

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-61-66

УДК 616.98:579.842.23

Л.М. Куклева, И.В. Тучков, Е.Г. Оглодин, З.Л. Девдариани, О.А. Морозов, О.С. Кузнецов,  
В.Г. Германчук, Г.А. Ерошенко

## ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММА *YERSINIA PESTIS*, ПРОДУЦИРУЮЩЕГО ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК GFP, И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

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

**Цель работы** – конструирование рекомбинантного штамма *Y. pestis*, продуцирующего флуоресцентный белок GFP, и анализ перспектив его использования для изучения взаимодействия возбудителя с простейшими, а также с макроорганизмом млекопитающих (грызунов). **Материалы и методы.** Для создания штамма, продуцирующего флуоресцентный белок GFP, использовали природный штамм *Yersinia pestis*, выделенный в 2016 г. в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы. Ген флуоресцентного белка был введен в составе коммерческого вектора pTurboGFP-B методом электропорации. Свойства полученного рекомбинантного штамма *Y. pestis* 367 pTurbo-GFP-B исследовали с помощью микробиологических, биологических и молекулярно-генетических методов. **Результаты и обсуждение.** Методом электропорации получен штамм возбудителя чумы, содержащий векторную плазмиду pTurboGFP-B, которая кодирует синтез зеленого флуоресцирующего белка GFP, и имеющий устойчивость к антибиотику ампициллину. Сконструированный штамм *Y. pestis*, продуцирующий зеленый флуоресцентный белок, по своим культурально-морфологическим, биохимическим свойствам, вирулентности и выживаемости в смешанной культуре с акантамебами *Acanthamoeba castellanii* не отличался от исходного. На плотных питательных средах рекомбинантный штамм и его субкультуры, полученные от зараженных животных, формировали колонии желто-зеленого цвета, флуоресцирующие при УФ-облучении. В препаратах, полученных от животных и из со-культур с амебами, наблюдали флуоресцирующие клетки возбудителя чумы. Созданный штамм можно использовать в качестве модельного для изучения в лабораторных условиях взаимоотношений возбудителя чумы с клетками простейших (почвенные амебы, нематоды) и млекопитающих.

**Ключевые слова:** возбудитель чумы, рекомбинантный биофлуоресцентный штамм, плазида pTurboGFP-B.

Корреспондирующий автор: Куклева Любовь Михайловна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: 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; 4:61–66. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-61-66

L.M. Kukleva, I.V. Tuchkov, E.G. Oglochin, Z.L. Devdariani, O.A. Morozov, O.S. Kuznetsov,  
V.G. Germanchuk, G.A. Eroshenko

## Construction of *Yersinia pestis* Strain Producing Fluorescent Protein GFP and Prospects of Its Usage

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

**Abstract. Objective** of the study was to construct the recombinant *Y. pestis* strain producing fluorescent protein GFP and analysis of the prospects of its usage for investigation of interaction of the agent with the protozoa, and also macroorganism of mammals (rodents). **Materials and methods.** To create the strain producing fluorescent protein GFP, we used the natural *Y. pestis* strain isolated in 2016 in Gorno-Altai high-mountain plague focus. Fluorescent protein gen was inserted into commercial vector pTurboGFP-B via electroporation. Properties of the obtained recombinant *Y. pestis* strain 367 pTurboGFP-B were studied using microbiological, biological, and molecular-genetic methods. **Results and conclusions.** The plague agent strain, containing vector plasmid pTurboGFP-B which encodes synthesis of green fluorescent protein GFP, and being resistant to ampicillin was constructed applying electroporation. The designed *Y. pestis* strain, producing green fluorescent protein, does not differ from the stock strain by its cultural-morphological, biochemical properties, virulence and survivability in mixed culture with *Acanthamoeba castellanii*. On solid nutrient media, recombinant strain and its subcultures, obtained from infected animals, formed colonies of greenish-yellow color, becoming fluorescent under UV-light. In preparations from animals and from co-cultures with amoeba, fluorescent cells of plague agent were observed. The constructed strain can be utilized as a model one for investigation of interactions between plague agent and cells of protozoa (soil amoeba, nematodes) and mammals under laboratory conditions.

**Keywords:** plague agent, recombinant bio-fluorescent strain, plasmid pTurboGFP-B.

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

Corresponding author: Lubov M. Kukleva, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Kukleva L.M., Tuchkov I.V., Oglochin 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; 4:61–66. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-61-66

Received 04.03.19. Revised 14.05.19. Accepted 23.05.19.

На территории Российской Федерации и сопредельных государств находится 45 природных очагов чумы, расположенных в различных географических зонах. Естественными носителями чумы в природе являются свыше 200 видов млекопитающих, а переносчиками – более 150 видов блох [1].

По классическим представлениям, чума в природе существует как сложная паразитарная система взаимодействующих популяций возбудителя чумы, теплокровных носителей (грызунов, зайцеобразных, хищников и др.) и членистоногих переносчиков. Основным механизмом природной очаговости чумы считают непрерывное пассирование возбудителя блохами от грызуна к грызуну. Однако к настоящему времени накоплено большое количество фактов, позволяющих предположить, что трансмиссия не является основным механизмом энзоотии чумы [2]. С позиций горизонтальной трансмиссии невозможно объяснить целый ряд особенностей эпизоотического процесса при чуме – наличие длительных межэпизоотических периодов в очагах, «взрывное» начало эпизоотий после многолетних перерывов, возобновление активности очагов после глубоких депрессий численности носителей или смены основных носителей чумы. Очевидно, существует другой, более эффективный способ сохранения *Yersinia pestis* вне теплокровного хозяина, который обеспечивает его длительное сохранение в природном биоценозе очагов чумы [2, 3].

Существенным вкладом в решение проблемы энзоотии чумы стало выявление у возбудителя чумы способности к образованию биопленки – сообщества клеток, окруженных внеклеточным матриксом [4, 5]. Биопленка *Y. pestis* может способствовать длительному сохранению возбудителя во внешней среде [6]. Существует вероятность сохранения возбудителя чумы в членах почвенных биоценозов. На модели возбудителя показано, что выделенные из почвы цистообразующие амёбы способны фагоцитировать клетки *Y. pestis*. В экспериментальных условиях установлена возможность длительного сохранения штаммов основного подвида в ассоциации с почвенными амёбами *Acanthamoeba* sp. и слизевиками *Dictyostelium discoideum* [7, 8].

Недавно сформулирована гипотеза вертикальной трансмиссии, согласно которой в длительном сохранении и последующем выносе возбудителя чумы в популяцию грызунов зараженными личинками блох участвуют члены почвенных биоценозов очагов чумы – простейшие и нематоды [3, 8]. Для подтверждения этой гипотезы необходимы убедительные экспериментальные доказательства, однако при изучении взаимоотношений возбудителя чумы с членами природных биотопов возникают методические трудности, связанные с отсутствием у штаммов *Y. pestis* легко детектируемых маркеров.

В последние годы для облегчения мониторинга и выявления микроорганизмов широко используют методы молекулярной визуализации, главным эле-

ментом которых является применение специальных инертных контрастных макромолекул, которые не нарушают процессов жизнедеятельности клетки и не приводят к фатальным биологическим изменениям [9]. В настоящее время в качестве удобных и эффективных прижизненных маркеров микроорганизмов используют различные флуоресцентные белки.

Впервые зеленый флуоресцирующий белок – GFP (от англ. green fluorescent protein) обнаружен у медузы *Aequorea victoria* [10]. Затем была определена структура белка, клонирован кодирующий его ген и показана экспрессия белка в различных прокариотических и эукариотических организмах [9]. Сейчас известно несколько десятков природных и модифицированных генов, белковые продукты которых дают излучение практически во всех участках видимого спектра, от сине-зеленого до рубиново-красного.

Белок GFP обладает рядом свойств, которые обуславливают его широкое использование в качестве биологического маркера. Он состоит из 232 аминокислот, молекулярная масса – 26 кДа; характеризуется двумя пиками поглощения при длинах волн 395 и 475 нм и пиком флуоресценции при 498 нм. Белок принимает нативную конфигурацию и образует флуорофор без участия каких-либо внешних ферментов и кофакторов, обладает низкой метаболической токсичностью. Флуоресценция, обусловленная GFP, стабильна даже в присутствии денатурирующих агентов в широком диапазоне pH, сигнал продолжителен во времени, отсутствует фоновая флуоресценция [9, 10].

В последние годы флуоресцентный белок GFP в качестве биосенсора успешно применяли на широком круге хозяев для установления внутриклеточной локализации и динамики белков, изучения механизмов экспрессии генов, распространения бактерий в организме животных, иммунных реакций, межбактериального взаимодействия в смешанных культурах [11–13].

Основными методами флуоресцентного маркирования бактерий являются введение гена флуоресцентного белка в составе плазмиды и встраивание маркерного гена в хромосому при помощи транспозона. Использование плазмид для маркирования бактерий имеет целый ряд преимуществ ввиду их многокопийности и интенсивности экспрессии белка. В последнее время для получения флуоресцентно-меченных штаммов часто используют плазмиду pTurboGFP-B. Множественная копия этой плазмиды повышает скорость накопления маркерного белка и интенсивность его флуоресценции. Плазмида pTurboGFP-B содержит ген модифицированного варианта белка GFP, клонированный из веслоногих ракообразных – копеподы *Pontellina plumata* [14]. Белок обладает яркой зеленой флуоресценцией (максимум поглощения/испускания – 482/502 нм), характеризуется высокой скоростью синтеза в широком диапазоне температур, фотостабильностью, не токсичен для клеток, стабильно в них сохраняется.

**Цель** настоящего исследования состояла в конструировании рекомбинантного штамма *Y. pestis*, продуцирующего флуоресцентный белок GFP, и анализе перспектив его использования для изучения взаимодействия возбудителя с простейшими, а также с макроорганизмом млекопитающих (грызунов).

### Материалы и методы

В работе в качестве реципиента использовали штамм *Yersinia pestis* 367, выделенный в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы в 2016 г. Бактерии культивировали на агаре и в бульоне LB при температуре 28 °С в течение 18 ч. В качестве селективного антибиотика для выращивания рекомбинантного штамма использовали ампициллин (50 мг/мл).

Для введения в клетки возбудителя чумы флуоресцентного белка GFP использовали коммерческую плазмиду pTurboGFP-B («Evrogen», Россия). Эта плазида размером 4,1 тпн содержит ген белка GFP, точку начала репликации плазмиды ColE1 и ген  $\beta$ -лактамазы, обеспечивающий устойчивость к ампициллину. Эксперименты проводили в соответствии с санитарными правилами «Безопасность работы с рекомбинантными молекулами ДНК».

Подготовку компетентных клеток и электропорацию выполняли в соответствии с рекомендациями R. Conchas *et al.* [15]. Клетки штамма *Y. pestis* 367 трансформировали в системе Gene Pulser Xcell (Bio-Rad, США) в следующих условиях: напряжение – 3 кВ, фиксированная емкость – 25 мкФ, сопротивление – 200 Ом. Эффективность трансформации определяли, высевая десятикратные разведения взвеси полученного штамма на пластинки агара LB с 50 мкг/мл ампициллина. Просмотр колоний осуществляли визуально.

Зеленое флуоресцентное свечение бактерий выявляли при помощи флуоресцентного микроскопа Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, ФРГ). Для детекции GFP использовали набор светофильтров № 10 (полоса возбуждения BP 450–490, испускания BP 515–565).

Видовые и дифференциально-диагностические признаки рекомбинантного штамма возбудителя чумы *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B определяли в соответствии с рекомендациями, изложенными в практическом руководстве [16]. Плазмидный состав штаммов изучали по методу С. Kado *et al.* [17]. Вирулентность исходного и рекомбинантного штамма определяли в тестах *in vitro* и *in vivo*. Вирулентность *in vitro* оценивали по признакам наличия зависимости от ионов кальция при 37 °С и сорбции красителей. Вирулентность *in vivo* определяли на беспородных белых мышах (18–20 г). Биомодели содержали в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях. Животных заражали подкожно испытуемыми штаммами в дозах  $1 \cdot 10^3$  и  $1 \cdot 10^4$  КОЕ/мл. Павших мышей вскрывали, делали мазки и посеы отпечат-

ков органов на плотные среды. Мазки-отпечатки от павших животных просматривали в микроскопе Axio Imager Z2 (Carl Zeiss) с объективом Plan Apjromat 150/1,35 DIC Glic Korr VIS-IR при увеличении  $\times 1500$ . Фотографии получали с помощью камеры Axio503 Color (Carl Zeiss).

Взаимодействие с простейшими изучали на модели амёб *Acanthamoeba castellanii*, выделенных из почв Горно-Алтайского высокогорного очага чумы в 2016 г. по ранее использованному методу [7]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартных методов и программ [18].

### Результаты и обсуждение

Для конструирования штамма возбудителя чумы, продуцирующего зеленый флуоресцентный белок GFP, в качестве реципиента использовали природный штамм *Y. pestis* 367, выделенный в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы от сурка (*Marmota baibacina*) в 2016 г. Штамм относится к основному подвиду, античному биовару, филогенетической линии 4.ANT, которая циркулирует в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы. Для штаммов линии 4.ANT характерно наличие дополнительной плазмиды pTP33 размером 33,8 тпн [19]. Методом электропорации сконструирован рекомбинантный штамм, получивший обозначение *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B. Эффективность трансформации составила  $2 \cdot 10^8$  трансформантов/мкг ДНК. Клетки *Y. pestis*, несущие ген зеленого флуоресцентного белка, после процедуры трансформации выявляли по наличию зеленого флуоресцентного свечения бактерий.

Проведено сравнение культурально-морфологических и биохимических свойств исходного и рекомбинантного штаммов *Y. pestis*. Установлено, что рекомбинантный штамм *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B обладал типичными для возбудителя чумы морфологией клеток, агглютинативным ростом в жидких питательных средах. На плотных питательных средах рекомбинантный штамм *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B формировал колонии желто-зеленого цвета, хотя структура колоний обоих штаммов не отличалась. Оба штамма характеризовались чувствительностью к диагностическим бактериофагам – псевдотуберкулезному, чумному Покровской и Л413 «С».

На основании проведенного изучения биохимических признаков установлено, что рекомбинантный штамм *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B по своим признакам не отличался от исходного. Оба штамма ферментировали глицерин, арабинозу, глюкозу, обладали денитрифицирующей активностью, не разлагали рамнозу и мелибиозу. По комплексу признаков, полученный штамм, как и исходный, относится к античному биовару основного подвида *Y. pestis*. Таким образом, введение в реципиентный штамм векторной плазмиды pTurboGFP-B не привело к изменению его свойств.



Для подтверждения присутствия векторной плазмиды в штамме *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B определяли плазмидный состав исходного и рекомбинантного штаммов (рис. 1).

Представленные на рис. 1 данные свидетельствуют о наличии у штаммов *Y. pestis* 367 и *Y. pestis* 367 pTurbo GFP-B трех резидентных плазмид возбудителя чумы – pFra (96,2 тпн), pCad (70,3 тпн) и pPst (9,6 тпн). Кроме того, в обоих штаммах выявлена плаزمида pTP33 (33,8 тпн), наличие которой характерно для штаммов возбудителя чумы линии 4.ANT [1]. В рекомбинантном штамме присутствует также векторная плазмиды pTurboGFP-B (4,1 kb).

Вирулентность рекомбинантного штамма *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B *in vitro* определяли по наличию зависимости роста от присутствия в среде ионов кальция при 37 °С и способности к пигментсорбции [16]. Установлено наличие признака зависимости роста от ионов  $Ca^{2+}$  в условиях 37 °С у обоих изученных штаммов. Популяции обоих штаммов на 95 % состояли из  $Ca^{2+}$ -зависимых клеток. Способность к сорбции пигмента на среде LB, содержащей краситель Конго красный, выявлена как у исходного, так и у рекомбинантного штаммов возбудителя чумы. Клетки, сорбирующие краситель, составляли 90–95 % от общего количества клеток в популяции. Таким образом, введение рекомбинантной плазмиды в штамм *Y. pestis* 367 не изменило признаки, ассоциируемые с вирулентностью этого возбудителя.

Для оценки вирулентности рекомбинантного штамма *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B *in vivo* проведено подкожное заражение белых мышей исходным и рекомбинантным штаммами в дозах  $1 \cdot 10^3$  и  $1 \cdot 10^4$  КОЕ/мл. В результате установлено, что оба

штамма вызывали гибель животных в использованных дозах. Средний срок жизни зараженных животных составил  $(5,3 \pm 0,47)$  сут (для исходного штамма) и  $(5,5 \pm 0,50)$  сут (для рекомбинантного штамма). Выявленные различия статистически недостоверны (критерий достоверности разницы –  $t_d < 12,7$ ). У павших животных выявлена типичная патологоанатомическая картина чумы. Флуоресцирующие клетки штамма *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B высевали из всех органов (регионарные лимфоузлы, печень, селезенка) и крови. Наибольшую обсемененность наблюдали в печени и селезенке (рис. 2, А, Б). В мазках-отпечатках органов погибших животных обнаружены бактериальные клетки, обладающие зеленой флуоресценцией. Клетки рекомбинантного штамма четко визуализировались в отпечатках ввиду отсутствия фонового свечения.

Изучена возможность использования сконструированного штамма *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B в исследованиях по изучению экологии возбудителя чумы, в частности в изучении взаимодействия с простейшими из почвенных биоценозов природных очагов. Для совместного культивирования использовали аксенические культуры акантамб *A. castellanii*, выделенные на эпизоотических участках Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. Таким образом, проведено моделирование выживаемости штамма *Y. pestis* в простейших, к которым был адаптирован исходный штамм 367, поскольку этот штамм и амёбы выделены в одних и тех же участках Горно-Алтайского высокогорного очага чумы.

В результате установлено, что рекомбинантный штамм сохраняется в клетках амёб при температуре 26 °С и влажности 20 % в течение всего срока эксперимента (21 день). При этом клетки рекомбинантного штамма четко визуализировались в люминесцентном микроскопе Axio Imager Z2 (Carl Zeiss) в виде биполяров, типичной формы возбудителя чумы (рис. 2, В).

Таким образом, с помощью метода электропорации нами сконструирован рекомбинантный биофлуоресцентный штамм *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B с векторной плазмидой pTurboGFP-B, детерминирующей синтез зеленого флуоресцирующего белка GFP. Эффективность трансформации была высокой и составила  $2 \cdot 10^8$  трансформантов/мкг ДНК векторной плазмиды. Введение реципиентной плазмиды не приводило к изменению видовых и биохимических признаков исходного штамма, его вирулентности, выживаемости в смешанной культуре с акантамбами *A. castellanii*. Клетки рекомбинантного штамма на плотной среде формировали колонии с зеленой флуоресценцией, которую можно наблюдать невооруженным глазом при естественном освещении. В препаратах (мазки-отпечатки органов животных, павших от заражения рекомбинантным штаммом, а также мазки со-культур с амёбами) с использованием люминесцентного микроскопа Axio Imager Z2 четко визуализировались флуоресцирующие би-

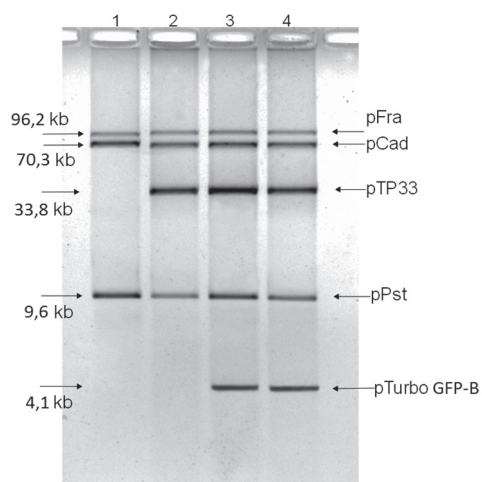


Рис. 1. Плазмидный состав исходного *Y. pestis* 367 и рекомбинантного *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B штаммов:

Штаммы *Y. pestis*: 1 – EV NIIIEG; 2 – 367; 3 – 367 pTurboGFP-B; 4 – 367 pTurbo GFP-B (получен от зараженных животных)

Fig. 1. Plasmid composition of the stock *Y. pestis* 367 and recombinant *Y. pestis* 367 pTurboGFP-B strains:

*Y. pestis* strains: 1 – EV NIIIEG; 2 – 367; 3 – 367 pTurboGFP-B; 4 – 367 pTurbo GFP-B (obtained from infected animals)

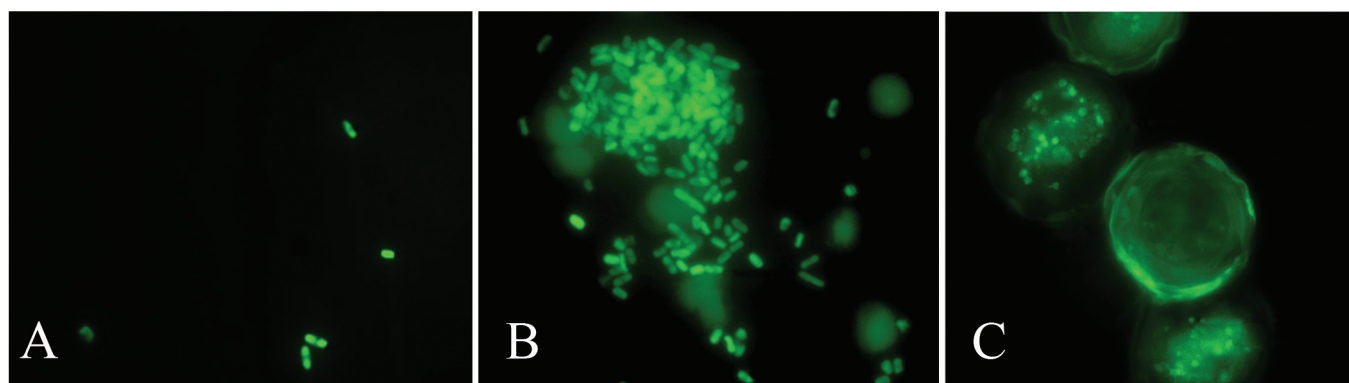


Рис. 2. Выявление флуоресценции клеток штамма *Y. pestis* pTurbo GFP-B в экспериментах по заражению белых мышей и совместному культивированию с амёбами *A. castellanii*:

*A* – в мазках крови белых мышей, павших от чумы; *B* – в мазках-отпечатках селезенки; *C* – в мазках со-культур с амёбами *A. castellanii*. Микроскоп флуоресцентный Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, ФРГ). Эмиссия при длине волны 502 нм. Увеличение  $\times 1500$

Fig. 2. Detection of fluorescent cells of *Y. pestis* pTurbo GFP-B strain in experiments on infection of white mice and co-culture with amoeba *A. castellanii*:

*A* – in blood smears of white mice that died of plague; *B* – in spleen tissue/touch-smears; *C* – in smears of co-cultures with amoeba *A. castellanii*. Fluorescent microscope Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Federal Republic of Germany). Emission at wave-length of 502 nm. Magnification –  $\times 1500$

поляры, типичной для возбудителя чумы формы. Преимуществом использования штаммов *Y. pestis* с плазмидой pTurboGFP-B является кодируемая плазмидой устойчивость к антибиотику ампициллину, что облегчает селекцию клеток этого штамма из смешанных культур или при высеве из органов павших животных.

Изучение флуоресцирующих белков – их клонирование, определение структуры и возможности экспрессии кодирующих их генов в различных про- и эукариотических организмах – обеспечило исследователей надежными прижизненными маркерами для изучения живых клеток. Благодаря использованию флуоресцирующих белков стало возможным визуализировать процессы, происходящие при развитии инфекционного процесса в макроорганизме, оценивать выживаемость и конкурентноспособность бактерий во внешней среде. Широкое применение нашло использование зеленого флуоресцентного белка GFP.

Однако использованию зеленого флуоресцентного белка для изучения патогенных иерсиний посвящены единичные работы. Так, E. Gensberger *et al.* [12] получили штаммы *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, меченные белком GFP, и отметили отсутствие влияния этого белка на ростовые характеристики использованных штаммов. Проведено изучение вирулентности штаммов *Y. pestis* со встроенным в хромосому геном белка GFP [13]. Показано преимущество использования маркированных GFP штаммов при скрининге бактерий внутри макрофагов [11, 13], продемонстрирован новый подход к характеристике детерминант вирулентности возбудителя чумы. Авторы количественно оценивали синтез факторов вирулентности возбудителя чумы, используя плазмиду, в которой экспрессия GFP, находилась под контролем промоторов YOP белков, входящих в систему секреции 3 типа [11]. Однако нами впервые

получен штамм *Y. pestis*, продуцирующий зеленый флуоресцентный белок GFP, на основе природного штамма, выделенного в Горно-Алтайском природном очаге в современный период. Проведены изучение распространения этого штамма в организме лабораторных животных. Показаны преимущества использования флуоресцентного штамма для изучения взаимодействия *Y. pestis* с массовыми членами почвенных биоценозов (простейшие, слизевик). Этот штамм найдет применение для изучения в лабораторных условиях механизмов персистенции возбудителя чумы в природных биоценозах очагов чумы, а также для исследования особенностей патогенеза этой инфекции.

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

# Список литературы

- Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 191 с.
- Солдаткин И.С., Руденчик Ю.В., Ефимов С.В. Эпизоотический процесс в природных очагах чумы (обзор данных и ревизия концепции). В кн.: Эйгелис Ю.К., редактор. Вопросы паразитологии и неспецифической профилактики зоонозов. Саратов; 1988. С. 83–134.
- 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. *Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье*. 2006; 5:88–92.
- Darby C. Uniquely insidious: *Yersinia pestis* biofilms. *Trends Microbiol.* 2008; 16(4):158–64. DOI: 10.1016/j.tim.2008.01.005.
- Hinnebusch B., Erickson D. *Yersinia pestis* biofilm in the flea vector and its role in the transmission of plague. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008; 322:229–48. DOI: 10.1007/978-3-540-75418-3\_11.
- Hall-Stoodley L., Costerton J., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2(2):95–108. DOI: 10.1038/nrmicro821.
- 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.

8. Никульшин С. В., Онацкая Т. Г., Луканина Л. М. Изучение ассоциации почвенных амёб *Hartmannella rhysodes* с бактериями – возбудителями чумы и псевдотуберкулеза в эксперименте. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1992; 69(9–10):2–4.

9. Zhang X., Cui Z., Wang D. Sensing of biomolecular interactions using fluorescence complementing systems in living cells. *Biosens. Bioelectron.* 2016; 76:243–50. DOI: 10.1016/j.bios.2015.07.069.

10. Sarcar P., Chattopadhyay A. GFP fluorescence: A few lesser-known nuggets that make it work. *J. Biosci.* 2018; 43(3):421–30. DOI: 10.1007/s12038-018-9779-9.

11. Forde C., Rocco J., Fitch J., McCutchen-Maloney S. Real-time characterization of virulence factor expression in *Yersinia pestis* using a GFP reporter system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 324(2):795–800. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.08.236.

12. Gensberger E., Kostić T. Green fluorescent protein labeling of food pathogens *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Microbiol. Meth.* 2017; 132:21–6. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.11.008.

13. Su S., Bangar H., Saldanha R., Pemberton A., Aronow B., Dean G., Lamkin T., Hassett D.J. Construction and characterization of stable, constitutively expressed, chromosomal green and red fluorescent transcriptional fusions in the select agents, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *MicrobiologyOpen*. 2014; 3(5):610–29. DOI: 10.1002/mbo3.192.

14. Shagin D.A., Barsova E.V., Yanushevich Y.G., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Labas Y.A., Semenova T.N., Ugalde J.A., Meyers A., Nunez J.M., Widder E.A., Lukyanov S.A., Matz M.V. GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity. *Mol. Biol. Evol.* 2004; 21(5):841–50. DOI: 10.1093/molbev/msh079.

15. Conchas R.F., Carniel E. A highly efficient electroporation system for transformation of *Yersinia*. *Gene*. 1990; 87(1):133–7. DOI: 10.1016/0378-1119(90)90505-L.

16. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.

17. Kado C., Liu S.-T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 1981; 145(3):1365–73. PMID: 7009583. PMCID: PMC217141.

18. Плохинский Н.А. Биометрия. М.: Изд-во МГУ; 1970. 367 с.

19. Балахонов С.В., Афанасьев М.В., Шестопалов М.Ю., Остях А.С., Витязева С.А., Корзун В.М., Вержущий Д.Б., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В., Ивченко Н.И., Рождественский Е.Н., Висков Е.Н., Фомина Л.А. Первый случай выделения *Yersinia pestis* subsp. *pestis* в Алтайском горном природном очаге чумы. Сообщение I. Микробиологическая характеристика, молекулярно-генетическая и масс-спектрометрическая идентификация изолята. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 1:60–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-60-65.

## References

1. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Natural Plague Foci in the Territory of Caucasus, Caspian-Sea Region, Central Asia and Siberia]. Moscow: “Meditsina”; 2005. 192 p.

2. Soldatkin I.S., Rudenchik Yu.V., Efimov S.V. [Epizootic process in the natural foci of plague (the review of data and audit of the concept)]. In: [Issues of Parasitology and Non-Specific Prevention of zoonoses]. Saratov; 1988. P. 83–134.

3. 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]. *Entomologicheskies i Parazitologicheskies Issledovaniya v Povolzhie* [Entomological and Parasitological Studies in Volga River Basin]. 2006; 5:88–92.

4. Darby C. Uniquely insidious: *Yersinia pestis* biofilms. *Trends Microbiol.* 2008; 16(4):158–64. DOI: 10.1016/j.tim.2008.01.005.

5. Hinnebusch B., Erickson D. *Yersinia pestis* biofilm in the flea vector and its role in the transmission of plague. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008; 322:229–48. DOI: 10.1007/978-3-540-75418-3\_11.

6. Hall-Stoodley L., Costerton J., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2(2):95–108. DOI: 10.1038/nrmicro821.

7. Koshel’ E.I., Eroshenko G.A., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Shirokov A.A., Burov A.M., Kuznetsov O.S., Kuttyrev 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.

8. Nikul’shin S.V., Onatskaya T.G., Lukanina L.M. [Associations of the soil amoeba *Hartmannella rhysodes* with the bacterial causative agents of plague and pseudotuberculosis in an experiment]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology]. 1992; 9–10:2–5.

9. Zhang X., Cui Z., Wang D. Sensing of biomolecular interactions using fluorescence complementing systems in living cells. *Biosens. Bioelectron.* 2016; 76:243–50. DOI: 10.1016/j.bios.2015.07.069.

10. Sarcar P., Chattopadhyay A. GFP fluorescence: A few lesser-known nuggets that make it work. *J. Biosci.* 2018; 43(3):421–30. DOI: 10.1007/s12038-018-9779-9.

11. Forde C., Rocco J., Fitch J., McCutchen-Maloney S. Real-time characterization of virulence factor expression in *Yersinia pestis* using a GFP reporter system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 324(2):795–800. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.08.236.

12. Gensberger E., Kostić T. Green fluorescent protein labeling of food pathogens *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Microbiol. Meth.* 2017; 132:21–6. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.11.008.

13. Su S., Bangar H., Saldanha R., Pemberton A., Aronow B., Dean G., Lamkin T., Hassett D.J. Construction and characterization of stable, constitutively expressed, chromosomal green and red fluorescent transcriptional fusions in the select agents, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *MicrobiologyOpen*. 2014; 3(5):610–29. DOI: 10.1002/mbo3.192.

14. Shagin D.A., Barsova E.V., Yanushevich Y.G., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Labas Y.A., Semenova T.N., Ugalde J.A., Meyers A., Nunez J.M., Widder E.A., Lukyanov S.A., Matz M.V. GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity. *Mol. Biol. Evol.* 2004; 21(5):841–50. DOI: 10.1093/molbev/msh079.

15. Conchas R.F., Carniel E. A highly efficient electroporation system for transformation of *Yersinia*. *Gene*. 1990; 87(1):133–7. DOI: 10.1016/0378-1119(90)90505-L.

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

17. Kado C., Liu S.-T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 1981; 145(3):1365–73. PMID: 7009583. PMCID: PMC217141.

18. Plokhinsky N.A. Biometrics. Moscow: MSU Publishing House; 1970. 367 p.

19. Balakhonov S.V., Afanas’ev M.V., Shestopalov M.Yu., Ostyak A.S., Vitayeva S.A., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Ivchenko N.I., Rozhdestvensky E.N., Viskov E.N., Fomina L.A. [The first case of *Yersinia pestis* subsp. *pestis* isolation in the territory of Altai mountain natural plague focus. Communication 1. Microbiological characteristics, molecular-genetic and mass-spectrometric identification of the isolate]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2013; 1:60–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-60-65.

## Authors:

Kukleva L.M., Tuchkov I.V., Oglozin E.G., Devdariani Z.L., Morozov O.A., Kuznetsov O.S., Germanchuk V.G., Eroshenko G.A. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

## Об авторах:

Куклева Л.М., Тучков И.В., Оглозин Е.Г., Девдариани З.Л., Морозов О.А., Кузнецов О.С., Германчук В.Г., Ерошенко Г.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Поступила 04.03.19.

Отправлена на доработку 14.05.19.

Принята к публ. 23.05.19.