

УДК 616.981.452

Г.А.Ерошенко, Н.А.Видяева, Л.М.Куклева, Е.И.Кошель, Г.Н.Одинокоев, Н.Ю.Шавина, Т.В.Князева, Т.В.Мокроусова, Я.М.Краснов, Л.В.Анисимова, Л.А.Новичкова, П.С.Ерохин, А.В.Бойко, В.В.Кутырев

**ИЗУЧЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЕНКИ  
У БЕСПИГМЕНТНЫХ И БЕСПЛАЗМИДНЫХ МУТАНТОВ ШТАММА *YERSINIA PESTIS*  
НА БИОТИЧЕСКИХ ПОВЕРХНОСТЯХ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* И *IN VIVO***

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

У беспиgmentных и бесплазмидных мутантов – изогенных вариантов высоковирулентного штамма *Yersinia pestis* 231 – проведено изучение образования биопленки на биотических поверхностях в условиях *in vitro* (на лабораторной модели нематоды *Caenorhabditis elegans*) и *in vivo* (в пищеварительном тракте блохи *Nosopsyllus laeviceps*). Установлено, что причиной спонтанной потери способности к формированию биопленки и образованию пигментированных колоний может быть не только делеция всей хромосомной области пигментации, но и точечная мутация в структурном *hms* опероне. Показано, что отсутствие плазмид *pCad*, *pFra* или *pPst* не влияет на способность бесплазмидных мутантов формировать биопленку на кутикуле нематоды *C. elegans*.

*Ключевые слова:* возбудитель чумы, мутанты, биопленка, биотическая поверхность

G.A.Eroshenko, N.A.Vidyaeva, L.M.Kukleva, E.I.Koshel', G.N.Odinokov, N.Yu.Shavina, T.V.Knyazeva, T.V.Mokrousova, Ya.M.Krasnov, L.V.Anisimova, L.A.Novichkova, P.S.Erokhin, A.V.Boiko, V.V.Kutyrev

**Studies of Biofilm Formation in Non-Pigmented and Plasmid-Deprived Mutants of *Yersinia pestis* on Biotic Surfaces, *in vivo* and *in vitro* Conditions**

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

In non-pigmented and plasmid-deprived mutants – isogenic variants of highly virulent *Yersinia pestis* 231 strain – studied is the mechanism of biofilm formation on biotic surfaces, both *in vitro* (on the laboratory model of nematode *Caenorhabditis elegans*) and *in vivo* (inside the alimentary tract of *Nosopsyllus laeviceps* flea). It is determined that spontaneous loss of ability to form biofilms and generate pigmented colonies in the mutants is probably caused not only by the deletion of the whole chromosome pigmentation fragment, but also by a point(single base) mutation in structural *hms* operon. It is demonstrated that the absence of *pCad*, *pFra* or *pPst* plasmids does not have an impact on the ability of plasmid-deprived mutants to form biofilm on the cuticle of nematode *C. elegans*.

*Key words:* plague agent, mutants, biofilm, biotic surface.

Возбудитель чумы *Yersinia pestis* имеет сложный жизненный цикл, включающий пребывание в теплокровном хозяине (37 °С, богатая питательная среда, воздействие иммунной системы) и пищеварительном тракте переносчика – блохи (28 °С, ограниченные питательные ресурсы, действие пищеварительных ферментов насекомого). Смена фазы жизненного цикла, связанная с переходом из теплокровного организма в переносчика – блоху, приводит к перестройке метаболических процессов возбудителя и прекращению образования факторов патогенности, необходимых для выживания и размножения в условиях организма млекопитающих. Под действием сигналов (в том числе и снижения температуры до 28 °С), поступающих из внешней среды, возбудитель чумы переходит в состояние биопленки – многослойного скопления клеток, погруженных в экзополисахаридный матрикс. В пищеварительном тракте блохи, куда возбудитель попадает с кровью, на акантах преджелудка он образует массивную биопленку – «чумной блок», наличие которого повышает эффективность трансмиссии *Y. pestis* [6, 8].

За биосинтез биопленки у *Y. pestis* отвечает целый

ряд генов, в том числе и гены, расположенные в хромосомной области пигментации [7, 13]. Хромосомная *pgm* область имеет размер 102 т.п.н. и фланкирована двумя копиями *IS100* элементов, гомологичная рекомбинация по которым может явиться причиной спонтанной потери (с частотой 10<sup>-5</sup>) всей этой области [11]. Такая мутация вызывает утрату способности клеток *Y. pestis* образовывать пигментированные колонии на среде с гемином или Конго красным и приводит к авирулентности штаммов [11, 12, 14]. За образование пигментированных колоний (вследствие адсорбции красителя на поверхности клеток) и формирование биопленки отвечает один и тот же locus хромосомной области пигментации – оперон *hmsHFRS* [7, 8]. Другой участок *pgm* области – остров высокой патогенности НРІ – включает *ybt* регион с генами иерсиниабактин-сидерофорзависимой системы транспорта железа и геном *psn*, кодирующим рецептор комплекса *Ybt-Fe*, а также чувствительность к видоспецифическому бактериоцину – пестицину. Наличие острова патогенности НРІ, наряду с плазмидой кальцийзависимости *pCad*, кодирующей систему секреции III типа, является обязательным для

проявления вирулентности возбудителем чумы [14].  
 К настоящему времени установлено, что для формирования биопленки *Y. pestis* необходимы также гены биосинтеза гептозы *gmhA*, полиаминов *speA*, *speC*, сенсорной регуляторной двухкомпонентной системы PhoP/PhoQ и др. [9, 15, 16]. Однако несмотря на интенсивное исследование феномена образования биопленки у возбудителя чумы, генетические основы механизмов ее формирования остаются исследованными далеко недостаточно.

Целью нашей работы было изучение влияния различных мутаций в геноме штаммов возбудителя чумы на образование ими биопленки на биотических поверхностях в условиях *in vitro* – на модели круглого червя нематоды *C. elegans* и *in vivo* – в блохах *Nosopsyllus laeviceps*.

### Материалы и методы

В работе использован набор беспигментных и бесплазмидных спонтанных мутантов, полученных из высоковирулентного штамма *Y. pestis* 231 [14], а также вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ (табл. 1). Штаммы культивировали на 1,5 % агаре и в бульоне LB (рН 7,2) при 28 °С в течение 18–24 ч. Выделение ДНК штаммов проводили общепринятым способом [5]. Определение способности штаммов образовывать пигментированные колонии осуществляли выращиванием культур в течение 4 дней при 28 °С на твердой синтетической среде с Конго красным для изучения признака пигментации (производство РосНИПЧИ «Микроб»).

Изучение образования биопленки на биотической поверхности *in vitro* проводили на лабораторной модели – нематоды *Caenorhabditis elegans* (штамм N2 Bristol). Штамм получен из *Caenorhabditis Genetics Center* (Университет Миннесоты, США). На газон бактериальной культуры, выращенной на NGM агаре при комнатной температуре, наносили 20 взрослых особей для откладывания яиц, которых потом удаляли [8, 10]. Чашки инкубировали при 20 °С в течение 48 ч. О наличии у штамма способности к формированию биопленки судили по образованию этим штаммом массивного скопления клеток на головной и других частях тела нематод.

Исследование способности к формированию

биопленки на биотической поверхности *in vivo* осуществляли с использованием блох *Nosopsyllus laeviceps*. Инфицирование блох проводили на биомембране с заражающей взвесью бактерий 10<sup>9</sup> КОЕ/мл [2]. С интервалом в 2 сут блох, зараженных *Y. pestis*, подкармливали на белых мышах, а часть зараженных блох (по 10 шт. на каждый штамм) растирали с физраствором, взвесь наносили на покровные стекла, обрабатывали 2,5 % глутаральдегидом и затем просматривали на атомно-силовом микроскопе Solver P47-Pro (NT-MDT, Россия).

Для детекции генов использованы рассчитанные нами специфические праймеры на гены *hmsHFRS*, *irp-2*, *psn*:

*hmsS-L* CGCCCTGATTTTACGG и *hmsS-R* CATCCCTGGCGTAAATGG;

*hmsR-As* ACTCATCCTATGTCTGGTG и *hmsR-As* GACCAGATATTCAGTGG;

*hmsF-SAAGACAGCACAGGGCGGAC* и *hmsF-R* TCCGTGGCCACAGGTA;

*hmsH-S* CTTCTGCCTATATTGACCG и *hmsH-As* GATGCCATTCTTGTAGCG;

*Irp2-S* ATGATTTCTGGCGCACCA и *Irp2-As* AGGCGATATGCAGCATTG;

*Psn-S* ACACAATATCACGGCAGC и *Psn-AS* ACCAGATTAACCGCCAGTC.

Аmplифицированные фрагменты генов у штаммов *Y. pestis* секвенировали на генетическом анализаторе модели «CEQ 8000» (Beckman Coulter). Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов осуществляли с использованием алгоритма BLAST (NCBI) и программного обеспечения MEGA 5.0.

### Результаты и обсуждение

Изучение влияния различных мутаций на образование биопленки на биотической поверхности проводили с использованием коллекции изогенных мутантов, полученных из вирулентного штамма *Y. pestis* 231. Из этого штамма ранее были изолированы два спонтанных беспигментных мутанта [14]. Один из них *Y. pestis* 231/3 был получен селекцией на синтетической среде с красителем Конго красным путем отбора беспигментных колоний. Отобранный мутант *Y. pestis* 231/3, кроме потери способности об-

Таблица 1

Использованные в работе штаммы *Y. pestis*

Штамм <i>Y. pestis</i>	Происхождение	Характеристика	Образование биопленки/ пигментсорбция
231	Природный штамм, выделен в 1947 г. в Аксайском высокогорном очаге чумы	Вирулентный	+/+
231/3	Производный штамма 231	Авирулентный, Pst <sup>+</sup>	-/-
KM130	«	Вирулентный, Pst <sup>+</sup>	-/-
231 pCad <sup>-</sup>	«	Авирулентный, Pst <sup>+</sup>	+/+
231 pFra <sup>-</sup>	«	Вирулентный, Pst <sup>+</sup>	+/+
231 pPst <sup>-</sup>	«	Вирулентный, Pst <sup>+</sup>	+/+
EVНИИЭГ	Выделен от трупа человека в 1926 г. на о. Мадагаскар	Авирулентный, Pst <sup>+</sup>	-/-

разовывать пигментированные колонии, также полностью утратил вирулентность и чувствительность к видоспецифическому бактериоцину – пестицину (Pst<sup>r</sup> фенотип). Другой беспигментный мутант *Y. pestis* 130 был отобран путем высева органов морской свинки, павшей при заражении штаммом 231. Этот штамм в отличие от предыдущего беспигментного мутанта не потерял вирулентности и пестицинчувствительности. Кроме этих двух беспигментных мутантов, в работе были использованы бесплазмидные мутанты – производные штамма *Y. pestis* 231, спонтанно утратившие одну из плазмид чумного микроба: кальцийзависимости – pCad, пестициногенности – pPst или фракционную плазмиду pFra. Все три бесплазмидных варианта сохранили способность формировать пигментированные колонии на среде с красителем и пестицинчувствительность (Pgm<sup>+</sup> Pst<sup>s</sup> фенотип).

Для выяснения характера мутаций, вызвавших Pgm<sup>-</sup> фенотип у производных штамма *Y. pestis* 231 – 231/3 и 130, нами были рассчитаны праймеры на разные участки хромосомной области пигментации: гены *hmsHFRS* оперона, острова патогенности НР1 – *irp2* и *psn*, а также на регуляторные гены *hmsT* и *hmsP* [10], контролирующие *hms* оперон и расположенные вне *pgm* области. В ПЦР с помощью этого набора праймеров была исследована структура *pgm* области у беспигментных мутантов *Y. pestis* 231/3 и 130 (табл. 2).

Как следует из табл. 2, у беспигментного мутанта *Y. pestis* 231/3 отсутствовали все гены *hmsHFRS* оперона, гены острова НР1 – *irp2* и *psn*. Аналогичную характеристику имел и изученный нами штамм *Y. pestis* EVНИИЭГ, у которого также не выявлялись гены *hms* локуса и острова высокой патогенности НР1. Ранее было показано, что у вакцинного штамма EV НИИЭГ отсутствует вся область пигментации вследствие обширной делеции в этом участке хромосомы [4]. Этот факт, а также высокая частота спонтанной утраты хромосомной области пигментации (10<sup>-5</sup>) позволяют с высокой степенью вероятности предположить потерю у беспигментного мутанта *Y. pestis* 231/3 всей области пигментации, в том числе и генов структурного *hms* оперона, необходимого для образования биопленки.

Таблица 2

Детекция в ПЦР генов хромосомной области пигментации у использованных в работе штаммов *Y. pestis*

Штамм \ Ген	<i>hmsH</i>	<i>hmsF</i>	<i>hmsR</i>	<i>hmsS</i>	<i>irp2</i>	<i>psn</i>	<i>hmsT</i>	<i>hmsP</i>
231	+	+	+	+	+	+	+	+
231/3	-	-	-	-	-	-	+	+
130	+	+	+	+	+	+	+	+
EVНИИЭГ	-	-	-	-	-	-	+	+
231 pCad <sup>-</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+
231 pFra <sup>-</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+
231 pPst <sup>-</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+

Pgm<sup>-</sup> фенотип другого беспигментного мутанта – *Y. pestis* 130 был вызван, очевидно, другой мутацией, поскольку в отличие от штамма *Y. pestis* 231/3 он сохранил высокую вирулентность и пестицинчувствительность. ПЦР-анализ штамма *Y. pestis* 130 показал, что он содержит все гены *hms* оперона и гены острова патогенности НР1 – *irp2* и *psn*. Это означает, что его Pgm<sup>-</sup> фенотип не связан с потерей всей *pgm* области, а скорее с мутацией, затрагивающей структуру самого *hms* оперона. Для ее выявления нами были секвенированы амплифицированные в ПЦР фрагменты генов *hmsHFRS*. Последовательности фрагментов всех 4 генов были полностью идентичными у исходного штамма *Y. pestis* 231 и его беспигментного мутанта *Y. pestis* 130, за исключением единственной выявленной нами точечной мутации в гене *hmsH* – делеции единичного нуклеотида (-A) в позиции 254 от начала секвенированного в ПЦР фрагмента гена. Делеция единичного нуклеотида приводит к сдвигу рамки считывания гена *hmsH* и нарушению последовательности кодируемого геном структурного белка HmsH, необходимого для образования пигментированных колоний и формирования биопленки. Таким образом, причина отсутствия формирования биопленки и образования пигментированных колоний на среде с красителем у беспигментного мутанта *Y. pestis* 130 вызвана нарушением последовательности одного из структурных *hms* генов.

Для изучения влияния выявленных мутаций на образование биопленки на биотической поверхности в условиях *in vitro* нами была использована лабораторная модель круглого червя – нематоды *C. elegans* штамм N2 Bristol. На газон 18-часовых культур изучаемых штаммов наносили нематод, посеы инкубировали в течение 48 часов, после чего их просматривали для выявления образования биопленки на кутикуле червей. Штамм *Y. pestis* 231 образовывал хорошо видимую биопленку на головной и других частях туловища нематод (рис. 1, А), в то время как беспигментные мутанты 231/3 и 130 не образовывали ее (рис. 1, Б, В). Это означает, что оба типа мутаций – потеря всей области пигментации и точечная мутация в структурном гене *hms* оперона – вызывают потерю способности формировать биопленку на биотической поверхности – на кутикуле нематоды *C. elegans*.

На этой модели нами также было исследовано образование биопленки бесплазмидными мутантами штамма *Y. pestis* 231, поскольку ранее изучение влияния отсутствия плазмид чумного микроба на формирование биопленки на кутикуле нематод не проводилось. В результате проведенных экспериментов установлено, что потеря плазмид *Y. pestis* не приводит к нарушению проявления этого свойства. Все три бесплазмидных мутанта, спонтанно утративших плазмиды кальцийзависимости (*Y. pestis* 231 pCad<sup>-</sup>), пестициногенности (*Y. pestis* 231 pPst<sup>-</sup>) или фракционную (*Y. pestis* 231 pFra<sup>-</sup>), в отличие от беспигментных изогенных мутантов, обладали способностью формировать биопленку *in vitro* на кутикуле немато-



Рис. 1. Изучение образования биопленки на модели нематоды *C. elegans* штаммами *Y. pestis*: А – 231 исходный; Б – 231/3; В – 130; Г – 231 pCad<sup>-</sup>; Д – 231 pPst<sup>-</sup>; Е – 231 pFra<sup>-</sup>

ды *C. elegans* (рис. 1, Г, Д, Е), и, следовательно, гены, расположенные на плаزمиде, не оказывали влияния на проявление этого свойства.

Нами была также исследована способность изогенных беспигментных мутантов *Y. pestis* 231, 231/3 и 130 образовывать биопленку в условиях *in vivo* – в пищеварительном тракте блохи *N. laeviceps*. Инфицирование блох проводили на биомембране с заражающей взвесью бактерий  $10^9$  КОЕ/мл [2]. Через 48 ч после заражения по 10 блох каждого штамма растирали с физраствором, и взвесь наносили на покровные стекла, фиксировали 2,5 % глутаральдегидом для дальнейшего просмотра на атомно-силовом микроскопе (рис. 2).

Через 2 сут после заражения штамм *Y. pestis* 231 содержался в преджелудке блох *N. laeviceps* в достаточно высокой концентрации ( $10^3$ – $10^4$  КОЕ). С помощью атомно-силовой микроскопии у культуры штамма 231, выделенной от блох, выявлена структура биопленки (рис. 2, А). После второй подкормки на 4-е сутки после заражения штаммом *Y. pestis* 231 обнаруживались заблокированные блохи, содержащие массивную биопленку – «чумной блок» в преджелудке. В отличие от исходного штамма беспигментные мутанты – *Y. pestis* 231/3 и 130 выделялись от блох через 48 ч в низкой концентрации ( $10^1$  и  $10^2$  КОЕ) и в виде отдельных несвязанных между собой клеток (рис. 2, Б, В). После второй подкормки на 4-е сутки культуры *Y. pestis* 231/3 и 130 от блох уже не выделялись, что свидетельствовало об их полном вымывании из блох из-за отсутствия способности колонизировать пищеварительный тракт насекомого.

В целом, беспигментные изогенные мутанты штамма *Y. pestis* 231 – 231/3 и 130 независимо от того,

какой тип мутаций они содержали – утрату всей области пигментации или точечную мутацию в одном из генов *hms* локуса – не образовывали биопленку на биотической поверхности *in vitro* – на кутикуле нематоды *C. elegans*, а также *in vivo* – в пищеварительном тракте блохи *N. laeviceps*. Это подтверждает ранее сделанный вывод о том, что сохранение структурно-функциональной целостности генов именно *hms* оперона необходимо для образования биопленки не только *in vitro* – на кутикуле нематоды *C. elegans*, но и *in vivo* – в блохе [8].

Изучение образования биопленки бесплазмидными вариантами штамма *Y. pestis* 231 в блохах нами не проводилось, поскольку такие исследования были выполнены в полном объеме ранее другими авторами, показавшими, что отсутствие плазмид pPst и pCad не приводит к снижению эффективности формирования «чумного блока» в преджелудке блохи [3]. В то же время было установлено, что штаммы *Y. pestis*, лишенные плазмиды pFra, с низкой частотой вызывали образование блока в преджелудке блохи [1], что, по-видимому, было связано с их сниженной выживаемостью в пищеварительном тракте переносчика из-за отсутствия фосфолипазы Д, кодируемой геном *ymt*, локализованном на этой плазмиде. Эти данные указывают на то, что существуют различия в формировании биопленки на кутикуле нематод и в пищеварительном тракте блох у штаммов *Y. pestis*, лишенных плазмиды pFra, в отличие от pCad<sup>-</sup> и pPst<sup>-</sup> вариантов, эффективно образующих биопленку на обоих типах биотических поверхностей.

Таким образом, нами впервые получены данные о том, что спонтанная потеря способности к образованию биопленки может быть вызвана не только

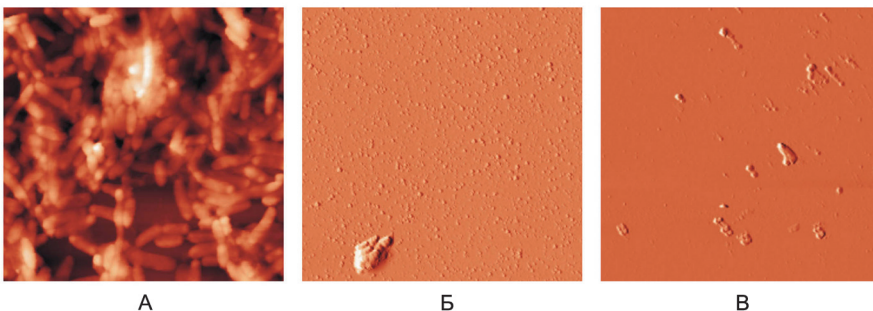


Рис. 2. Изучение образования биопленки в блохах у штаммов *Y. pestis* 231 (А), 231/3 (Б) и 130 (В) с помощью атомно-силовой микроскопии. Размер АСМ изображения составляет 20×20 мкм

делацией всей области пигментации, как это было описано ранее [11], но и точечной мутацией в структурном *hms* опероне. Поскольку этот тип мутаций обнаружен у штамма *Y. pestis*, выделенного из теплокровного животного и с учетом того, что другой тип Pgm<sup>-</sup> мутации (потеря *pgm* области) в природе также встречается у штаммов, выделенных от носителей – грызунов и переносчиков (блох), то это означает, что пребывание в макроорганизме может сопровождаться преобразованиями генома возбудителя, приводящими к изменению его вирулентности и адаптационных возможностей при смене фаз существования в его сложном жизненном цикле.

Работа выполнена по государственному контракту № 70-Д от 25 июля 2011 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Величко Л.Н., Князева Т.В., Анисимов А.П., Назарова Л.С., Мокроусова Т.В., Кокушкин А.М. и др. Влияние экспрессии генов Fга оперона *Yersinia pestis* на трансмиссивный и алиментарный пути передачи чумы грызунами. Пробл. особо опасных инф. 2000; 80:127–32.
2. Величко Л.Н., Кокушкин А.М., Князева Т.В., Мокроусова Т.В., Марысаев В.Б. Применение аппарата для работы с инфицированными чумой блохами. Пробл. особо опасных инф. 1994; 4:49–55.
3. Кокушкин А.М., Величко Л.Н., Князева Т.В., Анисимов П.И., Мокроусова Т.В. Изучение роли собственных плазмид и признака пигментсорбции в способности бактерий чумы инфицировать блох и вызывать у них блокообразование. В кн.: Природно-очаговые инфекции и их профилактика. Саратов; 1991. С. 110–8.
4. Кутырев В.В., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Виноградова Н.А. Сравнительная генетическая характеристика вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV и его предполагаемых «вирулентных производных». Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2009; 4:50–6.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
6. Bacot AW, Martin CJ. Observation on the mechanism on the transmission of by fleas. J. Hyg. Plague Suppl. 1914; 3:423–39.
7. Bobrov A.G., Kirillina O., Ryjenkov D.A., Waters C.M., Price P.A., Fetherston J.D. et al. Systemic analysis of cyclic di-GMP signaling enzymes and their role in biofilm formation and virulence in *Yersinia pestis*. Mol. microbiol. 2011; 79:533–51.
8. Darby C, Hsu J.W., Ghori N., Falkow S. *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. Nature. 2002; 417:243–4.
9. Darby C, Ananth S.L., Tan L., Hinnebusch B.J. Identification of *gmhA*, a *Yersinia pestis* gene required for flea blockage, by using a *Caenorhabditis elegans* biofilm system. Infect. Immun. 2005;

73:7236–42.

10. Eroshenko G.A., Vityaeva N.A., Kutyrev V.V. Comparative analysis of biofilm formation by main and nonmain subspecies of *Yersinia pestis* strains. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2010; 59:513–20.

11. Fetherston J.D., Schuetze, P., Perry, R.D. Loss of the pigmentation phenotype in *Yersinia pestis* is due to the spontaneous deletion of 102 kb of chromosomal DNA which is flanked by a repetitive element. Mol. Microbiol. 1992; 6:512693–704.

12. Jackson S., Burrows T. The pigmentation of *Pasteurella pestis* on a defined medium containing haemin. Brit. J. Exp. Pathol. 1956; 37:570–6.

13. Kirillina O., Fetherston J., Bobrov A., Abney J., Perry R. HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hms-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis*. Mol. Microbiol. 2004; 54:75–88.

14. Kutyrev V.V., Filippov A.A., Oparina O.S., Protsenko O.A. Analysis of *Yersinia pestis* chromosomal determinants Pgm<sup>+</sup> and Pst<sup>+</sup> associated with virulence. Microb. Pathog. 1992; 12(3):177–86.

15. Patel C.N., Wortham B.W., Lines J.L., Fetherston J.D., Perry R.D., Oliveira M.A. Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. J. Bacteriol. 2006; 188:2355–63.

16. Vadivaloo V.V. PhoP regulation of *Yersinia pestis* during flea infection. In: «Yersinia 2010». 10 th. Intern. Symp.; Oct. 23–27, 2010; Brazil. P. 67.

#### References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Velichko L.N., Knyazeva T.V., Anisimov A.P., Nazarova L.S., Mokrousova T.V., Kokushkin A.M. et al. [Effect of Fga gene expression of *Yersinia pestis* operon on the vector-borne and alimentary routes of plague transmission by rodents]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2000; 80:127–32.
2. Velichko L.N., Kokushkin A.M., Knyazeva T.V., Mokrousova T.V., Marysaev V.B. [Usage of the equipment for work with plague infected fleas]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 1994; 4:49–55.
3. Kokushkin A.M., Velichko L.N., Knyazeva T.V., Anisimov P.I., Mokrousova T.V. [Studies of the impact of intrinsic (inherent) plasmids and pigment-sorption characteristic on the plague agent ability to infect fleas and initiate block-formation in them]. In: [Natural Foci Infections and Their Prophylaxis]. Saratov; 1991. P. 110–8.
4. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Vinogradova N.A. [Comparative genetic characterization of the vaccine *Yersinia pestis* EV strain and its potential “virulent derivatives”]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2009; 4:50–6.
5. Maniatis T., Fritch E., Sambrook G. [Molecular cloning]. M., 1984. 480 p.

#### Authors:

Eroshenko G.A., Vityaeva N.A., Kukleva L.M., Koshel' E.I., Odinokov G.N., Shavina N.Yu., Knyazeva T.V., Mokrousova T.V., Krasnov Ya.M., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Erokhin P.S., Boiko A.V., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrap@microbe.ru

#### Об авторах:

Ерошенко Г.А., Видяева Н.А., Куклева Л.М., Кошель Е.И., Одинокоев Г.Н., Шавина Н.Ю., Князева Т.В., Мокроусова Т.В., Краснов Я.М., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Ерохин П.С., Бойко А.В., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Поступила 20.12.11.