

Е.И.Кошель¹, Г.А.Ерошенко¹, Л.В.Анисимова¹, Л.А.Новичкова¹, А.А.Широков², А.М.Буров²,
О.С.Кузнецов¹, В.В.Кутырев¹

ОЦЕНКА ДЛИТЕЛЬНОСТИ СОХРАНЕНИЯ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* В КЛЕТКАХ ПОЧВЕННЫХ АМЕБ *ACANTHAMOEBA* SP. В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ²ФГБУН «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» РАН, Саратов, Российская Федерация

Цель работы. Анализ возможности длительного сохранения штаммов *Y. pestis* в ассоциации с амебами *Acanthamoeba* sp. **Материалы и методы.** Исследовано взаимодействие амеб *Acanthamoeba* sp., выделенных из почв нор грызунов в Прикаспийском песчаном, Волго-Уральском степном и Прикаспийском Северо-Западном степном природных очагах чумы, с 4 штаммами *Y. pestis* основного подвида, 1 штаммом кавказского и 1 штаммом алтайского подвида. **Результаты и обсуждение.** Установлено, что штаммы основного подвида сохраняются в клетках амеб при температуре 26 °С и влажности 20 % (моделирование засушливых периодов в природных очагах чумы) в течение двух–четырех месяцев проведения эксперимента и в 10–20 раз дольше, чем в чистой культуре. Два штамма неосновных подвида не показали увеличения длительности выживания в ассоциации с акантамебами, что может быть связано с их пониженной резистентностью к фагоцитозу амебами этого рода. Методами флуоресцентной и электронной трансмиссионной микроскопии установлено, что клетки возбудителя чумы сохраняются в клетках амеб в индивидуальных вакуолях, окруженных эндоплазматическим ретикулом. Полученные данные могут свидетельствовать о возможном участии амеб *Acanthamoeba* sp. в сохранении *Y. pestis* в почвенных биоценозах природных очагов чумы.

Ключевые слова: возбудитель чумы, почвенные амебы, взаимодействие, внутриклеточная локализация.

Корреспондирующий автор: Елена Ивановна Кошель, e-mail: rusrap1@microbe.ru.

Е.И.Кoшель¹, Г.А.Ерошенко¹, Л.В.Анисимова¹, Л.А.Новичкова¹, А.А.Широков², А.М.Буров², О.С.Кузнецов¹,
В.В.Кутырев¹

Exploratory Study of the Long-Term Persistence of *Yersinia pestis* in the Cells of Soil-Inhabiting Ameba – *Acanthamoeba* Sp.

¹Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation; ²RAS Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov, Russian Federation

Objective of the study is to explore the feasibility of the long-term persistence of *Yersinia pestis* strains in association with ameba – *Acanthamoeba* sp. **Materials and methods.** Investigated has been interaction of ameba – *Acanthamoeba* sp., isolated from rodent burrows in the Pre-Caspian sandy, Volga-Ural steppe, and Pre-Caspian North-Western steppe natural foci, with 4 strains of *Y. pestis* of the main subspecies, 1 strain of caucasica and 1 strain of altai subspecies. **Results and discussion.** It is established that the strains of the main subspecies survive in the cells of ameba at 26 °C and 20 % humidity (modeling of the drought conditions in the natural plague foci) within 2–4 months of experiment, and 10–20 times longer that in pure culture. Two strains of the non-main ssp. have not demonstrated an increase in persistency in association with *Acanthamoeba* sp., which may occur due to degraded resistance to phagocytosis in the ameba of this specie. Using fluorescent and transmission electronic microscopy, it is determined that the cells of plague agent persist in ameba cells in individual vacuoles, enclosed in endoplasmic reticulum. The data obtained may testify to the possible involvement of ameba *Acanthamoeba* sp. into sustainment of *Y. pestis* in soil biocoenoses of natural plague foci.

Key words: plague agent, soil-inhabiting ameba, interaction, intracellular localization.

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

Corresponding author: Elena I. Koshel', e-mail: rusrap1@microbe.ru.

Citation: Koshel' E.I., Eroshenko G.A., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Shirokov A.A., Burov A.M., Kuznetsov O.S., Kutuyev V.V. Exploratory Study of the Long-Term Persistence of *Yersinia pestis* in the Cells of Soil-Inhabiting Ameba – *Acanthamoeba* Sp. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 2:69–74. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-69-74

До сих пор точные механизмы сохранения возбудителя чумы в природе остаются не выясненными. В соответствии с классическим представлением основным механизмом сохранения *Yersinia pestis* в природных очагах чумы является горизонтальная трансмиссия по цепочке грызун–блоха–грызун, с помощью которой поддерживается постоянная циркуляция возбудителя в очагах [4]. Однако эта схема не позволяет удовлетворительно объяснить многие особенности функционирования очагов, такие как длительные межэпизоотические периоды с отсутствием выявления

зараженных животных и выделения культур возбудителя чумы, быстрое и массовое начало эпизоотий чумы на обширных территориях очагов. Недавно сформулирована гипотеза вертикальной трансмиссии, предполагающая участие членов почвенных биоценозов очагов чумы – простейших и нематод – в длительном сохранении и последующем выносе возбудителя чумы из почвенного биотопа в наземный [3, 6, 7]. Эта гипотеза объясняет сохранение возбудителя в течение межэпизоотических периодов и одновременное «взрывное» начало эпизоотий чумы на обширных

пространствах природного очага.

К числу наиболее многочисленных членов почвенных биоценозов относятся простейшие – амёбы. Установлено, что амёбы являются природными резервуарами многих патогенных бактерий – возбудителей легионеллеза, туляремии, холеры, сибирской язвы и других опасных и особо опасных инфекций [7, 11, 12]. Благодаря ассоциации с простейшими эти бактерии могут не только длительно сохраняться в окружающей среде, но и увеличивать свою численность за счет питательных ресурсов клеток амёб. Возможно, что такой же способ сохранения в почвенных биоценозах природных очагов использует и возбудитель чумы. Этот механизм может обеспечить его выживание во время межэпизоотических периодов и последующий вынос в наземный биоценоз при наступлении благоприятных климатических условий.

В предыдущих исследованиях нами установлено, что наиболее многочисленными представителями простейших в почвах нор грызунов природных очагов чумы Прикаспия являются цистообразующие амёбы рода *Acanthamoeba* [1]. Обсемененность клетками *Acanthamoeba* sp. почвенного субстрата в очагах очень высока и достигает 300000 кл./г. Такая высокая численность может обеспечить постоянное взаимодействие клеток амёб этого рода с возбудителем чумы, а устойчивость цист амёб к неблагоприятным условиям – долговременное сохранение возбудителя чумы в ассоциации с ними. В настоящее время доказана роль амёб рода *Acanthamoeba* в сохранении патогенных бактерий *Burkholderia*, *Coxiella*, *Legionella*, *Francisella*, *Vibrio*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Helicobacter* и др. [11]. В то же время взаимодействие акантамёб с возбудителем чумы ранее не исследовалось. В литературе опубликована лишь одна работа, свидетельствующая о возможности сохранения клеток *Y. pestis* в предцистах амёбы *Hartmannella rhysodes* [3]. Однако доказательства длительного сохранения клеток возбудителя чумы в ассоциации с амёбами до настоящего момента отсутствуют.

Цель данного исследования – анализ возможности длительного сохранения штаммов *Y. pestis* в ассоциации с амёбами *Acanthamoeba* sp., выделенными из почв прикаспийских очагов чумы.

Материалы и методы

Почвенные амёбы. В работе использованы амёбы *Acanthamoeba* sp., выделенные ранее из субстрата дна камер нор различных грызунов в Прикаспийском песчаном, Волго-Уральском степном и Прикаспийском Северо-Западном степном природных очагах чумы. Схемы выделения и идентификации почвенных амёб описаны нами в предыдущей работе [1].

Изучение длительного сохранения штаммов *Y. pestis* в ассоциации с амёбами *Acanthamoeba* sp. В работе использовано 6 штаммов *Y. pestis*, включающих 4 штамма основного подвида и 2 штамма

неосновных подвигов. К основному подвиду относились штаммы *Y. pestis* КМ-932, А-1792, 231(708) и его производный КМ-130. Из двух штаммов неосновных подвигов С-534 относится к кавказскому подвиду, а И-3000 – к алтайскому. Культуры штаммов *Y. pestis* выращивали на агаре или бульоне LB.

В начале эксперимента получали совместные культуры амёб с исследуемыми штаммами *Y. pestis*. Для этого из суточных агаровых культур *Y. pestis* готовили суспензии клеток в концентрации $1 \cdot 10^{12}$ кл./мл в 0,9 % растворе NaCl. В 1 мл готовых бактериальных суспензий вносили 0,05 мл штоковой взвеси аксенической культуры амёб *Acanthamoeba* sp. с тем, чтобы конечная концентрация амёб составила $5 \cdot 10^2$ кл./мл. Затем полученные совместные культуры наносили по 0,2 мл на чашки Петри с плотной средой NGM [9] и растирали по поверхности среды шпателем. Совместные культуры *Y. pestis* и *Acanthamoeba* sp инкубировали при температуре 28 °С в термостате в течение нескольких суток до полного «выедания» газонов *Y. pestis* клетками амёб. Для каждого штамма готовили по 2 чашки. После накопления биомассы амёб собирали с поверхности агара двух чашек шпателем в пробирку с 2 мл 0,9 % раствором NaCl. Полученные суспензии центрифугировали со скоростью 4000 об./мин в течение 1 мин, после чего надосадочную жидкость удаляли, а осадок амёб ресуспендировали в 2 мл 0,9 % раствора NaCl. Этот этап промывки повторяли дважды. Промытые суспензии амёб наносили по 100 мкл на стерильные бумажные фильтры размером 1×4 см и помещали в отдельные стерильные стеклянные пробирки без добавления питательных веществ и влаги. Для каждого штамма готовили 18 таких пробирок. Кроме того, для каждого штамма готовили 18 контрольных пробирок с фильтрами с нанесенной на них чистой культурой штамма. Чистые культуры штаммов предварительно выращивали на плотной среде NGM при 28 °С в течение 2 сут и затем суспендировали в 2 мл 0,9 % раствора NaCl до получения концентрации $1 \cdot 10^{12}$ кл./мл. 100 мкл суспензии чистой культуры наносили на полоски фильтров того же размера. Таким образом, для каждого штамма готовили 18 опытных пробирок с полосками фильтров, содержащих отмытые после совместного культивирования с *Y. pestis* амёбы, и 18 контрольных пробирок с чистыми культурами штаммов *Y. pestis*. В общей сложности в одном повторе для 6 исследованных штаммов использовали 216 таких пробирок. Пробирки содержали в климатической камере KBF 720 (Binder, Германия) при температуре 26 °С и относительной влажности воздуха 20 % в течение 4 месяцев для моделирования условий засушливых климатических периодов. На протяжении всего эксперимента делали высевы из пробирок, начиная со вторых суток. Высевы проводили через 2, 4, 6, 14, 21, 28, 60, 90 и 120 сут. Для этого через каждый интервал времени в две опытные и две контрольные пробирки каждого штамма добавляли по 2 мл LB бульона. Посевы инкубировали при 28 °С. После по-

мутнения бульона (или по истечении 10 сут) 100 мкл бульона высевали на 1 чашку с LB агаром, которую инкубировали при 28 °С. С выросшей бактериальной культурой ставили реакцию с чумными бактериофагами Покровской и Л-413С, а также готовили из нее препараты ДНК. С препаратами ДНК проводили ПЦР с использованием набора реагентов «Тест-система для выявления ДНК *Yersinia pestis* методом ПЦР (ГенПест)» (производство РосНИПЧИ «Микроб») в соответствии с инструкцией производителя, за исключением того, что количество циклов амплификации увеличивали до 40. Амплификацию проводили в термоциклере «БИС – А111» (БИС-Н, Россия).

По положительным результатам этих двух тестов судили о принадлежности выделенной бактериальной культуры к виду *Y. pestis*. В случае получения отрицательного результата из этой же пробирки делали повторный высеv через 10 сут после добавления бульона в образцы. Если возбудитель чумы в образце не выявлялся, то результат считали отрицательным. Для повышения достоверности весь эксперимент, начиная с этапа получения совместных культур, повторяли для каждого штамма *Y. pestis* 2 раза.

Определение локализации возбудителя чумы в клетках амёб *Acanthamoeba sp.* Для определения внутриклеточной локализации клеток возбудителя чумы в амёбах *Acanthamoeba sp.* готовили образцы для флуоресцентной и электронной микроскопии. Для анализа использовали совместную агаровую культуру штамма *Y. pestis* 231(708) и амёб *Acanthamoeba sp.*, приготовленную по вышеуказанной методике. Культуру обеззараживали добавлением мертиолята натрия до конечной концентрации 0,01 с последующим прогреванием в течение 40 мин при температуре 57 °С. После этого совместную культуру промывали 2 раза. Из полученного осадка готовили мазки, которые окрашивали с помощью коммерческого набора «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие чумные адсорбированные лошадиные» (производство РосНИПЧИ «Микроб»), в состав которого входит иммуноглобулиновая фракция чумной агглютинирующей лошадиной сыворотки, меченая флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ). Для контрастирования и снижения уровня неспецифического свечения дополнительно использовали набор реагентов «Альбумин бычий или бараний, меченый родамином сухой» (производство НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи РАН). Просмотр мазков осуществляли на микроскопе Axio Lab. A1 с цифровой камерой Axio Cam ERC 5s (Carl Zeiss, Германия). Для просвечивающей электронной микроскопии также использовали совместную агаровую культуру штамма *Y. pestis* 231(708) и амёб *Acanthamoeba sp.*

Для получения ультратонких срезов использовали ультратом LKB III (LKB, Швеция). Готовые образцы просматривали при помощи просвечивающего электронного микроскопа Libra 120 (Carl Zeiss, Германия) на базе Центра коллективного

пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» Учреждения Российской академии наук Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Саратов).

Результаты и обсуждение

*Изучение возможности длительного сохранения штаммов *Y. pestis* в ассоциации с амёбами *Acanthamoeba sp.** Эксперимент по изучению длительного сохранения *Y. pestis* в акантамебах проводили в течение 4 месяцев. Совместные культуры амёб и штаммов *Y. pestis* содержали в климатической камере KBF 720 (Binder, Германия) при температуре 26 °С и относительной влажности воздуха 20 % в отсутствие питательных веществ и влаги, моделируя засушливые климатические периоды природных очагов чумы. Схожую схему использовали при изучении длительного сохранения возбудителя туляремии в амёбах *A. castellanii* [10]. В результате удалось установить, что в ассоциации с амёбами *Acanthamoeba sp.* большинство штаммов *Y. pestis* сохранялось значительно дольше, чем в чистой культуре. Используемые в работе штаммы *Y. pestis* в чистой культуре сохранялись в указанных условиях эксперимента не более двух недель (таблица). Наибольшую жизнеспособность показали два штамма неосновных подвидов: кавказского (С-534) и алтайского (И-3000), которые высевались в течение 2 недель. Такое длительное сохранение на фильтровальной бумаге клеток этих штаммов было неожиданным, поскольку все штаммы *Y. pestis* являются ауксотрофами, не способными существовать в отсутствие ряда органических питательных веществ и влаги. Однако для этих двух штаммов нами установлено, что они образуют массивную биопленку на абиотических поверхностях и, возможно, это свойство обеспечило их наибольшую жизнеспособность в чистой культуре.

Штаммы *Y. pestis* 231(708), КМ 932 и А-1792 основного подвида, которые продуцируют существенно меньшее количество поли-*N*-ацетилглюкозамина – основного вещества биопленки, сохранялись в усло-

Длительность выживания штаммов *Y. pestis* в совместной культуре с амёбами *Acanthamoeba sp.* и в чистой культуре

Штамм <i>Y. pestis</i>	Длительность выживания в ассоциации с амёбами, сут	Длительность выживания в чистой культуре, сут
Основной подвид		
231(708)	120	6
КМ-130, мутант 231(708)	6	2
КМ 932	60	6
А-1792	60	6
Неосновные подвиды		
С-534, кавказский подвид	6	14
И-3000, алтайский подвид	14	14

виях проводимого эксперимента в чистой культуре не более недели. Самым нежизнеспособным оказался штамм КМ-130 (мутант природного штамма *Y. pestis* 231(708)), не образующий биопленку, который не выделялся уже через 2 сут. По-видимому, образование биопленки способствует сохранению возбудителя чумы в неблагоприятных условиях, защищая клетки от высыхания и недостатка питательных веществ.

В тех же условиях большинство исследованных штаммов *Y. pestis* в ассоциации с амебами *Acanthamoeba* sp. сохранялось значительно дольше, чем в чистой культуре (таблица). Штаммы КМ-932 и А-1792 основного подвида выжили в ассоциации с амебами в течение 2 месяцев, т.е. в 10 раз дольше, чем в чистой культуре. Штамм 231(708) основного подвида сохранился в культуре с амебами в течение наиболее длительного времени и выделился спустя 4 месяца от начала эксперимента, то есть в 20 раз дольше, чем в чистой культуре. Его мутант сохранился в совместной культуре с амебами в 3 раза дольше, чем в чистой культуре, но существенно меньше (в 20 раз), чем исходный штамм 231(708). Таким образом, у природных штаммов *Y. pestis* основного подвида отмечалось повышение длительности выживания в ассоциации с акантамебами в среднем в 10–20 раз по сравнению с чистой культурой. В то же время два штамма неосновных подвигов – С-534 и И-3000 – не показали увеличения длительности выживания в ассоциации с амебами, несмотря на их высокие показатели сохранения в чистой культуре в условиях эксперимента. Штамм И-3000 сохранился в ассоциации с амебами в течение того же срока, что и в чистой культуре – 14 сут, а штамм С-534 – 6 сут. Причиной этого может быть выявленная нами ранее пониженная резистентность штаммов неосновных подвигов к фагоцитозу амебами *Acanthamoeba* sp. по сравнению с более устойчивыми штаммами основного подвида, что подробно отражено в диссертации Е.И.Кошель «Образование биопленки штаммами *Yersinia pestis* разных подвигов и их взаимодействие с членами почвенных биоценозов очагов чумы». Это, в свою очередь, может быть связано с более низким уровнем экспрессии одного из основных факторов патогенно-

сти возбудителя чумы – системы секреции III-го типа у штаммов неосновных подвигов [8].

Внутриклеточная локализация клеток *Y. pestis* в амебах *Acanthamoeba* sp. По данным литературы, возбудители опасных инфекций могут сохраняться в амебах в пространстве между стенками цист амеб, свободно располагаться в цитоплазме, а также занимать органоиды клетки и вакуоли [11, 12]. В нашем исследовании с помощью флуоресцентной и просвечивающей электронной микроскопии удалось выяснить, что клетки *Y. pestis* сохраняются в цитоплазме амеб в индивидуальных вакуолях. При обработке иммуноглобулинами, конъюгированными с ФИТЦ, и альбумином, меченым родамином, клетки возбудителя чумы внутри амеб при УФ-облучении визуализировались по характерному желто-зеленому специфическому свечению, в то время как стенки клеток амеб давали оранжевое флуоресцентное свечение (рис. 1). На первой стадии после фагоцитоза трофозоиты амеб оказывались полностью заполненными клетками возбудителя чумы. На рис. 1 виден крупный трофозоит, заполненный светящимися клетками *Y. pestis*. К моменту инцистирования часть клеток переваривалась амебой, а часть оставалась жизнеспособной. С течением времени количество жизнеспособных клеток становилось меньше, однако их число оказалось достаточным, чтобы спустя 4 месяца из амеб высевались культуры *Y. pestis*. С помощью электронной микроскопии показано, что неизмененные клетки *Y. pestis* находятся внутри клеток амеб, располагаясь при этом в отдельных вакуолях (рис. 2). Также как и легионеллы, клетки возбудителя чумы оказываются в этих вакуолях окруженными эндоплазматическим ретикуломом. Вероятно, в этих условиях клетки могут выживать длительное время, будучи надежно защищенными внутри цист амеб. Можно предположить, что при попадании в благоприятную для возбудителя чумы среду его клетки начинают активно делиться и разрушают хозяйскую клетку подобно другим бактериям.

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлены важные особенности взаимодействия возбудителя чумы с почвенными амебами.

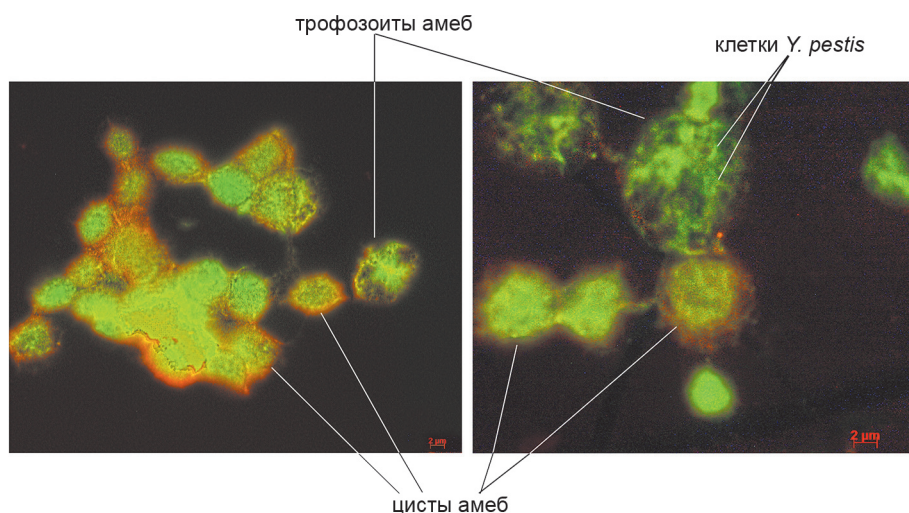


Рис. 1. Иммунофлуоресцентный анализ амеб *Acanthamoeba* sp. после их выращивания на штамме *Y. pestis* 231(708), микроскоп Axio Lab. A1 с цифровой камерой Axio Cam ERC 5s (Carl Zeiss, Германия). Увеличение $\times 1000$. Специфическое желто-зеленое свечение указывает на внутриклеточную локализацию клеток возбудителя чумы в трофозонтах и цистах амеб

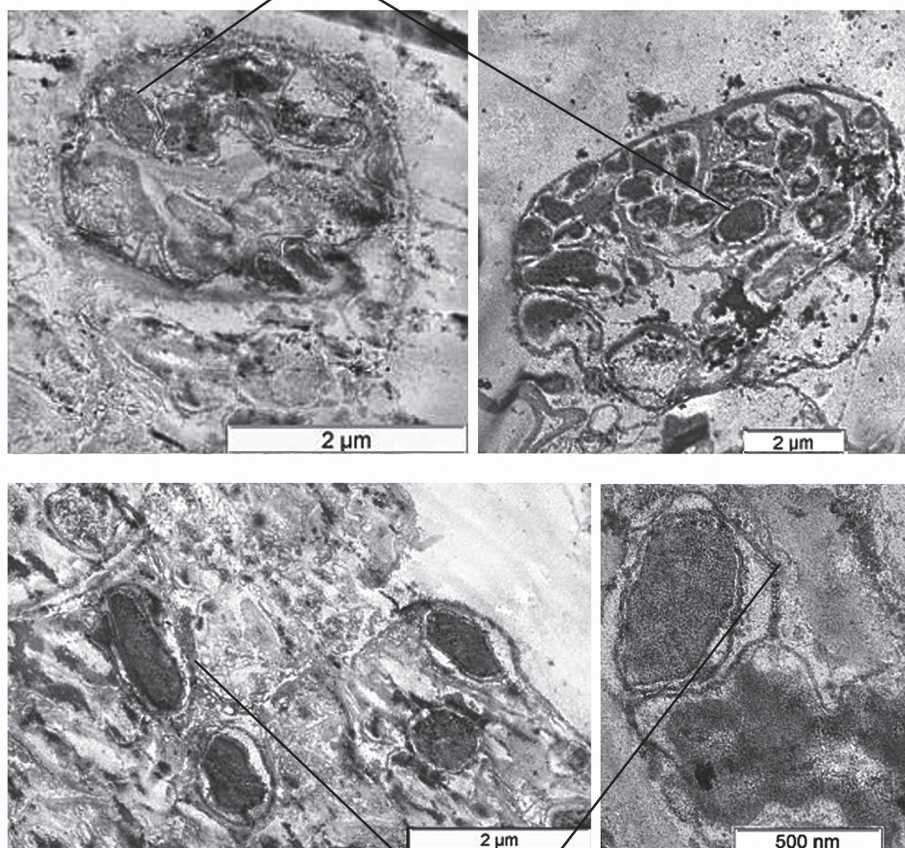
клетки *Y. pestis* в индивидуальных вакуолях

Рис. 2. Электронные микрофотографии амёб *Acanthamoeba* sp., содержащих клетки *Y. pestis* 231(708) в вакуолях. Получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа Libra 120 (Carl Zeiss, Германия):

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ЭПР, окружающий вакуоль с клеткой *Y. pestis*

Впервые показано, что клетки *Y. pestis* способны выживать в течение длительного времени в отсутствие питательных веществ и влаги в ассоциации с *Acanthamoeba* sp. Установлено, что совместно с акантамебами штаммы основного подвида, в отличие от штаммов неосновных подвигов, выживают в среднем в 10–20 раз дольше (до 4 месяцев проведения опыта), чем в чистой культуре. Это может быть связано с их большей устойчивостью к фагоцитозу акантамебами по сравнению со штаммами неосновных подвигов. Также показано, что клетки *Y. pestis* локализируются в амёбах в индивидуальных вакуолях, окруженных эндоплазматическим ретикулумом. Можно высказать предположение, что почвенные амёбы могут быть не только резервуаром возбудителя чумы, но и переносчиком инфекции из почвенного экотопа в теплокровных животных, в первую очередь, в мелких роющих грызунов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кошель Е.И., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Видяева Н.А., Гусева Н.П., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Определение систематической принадлежности почвенных амёб из очагов чумы

Прикаспия на основе анализа участков рибосомного оперона. *Генетика*. 2015; 51:39–45.

2. Кутырев В.В., Ерошенко Г.А., Попов Н.В., Видяева Н.А., Коннов Н.П. Молекулярные механизмы взаимодействия возбудителя чумы с беспозвоночными животными. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2009; 4:7–12.

3. Никольшин С.В., Онацкая Т.Г., Луканина Л.М. Изучение ассоциации почвенных амёб *Hartmannella rhysodes* с бактериями – возбудителями чумы и псевдотуберкулеза в эксперименте. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1992; 9 (10):2–4.

4. Павловский Е.Н. Природная очаговость трансмиссивных болезней в связи с ландшафтной эпидемиологией зооантропонозов. М.-Л.; 1964. 211 с.

5. Попов Н.В., Слудский А.А., Удовиков А.И., Аникин В.В., Яковлев С.А., Караваева Т.Б. К роли нематод [*Secernentea, Rhabdidae*] – паразитов блох в энзоотии чумы. *Энтомол. и паразитол. исследования в Поволжье*. 2006; 5:88–93.

6. Попов Н.В., Кошель Е.И., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Формирование современных представлений о механизмах энзоотии чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 3(109):5–8.

7. Abd H., Johansson T., Golovliov I., Sandstrom G., Forsman M. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69:600–6.

8. Ansong C., Schrimpe-Rutledge A.C., Mitchell H.D., Chauhan S., Jones M.B., Kim Y.-M., McAteer K., Kaiser B.L.D., Dubois J.L., Brewer H.M., Frank B.C., McDermott J.E., Metz T.O., Peterson S.N., Smith R.D., Motin V.L., Adkins J.N. Multi-omic systems approach to elucidating *Yersinia pestis* virulence mechanisms. *Mol. Biosyst.* 2013; 9: 44–54.

9. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1974; 77:71–94.

10. El-Etr S.H., Margolis J.J., Monack D., Robison R.A., Cohen M., Moore E., Rasley A. *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75:7488–500. DOI: 10.1128/AEM.01829-09.

11. Greub G., Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17:413–33.

12. Harb O.S., Abu Kwai Y. Essential role for the *Legionella pneumophila* rep helicase homologue in intracellular infection of mammalian cells. *Infect. Immun.* 2000; 68:6970–8.

References

1. Koshel' E.I., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Vidyayeva N.A., Guseva N.P., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Identification of systematic positioning of soil amoeba, isolated from foci of the Caspian-Sea Region, based on the analysis of ribosomal operon segments]. *Genetika.* 2015; 51:39–45.
2. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Popov N.V., Vidyayeva N.A., Konnov N.P. [Molecular mechanisms of interaction between plague agent and invertebrate animals]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2009; 4:7–12.
3. Nikul'shin S.V., Onatskaya T.G., Lukanina L.M. [Studies of association between soil amoeba *Hartmannella rhyssodes* and bacteria – plague and pseudotuberculosis agents, *in vitro*]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1992; 9 (10):2–4.
4. Pavlovsky E.N. [Natural Focality of transmissible diseases in connection with landscape epidemiology of zoonoses]. M.-L.; 1964. 211 p.
5. Popov N.V., Sludsky A.A., Udovikov A.I., Anikin V.V., Yakovlev S.A., Karavaeva T.B. [Concerning the role of nematodes [*Secernentea*, *Rhabdidae*], flea parasites, in plague enzootics]. *Entomol. Parazitol. Issled. v Povolzh'e.* 2006; 5:88–93.
6. Popov N.V., Koshel' E.I., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Formation of modern concepts on the mechanism of plague enzooty]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 3:5–8.
7. Abd H., Johansson T., Golovliov I., Sandstrom G., Forsman M. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69:600–6.
8. Ansong C., Schrimpe-Rutledge A.C., Mitchell H.D., Chauhan S., Jones M.B., Kim Y.-M., McAteer K., Kaiser B.L.D., Dubois J.L., Brewer H.M., Frank B.C., McDermott J.E., Metz T.O., Peterson S.N., Smith R.D., Motin V.L., Adkins J.N. Multi-omic systems approach to elucidating *Yersinia pestis* virulence mechanisms. *Mol. Biosyst.* 2013; 9: 44–54.

9. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 1974; 77:71–94.
10. El-Etr S.H., Margolis J.J., Monack D., Robison R.A., Cohen M., Moore E., Rasley A. *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75:7488–500. DOI: 10.1128/AEM.01829-09.
11. Greub G., Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17:413–33.
12. Harb O.S., Abu Kwai Y. Essential role for the *Legionella pneumophila* rep helicase homologue in intracellular infection of mammalian cells. *Infect. Immun.* 2000; 68:6970–8.

Authors:

Koshel' E.I., Eroshenko G.A., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Kuznetsov O.S., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Shirokov A.A., Burov A.M. RAS Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms. Saratov, Russian Federation.

Об авторах:

Кощель Е.И., Ерошенко Г.А., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Кузнецов О.С., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Широков А.А., Буров А.М. ФГБУН «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» РАН. Саратов, Российская Федерация.

Поступила 20.04.15.