покровской и псевдотуберкулезный диагностический. Микробную культуру выращивали на плотной и в жидкой питательных средах при температуре 27 °С в течение 20–24 ч. Совместную инкубацию бактерий и бактериофага или гентамицина проводили при температуре 27 °С в течение 20 мин или 37 °С в течение 2 ч соответственно. Препараты культур исследовали методом просвечивающей электронной микроскопии. **Результаты и обсуждение.** Проведена оценка влияния условий культивирования и различных стрессорных факторов на процесс везикулообразования клетками вакцинного штамма *Y. pestis* EV. Определены характер и выраженность морфофункциональных изменений в клетках *Y. pestis* EV в ответ на воздействие бактериофагами (чумной Покровской и псевдотуберкулезный) или антибиотиком (гентамицин). Установлено, что совместная инкубация в течение 20 мин *Y. pestis* EV с бактериофагом Покровской или гентамицином приводит к увеличению продукции внеклеточных везикул и сопровождается развитием дегенеративных изменений бактериальных клеток.

**Ключевые слова:** *Yersinia pestis*, бактериофаг, антибиотикорезистентность, электронная микроскопия.

Корреспондирующий автор: Дудина Любовь Геннадьевна, e-mail: necdew@mail.ru.

Для цитирования: Дудина Л.Г., Малкова М.А., Чернядьев А.В., Литвинец С.Г., Бывалов А.А. Влияние специфических бактериофагов и гентамицина на морфологию и везикулообразование бактерий *Yersinia pestis* EV. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 2:50–54. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-50-54

L.G. Dudina<sup>1,2</sup>, M.A. Malkova<sup>1,2</sup>, A.V. Chernyad'ev<sup>1</sup>, S.G. Litvinets<sup>1</sup>, A.A. Byvalov<sup>1,2</sup>**Effect of Bacteriophages and Gentamycine on Morphology and Vesicle Formation of Bacteria *Yersinia pestis* EV**<sup>1</sup>Vyatka State University, Kirov, Russian Federation;<sup>2</sup>Komi Institute of Physiology at the Scientific Center of the Ural Branch of RAS, Syktyvkar, Russian Federation

**Abstract.** Objective was to assess the effect of specific bacteriophages and gentamycine on the morphological-functional properties of bacteria in the vaccine strain *Yersinia pestis* EV. **Materials and methods.** The vaccine strain *Y. pestis* EV, Pokrovskaya bacteriophage and the pseudotuberculous diagnostic bacteriophage were used for the study. The microbial culture was grown on solid and in liquid growth media at 27 °C for 20–24 h. The co-incubation of bacteria and bacteriophage or gentamycine was carried out at 27 °C for 20 minutes or at 37 °C for 2 hours, respectively. Culture preparations were examined by transmission electron microscopy. **Results and discussion.** The influence of cultivation conditions and various stress factors on the vesicle production by the vaccine strain *Y. pestis* EV cells was evaluated. The nature and intensity of morphological-functional changes in *Y. pestis* EV cells in response to the effect of bacteriophages (plague Pokrovskaya and pseudotuberculous bacteriophages) or an antibiotic (gentamycine) were determined. It was established that co-incubation of *Y. pestis* EV with Pokrovskaya bacteriophage or gentamycine for 20 min leads to the increase in the production of extracellular vesicles and is accompanied by the development of degenerative changes in bacterial cells.

**Key words:** *Yersinia pestis*, bacteriophage, antibiotic resistance, electron microscopy.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Lubov G. Dudina, e-mail: necdew@mail.ru.

Citation: Dudina L.G., Malkova M.A., Chernyad'ev A.V., Litvinets S.G., Byvalov A.A. Effect of Bacteriophages and Gentamycine on Morphology and Vesicle Formation of Bacteria *Yersinia pestis* EV. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 2:50–54. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-50-54

Received 12.04.18. Revised 23.04.18. Accepted 12.02.19.

Наличие природных очагов чумы во многих регионах мира предопределяет возможность возникновения и эпидемического распространения этой инфекции. Более того, в последние годы наметилась тенденция к росту числа случаев заболевания чумой. Так, за неполные четыре месяца 2017 г. (август–сентябрь) на о. Мадагаскар зарегистрировано 2348 случаев заболевания, включая подтверж-

денные, вероятные и сомнительные, из которых 202 с летальным исходом [1]. Вместе с тем последние десятилетия характеризуются резким ростом антибиотикорезистентности возбудителей многих бактериальных инфекций, в том числе и чумы [2, 3, 4]. Учитывая такие особенности патогенеза чумы, как относительно короткий инкубационный период, стремительное развитие симптомов заболе-

вания, а также высокую смертность и контагиозность возбудителя, вопросы выбора эффективной схемы лечения имеют принципиальное значение для предупреждения смертельного исхода болезни и эпидемического распространения инфекции. В этой связи, применительно к таким особо опасным бактериальным инфекциям как чума, становится особенно актуальным поиск альтернативных антибиотикопротекции или дополняющих ее подходов, основанных на применении специфических бактериофагов. С наступлением эры антибиотиков утраченный во второй трети XX в. интерес к фаготерапии сейчас начинает активно восстанавливаться. Это выражается, в частности, в проведении исследований, направленных на изучение эффективности фаготерапии в модельных опытах, фармакокинетики фагов, их цитотоксичности в отношении клеток макроорганизма, на исследование механизмов взаимодействия «бактерия – бактериофаг» [5].

Везикулообразование является достаточно универсальной и многофункциональной физиологической особенностью бактерий, интенсивность которой усиливается в стрессовых для микроба условиях. Продукция везикул признается одним из эффективных механизмов агрессии бактерий в отношении клеток хозяина, но, в то же время, это и способ защиты патогена от действия факторов внешней среды [6, 7]. Недавно установлена способность вирулентных бактерий *Yersinia pestis* образовывать внеклеточные везикулы [8, 9], однако их значимость в жизнедеятельности данного возбудителя практически не исследована. Изучение процесса везикулообразования у *Y. pestis* в разнообразных стрессовых условиях открывает перспективу понимания молекулярных механизмов, участвующих в реализации патогенности возбудителя чумы, и поиска эффективных средств терапии и профилактики этой опасной болезни.

**Целью** настоящей работы явилась оценка влияния специфических бактериофагов и гентамицина на морфофункциональные свойства бактерий вакцинного штамма *Y. pestis* EV.

### Материалы и методы

В работе использованы культуры *Y. pestis* вакцинного штамма EV линии НИИЭГ, бактериофаги чумной Покровской и псевдотуберкулезный диагностический, полученные из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Микробную культуру выращивали на плотной (на основе БТН-агара производства «Биотехновация», Россия) и жидкой (на основе солянокислотного гидролизата казеина производства ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) питательных средах при температуре 27 °С в течение 20–24 ч. Совместную инкубацию бактерий (~1·10<sup>9</sup> м.к./мл) и бактериофага (~1·10<sup>9</sup> БОЕ/мл) или гентамицина (20 мкг/мл) (Борисовский завод медицинских препара-

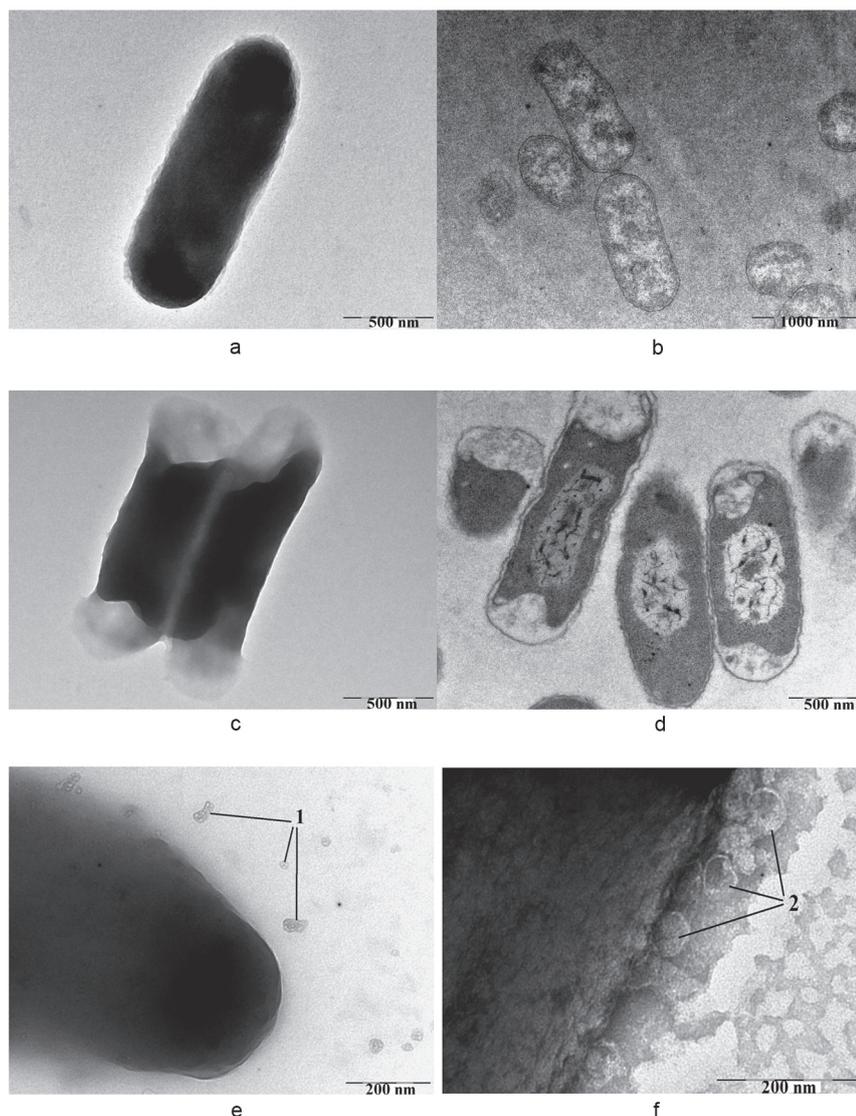
ратов, Беларусь) проводили при температуре 27 °С в течение 20 мин или температуре 37 °С в течение 2 ч соответственно. Эти препараты, а также контрольные препараты (интактные, необработанные бактерии) фиксировали 2,5 % глутаровым альдегидом («Sigma-Aldrich», США) и исследовали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) в негативно окрашенном (2 % уранилацетат, «Sigma-Aldrich», США) и неокрашенном виде. Ультратонкие срезы контрастировали в растворе уранилацетата и азотнокислого свинца («Sigma-Aldrich», США) по E.S. Reynolds [10]. Снимки получали на электронном микроскопе JEM-2100 («Jeol», Япония) при ускоряющем напряжении 160 кВ. За клетки, образующие везикулы, принимали такие, на теле которых и/или в непосредственной близости вокруг них выявлялись отдельные везикулы и/или их агрегаты.

### Результаты и обсуждение

В ходе предварительных исследований установлено, что клетки вакцинного штамма *Y. pestis* EV при выращивании на плотной и жидкой питательных средах способны экскретировать во внеклеточное пространство везикулы размером 8–120 нм. Однако доля везикулообразующих клеток оказалась низкой – как правило, значительно меньше 10 %.

Результаты электронно-микроскопического исследования препаратов показали, что для контрольной, не обработанной бактериофагом или антибиотиком, поверхностной культуры *Y. pestis* EV характерна морфологическая однородность бактериальных клеток, имеющих типичную цилиндрическую форму с закругленными концами (рисунок, а). У небольшой части популяции на поверхности клеток отмечали тонкий неравномерный слой матрикса, часто фрагментарный. Наличие везикул регистрировали лишь у малой части клеток. Культуры нередко содержали небольшие плотные агрегаты бактерий. На ультратонких срезах видно, что клеточная стенка не имеет выраженной извилистости, протоплазма относительно однородная во всем объеме клетки, нуклеоид не выделен, периплазматическое пространство равномерное, выраженных включений или вакуолизации не отмечено (рисунок, б).

После 20 мин инкубации поверхностной культуры *Y. pestis* EV с бактериофагом Покровской большинство бактерий значительно изменило свои размеры (таблица) и морфологию. Появились клетки с «обрубленными» концами, пустотами на полюсах и выраженной бугристостью поверхности (рисунок, с, d). Слой матрикса на клетках был рыхлым и неоднородным и мало отличался от контроля. Выявлено некоторое повышение, по сравнению с контролем, доли клеток, продуцирующих везикулы (рисунок, e). Свободно лежащие в культуре фаговые частицы обнаруживались крайне редко, однако, в нескольких случаях зафиксированы клетки, достаточно густо покрытые фаговыми частицами (рисунок, f). Очевидно,



Просвечивающая электронная микроскопия клеток штамма *Y. pestis* EV: *a, b* – intactных, *c, d, e, f* – обработанных бактериофагом Покровской; *a, b, c, d* – бактерии выращены на плотной, *e, f* – жидкой питательных средах; *1* – везикулы, *2* – фаговые частицы

Transmission electron microscopy of the cells of *Y. pestis* EV strain: *a, b* – intact ones, *c, d, e, f* – treated with Pokrovskaya bacteriophage; *a, b, c, d* – bacteria were grown on solid medium, *e, f* – on liquid medium; *1* – vesicles, *2* – phage particles

это вторичная генерация фаговых частиц, высвободившихся из разрушенной клетки и адгезировавших на соседней, до этого неинфицированной клетке. Для осуществления полного цикла лизиса очень малой доли клеток оказалось достаточно 20 мин инкубирования бактерий со специфическим фагом. На это указывает и появление мертвых бактерий в виде пустых оболочек. На ультратонких срезах хорошо видны изменения морфологии бактерий – повышенная извилистость клеточной стенки, просветление в области нуклеоида, более плотная протоплазма, часто с гранулами электронно-прозрачных включений. Цитоплазма таких клеток отходит (обычно на полюсах) от клеточной стенки с образованием крупных округлых просветлений (рисунок, d).

Инкубация культуры *Y. pestis* EV с псевдотуберкулезным диагностическим бактериофагом, который, по результатам наших предварительных исследований, эффективно лизирует бактерии чумного микроба, приводила к аналогичным, но менее выраженным изменениям морфологии клеток.

Интактные клетки (контроль) *Y. pestis* EV глубинной культуры практически не отличались по

морфологической картине от клеток, выращенных на плотной питательной среде. Но отмечено, что глубинные культуры характеризовала несколько большая длина клеток (таблица), содержание делящихся бактерий и меньшая склонность к агрегации. Однако при взаимодействии с бактериофагом Покровской у глубинных культур не выявлено столь резкого изменения морфологии клеток. Большинство клеток в меньшей степени изменили свои характерные форму и размеры, отличие в основном проявилось в более выраженной активизации процесса везикулообразования (таблица) и появлении мертвых бактерий, представленных пустыми оболочками клеток, как в результате выхода вторичных фаговых частиц. Инкубация с псевдотуберкулезным бактериофагом бактерий, выращенных в жидкой питательной среде, не вызвала повышения уровня везикулообразования.

При инкубировании глубинной культуры *Y. pestis* EV в присутствии антибиотика гентамицина, эффективного при лечении чумы, наблюдали уменьшение длины клеток без резко выраженных изменений иных морфологических особенностей бактерий и

**Влияние иерсиниозных бактериофагов и гентамицина на размеры клеток *Y. pestis* EV и уровень везикулообразования**  
**Effect of Yersinia bacteriophages and gentamycine on the size of *Y. pestis* EV cells and the level of vesicle production**

Питательная среда / Nutrient medium	Оцениваемый параметр / Estimated parameter	Интактные клетки (контроль) / Intact cells (control)	Клетки с фагом Покровской / Cells with Pokrovskaya phage	Клетки с фагом псевдотуберкулезным / Cell with pseudotuberculosis phage	Клетки с гентамицином / Cells with gentamycine
Плотная / Solid	Длина клеток, $X \pm I_{95}$ , мкм / Length of cells, $X \pm I_{95}$ , μm	1,51±0,11 (n=128)	1,04±0,07* (n=187)	1,13±0,08* (n=88)	Не определяли / Not determined
	Содержание клеток с везикулами, $X \pm m$ , % / Content of cells with vesicles, $X \pm m$ , %	7,8±2,2 (n=143)	10,3±2,2* (n=195)	14,7±3,6* (n=95)	Не определяли / Not determined
Жидкая / Liquid	Длина клеток, $X \pm I_{95}$ , мкм / Length of cells, $X \pm I_{95}$ , μm	1,94±0,15 (n=165)	1,67±0,10* (n=223)	1,68±0,10* (n=172)	1,64±0,18* (n=52)
	Содержание клеток с везикулами, $X \pm m$ , % / Content of cells with vesicles, $X \pm m$ , %	4,6±2,5 (n=208)	17,7±2,5* (n=231)	4,6±1,8 (n=131)	7,4±3,6 (n=54)

\* Различие со значением соответствующего параметра для интактных клеток достоверно (p<0,05).

\* The difference with the value of the corresponding parameter for intact cells is reliable (p<0,05).

степени везикулообразования (таблица).

Известно, что внеклеточные везикулы грамотрицательных бактерий играют важную роль во взаимодействии патогенов с организмом хозяина. Молекулярный профиль внеклеточных везикул, наряду с другими факторами, определяет способность патогена противостоять агрессивной среде макроорганизма [8]. Экспериментально установленное влияние различных внешних воздействий на качественные и количественные характеристики везикулообразования [11, 12] делает возможным направленное получение везикул с определенным составом. В литературе обсуждается возможность влияния на процесс везикулообразования у микроорганизмов воздействием целого ряда стрессорных факторов [13]. Применение стрессоров (бактериофагов, антибиотика) в нашем исследовании позволило оценить их влияние на характер морфофункциональных изменений клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV. Детальное электронно-микроскопическое исследование везикулоподобных образований на поверхности клеток чумного микроба и химический анализ их состава свидетельствуют о достаточно высокой схожести характеристик внеклеточных везикул у бактерий целого ряда таксонов [9, 14]. Электронно-микроскопическая картина везикул, продуцируемых клетками вариантов вирулентного штамма *Y. pestis* CO92, лишенных плазмиды кальцийзависимости [8], очень близка к полученной нами, однако средний размер везикул (~100 нм), определенный авторами цитируемой работы, оказался существенно выше по сравнению с нашей оценкой. Выявленная нами способность клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV, утратившего *pgm*-локус хромосомной ДНК [15], к продукции внеклеточных везикул, согласуется с данными, полученными А.М. Kolodziejek *et al.* [9] при изучении клеток *Y. pestis* KIM6<sup>-</sup> (*pgm*<sup>-</sup>) и KIM6<sup>+</sup> (*pgm*<sup>+</sup>). Следовательно, наличие генов локуса пигментсорбции не является существенным в реализации феномена везикулообразования у клеток чумного микроба. Считается, что внеклеточные везикулы принимают участие в образовании бактери-

альных биопленок [16, 17]. Однако применительно к патогенным иерсиниям это положение в полной мере отнести, очевидно, нельзя, поскольку свойство биопленкообразования у *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* связано с носительством клетками *pgm*-области хромосомной ДНК [18], а вышеприведенные данные литературы [9] и результаты наших экспериментов указывают на независимость процесса продукции везикул от наличия *pgm*-локуса. По всей видимости, везикулы *Y. pestis* не являются обязательными компонентами биопленки, и их значимость для возбудителя в условиях *in vitro* и *in vivo* лишь предстоит исследовать.

Мы регистрировали уровень везикулообразования в том числе и у бактерий, выращенных в условиях *in vitro*, способствующих их росту и размножению, без воздействия стрессорных факторов. При этом доля таких «интактных» клеток *Y. pestis* EV, продуцирующих везикулы, по сравнению с жидкой питательной средой оказалась несколько выше при культивировании бактерий на плотной питательной среде. Под действием выбранных стрессорных факторов (бактериофаги, антибиотик) происходило не только усиление везикулообразования, но и нарастающие дегенеративные изменения микробных клеток.

Таким образом, совместная инкубация в течение 20 мин клеток *Y. pestis* EV с бактериофагом Покровской или гентамицином приводит к увеличению продукции внеклеточных везикул и сопровождается развитием дегенеративных изменений бактериальных клеток.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

**Список литературы**

1. Plague outbreak situation reports 2017. World Health Organization Regional Office for Africa. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.afro.who.int/health-topics/plague/plague-outbreak-situation-reports> (дата обращения 16.12.2017).
2. Cabanel N., Bouchier C., Rajerison M., Carniel E. Plasmid-mediated doxycycline resistance in a *Yersinia pestis* strain isolated from a rat. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2018; 51(2):249–54. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.09.015.

3. Galimand M., Carniel E., Courvalin P. Resistance of *Yersinia pestis* to antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(10):3233–36. DOI: 10.1128/AAC.00306-06.
4. Welch T.J., Fricke W.F., McDermott P.F., White D.G., Rosso M.L., Rasko D.A., Mammel M.K., Eppinger M., Rosovitz M.J., Wagner D., Rahalison L., Leclerc J.E., Hinshaw J.M., Lindler L.E., Cebula T.A., Carniel E., Ravel J. Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PLoS ONE.* 2007; 2(3):e309. DOI: 10.1371/journal.pone.0000309.
5. Filippov A.A., Sergueev K.V., He Y., Huang X.Z., Gnade B.T., Mueller A.J., Fernandez-Prada C.M., Nikolich M.P. Bacteriophage therapy of experimental bubonic plague in mice. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 954:337–48. DOI: 10.1007/978-1-4614-3561-7\_41.
6. Manning A.J., Kuehn M.J. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol.* 2011; 11:258. DOI: 10.1186/1471-2180-11-258.
7. Olsen I., Amano A. Outer membrane vesicles - offensive weapons or good Samaritans? *J. Oral Microbiol.* 2015; 7:27468. DOI: 10.3402/jom.v7.27468.
8. Eddy J.L., Giolda L.M., Caulfield A.J., Rangel S.M., Latham W.W. Production of Outer Membrane Vesicles by the Plague Pathogen *Yersinia pestis*. *PLoS ONE.* 2014; 9(9):e107002. DOI: 10.1371/journal.pone.0107002.
9. Kolodziejek A.M., Caplan A.B., Bohach G.A., Paszczynski A.J., Minnich S.A., Hovde C.J. Physiological Levels of Glucose Induce Membrane Vesicle Secretion and Affect the Lipid and Protein Composition of *Yersinia pestis* Cell Surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 79(14):4509–14. DOI: 10.1128/AEM.00675-13.
10. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 1963; 17:208–12. PMID: 13986422. PMID: PMC2106263.
11. Collins B.S. Gram-negative outer membrane vesicles in vaccine development. *Discov. Med.* 2011; 12(62):7–15. PMID: 21794204.
12. van Niel G., D'Angelo G., Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2018; 19(4):213–28. DOI: 10.1038/nrm.2017.125.
13. Klimentová J., Stulík J. Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. *Microbiol. Res.* 2015; 170:1–9. DOI: 10.1016/j.micres.2014.09.006.
14. Jan A.T. Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria: A Perspective Update. *Front. Microbiol.* 2017; 8:1053. PMID: 28649237. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01053.
15. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific Diversity of *Yersinia pestis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17(2):434–64. DOI: 10.1128/CMR.17.2.434-464.2004.
16. Schwegheimer C., Kuehn M.J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13(10):605–19. DOI: 10.1038/nrmicro3525.
17. Wang W., Chanda W., Zhong M. The relationship between biofilm and outer membrane vesicles: a novel therapy overview. *FEMS Microbiol. Lett.* 2015; 362(15):fnv117. DOI: 10.1093/femsle/fnv117.
18. Schachterle J.K., Stewart R.M., Schachterle M.B., Calder J.T., Kang H., Prince J.T., Erickson D.L. *Yersinia pseudotuberculosis* BarA-UvrY Two-Component Regulatory System Represses Biofilms via CsrB. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8:323. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00323. PMID: 30280093.
- Cebula T.A., Carniel E., Ravel J. Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PLoS ONE.* 2007; 2(3):e309. DOI: 10.1371/journal.pone.0000309.
5. Filippov A.A., Sergueev K.V., He Y., Huang X.Z., Gnade B.T., Mueller A.J., Fernandez-Prada C.M., Nikolich M.P. Bacteriophage therapy of experimental bubonic plague in mice. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 954:337–48. DOI: 10.1007/978-1-4614-3561-7\_41.
6. Manning A.J., Kuehn M.J. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol.* 2011; 11:258. DOI: 10.1186/1471-2180-11-258.
7. Olsen I., Amano A. Outer membrane vesicles - offensive weapons or good Samaritans? *J. Oral Microbiol.* 2015; 7:27468. DOI: 10.3402/jom.v7.27468.
8. Eddy J.L., Giolda L.M., Caulfield A.J., Rangel S.M., Latham W.W. Production of Outer Membrane Vesicles by the Plague Pathogen *Yersinia pestis*. *PLoS ONE.* 2014; 9(9):e107002. DOI: 10.1371/journal.pone.0107002.
9. Kolodziejek A.M., Caplan A.B., Bohach G.A., Paszczynski A.J., Minnich S.A., Hovde C.J. Physiological Levels of Glucose Induce Membrane Vesicle Secretion and Affect the Lipid and Protein Composition of *Yersinia pestis* Cell Surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 79(14):4509–14. DOI: 10.1128/AEM.00675-13.
10. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 1963; 17:208–12. PMID: 13986422. PMID: PMC2106263.
11. Collins B.S. Gram-negative outer membrane vesicles in vaccine development. *Discov. Med.* 2011; 12(62):7–15. PMID: 21794204.
12. van Niel G., D'Angelo G., Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2018; 19(4):213–28. DOI: 10.1038/nrm.2017.125.
13. Klimentová J., Stulík J. Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. *Microbiol. Res.* 2015; 170:1–9. DOI: 10.1016/j.micres.2014.09.006.
14. Jan A.T. Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria: A Perspective Update. *Front. Microbiol.* 2017; 8:1053. PMID: 28649237. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01053.
15. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific Diversity of *Yersinia pestis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17(2):434–64. DOI: 10.1128/CMR.17.2.434-464.2004.
16. Schwegheimer C., Kuehn M.J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13(10):605–19. DOI: 10.1038/nrmicro3525.
17. Wang W., Chanda W., Zhong M. The relationship between biofilm and outer membrane vesicles: a novel therapy overview. *FEMS Microbiol. Lett.* 2015; 362(15):fnv117. DOI: 10.1093/femsle/fnv117.
18. Schachterle J.K., Stewart R.M., Schachterle M.B., Calder J.T., Kang H., Prince J.T., Erickson D.L. *Yersinia pseudotuberculosis* BarA-UvrY Two-Component Regulatory System Represses Biofilms via CsrB. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8:323. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00323. PMID: 30280093.

## References

1. World Health Organization Regional Office for Africa. Plague outbreak situation reports 2017. [Internet]. (Cited 6 Dec 2017). Available from: <http://www.afro.who.int/health-topics/plague/plague-outbreak-situation-reports>.
2. Cabanel N., Bouchier C., Rajerison M., Carniel E. Plasmid-mediated doxycycline resistance in a *Yersinia pestis* strain isolated from a rat. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2018; 51(2):249–54. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.09.015.
3. Galimand M., Carniel E., Courvalin P. Resistance of *Yersinia pestis* to antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(10):3233–36. DOI: 10.1128/AAC.00306-06.
4. Welch T.J., Fricke W.F., McDermott P.F., White D.G., Rosso M.L., Rasko D.A., Mammel M.K., Eppinger M., Rosovitz M.J., Wagner D., Rahalison L., Leclerc J.E., Hinshaw J.M., Lindler L.E.,

## Authors:

Dudina L.G., Malkova M.A., Byvalov A.A. Vyatka State University; 36, Moskovskaya St., Kirov, 610000, Russian Federation; e-mail [info@vyatsu.ru](mailto:info@vyatsu.ru). Komi Institute of Physiology at the Scientific Center of the Ural Branch of RAS; Syktyvkar, Russian Federation.  
Chernyad'ev A.V., Litvinets S.G. Vyatka State University. 36, Moskovskaya St., Kirov, 610000, Russian Federation. E-mail: [info@vyatsu.ru](mailto:info@vyatsu.ru).

## Об авторах:

Дудина Л.Г., Малкова М.А., Бывалов А.А. Вятский государственный университет, Российская Федерация, 610000, Киров, Московская ул., 36; e-mail [info@vyatsu.ru](mailto:info@vyatsu.ru). Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН; Российская Федерация, Сыктывкар.  
Чернядьев А.В., Литвинцев С.Г. Вятский государственный университет. Российская Федерация, 610000, Киров, Московская ул., 36. E-mail: [info@vyatsu.ru](mailto:info@vyatsu.ru).

Поступила 12.04.18.

Отправлена на доработку 23.04.18.

Принята к публ. 12.02.19.