

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-82-89

УДК 616.98:579.842.23

М.А. Макашова, Е.Г. Оглодин, Л.М. Куклева, Н.А. Шарапова, Е.А. Нарышкина, В.Г. Германчук,
Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев

Длительное сохранение *Yersinia pestis* в ассоциации с *Acanthamoeba castellanii* в эксперименте

ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель исследования – выявление возможности длительного выживания и сохранения свойств *Yersinia pestis* в ассоциации с почвенными амебами *Acanthamoeba castellanii*. **Материалы и методы.** Использовали штаммы возбудителя чумы и акантамеб, выделенные на одном участке Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. Систематическую принадлежность простейших определяли путем анализа данных секвенирования фрагмента гена 18S рРНК с последующим выравниванием на последовательности амеб из базы данных NCBI GenBank. Получение флуоресцентного штамма *Y. pestis* осуществляли методом электропорации с использованием плазмиды pTurboGFP-B. Совместное культивирование проводили в солевом буфере в отсутствие питательных веществ для клеток возбудителя чумы. Определение влияния сокультивирования с простейшими на свойства штамма *Y. pestis* выполняли с помощью микробиологических, биологических и молекулярно-генетических методов. **Результаты и обсуждение.** Установлено сохранение жизнеспособности клеток штамма *Y. pestis* основного подвида античного биовара филогенетической линии 4.ANT в совместной культуре с клетками амеб в отсутствие дополнительных питательных веществ на протяжении 22 месяцев эксперимента. Сокультивирование с амебами не привело к изменению культурально-морфологических, генетических и вирулентных свойств штамма возбудителя чумы. Полученные данные подтверждают возможность использования *Acanthamoeba castellanii* чумным микробом для персистенции в почвенных биоценозах и открывают перспективу изучения механизмов сохранения возбудителя чумы в течение длительных межэпизоотических периодов.

Ключевые слова: межэпизоотические периоды, чума, механизм сохранения, свободноживущие амебы, *Yersinia pestis*, *Acanthamoeba*.

Корреспондирующий автор: Макашова Марина Александровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Макашова М.А., Оглодин Е.Г., Куклева Л.М., Шарапова Н.А., Нарышкина Е.А., Германчук В.Г., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Длительное сохранение *Yersinia pestis* в ассоциации с *Acanthamoeba castellanii* в эксперименте. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 4:82–89. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-82-89

Поступила 15.12.2022. Принята к публ. 22.12.2022.

M.A. Makashova, E.G. Oglodin, L.M. Kukleva, N.A. Sharapova, E.A. Naryshkina,
V.G. Germanchuk, G.A. Eroshenko, V.V. Kutyrrev

Long-Term Persistence of *Yersinia pestis* in Association with *Acanthamoeba castellanii* in Experiment

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to test the feasibility of long-term survival and preservation of the properties of *Yersinia pestis* in association with soil amoeba *Acanthamoeba castellanii*. **Materials and methods.** *Y. pestis* strains and acanthamoeba isolated in the common area of the Gorno-Altai high-mountain plague focus were used for the study. The systematic affiliation of protozoa was determined through analyzing the 18S rRNA gene fragment sequencing data, followed by alignment with amoeba sequences from the NCBI GenBank database. A fluorescent *Y. pestis* strain was obtained by electroporation using the pTurboGFP-B plasmid. Co-cultivation was carried out in saline buffer in the absence of nutrients for the cells of plague pathogen. The influence of co-culturing with protozoa on *Y. pestis* properties was determined using microbiological, biological, and molecular-genetic methods. **Results and discussion.** The cell viability preservation for 22 months of the experiment in *Y. pestis* strain belonging to the main subspecies of the antique biovar, the 4.ANT phylogenetic line in co-culture with amoeba cells in the absence of additional nutrients has been established. Co-cultivation with amoebae did not lead to a change in the cultural, morphological, genetic and virulent properties of the plague pathogen strain. The data obtained confirm the possibility of using *Acanthamoeba castellanii* by the plague microbe to persist in soil biocenoses and open up the prospect of studying the mechanisms of plague pathogen surviving during extended inter-epizootic periods.

Key words: inter-epizootic periods, plague, mechanism of persistence, free-living amoeba, *Yersinia pestis*, *Acanthamoeba*.

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

Corresponding author: Marina A. Makashova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Makashova M.A., Oglodin E.G., Kukleva L.M., Sharapova N.A., Naryshkina E.A., Germanchuk V.G., Eroshenko G.A., Kutyrrev V.V. Long-Term Persistence of *Yersinia pestis* in Association with *Acanthamoeba castellanii* in Experiment. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 4:82–89. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-82-89

Received 15.12.2022. Accepted 22.12.2022.

Makashova M.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7713-7959>
Oglodin E.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2955-3034>
Kukleva L.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2438-8364>
Sharapova N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5289-7783>

Naryshkina E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9190-099X>
Germanchuk V.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8986-3640>
Eroshenko G.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5403-989X>
Kutyrev V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Одним из наиболее актуальных вопросов в экологии *Yersinia pestis* является выяснение возможных механизмов сохранения возбудителя в почвенных биоценозах природных очагов чумы. Известно, что ряд патогенных бактерий (*Legionella pneumophila* [1, 2], *Mycobacterium marinum* [3], *Vibrio cholerae* [4], *Francisella tularensis* [5]) используют образование вне- и внутриклеточных ассоциаций с водными и почвенными простейшими в качестве стратегии выживания в окружающей среде. Подобные ассоциации являются экологической нишей, в которой многие бактериальные и грибковые патогены не только избегают стрессорного воздействия окружающей среды, но и размножаются с последующим выходом во внешнюю среду [6]. Согласно литературным данным, возбудитель чумы способен сохраняться в клетках *Hartmannella rhysodes* [7], инфузорий *Tetrahymena pyriformis* [8, 9], *Dictyostelium discoideum* [10], *Acanthamoeba castellanii* [11–13] от 2 дней до 14 месяцев.

Выживание *Y. pestis* напрямую зависит от условий сокультивирования (температура, влажность, среда культивирования, соотношение концентраций амёб и бактериальных клеток). Эксперименты по изучению взаимодействия амёб и штаммов возбудителя чумы проводились в почве [9], жидкой среде, содержащей органические вещества [8, 13], в отсутствие влаги для имитации засушливых условий [11]. Однако для того, чтобы выяснить закономерности взаимодействия и установить возможность длительного сохранения *Y. pestis* в клетках амёб, необходимо создать условия, при которых единственной стратегией выживания будет использование ресурсов простейших. Так, сокультивирование в солевом растворе без питательных веществ, с одной стороны, будет интенсифицировать процесс фагоцитоза бактериальных клеток амёбами, а с другой стороны – инициировать использование *Y. pestis* питательных ресурсов амёб.

В большинстве проведенных исследований были использованы музейные штаммы *Y. pestis*. Однако для более точного моделирования необходимо использование организмов, являющихся членами одного биоценоза. Существование организмов на протяжении длительного времени на одной территории приводит к формированию устойчивого сообщества [14]. Удобной моделью для рассмотрения этих взаимоотношений являются штаммы *Y. pestis* и амёб, выделенные на территории активного в настоящее время Горно-Алтайского высокогорного очага и адаптированные к одному природному биоценозу.

При изучении численности простейших из почв природных очагов чумы Прикаспия и Горного Алтая установлено, что в 1 г почвы может находиться до 300 тыс. клеток простейших [13, 15]. Одним из доминирующих представителей простейших являются цистообразующие амёбы рода *Acanthamoeba*.

Высокая численность акантамёб в почвах в совокупности с широким распространением в разных очагах чумы свидетельствует о том, что они могут рассматриваться в качестве природных резервуаров *Y. pestis*. В эксперименте по совместному культивированию возбудителя чумы основного подвида античного биовара филогенетической линии 4.ANT и *A. castellanii*, выделенных на одной территории Горно-Алтайского высокогорного очага чумы, в жидкой питательной среде LB в течение 14 дней описана динамика изменения концентраций клеток *Y. pestis* и амёб в исследуемой среде, свидетельствующая о наличии взаимодействий между этими организмами [13]. В то же время значительный интерес представляет исследование длительного взаимодействия *Y. pestis* и амёб *A. castellanii* для установления механизмов персистенции возбудителя во время длительных межэпизоотических периодов в очагах.

Немаловажным также является изучение влияния акантамёб на свойства клеток *Y. pestis* при их длительном сосуществовании. Имеются данные о повышении вирулентности иерсиний при пассировании через инфузории, аналогичном пассированию на перитонеальных макрофагах морских свинок и белых мышей [16]. Поэтому актуальным вопросом является изучение свойств штаммов возбудителя чумы после длительного совместного культивирования с амёбами.

Цель исследования заключалась в моделировании длительного выживания *Y. pestis* в ассоциации с почвенными амёбами *A. castellanii* и изучении его влияния на свойства и вирулентность этого патогена.

Материалы и методы

Штаммы *Y. pestis*, условия культивирования, биохимический анализ, оценка вирулентности. Для изучения взаимоотношений возбудителя чумы с акантамёбами в работе использовали флуоресцентный штамм *Y. pestis* KM2083, полученный в результате трансформации природного штамма *Y. pestis* 216 античного биовара основного подвида, выделенного в 2017 г. от серого сурка *Marmota baibacina* на территории Горно-Алтайского высокогорного очага чумы (координаты N 49.63350°, E 89.05306°). Трансформацию клеток осуществляли методом электропорации плазмидой pTurboGFP-B (ЗАО «Евроген», Россия), кодирующей гены зеленого флуоресцентного белка TurboGFP и β-лактамазы, обеспечивающей устойчивость к ампициллину [17]. Рекомбинантный штамм выращивали на твердой среде LB (pH 7,2) с добавлением 50 ед/мл ампициллина при 28 °С в течение 24 и 48 ч. Сравнение культуральных, биохимических свойств, чувствительности к диагностическим бактериофагам штаммов осуществляли по стандартным методикам [18].

Вирулентность оценивали заражением беспородных белых мышей подкожно в дозах $1 \cdot 10^3$ и $1 \cdot 10^4$ КОЕ/мл. Биомодели содержали в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях. После вскрытия павших животных фрагменты органов засеивали на плотную среду LB и изготавливали мазки-отпечатки. Мазки органов грызунов просматривали в микроскопе Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия), часть из которых окрашивали по Граму, а другую часть фиксировали в 96° спирте в течение 30 мин и просматривали в образцах при длине волны 470 нм.

Культивирование амёб. Культура амёб выделена из почвы норы серого сурка в непосредственной близости от места выделения штамма *Y. pestis* 216 из точки с координатами N 49.36537°, E 89.05073°. Выделение культуры амёб проводили в соответствии с методикой, описанной ранее [13]. Аксеническую культуру амёб выращивали в среде PYG (пептон – 20 г, дрожжевой экстракт – 2 г, глюкоза – 18 г, цитрат натрия – 1 г, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,98 г, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,355 г, KH_2PO_4 – 0,34 г, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ – 0,02 г, вода – до 1000 мл) при 22 °С до концентрации $1 \cdot 10^6$ кл./мл. Культуру амёб отмывали от питательной среды трехкратным центрифугированием при 4 тыс. об/мин в течение 15 мин в 30 мл солевого буфера АВ (цитрат натрия – 1 г, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,98 г, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,355 г, KH_2PO_4 – 0,34 г, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ – 0,02 г, вода – до 1000 мл). Концентрацию клеток определяли, используя счетную камеру Горяева.

Совместное культивирование возбудителя чумы и амёб. Совместное культивирование проводили в солевом буфере АВ с добавлением 50 ед/мл ампициллина. Концентрация амёб в образцах была равна $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл. Микробная нагрузка в первом образце составляла 1 КОЕ/клетка амёбы (концентрация *Y. pestis* KM2083 – $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл), во втором – 0,1 КОЕ/клетка амёбы ($1 \cdot 10^2$ КОЕ/мл). В качестве контрольного образца использован тот же рекомбинантный штамм *Y. pestis* KM2083 в концентрации $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл, но в отсутствие клеток амёб. Культивирование проводилось в климатической камере KBF 115 (Binder, Германия) при температуре 22 °С и влажности 60 %. Определение количества КОЕ в образцах совместных культур проводили путем нанесения на твердую питательную среду LB 100 мкл образца, культивирования при 28 °С в течение 48 часов и подсчета выросших колоний. Высевы проводили ежедневно на протяжении двух недель, затем раз в неделю, и через месяц со дня начала эксперимента высевы проводили 1 раз в месяц.

Определение систематической принадлежности простейших. Выделение ДНК из амёб осуществляли коммерческим набором «ДНК-сорб-Д» («АмплиСенс», Россия). Для определения видовой принадлежности амёб анализировали участок гена 18S рРНК, полученный методом полимеразной цеп-

ной реакции (ПЦР) с праймерами JDP1/JDP2 [19]. Амплификацию фрагментов проводили в приборе Bio-Rad T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США) с набором реагентов «БиоМастер LR HS-ПЦР-Color (2×)» (ООО «Биолабмикс», Россия). Секвенирование продуктов ПЦР выполняли на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500xL (Applied Biosystems, США). Полученные нуклеотидные последовательности выравнивали алгоритмом BLAST на нуклеотидные последовательности простейших из базы данных NCBI GenBank. Изолят считали идентифицированным при проценте гомологии более 99 %.

Выявление нуклеотидных замен в геномных последовательностях *Y. pestis*. Выделение ДНК возбудителя чумы выполняли набором реагентов PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, США). Определение нуклеотидных последовательностей осуществляли на платформе Ion Torrent (Life Technologies, США). Обработку полученных данных проводили в Ion Torrent Suite software package 5.12, Newbler gsAssembler 2.6. Поиск однонуклеотидных полиморфизмов (SNP – single nucleotide polymorphism) осуществляли программой Wombac 2.0 (<https://github.com/tseemann/wombac>).

Результаты и обсуждение

Штаммы возбудителя чумы и амёб. Для моделирования природных условий взаимодействия *Y. pestis* с акантамебами в эксперимент взяты культура амёб и штамм возбудителя чумы, выделенные на одном участке Горно-Алтайского очага. Для проведения эксперимента использовали рекомбинантный флуоресцентный штамм *Y. pestis* KM2083, полученный из природного штамма *Y. pestis* 216 основного подвида античного биовара филогенетической линии 4.ANT. Трансформирование клеток возбудителя чумы плазмидой pTurboGFP-B не привело к изменению его культурально-морфологических, биохимических свойств, чувствительности к бактериофагам, вирулентности для белых мышей.

Из пробы почвы, взятой на эпизоотическом участке рядом с местом выделения штамма *Y. pestis* 216, получены простейшие, которые по морфологическим характеристикам отнесены к роду *Acanthamoeba*. Для установления систематической принадлежности амёб методом ПЦР с использованием праймеров JDP1/JDP2 на ген 18S рРНК получены фрагменты ДНК размером 450 п.н. При анализе данных капиллярного секвенирования получена нуклеотидная последовательность, при сравнении которой с имеющимися в NCBI GenBank последовательностями при 100 % покрытии и 100 % гомологии установлена принадлежность исследуемых простейших к виду *A. castellanii*. Следует отметить, что выявленное широкое распространение *A. castellanii* в очагах чумы Прикаспия [15] и Горного Алтая [13] свидетельствует о распространенности представителей этого вида в почве природно-очаговых территорий.

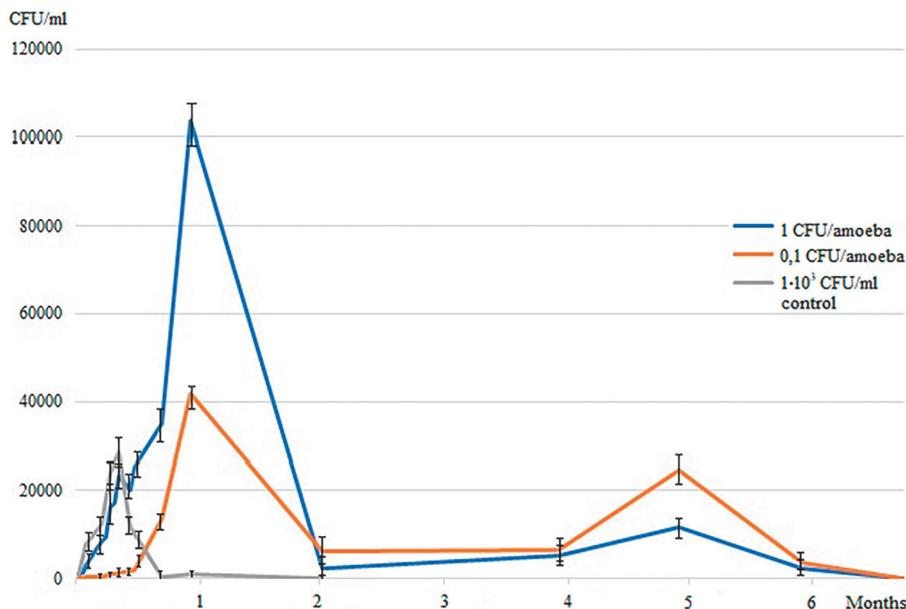


Рис. 1. Динамика изменения концентрации *Y. pestis* KM2083 при совместном культивировании с *A. castellanii* в экспериментальных и контрольном образцах на протяжении 7 месяцев. Планки погрешностей представляют собой доверительный интервал результатов трех измерений при уровне значимости $\alpha=0,05$

Fig. 1. Dynamics of changes in the concentration of *Y. pestis* KM2083 during co-cultivation with *A. castellanii* in experimental and control samples over 7 month period. Error bars represent the confidence interval of the results of three measurements at a significance level of $\alpha=0.05$

В сочетании с данными по сохранению *Y. pestis* в цистах амёб [7, 12] это может указывать на возможную роль этих простейших в персистенции возбудителя чумы в почвенных биоценозах.

Моделирование длительного сохранения *Y. pestis* в жидкой сокультуре с амёбами. Совместное культивирование проводили в жидкой среде в условиях отсутствия питательных для *Y. pestis* веществ при температуре и влажности, имитирующих природные условия. В экспериментальных образцах культуры возбудителя чумы и амёб объединяли в пробирках с буфером АВ с добавлением ампициллина в соотношениях 1 КОЕ и 0,1 КОЕ на 1 амёбу. В качестве контрольного образца использовали тот же рекомбинантный штамм *Y. pestis* KM2083 в концентрации $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл в отсутствие клеток амёб. Образцы инкубировали при температуре 22 °С и влажности 60 % и высевали через определенные промежутки времени на чашки Петри со средой LB для определения количества КОЕ в образце. Результаты изменения концентраций возбудителя чумы при совместном культивировании с акантамёбами на протяжении 7 месяцев представлены на рис. 1. Для определения диапазона значений, который может содержать среднее значение с уровнем достоверности 95 %, рассчитывали доверительные интервалы для каждого экспериментального измерения.

При совместном культивировании *Y. pestis* с *A. castellanii* установлен значительно более длительный срок сохранения живых клеток возбудителя чумы в экспериментальных образцах по сравнению с контрольным, в котором клетки амёб отсутствовали. В первом образце (концентрация – 1 КОЕ/клетка амёбы) наличие бактерий фиксировали на протяжении 7 месяцев, в образце с более низкой исходной концентрацией клеток *Y. pestis* (0,1 КОЕ/клетка амёбы) присутствие бактерий наблюдали на протяжении всего срока эксперимента (22 месяца), что подтверждается результатами микроскопии (рис. 2),

в то время как в контрольном образце бактериальные клетки обнаруживали в течение 2 месяцев.

О взаимодействии культур амёб и *Y. pestis* в экспериментальных образцах говорят также факты повышения концентрации клеток возбудителя чумы в отсутствие питательных веществ. Через месяц, а затем и через 5 месяцев от начала эксперимента в обоих образцах зафиксировано двух-трехкратное (от 2,3 до 3,75 раза) увеличение концентрации клеток *Y. pestis* по сравнению с предыдущими значениями. Подъемы численности, вероятно, вызваны размножением клеток *Y. pestis* в амёбах с последующим выходом в среду, в то время как падения концентраций могут быть обусловлены поглощением бактериальных клеток амёбами или отмиранием клеток в среде без питательных веществ. Из-за чередования циклов размножения и отмирания клеток динамика изменения концентрации *Y. pestis* носила волнообразный характер. В контрольном образце на 10-е сутки концентрация возбудителя чумы достигла

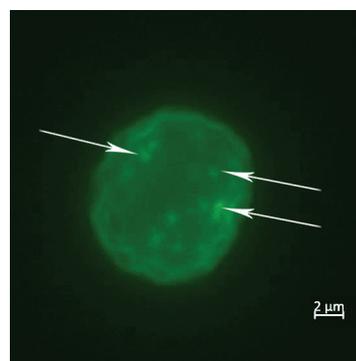


Рис. 2. Клетки штамма *Y. pestis* KM2083 в цисте *A. castellanii* после 22 месяцев сокультурирования (отмечены стрелками). Микроскоп Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия). Длина волны эмиссии – 502 нм, увеличение – 1500x

Fig. 2. *Y. pestis* KM2083 cells in an *A. castellanii* cyst after 22 months of co-culturing (marked with arrows). Microscope Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Germany). Emission wavelength – 502 nm, magnification – 1500x

максимума и затем в течение двух месяцев упала до нуля. Возможной причиной размножения *Y. pestis* в первые сутки были накопленные в клетках питательные вещества.

Также обращает на себя внимание разница динамики изменения концентрации *Y. pestis* в экспериментальных образцах с разными соотношениями клеток амёб и возбудителя чумы в первый месяц эксперимента. У первого образца (1 КОЕ/клетка амёбы) на протяжении первых 12 дней эксперимента динамика численности была аналогичной контрольному образцу, однако вместо падения концентрации (как в контрольном образце) у экспериментального образца рост концентрации продолжился и через месяц от начала эксперимента концентрация клеток возбудителя чумы достигла максимального значения. Второму образцу с меньшей микробной нагрузкой по отношению к амёбам потребовалось больше времени, чтобы увеличить концентрацию. Возможно, благодаря этому клетки *Y. pestis* лучше адаптировались к экспериментальной среде и высевались на протяжении 22 месяцев.

Взаимодействие амёб и возбудителя чумы на плотной питательной среде. По прошествии 24 ч совместного культивирования *Y. pestis* с культурой амёб в солевом буфере АВ 100 мкл образца (0,1 КОЕ/клетка амёбы) наносили на чашку Петри с агаром LB, содержащим ампициллин, в трех повторностях и инкубировали в климатической камере при 22 °С и 60 % влажности воздуха. На 2, 4, 16 и 21-й день чашки Петри с посевами просматривали под микроскопом. Результаты микроскопического исследования представлены на рис. 3. На 2-й день все амёбы находились в активной форме (трофозоиты), большинство из них располагались вблизи микробных колоний, что свидетельствует о положительном таксисе амёбных клеток к *Y. pestis*. При флуоресцентной микроскопии установлено, что трофозоиты

наполнены клетками *Y. pestis*. Наблюдение на 4-й и 16-й день после высева на твердую питательную среду показало, что часть клеток амёб переходит в неактивное состояние (цисты), покрываясь двуслойной оболочкой, внутри трофозоитов также наблюдались скопления фагоцитированных клеток возбудителя чумы. При изучении взаимоотношений возбудителя чумы и амёб инцистирование амёб *H. rhyssodes* [7] происходит уже через 2–3 суток, в то время как образование цист *A. castellanii* происходит на 3–4-е сутки [13], что соотносится с полученными данными. При сравнении фотографий 3 и 7 (рис. 3), выполненных на одном участке агара в видимом спектре света и с применением фильтра для специфической детекции, видно, что флуоресцентные клетки бактерий присутствуют не только в клетках трофозоитов, но и в цистах амёб. На 21-й день наблюдения все клетки акантамёб представлены инцистированными формами, собранными в группы. При микроскопии в зеленом спектре можно наблюдать флуоресценцию оболочек цист. Также зафиксировано образование вторичных колоний возбудителя чумы, что может свидетельствовать о разрушении амёбных клеток и выходе *Y. pestis* на поверхность агара.

Таким образом, при микроскопическом наблюдении за культурами *Y. pestis* и *A. castellanii* на плотной питательной среде выявлены общие закономерности взаимоотношений возбудителя чумы в ассоциации с простейшими в виде положительного таксиса, способствующего эффективному фагоцитозу клеток возбудителя чумы, и временных промежутков инцистирования амёб.

Изучение свойств *Y. pestis* после сокультивирования с амёбами. Признано, что хищничество простейших является ключевой движущей силой эволюции и экологии многих микробных патогенов [6, 20]. Поедание бактерий простейшими оказывает селективное давление, стимулируя вирулентность

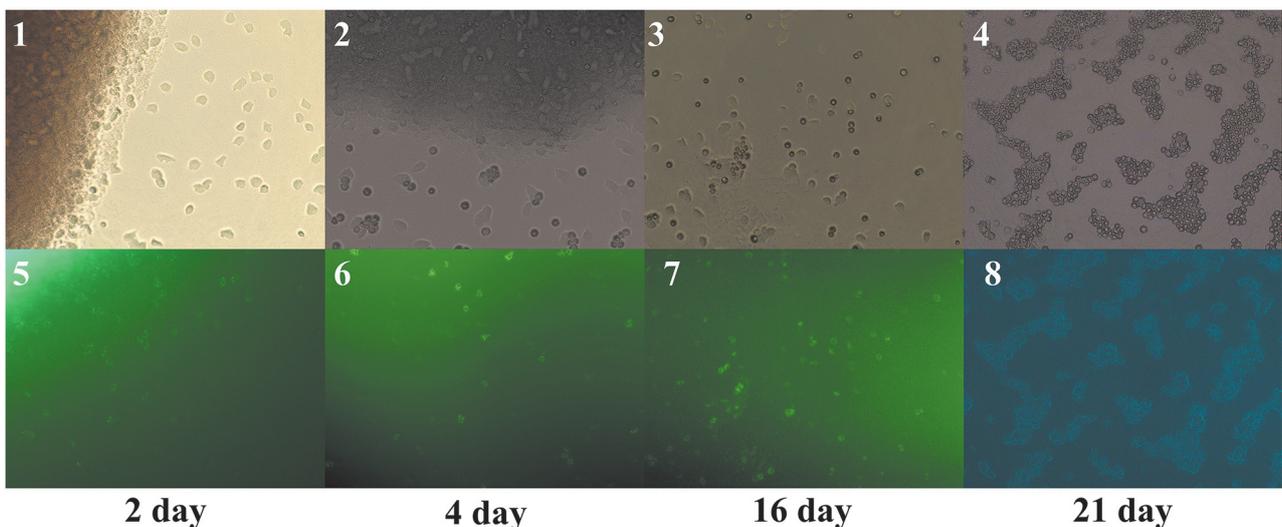


Рис. 3. Изучение взаимодействия клеток амёб и штамма *Y. pestis* KM2083 методами световой (1–4) и флуоресцентной (5–8) микроскопии. Микроскоп Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия). Длина волны эмиссии – 502 нм, увеличение – 100х

Fig. 3. Study of the interaction between amoeba cells and *Y. pestis* strain KM2083 using light (1–4) and fluorescence (5–8) microscopy. Microscope Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Germany). Emission wavelength – 502 nm, magnification – 100x

бактерий и формируя их геномы. Примечательно, что многие патогены становятся более вирулентными после прохождения через простейших [16, 21]. Для изучения длительного влияния амёб *A. castellanii* на клетки возбудителя чумы проведено сравнение свойств флуоресцентного штамма *Y. pestis* KM2083 pTurboGFP-B до и после 22 месяцев совместного культивирования с акантамебами в замкнутой системе в отсутствие в среде питательных веществ, необходимых для роста и размножения возбудителя.

Высеянные на твердую питательную среду LB после сокультивирования с амёбами изолированные колонии имели типичную R-форму с небольшой кружевной зоной по периферии. Бактериальные клетки в мазках имели форму биполярно-окрашенных грам-отрицательных палочек. Способность к продукции флуоресцентного белка сохранилась в 9 % колоний. Появление колоний, состоящих из клеток, утративших рекомбинантную плазмиду или не экспрессирующих флуоресцентный белок, по-видимому, связано с деградацией в среде антибиотика ампициллина, оказывающего селективное давление на рост колоний, содержащих плазмиду pTurboGFP-B. В дальнейших экспериментах проводили сравнение исходного штамма с его производными, как сохранившимися, так и утратившими плазмиду pTurboGFP-B.

При сравнении биохимических свойств исходной, флуоресцентных и утративших это свойство производных культур *Y. pestis* KM2083 отличий не выявлено. Штаммы ферментировали глюкозу, арабинозу, маннозу, орто-нитрофенил-β-галактозидаарабинозу, глицерин, восстанавливали нитраты в нитриты, не разлагали рамнозу, мелибиозу, лактозу, сахарозу, сорбит, инозит, мочевины. При проверке питательных потребностей зависимость роста культур – производных *Y. pestis* KM2083 от аминокислот метионина, фенилаланина и треонина не изменилась.

Сравнение вирулентности исходной и полученных культур штамма *Y. pestis* KM2083 методами *in vitro* позволило выявить зависимость роста от наличия в питательной среде ионов Ca^{2+} при 37 °C и способность сорбировать пигмент из среды, содержащей краситель Конго красный. Это свидетельствует о сохранении у прошедших сокультивирование с амёбами культур *Y. pestis* основных детерминант вирулентности: плазмиды кальций-зависимости и хромосомной *pgm*-области пигментации.

Оценку вирулентности исходного штамма *Y. pestis* KM2083 pTurboGFP-B и его производных после совместного культивирования с амёбами проводили методом *in vivo* – при подкожном заражении беспородных белых мышей. Для заражения использовали исходный штамм *Y. pestis* KM2083 TurboGFP-B и его производные (после сокультивирования), экспрессирующие и не экспрессирующие флуоресцентный белок TurboGFP. В результате установлено, что все варианты вызывали гибель животных в дозах $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл и $1 \cdot 10^4$ КОЕ/мл. При микроскопическом исследовании мазков-отпечатков легких, пече-

ни, селезенки и крови павших животных выявлены клетки возбудителя чумы.

Определение влияния длительного совместного культивирования с амёбами на сохранение родоспецифичной (pCad) и видоспецифичных (pFra, pPst) плазмид в составе генома возбудителя чумы выполнено методом ПЦР со специфичными праймерами к плазидам возбудителя чумы (с использованием тест-системы «Ген *Y. pestis* идентификация – РФФ», регистрационное удостоверение ФСР 2011/12105). Из 111 исследованных колоний из экспериментальных образцов у одной колонии выявлено отсутствие плазмиды pPst (0,9 % от исследованных колоний). Выявленный факт утраты плазмиды может быть связан с жесткими условиями, в которых находился возбудитель чумы в течение эксперимента. Кроме указанных плазмид, в геноме возбудителя чумы филогенетической линии 4.ANT присутствует плазида pTP33, присутствие которой в составе всех исследованных культур подтверждалось методом С.И. Kado *et al.* [22]. В совокупности с низким процентом утраты плазмиды pPst можно сделать вывод, что длительное сокультивирование с акантамебами не влияет на плазмидный состав штамма *Y. pestis*, что может указывать на значение плазмид для сохранения возбудителя чумы в ассоциации с амёбами.

Для выявления влияния эксперимента на генетический аппарат проведено полногеномное секвенирование двух производных штамма *Y. pestis* KM2083 (экспрессирующий и не экспрессирующий флуоресцентный белок) после сокультивирования с амёбами. При сравнении последовательностей с исходным штаммом выявлены 4 общие SNPs для обоих производных, две из которых привели к замене аминокислоты в продуктах генов (таблица). В геноме производного, утратившего свойство флуоресценции, дополнительно выявлено 5 SNP, две из которых являются несинонимичными, в то время как одна из них приводит к формированию стоп-кодона в продукте гена, а две находятся в межгенном пространстве. Следует сказать, что выявленные нуклеотидные замены не влияют на основные свойства *Y. pestis*.

Таким образом, в результате моделирования условий, при которых единственным способом для выживания клеток возбудителя чумы было использование ресурсов амёб, установлено длительное сохранение штамма *Y. pestis* основного подвида античного биовара филогенетической линии 4.ANT в ассоциации с *A. castellanii* до 22 месяцев, что существенно превышает срок выживания чистой культуры в отсутствие акантамеб. Кроме сохранения в цистах простейших для переживания неблагоприятных условий среды, возбудитель чумы может использовать клетки амёб для размножения с последующим высвобождением в окружающую среду, как это произошло на 1-й и 5-й месяцы эксперимента в виде «пиковых» значений концентраций *Y. pestis*. Длительное сохранение возбудителя чумы также может быть связано с адаптацией использованных в эксперименте организмов

Полиморфизм SNPs у производных штамма *Y. pestis* KM2083 pTurboGFP-B после длительного сокультивирования с *A. castellanii*
 SNP polymorphism in derivatives of *Y. pestis* strain KM2083 pTurboGFP-B after long-term co-cultivation with *A. castellanii*

Вариант штамма Strain variant	Координаты SNP* SNP position*	Замена нуклеотида Nucleotide substitution	Ген Gene	Кодируемый продукт Encoded product	Замена аминокислоты Amino acid substitution
1, 2**	2050377	C→A	YPO_RS10010	Белок Р-кольца базального тельца жгутика Flagellar basal body P-ring protein FlgI	Arg→Ser
1, 2	2124310	G→T	YPO_RS10405	Белок, содержащий домен рецептора toll/интерлейкина-1 Toll/interleukin-1 receptor domain-containing protein	Lys→Asn
1, 2	1686038	G→C	<i>tssF</i>	Субъединица базовой пластинки системы секреции VI типа TssF Type VI secretion system baseplate subunit TssF	–
1, 2	2125597	A→G	intergenic	–	–
2	2187586	A→T	YPO_RS10640	Белок, содержащий карбоксипептидазоподобный регуляторный домен Carboxypeptidase-like regulatory domain-containing protein	Tyr→Phe
2	3144064	T→A	YPO_RS15035	Фосфатаза PAP2 / белок семейства фосфатаз двойной специфичности Phosphatase PAP2 / dual specificity phosphatase family protein	Ple→Lys
2	684581	C→A	YPO_RS04100	Пиридоксальфосфат-зависимая аминотрансфераза Pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase	Ser→стоп-кодон Ser→stop-codon
2	1094928-1094929	AT→TA	intergenic	–	–
2	4626509-4626510	AT→TA	intergenic	–	–

Примечание: *позиция указана по референсному геному *Y. pestis* CO92 (ID NCBI GenBank: NC_003143.1); **цифрой 1 отмечен производный *Y. pestis* KM2083, экспрессирующий флуоресцентный белок, цифрой 2 – производный *Y. pestis* KM2083, не экспрессирующий флуоресцентный белок.

Note: *position across the reference genome of *Y. pestis* CO92 (NCBI GenBank ID: NC_003143.1); **number 1 indicates the *Y. pestis* KM2083 derivative expressing the fluorescent protein, number 2 indicates the *Y. pestis* KM2083 derivative not expressing the fluorescent protein.

к сходным ландшафтно-климатическим условиям. Установлено, что длительное сокультивирование не привело к значительному изменению фенотипических, генетических и вирулентных свойств штамма возбудителя чумы. Сохранение патогенности штамма имеет решающее значение для последующего развития эпизоотии в природном очаге чумы. Все это в совокупности подтверждает возможность длительного сохранения *Y. pestis* в ассоциации с акантамебами в течение длительных межэпизоотических периодов и позволяет рассматривать *A. castellanii* в качестве природного резервуара возбудителя чумы. Дальнейшее накопление экспериментальных данных результатов совместного культивирования штаммов возбудителя чумы разных подвидов с различными представителями простейших при отличающихся условиях культивирования (температура, влажность, наличие питательных веществ) будет способствовать систематизации знаний и лучшему пониманию механизмов взаимодействия чумного микроба с членами почвенных биоценозов природных очагов чумы.

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

Список литературы

1. Al-Quadan T., Price C.T., Abu Kwaik Y. Exploitation of evolutionarily conserved amoeba and mammalian processes by *Legionella*. *Trends Microbiol.* 2012; 20(6):299–306. DOI: 10.1016/j.tim.2012.03.005.
2. Cirillo J.D., Falkow S., Tompkins L.S. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion.

Infect. Immun. 1994; 62(8):3254–61. DOI: 10.1128/iai.62.8.3254-3261.1994.

3. Kennedy G.M., Morisaki J.H., DiGiuseppe Champion P.A. Conserved mechanisms of *Mycobacterium marinum* pathogenesis within the environmental amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(6):2049–52. DOI: 10.1128/AEM.06965-11.

4. Abd H., Saeed A., Weintraub A., Nair G.B., Sandström G. *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007; 60(1):33–9. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00254.x.

5. 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(23):7488–500. DOI: 10.1128/AEM.01829-09.

6. Sun S., Noorian P., McDougald D. Dual role of mechanisms involved in resistance to predation by protozoa and virulence to humans. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1017. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01017.

7. Никульшин С.В., Онацкая Т.Г., Луканина Л.М., Бондаренко А.И. Изучение ассоциации почвенных амёб *Hartmannella rhyssodes* с бактериями – возбудителями чумы и псевдотуберкулеза в эксперименте. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 1992; 9-10:2–5.

8. Пушкарева В.И. Экспериментальная оценка взаимодействия *Yersinia pestis* EV с почвенными инфузориями и возможности длительного сохранения бактерий в цистах простейших. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2003; 4:40–4.

9. Бренева Н.В., Марамович А.С., Климов В.Т. Экологические закономерности существования патогенных иерсиний в почвенных экосистемах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2005; 6:82–8.

10. Markman D.W., Antolin M.F., Bowen R.A., Wheat W.H., Woods M., Gonzalez-Juarrero M., Jackson M. *Yersinia pestis* survival and replication in potential amoeba reservoir. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(2):294–302. DOI: 10.3201/eid2402.171065.

11. Кошель Е.И., Ерошенко Г.А., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Широков А.А., Буров А.М., Кузнецов О.С., Кутырев В.В. Оценка длительности сохранения штаммов *Yersinia pestis* в клетках почвенных амёб *Acanthamoeba* sp. в экспериментальных условиях. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2016; 2:69–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-69-74.

12. Benavides-Montaño J.A., Vadyvaloo V. *Yersinia pestis* resists predation by *Acanthamoeba castellanii* and exhibits prolonged intracellular survival. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017; 83(13):e00593-17. DOI: 10.1128/AEM.00593-17.

13. Оглодин Е.Г., Морозов О.А., Никифоров К.А., Куклева Л.М., Шарапова Н.А., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Денисов А.В., Санаров П.П., Токмакова Е.Г., Макашова М.А., Германчук В.Г., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Видовая принадлежность, численность и динамика взаимодействия акантамеб из почв Горно-Алтайского высокогорного очага чумы со штаммами *Yersinia pestis*. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2017; 4:56–61. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-56-61.

14. Работнов Т.А. Об организации биогеоценоза. В кн.: Герасимов И.П., редактор. *Международная география-76 / XXIII Междунар. геогр. конгресс. Секция 4: Биогеография и география почв.* М.: 1976. С. 101–4.

15. 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(1):39–45. DOI: 10.7868/S0016675815010051.

16. Литвин В.Ю., Пушкарева В.И. О вероятном механизме поддержания вирулентности бактерий в почвенных и водных сообществах. В кн.: Литвин В.Ю., редактор. *Патогенные бактерии в сообществах (механизмы и формы существования): сб. науч. тр. М.: Росагросервис; 1994. С. 24–34.*

17. Куклева Л.М., Тучков И.В., Оглодин Е.Г., Девдариани З.Л., Морозов О.А., Кузнецов О.С., Германчук В.Г., Ерошенко Г.А. Получение штамма *Yersinia pestis*, продуцирующего флуоресцентный белок GFP, и перспективы его использования. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 4:61–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-61-66.

18. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. *Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней. Практическое руководство.* М.: Шико; 2013. 560 с.

19. Schroeder J.M., Booton G.C., Hay J., Niszl I.A., Seal D.V., Markus M.B., Fuerst P.A., Byers T.J. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(5):1903–11. DOI: 10.1128/JCM.39.5.1903-1911.2001.

20. Casadevall A., Fu M.S., Guimaraes A.J., Albuquerque P. The ‘amoeboid predator-fungal animal virulence’ hypothesis. *J. Fungi (Basel).* 2019; 5(1):10. DOI: 10.3390/jof5010010.

21. Espinoza-Vergara G., Noorian P., Silva-Valenzuela C.A., Raymond B.B.A., Allen C., Hoque M.M., Sun S., Johnson M.S., Pernice M., Kjelleberg S., Djordjevic S.P., Labbate M., Camilli A., McDougald D. *Vibrio cholerae* residing in food vacuoles expelled by protozoa are more infectious *in vivo*. *Nat. Microbiol.* 2019; 4(12):2466–74. DOI: 10.1038/s41564-019-0563-x.

22. Kado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 1981; 145(3):1365–73. DOI: 10.1128/jb.145.3.1365-1373.1981.

References

1. Al-Quadani T., Price C.T., Abu Kwaik Y. Exploitation of evolutionarily conserved amoeba and mammalian processes by *Legionella*. *Trends Microbiol.* 2012; 20(6):299–306. DOI: 10.1016/j.tim.2012.03.005.

2. Cirillo J.D., Falkow S., Tompkins L.S. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect. Immun.* 1994; 62(8):3254–61. DOI: 10.1128/iai.62.8.3254-3261.1994.

3. Kennedy G.M., Morisaki J.H., DiGiuseppe Champion P.A. Conserved mechanisms of *Mycobacterium marinum* pathogenesis within the environmental amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(6):2049–52. DOI: 10.1128/AEM.06965-11.

4. Abd H., Saeed A., Weintraub A., Nair G.B., Sandström G. *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol Ecol.* 2007; 60(1):33–9. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00254.x.

5. 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(23):7488–500. DOI: 10.1128/AEM.01829-09.

6. Sun S., Noorian P., McDougald D. Dual role of mechanisms involved in resistance to predation by protozoa and virulence to humans. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1017. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01017.

7. Nikul'shin S.V., Onatskaya T.G., Lukanina L.M., Bondarenko A.I. [The study of the association of soil amoebas *Hartmannella rhyssodes* with bacteria – the causative agents of plague and pseudotuberculosis in the experiment]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1992; (9-10):2–5.

8. Pushkareva V.I. [Experimental assessment of the interaction between *Yersinia pestis* EV and soil ciliates and the possibility of long-term preservation of bacteria in protozoan cysts]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2003; (4):40–44.

9. Breneva N.V., Maramovich A.S., Klimov V.T. [Ecological patterns of existence of pathogenic *Yersinia* in soil ecosystems]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2005; (6):82–8.

10. Markman D.W., Antolin M.F., Bowen R.A., Wheat W.H., Woods M., Gonzalez-Juarrero M., Jackson M. *Yersinia pestis* survival and replication in potential amoeba reservoir. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(2):294–302. DOI: 10.3201/eid2402.171065.

11. Koshel' E.I., Eroshenko G.A., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Shirokov A.A., Burov A.M., Kuznetsov O.S., Kutyrev V.V. [Exploratory study of the long-term persistence of *Yersinia pestis* in the cells of soil-inhabiting amoeba – *Acanthamoeba* sp.] *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (2):69–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-69-74.

12. Benavides-Montaño J.A., Vadyvaloo V. *Yersinia pestis* resists predation by *Acanthamoeba castellanii* and exhibits prolonged intracellular survival. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017; 83(13):e00593-17. DOI: 10.1128/AEM.00593-17.

13. Oglodin E.G., Morozov O.A., Nikiforov K.A., Kukleva L.M., Sharapova N.A., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.K., Denisov A.V., Sanarov P.P., Tokmakova E.G., Makashova M.A., Germanchuk V.G., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Specific appearance, numbers, and dynamics of interaction of *Acanthamoeba* from soils of Gorno-Altai high-mountain plague focus with *Yersinia pestis* strains]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (4):56–61. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-56-61.

14. Rabotnov T.A. [Regarding the functioning of biogeocenosis]. In: Gerasimov I.P., editor. [International Geography-76 / XXIII International Geographical Congress. Section 4: Biogeography and Soil Geography]. Moscow; 1976. P. 101–4.

15. Koshel' E.I., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Vidyayeva N.A., Guseva N.P., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [A study on the taxonomy of soil amoebas from Caspian plague foci based on the analysis of ribosomal operon sequences]. *Genetika [Genetics]*. 2015; 51(1):39–45. DOI: 10.7868/S0016675815010051.

16. Litvin V.Yu., Pushkareva V.I. [On a probable mechanism for retaining the virulence by bacteria of soil and water communities]. In: Litvin V.Yu., editor. [Pathogenic Bacteria in Communities (Mechanisms and Forms of Existence): Collection of Scientific Works]. Moscow: “Rosagroservis”; 1994. P. 24–34.

17. Kukleva L.M., Tuchkov I.V., Oglodin E.G., Devdariani Z.L., Morozov O.A., Kuznetsov O.S., Germanchuk V.G., Eroshenko G.A. [Construction of *Yersinia pestis* strain producing fluorescent protein GFP and prospects of its usage]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; (4):61–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-61-66.

18. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. Moscow: Shiko; 2013. 560 p.

19. Schroeder J.M., Booton G.C., Hay J., Niszl I.A., Seal D.V., Markus M.B., Fuerst P.A., Byers T.J. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(5):1903–11. DOI: 10.1128/JCM.39.5.1903-1911.2001.

20. Casadevall A., Fu M.S., Guimaraes A.J., Albuquerque P. The ‘amoeboid predator-fungal animal virulence’ hypothesis. *J. Fungi (Basel).* 2019; 5(1):10. DOI: 10.3390/jof5010010.

21. Espinoza-Vergara G., Noorian P., Silva-Valenzuela C.A., Raymond B.B.A., Allen C., Hoque M.M., Sun S., Johnson M.S., Pernice M., Kjelleberg S., Djordjevic S.P., Labbate M., Camilli A., McDougald D. *Vibrio cholerae* residing in food vacuoles expelled by protozoa are more infectious *in vivo*. *Nat. Microbiol.* 2019; 4(12):2466–74. DOI: 10.1038/s41564-019-0563-x.

22. Kado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 1981; 145(3):1365–73. DOI: 10.1128/jb.145.3.1365-1373.1981.

Authors:

Makashova M.A., Oglodin E.G., Kukleva L.M., Sharapova N.A., Naryshkina E.A., Germanchuk V.G., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Макашова М.А., Оглодин Е.Г., Куклева Л.М., Шарапова Н.А., Нарышкина Е.А., Германчук В.Г., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.