

Е.Г.Оглодин¹, О.А.Морозов¹, К.А.Никифоров¹, Л.М.Куклева¹, Н.А.Шарапова¹, Е.Н.Рождественский²,
Г.Х.Базарова², А.В.Денисов², П.П.Санаров², Е.Г.Токмакова³, М.А.Макашова¹, В.Г.Германчук¹,
Г.А.Ерошенко¹, В.В.Кутырев¹

ВИДОВАЯ ПРИНАДЛЕЖНОСТЬ, ЧИСЛЕННОСТЬ И ДИНАМИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АКАНТАМЕБ ИЗ ПОЧВ ГОРНО-АЛТАЙСКОГО ВЫСОКОГОРНОГО ОЧАГА ЧУМЫ СО ШТАММАМИ *YERSINIA PESTIS*

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов; ²ФКУЗ «Алтайская противочумная станция», Горно-Алтайск; ³ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация

Цель исследования. Анализ видовой принадлежности, численности и динамики взаимодействия акантамеб из почв Горно-Алтайского высокогорного очага чумы со штаммом *Yersinia pestis* 367, выделенным на энзоотической территории этого очага в 2016 г. **Материалы и методы.** В работе использованы почвенные амебы из Горно-Алтайского высокогорного очага и штамм *Y. pestis* 367 основного подвида античного биовара, выделенный в этом очаге в 2016 г. Определение систематической принадлежности выделенных амеб проводили с помощью ПЦР с родоспецифическими праймерами и секвенирования полученных ПЦР-фрагментов с дальнейшей идентификацией нуклеотидных последовательностей по базе данных GenBank. Определение локализации клеток *Y. pestis* в акантамебах проводили с помощью метода флуоресцирующих антител с использованием микроскопа Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия). **Результаты и выводы.** Впервые установлено присутствие акантамеб *Acanthamoeba castellanii* в почве нор серого сурка *Marmota altaica* в количестве до 300000 кл./г почвы в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы. Исследована динамика взаимодействия этих микроорганизмов и установлено сохранение возбудителя в вакуолях эндоплазматического ретикулаума акантамеб в течение 14 дней. Это предполагает возможность персистенции *Y. pestis* в амебах рода *Acanthamoeba* в почвенном биоценозе Горно-Алтайского высокогорного очага чумы.

Ключевые слова: возбудитель чумы, акантамебы, природные очаги чумы, механизмы персистенции, *Acanthamoeba*, *Yersinia pestis*.

Корреспондирующий автор: Оглодин Евгений Геннадьевич, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

E.G.Oglodin¹, O.A.Morozov¹, K.A.Nikiforov¹, L.M.Kukleva¹, N.A.Sharapova¹, E.N.Rozhdestvensky¹, G.Kh. Bazarova², A.V.Denisov², P.P.Sanarov², E.G.Tokmakova³, M.A.Makashova¹, V.G.Germanchuk¹, G.A.Eroshenko¹, V.V.Kutyrev¹

Specific Appurtenance, Numbers, and Dynamics of Interaction of *Acanthamoeba* from Soils of Gorno-Altai High-Mountain Plague Focus with *Yersinia pestis* Strains

¹Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; ²Altai Plague Control Station, Gorno-Altai, Russian Federation; ³Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation

Objective of the study is to analyze the appurtenance, numbers, and dynamics of interaction of acanthamoeba from soils of Gorno-Altai plague focus with *Yersinia pestis* 367 strain, isolated in 2016 in enzootic territory of this focus. **Materials and methods.** Utilized were soil amoeba from Gorno-Altai high-mountain focus and the strain *Y. pestis* 367 of the main subspecies of antique biovar, isolated there in 2016. Determination of systematic relation of the isolated amoeba was carried out using PCR with genus specific primers and sequencing of the obtained PCR fragments followed by identification of nucleotide sequences against GenBank database. Localization of *Y. pestis* cells in acanthamoeba was performed using fluorescent antibody technique by means of Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Germany). **Results and conclusions.** For the first time ever established has been the presence of *Acanthamoeba castellanii* in soils of burrows of *Marmota altaica* in the numbers of up to 300000 cells/gr in Gorno-Altai high-mountain focus. Investigated has been the dynamics of interaction of these microorganisms. Preservation of the agent in vacuoles of endoplasmatic reticulum within 14 days has been revealed. It is an indicative of the possibility of *Y. pestis* persistence in amoeba of *Acanthamoeba* subspecies in soil biocenosis of Gorno-Altai high-mountain plague focus.

Key words: plague agent, acanthamoeba, natural plague foci, mechanisms of persistence, *Acanthamoeba*, *Yersinia pestis*.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Evgeniy G. Oglodin, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Oglodin E.G., Morozov O.A., Nikiforov K.A., Kukleva L.M., Sharapova N.A., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Denisov A.V., Sanarov P.P., Tokmakova E.G., Makashova M.A., Germanchuk V.G., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Specific Appurtenance, 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. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-56-61

Чума – зоонозная особо опасная природно-очаговая болезнь, циркулирующая в природе на грызунах и их блохах. Этиологическим агентом чумы

является бактерия *Yersinia pestis*, которая вызывает эпизоотии чумы грызунов, приводящие к их массовой гибели. Эпизоотические периоды во многих

природных очагах чумы чередуются с межэпизоотическими периодами, в течение которых возбудитель чумы сохраняется до сих пор в не выявленном природном резервуаре. В последнее время появляется все больше данных о сохранении возбудителей опасных инфекций в почвенных амебах и других многочисленных членах почвенных и водных биоценозов. В том числе показано, что в амебах в течение длительного времени могут сохраняться такие опасные патогены, как *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium leprae* и другие [8, 9]. Для объяснения сохранения возбудителя чумы в межэпизоотический период недавно была разработана гипотеза «вертикальной трансмиссии», предполагающая сохранение возбудителя чумы в членах почвенных биоценозов в этот период и вынос возбудителя в популяцию грызунов с помощью зараженных личинок блох с последующим развитием эпизоотического процесса [4, 7]. Ранее также высказано предположение о том, что Protozoa могут играть решающую роль в эпизоотологии возбудителя чумы ввиду возможности сохранения возбудителя в вегетативных формах и цистах амеб в течение достаточно продолжительного времени. Предположено, что симбиотические простейшие пищеварительного тракта грызунов и зайцеобразных могут быть резервуарами возбудителя чумы, что обеспечивает постоянство эпизоотического процесса [1].

Ранее нами был проведен анализ видового состава и численности простейших из почв природных очагов чумы Прикаспия, исследовано их взаимодействие со штаммами *Y. pestis*. Из почв Прикаспийского Северо-Западного степного, Прикаспийского песчаного и Волго-Уральского степного очагов в России выделены амебы родов *Willertia*, *Hartmannella*, представители миксомицет, однако доминирующими по численности оказались амебы рода *Acanthamoeba* – *A. castellanii* и *Acanthamoeba* spp. Их численность была высокой и составляла от 30 до 300 тыс. клеток на 1 г почвы. Показана возможность сохранения штаммов *Y. pestis* в клетках акантамеб при 26 °C и влажности 20 % (моделирование засушливых периодов в природных очагах чумы) в течение 2–4 месяцев. Полученные данные могут свидетельствовать о возможном участии амеб *Acanthamoeba* spp. в сохранении *Y. pestis* в почвенных биоценозах природных очагов чумы.

В данной работе нами впервые проведен анализ видовой принадлежности, численности и динамики взаимодействия акантамеб из почв Горно-Алтайского высокогорного очага чумы со штаммом *Yersinia pestis* 367, выделенным на энзоотичной территории этого очага в 2016 г.

Материалы и методы

Выделение амеб, определение их численности. Для выделения амеб использовали плотную среду SM/10 (глюкоза – 1 г, Bacto-pepton – 1 г, дрожжевой экстракт – 1 г, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2 г, KH_2PO_4 – 1,9 г,

K_2HPO_4 – 1 г, Bacto-agar – 20 г, вода – до 1000 мл), на которой проводили совместное культивирование вытяжек почвы с суспензией штамма *Escherichia coli* OP50 при 28 °C в течение 6 сут. Для получения аксенической культуры амеб собранный с чашек материал в количестве 200–400 м.к. обрабатывали 1 мл раствора антибиотиков гентамицина, стрептомицина и ампициллина в концентрации 20 ед./мл каждого в течение 24 ч. Затем культуру отмывали в избытке фосфатного буфера (pH 6,4), центрифугировали при 4000 об./мин и ресуспендировали в 1 мл этого же буфера. Выделенные очищенные культуры амеб хранили при температуре 4 °C. Количество амеб в пробах почвы определяли по методу Singh с нашими модификациями [3]. Количество клеток амеб определяли методом подсчета клеток в камере Горяева.

Культивирование штаммов *Y. pestis*. Используемый в работе штамм *Y. pestis* 367 выделен в Горно-Алтайском высокогорном очаге в 2016 г. и получен нами из ГКПБ РосНИПЧИ «Микроб». Штамм выращивали на жидкой и твердой LB средах (pH 7,2). Анализ культурально-морфологических и биохимических характеристик штамма выполняли стандартными методами [6].

Микроскопия образцов. Визуализацию клеток *Y. pestis* в образцах проводили с помощью метода флуоресцирующих антител (МФА). Для специфического окрашивания использовали «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие чумные адсорбированные лошадиные» (производство РосНИПЧИ «Микроб», включающие иммуноглобулиновую фракцию чумной агглютинирующей лошадиной сыворотки, меченной флуоресцеин-5-изотиоционатом (ФИТЦ)). Препараты для окрашивания обрабатывали последовательно 2 % Triton X-100, 1 % Tween 20 (Sigma, США) в течение 30 мин. Для контрастирования и снижения уровня неспецифического свечения дополнительно использовали альбумин бычий (Sigma, США). Просмотр образцов проводили с использованием люминесцентного микроскопа Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия).

Определение систематической принадлежности амеб. Для получения ДНК амеб использовали набор «ДНК-Сорб» (ИнтерЛабСервис, Москва). Родовую принадлежность амеб устанавливали по результатам ПЦР со специфическими праймерами на участок рибосомного оперона – гена 18S рРНК [2]. О присутствии в образце ДНК амеб рода *Acanthamoeba* судили по образованию в ПЦР с праймерами JDP1/JDP2 фрагмента размером 450 п.н. Для видовой идентификации полученные в ПЦР фрагменты ДНК амеб секвенировали на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500xL. Анализ полученных последовательностей выполняли при помощи программы MEGA 6.0 и алгоритма BLAST на основе базы нуклеотидных последовательностей простейших из базы данных NCBI GenBank. Образец ДНК амеб считали идентифицированным по видовой принадлежности при проценте гомологии нуклеотидной последовательности выше 99 при условии совпаде-

ния длины сравниваемых последовательностей более чем на 95.

Результаты и обсуждение

В последние годы в Горно-Алтайском высокогорном очаге постоянно регистрируется эпизоотическая активность, а в 2014–2017 гг. здесь впервые произошло три случая заражения чумой человека после 35 лет отсутствия регистрации чумы на территории Российской Федерации [5]. В 2012–2017 гг. в этом очаге впервые обнаружена циркуляция высоковирулентных штаммов *Y. pestis* основного подвида. Почвенные амёбы из нор грызунов из Горно-Алтайского высокогорного очага и штамм *Y. pestis* 367, выделенный здесь в 2016 г., использованы нами для изучения динамики взаимодействия возбудителя чумы и простейших из почвенных биоценозов Горного Алтая. Места забора проб почвы и выделения использованного в работе штамма *Y. pestis* указаны на рис. 1. Образцы почв брали из постоянных и временных нор серого сурка *Marmota altaica* на глубине от 10 до 120 см. При анализе взятого образца почвы в Мухор-Тархатинском районе установлено, что в образце содержались цистообразующие амёбы, которые были отобраны для проведения экспериментов.

Определения численности и систематической принадлежности амёб из образца почвы из Горно-Алтайского высокогорного очага. При анализе численности цистообразующих амёб по методу Singh с модификациями [2] установлено, что численность амёб в 1 г почвы составляет 300000 кл./г почвы. Амёбы получали в чистой аксенической культуре и выделяли из них ДНК с помощью набора «ДНК-Сорб» (ИнтерЛабСервис, Москва). Родовую принадлежность выделенных амёб определяли по результатам ПЦР со специфическими праймерами JDP1/JDP2 на участок гена 18S рРНК рибосомного оперона [10, 11]. В ПЦР в исследуемом образце образовывался фрагмент размером 450 п.н., специфичный для амёб

рода *Acanthamoeba*, что свидетельствовало о принадлежности выделенных амёб к этому роду. Для подтверждения родовой принадлежности и определения вида выделенных акантамёб проведено секвенирование полученных в ПЦР фрагментов гена 18S рРНК и их сравнение с аналогичными нуклеотидными последовательностями из базы данных NCBI GenBank. Максимальный процент гомологии нуклеотидной последовательности гена 18S рРНК акантамёбы из почв в Горном Алтае с видом *A. castellanii* составил 100 при совпадении длины сравниваемой последовательности на 100 %, что однозначно доказывает принадлежность выделенных амёб к виду *A. castellanii*.

Ранее введенные нами в базу данных последовательности штамма *A. castellanii* из Волго-Уральского степного очага на 99 % совпадали с вновь выделенным нами штаммом *A. castellanii* из Горно-Алтайского высокогорного очага. Это указывает на широкое распространение этого вида в почвенных биоценозах очагов чумы Прикаспия и Алтая и совпадает с литературными данными о глобальном распространении вида *A. castellanii* в различных ландшафтно-географических зонах. Мы обозначили выделенный штамм из Горного Алтая как *A. castellanii* Tarhata. Полученный штамм акантамёб *A. castellanii* Tarhata был использован для моделирования взаимодействия амёб из Горно-Алтайского высокогорного очага и штаммов *Y. pestis* из этого очага.

Анализ взаимодействия штаммов *Y. pestis* из Горно-Алтайского высокогорного очага и акантамёб из этого очага. В работе использован штамм *Y. pestis* 367. Анализ его дифференциальных биохимических особенностей – отсутствие ферментации рамнозы, наличие способности к редукции нитратов и наличие маркерной плазмиды рTP33 указал на принадлежность к ветви 4.ANT античного биовара основного подвида возбудителя чумы. Штамм *Y. pestis* 367 выделен в с. Мухор-Тархата бактериологическим посевом от биопробной белой мыши. Анализ взаимодействия штамма *Y. pestis* 367 и акантамёб проводили в жидкой среде LB. В качестве контроля численности



Рис. 1. Место забора пробы образцов почв из постоянных и временных нор серого сурка *M. altaica* на территории Горно-Алтайского высокогорного очага и выделения штамма *Y. pestis* в участках проявления эпизоотической активности в 2014–2016 гг.:

К – место выделения *Y. pestis* 367; А – место выделения *A. castellanii* Tarhata

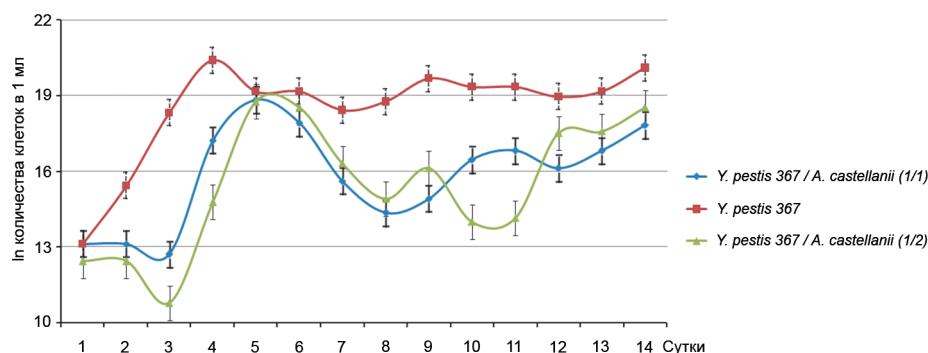


Рис. 2. Динамика роста *Y. pestis* 367 при совместном культивировании с клетками *A. castellanii* в соотношении концентраций клеток 1/1 и 1/2. В качестве контроля использовалась культура *Y. pestis* 367 без акантамеб в среде

клеток в жидкой среде использовали культуру *Y. pestis* 367, а культуру акантамеб с инактивированными клетками *Y. pestis* этого же штамма использовали в качестве контроля численности *A. castellanii*.

Выделенный штамм акантамебы *A. castellanii* размножали в жидкой среде на матрасах со средой PYG до концентрации $1 \cdot 10^6$ кл./мл. Штамм *Y. pestis* 367 выращивали в среде LB (pH 7,2) при 28 °C в течение 18 ч и доводили до концентрации $1 \cdot 10^9$ кл./мл. Культуры акантамеб и *Y. pestis* смешивали в пропорциях 1/1, 1/2, 1/10, 1/20 и культивировали в течение двух недель (рис. 2, 3). Совместное культивирование возбудителя чумы и амёб проводили в пробирках при постоянной температуре 22 °C и влажности 60 %, поддерживаемых климатической камерой KBF 720 (Binder, Германия). Забор материала из пробирки осуществляли каждые сутки в одно и то же время. Количество клеток *Y. pestis* 367 определяли по числу КОЕ на твердой агаровой среде LB с разведением исходного материала до 10 раз. Инактивацию *Y. pestis* проводили в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». Количество клеток амёб определяли методом подсчета клеток в камере Горяева по рекомендациям производителя. Полученные результаты по динамике изменения численности клеток акантамеб и *Y. pestis* представлены в таблице. Для подтверждения достоверности полученных результатов и определения уровня значимости проводили определение среднеквадратичного отклонения полученных значений. В таблице приведены значения количества КОЕ *Y. pestis* и количества клеток *A. castellanii*. Все значения укладываются в доверительный интервал ± 5 %.

На основе полученных данных построена диаграмма зависимости количества клеток возбудителя

чумы от численности акантамеб (рис. 2 и 3). Как следует из графика и таблицы, на 2–3-е сутки наблюдается падение КОЕ *Y. pestis* в пробирках с клетками акантамеб в соотношении 1/1 и 1/2, что свидетельствует об активном фагоцитозе амёбами клеток возбудителя чумы. Однако резкое изменение значений натурального логарифма КОЕ *Y. pestis* на 3–4-е сутки в 1,3 раза при совместном выращивании с культурой акантамеб в соотношении 1/1 и 1/2 может свидетельствовать об активном делении *Y. pestis* внутри клеток трофозоитов (таблица). Равномерный подъем в первые 4 сут КОЕ возбудителя чумы в контрольной пробирке показывает нормальный темп роста культуры чумы до стадии плато на 5–6-е сутки.

В то же время снижение количества КОЕ *Y. pestis* в пробирках с акантамебами показывает более интенсивный фагоцитоз с 6-х по 8-е сутки, чем вначале и в конце эксперимента. Таким образом, постепенное уменьшение амплитуды колебаний количества клеток и аналогичный темп роста культуры *Y. pestis* в контрольной пробирке на 13–14-е сутки по сравнению с темпом роста возбудителя чумы в пробирках с акантамебами свидетельствует о возможности взаимного сосуществования *Y. pestis* и *A. castellanii* в условиях жидкой среды.

Кроме того, полученные кривые динамики роста акантамеб (рис. 3) показывают интенсивность лизиса клеток амёб в связи с выходом *Y. pestis* 367 в жидкую среду. Постепенное падение численности акантамеб на 5-е и 8-е сутки соответствует росту клеток возбудителя чумы (рис. 2 и 3). Напротив, увеличение количества клеток *A. castellanii* в пробирке с соотношением к клеткам *Y. pestis* 367 как 2/1 на 6–7-е и 9–11-е сутки (рис. 3) свидетельствует об адаптации амёб к среде с возбудителем чумы и относительно устойчивом взаимном балансе количества клеток.

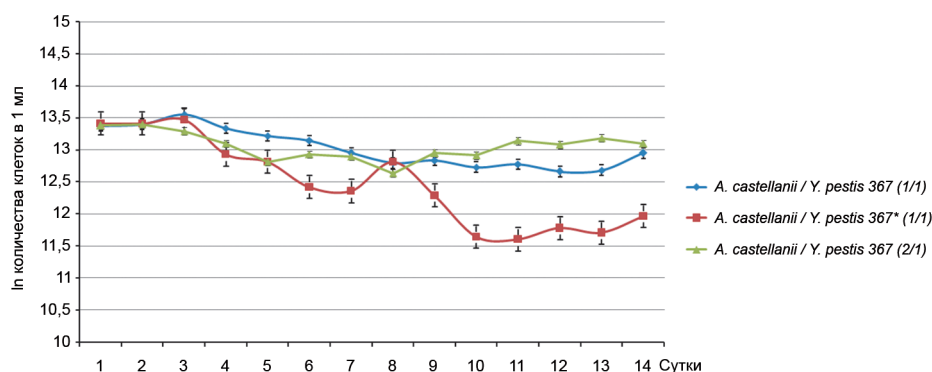


Рис. 3. Динамика роста клеток *A. castellanii* при совместном культивировании с *Y. pestis* 367 в соотношении 1/1 и 2/1. В качестве контроля использовалась культура акантамеб с инактивированной культурой *Y. pestis* 367 (отмечена*)

Однако отсутствие жизнеспособных клеток *Y. pestis* 367 в контрольной пробирке как источника питания не только задерживает рост амёб, но и негативно влияет на концентрацию клеток (рис. 3). Вероятно, приспособление акантамеб к питанию инактивированными клетками *Y. pestis* 367 более замедлено (рис. 3) по сравнению с амёбами в двух других пробирках в связи с лизисом при инактивации клеток и выхода токсинов в среду. Схожая с описанной выше динамика роста *Y. pestis* 367 при совместном культивировании с *A. castellanii* наблюдалась при соотношении исходных концентраций 1/10 и 1/20.

Определение внутриклеточной локализации клеток *Y. pestis* в клетках акантамеб проводили с помощью модифицированного метода флуоресцирующих антител (МФА) с использованием микроскопа AXIO Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия). Материал для окрашивания препаратов МФА наносили на предметное стекло и высушивали при комнатной температуре. Далее мазки фиксировали в течение 1 ч в 96 % этиловом спирте, высушивали на воздухе и обрабатывали последовательно 2 % Triton X-100, 1 % Tween 20 (Sigma, США) в течении 30 мин на стекле. Антитела разводили до рабочего разведения и окрашивали препараты в соответствии с инструкцией производителя. Микроскопию проводили в УФ-свете с фильтром GFP и регистрации изображения с помощью цифровой камеры AxioCam 105 color Carl Zeiss (Carl Zeiss, Германия).

На рис. 4 отображены этапы взаимодействия *Y. pestis* 367 с клетками акантамеб в жидкой среде. В первые сутки происходит активный фагоцитоз бактериальных клеток и накопление их внутри пищеварительных вакуолей трофозоитов (рис. 4, А), что подтверждается падением количества КОЕ *Y. pestis* в

первые сутки наблюдения (рис. 2). Следующим этапом адаптации к среде с бактериальными клетками чумы стало образование цист амёб, как способа переживания неблагоприятных условий. Об инцистировании клеток амёб свидетельствует уменьшение их размеров и образование групп по несколько клеток на 3–4-е сутки проведения эксперимента (рис. 4, Б). В результате приспособления к среде с патогенными бактериями среди акантамеб наблюдались клетки, содержащие вакуоли с *Y. pestis* 367, наряду с лизированными клетками амёб (рис. 4, В). Вероятно, сохранение акантамеб, содержащих клетки возбудителя чумы, определяет адаптацию к жидкой среде с *Y. pestis* 367. Наличие механизма инцистирования и сохранение патогенных бактериальных клеток внутри вакуолей может быть одним из определяющих факторов сосуществования *Y. pestis* 367 и *A. castellanii*.

Полученные результаты совпадают с ранее полученными нами данными о локализации клеток *Y. pestis* в индивидуальных вакуолях в сети эндоплазматического ретикулума *Acanthamoeba sp.* и о возможности длительного сохранения возбудителя в этих амёбах [3]. Таким образом, нами впервые установлено наличие акантамеб *A. castellanii* в почве нор серого сурка *M. altaica* на глубине 70 см от входа на участке эпизоотической активности в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы. Численность акантамеб здесь очень высока – до 300000 кл./г почвы, что обеспечивает их массовый контакт с клетками *Y. pestis*, выделяемых с продуктами жизнедеятельности переносчика *M. altaica* и его блох. Проведенный анализ взаимодействия выделенных акантамеб и штаммов *Y. pestis*, полученных на этом же эпизоотическом участке, свидетельствует о конкурентном взаимодействии этих микроорганизмов и возможности со-

Анализ динамики взаимодействия акантамеб *A. castellanii* из почв Горно-Алтайского высокогорного очага и *Y. pestis* 367

Сутки	<i>Y. pestis</i> 367 / <i>A. castellanii</i> (1/1)		<i>Y. pestis</i> 367	<i>A. castellanii</i> / <i>Y. pestis</i> 367*	<i>Y. pestis</i> 367 / <i>A. castellanii</i> (1/2)	
	<i>Y. pestis</i>	<i>A. castellanii</i>			<i>Y. pestis</i>	<i>A. castellanii</i>
1-е	$5 \cdot 10^5 \pm 2,5 \cdot 10^4$	$6,4 \cdot 10^5 \pm 3,2 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^5 \pm 2,5 \cdot 10^4$	$6,675 \cdot 10^5 \pm 3,33 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^5 \pm 1,2 \cdot 10^4$	$6,45 \cdot 10^5 \pm 3,22 \cdot 10^4$
2-е	$5 \cdot 10^5 \pm 2,5 \cdot 10^4$	$6,6 \cdot 10^5 \pm 3,3 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^5 \pm 2,5 \cdot 10^4$	$6,675 \cdot 10^5 \pm 3,33 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^5 \pm 1,25 \cdot 10^4$	$6,6 \cdot 10^5 \pm 3,3 \cdot 10^4$
3-е	$3,3 \cdot 10^5 \pm 1,65 \cdot 10^4$	$7,7 \cdot 10^5 \pm 3,8 \cdot 10^4$	$90 \cdot 10^6 \pm 4,5 \cdot 10^6$	$7,05 \cdot 10^5 \pm 3,52 \cdot 10^4$	$4,8 \cdot 10^4 \pm 2,4 \cdot 10^3$	$5,925 \cdot 10^5 \pm 2,96 \cdot 10^4$
4-е	$30 \cdot 10^6 \pm 1,5 \cdot 10^6$	$6,2 \cdot 10^5 \pm 3,1 \cdot 10^4$	$720 \cdot 10^6 \pm 36 \cdot 10^6$	$4,125 \cdot 10^5 \pm 2,06 \cdot 10^4$	$2,6 \cdot 10^6 \pm 1,3 \cdot 10^5$	$4,875 \cdot 10^5 \pm 2,43 \cdot 10^4$
5-е	$150 \cdot 10^6 \pm 7,5 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^5 \pm 2,7 \cdot 10^4$	$210 \cdot 10^6 \pm 10,5 \cdot 10^6$	$3,675 \cdot 10^5 \pm 1,83 \cdot 10^4$	$140 \cdot 10^6 \pm 7 \cdot 10^6$	$3,675 \cdot 10^5 \pm 1,83 \cdot 10^4$
6-е	$60 \cdot 10^6 \pm 3 \cdot 10^6$	$5,1 \cdot 10^5 \pm 2,5 \cdot 10^4$	$210 \cdot 10^6 \pm 10,5 \cdot 10^6$	$2,475 \cdot 10^5 \pm 1,23 \cdot 10^4$	$110 \cdot 10^6 \pm 5,5 \cdot 10^6$	$4,125 \cdot 10^5 \pm 2,06 \cdot 10^4$
7-е	$6 \cdot 10^6 \pm 3 \cdot 10^5$	$4,2 \cdot 10^5 \pm 2,1 \cdot 10^4$	$100 \cdot 10^6 \pm 5 \cdot 10^6$	$2,325 \cdot 10^5 \pm 1,23 \cdot 10^4$	$12 \cdot 10^6 \pm 6 \cdot 10^5$	$3,975 \cdot 10^5 \pm 1,98 \cdot 10^4$
8-е	$1,7 \cdot 10^6 \pm 0,85 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^5 \pm 1,8 \cdot 10^4$	$140 \cdot 10^6 \pm 7 \cdot 10^6$	$3,675 \cdot 10^5 \pm 1,83 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^6 \pm 1,5 \cdot 10^5$	$3,075 \cdot 10^5 \pm 1,53 \cdot 10^4$
9-е	$3 \cdot 10^6 \pm 1,5 \cdot 10^5$	$3,75 \cdot 10^5 \pm 1,87 \cdot 10^4$	$350 \cdot 10^6 \pm 17,5 \cdot 10^6$	$2,175 \cdot 10^5 \pm 1,08 \cdot 10^4$	$10 \cdot 10^6 \pm 5 \cdot 10^5$	$4,2 \cdot 10^5 \pm 2,1 \cdot 10^4$
10-е	$14 \cdot 10^6 \pm 7 \cdot 10^5$	$3,375 \cdot 10^5 \pm 1,68 \cdot 10^4$	$250 \cdot 10^6 \pm 12,5 \cdot 10^6$	$1,14 \cdot 10^5 \pm 0,57 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^6 \pm 0,6 \cdot 10^5$	$4,05 \cdot 10^5 \pm 2,02 \cdot 10^4$
11-е	$20 \cdot 10^6 \pm 1 \cdot 10^6$	$3,525 \cdot 10^5 \pm 1,76 \cdot 10^4$	$250 \cdot 10^6 \pm 12,5 \cdot 10^6$	$1,09 \cdot 10^5 \pm 0,5475 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^6 \pm 0,7 \cdot 10^5$	$5,1 \cdot 10^5 \pm 2,55 \cdot 10^4$
12-е	$10 \cdot 10^6 \pm 5 \cdot 10^5$	$3,15 \cdot 10^5 \pm 1,57 \cdot 10^4$	$170 \cdot 10^6 \pm 8,5 \cdot 10^6$	$1,305 \cdot 10^5 \pm 0,6525 \cdot 10^4$	$40 \cdot 10^6 \pm 2 \cdot 10^6$	$4,8 \cdot 10^5 \pm 2,4 \cdot 10^4$
13-е	$20 \cdot 10^6 \pm 1 \cdot 10^6$	$3,225 \cdot 10^5 \pm 1,61 \cdot 10^4$	$210 \cdot 10^6 \pm 10,5 \cdot 10^6$	$1,215 \cdot 10^5 \pm 0,6075 \cdot 10^4$	$43 \cdot 10^6 \pm 2,15 \cdot 10^6$	$5,325 \cdot 10^5 \pm 2,66 \cdot 10^4$
14-е	$55 \cdot 10^6 \pm 2,75 \cdot 10^6$	$4,2 \cdot 10^5 \pm 2,1 \cdot 10^4$	$530 \cdot 10^6 \pm 26,5 \cdot 10^6$	$1,575 \cdot 10^5 \pm 0,7875 \cdot 10^4$	$110 \cdot 10^6 \pm 5,5 \cdot 10^6$	$4,875 \cdot 10^5 \pm 2,43 \cdot 10^4$

Примечания. В таблице приведены средние значения численности клеток *A. castellanii* и КОЕ *Y. pestis* 367 в различном соотношении исходных концентраций. *Инактивированная культура *Y. pestis* 367.

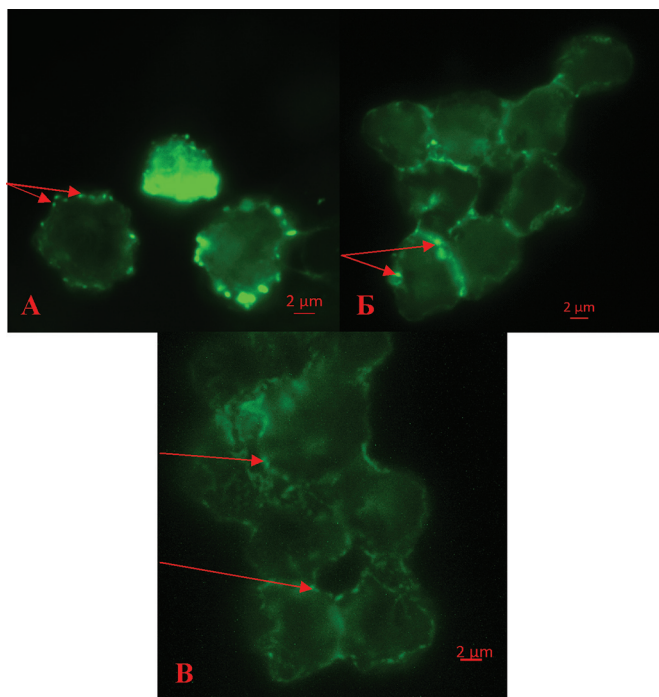


Рис. 4. Внутриклеточная локализация клеток штамма *Y. pestis* 367 в акантамебах *A. castellanii* из почвы Горно-Алтайского высокогорного очага. Материал отобран на 1-е (А), 3-и (Б) и 5-е (В) сутки совместного культивирования возбудителя чумы и клеток акантамеб в соотношении 1/1. Стрелками отмечены клетки *Y. pestis* 367 в индивидуальных вакуолях. Изображения получены на микроскопе AXIO Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия), с цифровой камерой AxioCam 105 color при увеличении 630×

хранения возбудителя чумы в вегетативных клетках и цистах акантамеб в почвенных биоценозах постоянных и временных нор сурка в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Домарадский И.В. Не является ли чума протозоозом? (роль Protozoa в эпизоотологии чумы). *Мед. паразитол.* 1999; 2:10–13.
2. Кошель Е.И., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Видяева Н.А., Гусева Н.П., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Определение систематической принадлежности почвенных амёб из очагов чумы Прикаспия на основе анализа участков рибосомного оперона. *Генетика*. 2015; 51:39–45. DOI: 10.7868/S0016675815010051.
3. 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. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 2:69–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-69-74.
4. Кутырев В.В., Ерошенко Г.А., Попов Н.В., Видяева Н.А., Коннов Н.П. Молекулярные механизмы взаимодействия возбудителя чумы с беспозвоночными животными. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2009; 4:7–12.
5. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Дёмина Ю.В., Пакскина Н.Д., Щучинов Л.В., Михайлов В.П., Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Денисов А.В., Шарова И.Н., Попов Н.В., Кузнецов А.А. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 1. Эпидемиологические и эпизоотологические особенности проявлений чумы в Горно-Алтайском высокогорном (Сайлюгемском) природном очаге чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 4:9–16.
6. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство 2-е изд. М.: ЗАО «Шико», 2013. 560 с.
7. Попов Н.В., Кошель Е.И., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Формирование современных представлений о механизмах эн-

зоотии чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 3(109):5–8.

8. Abd H., Johansson T., Golovliov I., Sandstrom G., Forsman M. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69:600–6. PMID: 12514047; PMCID: PMC152416.

9. Greub G., Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17:413–33. PMID: 15084508; PMCID: PMC387402.

10. Pelandakis M., Pernin P. Use of multiplex PCR and PCR restriction enzyme analysis for detection and exploration of the variability in the free-living amoeba *Naegleria* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68(4):2061–5. PMID: 11916734; PMCID: PMC123847.

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

References

1. Domadarsky I.V. [Is not plague a protozoan disease? (The role of Protozoa in epizootiology of plague)]. *Med. Parazitol.* 1999; 2:10–3.
2. Koshel' E.I., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Vidyayeva N.A., Guseva N.P., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Determination of specific apteruptance of soil amoeba from plague foci of Pre-Caspian based on analysis of ribosomal operon regions]. *Genetika*. 2015; 51:30–45. DOI: 10.7868/S0016675815010051.
3. 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 ssp.*]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 2: 69–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-69-74.
4. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Popov N.V., Vidyayeva N.A., Konnov N.P. [Molecular mechanisms of plague agent interaction with invertebrate animals]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2009; 4:7–12.
5. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakskina N.D., Shchuchinov L.V., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Denisov A.V., Sharova I.N., Popov N.V., Kuznetsov A.A. [Infection of an individual with plague in the Gorno-Altai high-mountain natural focus in 2014. Communication 1. Epidemiological and epizootiological peculiarities of plague manifestations in the Gorno-Altai high-mountain (Sailyugemsky) natural plague focus]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 4:9–16.
6. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. M.: 'Shiko', CJSC; 2nd edition, 2013. 560 p.
7. Popov N.V., Koshel' E.I., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Formation of modern concepts on the mechanism of plague enzooty]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 3(109):5–8.
8. Abd H., Johansson T., Golovliov I., Sandstrom G., Forsman M. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69:600–6. PMID: 12514047; PMCID: PMC152416.
9. Greub G., Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17:413–33. PMID: 15084508; PMCID: PMC387402.
10. Pelandakis M., Pernin P. Use of multiplex PCR and PCR restriction enzyme analysis for detection and exploration of the variability in the free-living amoeba *Naegleria* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68(4):2061–5. PMID: 11916734; PMCID: PMC123847.
11. Schroeder J., Booton G., Hay J., Niszl I., Seal D., Markus M., Fuerst P., Byers T. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *Clin. Microbiol.* 2001; 39(5):1903–11. DOI: 10.1128/JCM.39.5.1903-1911.2001.

Authors:

Oglodin E.G., Morozov O.A., Nikiforov K.A., Kukleva L.M., Sharapova N.A., Makashova M.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.
Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Denisov A.V., Sanarov P.P. Altai Plague Control Station. 2, Zavodskaya St., Gorno-Altai, 649002, Russian Federation. E-mail: chuma@mail.gorny.ru.
Tokmakova E.G. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissersa St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Об авторах:

Оглодин Е.Г., Морозов О.А., Никифоров К.А., Куклева Л.М., Шарпова Н.А., Макашова М.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.

Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Денисов А.В., Санаров П.П. Алтайская противочумная станция. Российская Федерация, 649002, Горно-Алтайск, ул. Заводская, 2. E-mail: chuma@mail.gorny.ru.

Токмакова Е.Г. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Поступила 16.11.17.