

К вопросу об определении вирулентности штаммов чумного микроба *in vitro*

Т.П.Шмелькова, Е.В.Сазанова, Т.А.Малюкова

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

Проведен анализ подходов к оценке вирулентности возбудителя чумы *in vitro*. Выделены следующие группы методов: молекулярно-генетический, культурально-биохимический, физиологический и иммунологический. Молекулярно-генетический метод регламентирован для исследования полевого материала. Наличие генетических маркеров патогенности возбудителя – первостепенная составляющая вирулентности, анализ экспрессии этих генов – следующий важный шаг на пути дифференциации штаммов по данному показателю. В качестве дополнения к молекулярно-генетическим методам оценки вирулентности актуален поиск информативных показателей вирулентности – биохимических, иммунологических, культуральных, физиологических, которыми обладают вирулентные штаммы возбудителя чумы в условиях максимального проявления своих патогенных свойств. Результаты, полученные при использовании современных подходов к оценке вирулентности чумного микроба *in vitro*, необходимо сопоставлять с показателем ЛД₅₀ как легитимным критерием оценки вирулентности для каждого изучаемого штамма чумного микроба.

Ключевые слова: чума, *Yersinia pestis*, патогенность, вирулентность, *in vitro*

Для цитирования: Шмелькова Т.П., Сазанова Е.В., Малюкова Т.А. К вопросу об определении вирулентности штаммов чумного микроба *in vitro*. Бактериология. 2021; 6(4): 70–78. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-70-78

Concerning determination of virulent properties of plague microbe *in vitro*

T.P.Shmelkova, E.V.Sazanova, T.A.Malyukova

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of the Rospotrebnadzor, Saratov, Russian Federation

Approaches to the assessment of virulence of plague agent *in vitro* were analyzed. The following groups of methods were outlined: molecular-genetic, cultural-biochemical, physiological and immunological. Molecular-genetic method has been included into nomenclature of studies of field material. Presence of genetic pathogenicity markers of the agent is a paramount component of virulence. Analysis of expression of these genes – is another important step towards differentiation of the strains by the indicator. As a supplement to molecular-genetic methods of virulence assessment, search for informative indicators of virulence – biochemical, immunological, cultural, physiological ones which virulent plague agent strains possess under conditions of maximum manifestation of their pathogenic properties. Results obtained in the course of practicing modern approaches to the assessment of plague microbe virulence *in vitro* should be balanced against LD₅₀ values for every plague microbe strain under investigation as legitimate criteria for virulence to date.

Key words: plague, *Yersinia pestis*, pathogenicity, virulence, *in vitro*

For citation: Shmelkova T.P., Sazanova E.V., Malyukova T.A. Concerning determination of virulent properties of plague microbe *in vitro*. Bacteriology. 2021; 6(4): 70–78. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2021-4-70-78

Патогенность как способность определенного вида/подвида микроорганизмов вызывать заболевание у определенных видов животных (включая человека) и/или растений – краеугольный камень, определяющий интерес исследователей к данному микробу. Вирулентность, как мера патогенности, является количественным показателем, значение которого зависит от конкретного штамма и даже клона патогена, условий его культивирования (пассивации), внутривидовой группы (популяции или клона) организма-хозяина и особенностей его содержания (питания, освещения, влажности и т.д.), а также способа заражения, циркадных ритмов, эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов как патогена, так и хозяина и т.д.

Возбудитель чумы *Yersinia pestis* отнесен к наиболее опасной I группе патогенности [1]. Оценка вирулентности штаммов возбудителя чумы регламентирована МУ

Для корреспонденции:

Шмелькова Татьяна Петровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Роспотребнадзора

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5230
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Статья поступила 02.12.2021 г., принята к печати 27.12.2021 г.

For correspondence:

Tatyana P. Shmelkova, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher of the Department of Educational Programs and Training of Specialists, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of the Rospotrebnadzor

Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5230
E-mail: rusrapi@microbe.ru

The article was received 02.12.2021, accepted for publication 27.12.2021

3.1.3.2355-08, МУК 4.2.2940-11 при определении номенклатуры и объема исследований для Центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности и обеспечения противозидемической готовности, Референс-центра по мониторингу за чумой и другими особо опасными бактериальными инфекциями, Центров верификации диагностической деятельности, осуществляющих функции государственных коллекций возбудителей особо опасных бактериальных инфекций I–II групп патогенности. Показатель вирулентности штаммов *Y. pestis* используют для паспортизации природных очагов чумы и количественной оценки их эпидемического потенциала в соответствии с «Программой расчета величины эпидемического потенциала природного очага чумы» [2].

С 1940-х гг. лабораторная диагностика чумы включала методы выявления авирулентных штаммов чумного микроба *in vitro* по фенотипическим свойствам: способности к росту при недостатке в среде культивирования ионов кальция при температуре 37°C; неспособности сорбировать из среды культивирования гемин или конго красный (конгорот) [3–6]. В 1969 г. Апариным Г.П. впервые было предложено дифференцировать штаммы *Y. pestis* на высоковирулентные, вирулентные, слабо вирулентные и авирулентные на основании показателя летальной дозы ЛД₅₀ [7]. Показатель ЛД₅₀ для белых мышей является золотым стандартом оценки вирулентности чумного микроба. Для высоковирулентных штаммов ЛД₅₀ при подкожном заражении белых мышей составляет 5–10 м.к. (микробных клеток), слабовирулентных – >1 × 10⁵ м.к., авирулентные – >1 × 10⁶ м.к. [8]. В качестве лабораторных животных также используют морских свинок. Вследствие избирательного характера вирулентности штаммы чумного микроба кавказского (*Y. pestis* subsp. *caucasica*) и алтайского (*Y. pestis* subsp. *altaica*) подвидов природных очагов полевого и пищевочного типов вирулентны для мышей и авирулентны для морских свинок [2].

В дальнейшем алгоритм лабораторной диагностики пополнился молекулярно-генетическими методами, позволяющими исследовать наличие генетических маркеров факторов патогенности.

В настоящее время вирулентность возбудителя чумы регламентировано оценивать как *in vivo*, так и *in vitro* [2]. Однако если при работе с лабораторными животными четко определены последовательность действий и система подсчета результатов, то технологии методов *in vitro* разнородны и постоянно эволюционируют. Вместе с тем способы оценки вирулентных свойств чумного микроба согласуются с концепцией «Три R» – усовершенствования, уменьшения и замены (Refinement, Reduction, Replacement) [9, 10], предусматривающей переход к технологиям без использования лабораторных животных или их лимитирования.

Цель обзора – обозначить спектр подходов к определению вирулентности возбудителя чумы в системе *in vitro*.

Можно выделить следующие группы методов оценки вирулентности чумного микроба *in vitro*: молекулярно-генетические, культурально-биохимические, физиологические, иммунологические.

Патогенность чумного микроба – полидетерминантный признак, который контролируется набором генов хромосомной и плазмидной локализации.

Молекулярно-генетический метод оценки вирулентности чумного микроба вошел в номенклатуру исследований полевого материала [2]. На хромосоме *Y. pestis* расположена область детерминант пигментации (*pgm*-область), в состав которой входят *hms*-локус с генами белков аккумуляции гемина и остров высокой патогенности НР1 с генами утилизации железа. Гены таких детерминант патогенности, как белок LcrV (V-антиген) и Yop-белки, локализованы на плазмиде pCad. Потеря этих генов приводит к утрате вирулентности возбудителя чумы для лабораторных животных. Дифференциацию авирулентных и потенциально вирулентных штаммов *Y. pestis* проводят по выявлению генов *irp2* (остров патогенности хромосомной области пигментации), *hmsH* (*hms*-локус хромосомной области пигментации), *IcrV* (плазмиды pCad) с использованием коммерческих наборов реагентов [8, 11, 12].

Культуры одного и того же штамма *Y. pestis* при полном генетическом сходстве могут отличаться по своим вирулентным свойствам. Различия в вирулентности связаны с изменением экспрессии отдельных генов, в частности гена *psaA*, который входит в состав оперона, кодирующего рН6-антиген с антифагоцитарной и адгезивной активностью, и гена *pst*, расположенного на плазмиде pPst, кодирующего синтез пестицина [13].

С помощью современных методов генетического анализа, таких как полногеномное секвенирование, точечный мутагенез, определение экспрессии генов *in vivo*, протеомный и транскриптомный анализ экспрессии генов, обнаружены гены, утрата которых также приводит к снижению вирулентности чумного микроба [14]. Это не только гены, кодирующие изученные и неизученные факторы вирулентности, но и гены, кодирующие регуляторные молекулы, которые осуществляют контроль экспрессии генов *Y. pestis* на транскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях [15, 16]. Один из регуляторных белков – рецептор циклического аденозинмонофосфата (Cyclic AMP receptor protein/CRP) – регулирует экспрессию многих генов, ассоциированных с вирулентностью – *pla* и системы секреции III типа Yop-YSC *Y. pestis* [17, 18].

Культурально-биохимические методы. Признак пигментации *Y. pestis*, ассоциированный с вирулентностью и связанный с расположенным в *pgm*-области островом высокой патогенности, определяют по способности возбудителя чумы образовывать пигментированные колонии на специальных средах, таких как синтетическая среда с гемом Джексона–Берроуза, агар Хоттингера с 0,05 мкг/мл красителя Конго красного, среда HmsD [19]. Однако среда Джексона–Берроуза практически не используется в настоящее время в связи со сложностями ее приготовления. Для детекции признака пигментсорбции чумного микроба рекомендована цветная дифференциально-диагностическая полусинтетическая среда HmsD [8].

Потребность в ионах кальция является одним из факторов вирулентности возбудителя чумы и служит признаком наличия и функционирования генов плазмиды вирулентности pCad. На среде Хигучи–Смита (магниево-оксалатный агар) авирулентные клетки *Y. pestis* через 40–42 ч инкубации при температуре 37°C образуют колонии I порядка, независимые от ионов кальция (авирулентные), еще через

40 ч дополнительной инкубации при той же температуре клетки с остаточной вирулентностью и тенденцией потери зависимости от ионов кальция дают начало колониям II порядка. Заключительный этап постановки теста – инкубация исходных посевов в течение 30 ч при температуре 28°C с развитием колоний III порядка из вирулентных клеток чумного микроба. Для дифференциации авирулентных (кальций-независимых) и вирулентных (кальцийзависимых) штаммов *Y. pestis* также используют коммерческую питательную среду для определения потребности чумного микроба в ионах кальция производства ФКУЗ Иркутского НИПЧИ [19].

Физиологические методы. Основное отличие авирулентных штаммов от вирулентных – способность распространяться и безудержно размножаться в организме [20]. Проведенный нами ранее анализ неоднородности бактерий по содержанию ДНК на клетку выявил различия в динамике деления вирулентных и авирулентных клеток возбудителя чумы [21]. Культуры вирулентных штаммов возбудителя чумы характеризовались более быстрым (до 48 ч) выходом из состояния репликации ДНК в стационарную фазу (быстрый рост) в отличие от культур авирулентных штаммов (медленный рост, выход в стационарную фазу превышал срок наблюдения – 48 ч). Одно из возможных объяснений зависимости вирулентности культуры от скорости ее размножения – выделение свободной формы липополисахарида (ЛПС) при делении бактерий [22]. Следовательно, чем выше интенсивность размножения бактериальной культуры, тем больше ЛПС высвобождается и более «токсичной» (вирулентной) является культура, так как «основа патогенеза чумы – это действие ЛПС на полиморфноядерные лейкоциты» [23, 24]. Для объективности оценки динамики деления бактерий нами был введен индекс неоднородности культуры, определяемый по интенсивности ДНК-флуоресценции меченных флуорохромом бактерий с использованием проточного цитометра. Индекс рассчитывали по отношению количества клеток с относительно высоким содержанием ДНК (репликация ДНК, каналы интенсивности флуоресценции от 201 до 512 у.е. (условных единиц)) к количеству клеток с относительно низким содержанием ДНК (стационарная фаза, каналы от 0 до 200 у.е.). Через 48 ч инкубации индекс неоднородности культур авирулентных штаммов составил $0,52 \pm 0,11$, тогда как у вирулентных штаммов – $0,18 \pm 0,03$ ($p < 0,001$). Предложено пороговое значение индекса неоднородности для определения вирулентных свойств культуры – 0,25. Штаммы с индексом неоднородности $\geq 0,25$ с большей степенью вероятности можно отнести к авирулентным, а штаммы с индексом неоднородности $< 0,25$ – к вирулентным. Данный метод может быть рекомендован как дополнительный для включения в комплекс методов оценки вирулентности штаммов чумного микроба.

Иммунологический метод. Ключевая роль в развитии патологического процесса при инфекционных болезнях принадлежит повреждению клеток организма хозяина, которое зависит от степени вирулентности инфицирующих агентов [25–27]. Штаммы возбудителя чумы обладают разной цитотоксичностью по отношению к лейкоцитам крови человека *in vitro*. При сопоставлении результатов проточно-цитометрического анализа цитотоксичности штаммов *Y. pestis* и их молекулярно-генетической характеристики с показателями

ЛД₅₀ для белых мышей выяснили, что вирулентные штаммы (ЛД₅₀ $< 1 \times 10^4$ м.к.) с генотипом *pgm*⁺*pFra*⁺*pCad*⁺*pPst*⁺ вызывают повреждение более 80% лейкоцитов крови человека, тогда как слабовирулентные и авирулентные штаммы (ЛД₅₀ $> 1 \times 10^5$ м.к.) с генотипами *pgm*⁺*pFra*⁺*pCad*⁺*pPst*⁺, *pgm*⁻*pFra*⁺*pCad*⁺*pPst*⁺, *pgm*⁺*pFra*⁺*pCad*⁻*pPst*⁺, *pgm*⁺*pFra*⁻*pCad*⁺*pPst*⁺ вызывают повреждение менее 50% лейкоцитов [28]. Сравнительный анализ цитотоксичности исследованных штаммов *Y. pestis* и их ЛД₅₀ свидетельствовал о высокой степени корреляции данных показателей (слабовирулентные и авирулентные штаммы – $r_s = 0,9$; вирулентные – $r_s = 0,7$). Очевидно, лейкоциты человека не являются стандартным препаратом, но именно кровь является одним из наиболее информативных и доступных материалов (биоматериалов) при изучении вирулентности штаммов возбудителя чумы непосредственно для человека, что обуславливает перспективность включения данного подхода в комплекс методов оценки вирулентности штаммов чумного микроба.

Вирулентность возбудителя чумы обусловлена способностью патогена выживать и размножаться внутри макрофагов («репликативной ниши») за счет подавления антибактериальных функций фагоцитов [29]. Репликация бактерий внутри макрофагов коррелирует с понижением содержания в них NO. Предполагают, что за подавление индукции NO ответственны белки *rip*-оперона (*required for intracellular proliferation*) *pgm* локуса *RipA*, *RipB* и *RipC* [30–32]. Мутантные по этим генам штаммы не способны выживать и размножаться внутри макрофагов [30].

Отдельно обозначим менее известные факторы, качественное и количественное определение которых может свидетельствовать о вирулентности штаммов *Y. pestis*.

Полифункциональные белки наружной мембраны, такие как SurA (Survival protein A), липопропротеин Брауна (Lpp), липопротеин NlpD, а также один из добавочных поверхностных белков – интимин/инвазин-подобный белок (Iip) чумного микроба, рассматривают как потенциальные факторы вирулентности [33–36]. Установлено, что делеционные мутанты вирулентных штаммов *Y. pestis* по генам этих белков обладают сниженной вирулентностью [33, 37, 38].

Считают, что развитию самой опасной формы чумы, легочной, способствует поверхностная протеаза омптинового типа возбудителя чумы – активатор плазминогена Pla [39], которая совместно с интегральным белком наружной мембраны Ail обеспечивает устойчивость чумного микроба к комплементу сыворотки крови [40, 41], прикрепление бактерий к макрофагам [42] и проникновение патогена внутрь клеток млекопитающих [43]. Штаммы, лишённые Pla, характеризуются увеличением ЛД₅₀ в миллион раз [44, 45]. Утрата Ail также приводит к снижению вирулентности патогена. Так, при экспериментальной легочной чуме показатель ЛД₅₀ мутантного по этому белку штамма для крыс увеличился более чем в 10 000 раз [46].

Антиоксидантная система микроорганизмов также является фактором патогенности [47–49]. Чумной микроб, попадая в фагоцит и подвергаясь губительному воздействию активных форм кислорода, выработал свою стратегию выживания в данных условиях – антиоксидантную систему, в которую входят ферменты каталазы и пероксидазы. Следует отметить, что корреляция между каталазной активностью

Y. pestis и вирулентностью обнаружена еще в 1949 г. [50]. Каталазную и пероксидазную активность чумного микроба изучали как отечественные исследователи (Джапаридзе М.Н. [51], Видяева Н.А. [52]), так и зарубежные (Garcia E. et al. [53], Marcheva D. [54], Mehig R.J., Brubaker R.R. [55]).

Известно, что на первых этапах развития инфекционного процесса сидерофор иерсиниабактин Ybt возбудителя чумы ассимилирует железо, концентрация которого в чувствительном организме резко снижается в ответ на внедрение патогена. Ybt, в отличие от сидерофоров энтеробактерий, не блокируется липокалином-2 макроорганизма и способствует размножению бактерий [56], что свидетельствует о его роли в патогенезе чумы и ставит его в ряд маркеров вирулентности чумного микроба. Привлекает внимание исследователей в качестве фактора вирулентности и другой железосвязывающий протеин *Y. pestis* – YfeA (YPO2439, y1897) [57]. Белки транспортной системы Zn (2+) YbtX и ZnuABC также необходимы для проявления вирулентных свойств чумного микроба при легочной и бубонной чуме [58].

Расширение технических возможностей способствует не только детальному изучению уже известных макромолекул, но и поиску новых – потенциальных маркеров вирулентности. Технология белковых чипов SELDI (surface enhanced laser desorption/ionization) позволяет определить отдельные белки возбудителя чумы, имеющие отношение к вирулентности [59]. Согласно Chromy B.A. et al. [60], при изучении белковых портретов штаммов возбудителей чумы с использованием масс-спектрометрии получены 24 неизвестных «уникальных» протеина – потенциальные детерминанты вирулентности.

Цикличность существования чумного микроба в природе в различных экологических нишах, включающих чувствительный теплокровный макроорганизм и блох, подразумевает реализацию патогеном различных стратегий выживания с использованием ряда факторов патогенности. Необходимо учитывать особенности изучения вирулентности чумного микроба *in vitro*. Вирулентность чумного микроба целесообразно изучать с использованием культур, выращенных при 37°C – температуре проявления всех основных детерминант вирулентности возбудителя. Выявлено повышение вирулентности культур возбудителя чумы при инкубации клеток в гемолизированных эритроцитах крови человека [61], что связано, в том числе, с активацией ЛПС [62, 63].

Более полное воспроизведение сложных взаимоотношений между микро- и макроорганизмом проводят при моделировании жизнедеятельности чумного микроба в условиях *in vivo* с использованием имплантированных камер и последующим выделением белков – потенциальных маркеров вирулентности – в сравнительном анализе клеток вирулентных и авирулентных штаммов [13, 64].

Вместе с тем с температурной регуляцией факторов вирулентности возбудителя чумы не все так однозначно. По данным Spinner J.L. et al. [65], белки мультимерного токсического комплекса (YitA and YipA), которые защищают чумной микроб от фагоцитоза нейтрофилами на первом этапе инфицирования, максимально синтезируются бактериями в организме блох при температуре 21°C. Кроме того, устойчивость чумного микроба зависит не только от температуры

культивирования. Так, бактерии, выделенные из блох, обладают большей резистентностью к фагоцитозу, чем бактерии, выращенные *in vitro* [66].

Интересно заметить, что один и тот же штамм *Y. pestis* может быть в большей степени вирулентным при проявлении бубонной формы чумы, чем легочной [67], вследствие чего проводят дифференциацию факторов вирулентности по роли в той или иной форме заболевания [36, 39]. Например, в чумном микробе различают 2 системы транспорта марганца: Yfe/Sit и/или MntH. Двойной делеционный мутант по этим белкам демонстрирует 133-кратную потерю вирулентности на модели бубонной чумы у мышей, тогда как на модели легочной чумы вирулентность сохраняется на прежнем уровне [68].

Обращает на себя внимание универсальность отдельных факторов вирулентности различных патогенов. Так, *rip*-оперон, обеспечивающий возможность репликации возбудителя чумы в макрофагах, присутствует также у *Salmonella* и *Burkholderia* [69, 70]. Полифункциональные белки наружной мембраны SurA, липопротеин Брауна (Lpp), NlpD были обнаружены у других видов семейства *Enterobacteriaceae* [71–73]. Очевидно, движущие силы эволюции вирулентных микроорганизмов однонаправлены, что и объясняет единые механизмы взаимодействия с чувствительным макроорганизмом.

Полигостальность возбудителя чумы объясняет множественность проявлений патогенности и неэффективность выбора одного или единичных факторов для оценки патогенности (вирулентности) чумного микроба. Представляет интерес анализ корреляционных связей факторов вирулентности с их принадлежностью к клиническим изолятам чумного микроба, как это было сделано, например, при изучении вибрионов и аэромонад различной экологической принадлежности [74]. В целом исследования, направленные на поиск новых факторов вирулентности чумного микроба, расширяют горизонты нашего представления о патогенезе и иммуногенезе чумы и могут быть использованы для увеличения панели маркеров патогенности *Y. pestis*.

Таким образом, нами обозначены подходы к оценке вирулентности штаммов возбудителя чумы *in vitro*. Наличие генетических маркеров патогенности микроба – первостепенная составляющая вирулентности, анализ экспрессии этих генов – еще один важный шаг на пути дифференциации штаммов по данному показателю. Однако регламентированный комплексный подход к определению вирулентности чумного микроба. В связи с этим результаты, полученные с помощью методов *in vitro*, необходимо сопоставлять с показателем ЛД₅₀ для каждого изучаемого штамма.

Возможные направления развития методических подходов к оценке вирулентности чумного микроба *in vitro* – детекция отдельных молекул нуклеиновых кислот, имеющих отношение к вирулентности, в изотермических условиях [29, 75], создание экспрессных тестов детекции факторов вирулентности для работы в полевых условиях (прототип – иммунохромаграфический тест, но в мультиплексном варианте). Совершенствование методических подходов оценки вирулентности чумного микроба повысит доказательность, рациональность и эффективность профилактических мероприятий при чуме.

Информация о финансировании

Статья подготовлена за счет средств федерального бюджета.

Financial support

The article was prepared at the expense of the federal budget.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Благодарности

Коллектив авторов выражает благодарность за редактирование и поддержку в написании статьи Ю.А.Попову, д.м.н., профессора, и.о. заведующей отделом образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Роспотребнадзора

Литература

1. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. СанПиН 3.3686-21.
2. Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации. МУ 3.1.3.2355-08.
3. Ben-Gurion R, Hertman J. Bacteriocin-like material produced by *Pasteurella pestis*. J Gen Microbiol. 1958 Oct;19(2):289-97. DOI: 10.1099/00221287-19-2-289
4. Higuchi KA, Smith JL. Studies on the nutrition and physiology of *Pasteurella pestis*. VI. A differential plating medium for the estimation of the mutation rate to avirulence. J Bacteriol. 1961 Apr;81(4):605-8. DOI: 10.1128/jb.81.4.605-608.1961
5. Jackson S, Burrows TW. The virulence-enhancing effect of iron on nonpigmented mutants of virulent strains of *Pasteurella pestis*. Br J Exp Pathol. 1956 Dec;37(6):577-83.
6. Madison RR. Fibriolytic specificity of *Bacterium pestis*. Proc Soc Exp Biol Med. 1936;34(3):301-2.
7. Апарин ГП, Тимофеева ЛА. К методике определения вирулентности чумного микроба. Докл. Иркут. противочум. ин-та. 1969;8:35-7.
8. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Под ред. Онищенко ГГ, Кутырева ВВ. М., 2013, 560 с.
9. Russel WMS, Burch R. The Principles of Humane Experimental Technique. London: Methuen and Co. Ltd. 1959, pp. 252.
10. Flecknell P. Replacement, reduction and refinement. ALTEX. 2002;19(2):73-8.
11. Булгакова ЕГ, Сухоносков ИЮ, Кутырев ВВ. Способ определения утраты вирулентности штаммами чумного микроба вследствие потери области пигментации. Патент на изобретение RUS 2288275 27.11.2006.
12. Куклев ВЕ, Осина НА, Бугоркова ТВ, Кутырев ВВ. Набор и способ ускоренной идентификации чумного микроба с одновременной дифференциацией вирулентных и авирулентных штаммов *Yersinia pestis*, определением их плазмидного профиля. Патент на изобретение RUS 2473701 27.01.2013.
13. Соломенцев ВИ, Кадникова ЛА, Кисличкина АА, Майская НВ, Комбарова ТИ, Платонов МЕ, и др. Сравнительное секвенирование транскриптомов культур *Yersinia pestis* subsp. *microti* bv. *ulegeica*, отличающихся по вирулентности для морских свинок. Бактериология. 2017;2(2):30-5. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-30-35
14. Andersson JA, Sha J, Erova TE, Fitts EC, Ponnusamy D, Kozlova EV, Kirtley ML, Chopra AK. Identification of New Virulence Factors and Vaccine Candidates for *Yersinia pestis*. Front Cell Infect Microbiol. 2017 Oct 17;7:448. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00448
15. Подладчикова ОН. Современные представления о молекулярных механизмах патогенеза чумы. Проблемы особо опасных инфекций. 2017;3:33-40. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-33-40
16. Galindo CL, Sha J, Moen ST, Agar SL, Kirtley ML, Foltz SM, et al. Comparative global gene expression profiles of wild-type *Yersinia pestis* C092 and its braun lipoprotein mutant at flea and human body temperatures. Comp Funct Genomics. 2010;2010:342168. DOI: 10.1155/2010/342168
17. Kim TJ, Chauhan S, Motin VL, Goh EB, Igo MM, Young GM. Direct transcriptional control of the plasminogen activator gene of *Yersinia pestis* by the cyclic AMP receptor protein. J Bacteriol. 2007 Dec;189(24):8890-900. DOI: 10.1128/JB.00972-07
18. Zhan L, Yang L, Zhou L, Li Y, Gao H, Guo Z, et al. Direct and negative regulation of the *sycO-ypkA-yopJ* operon by cyclic AMP receptor protein (CRP) in *Yersinia pestis*. BMC Microbiol. 2009 Aug 25;9:178. DOI: 10.1186/1471-2180-9-178
19. Дятлов ИА, Кутырев ВВ, Храмов МВ. Питательные среды для выделения, культивирования и идентификации возбудителей особо опасных инфекций бактериальной природы. М., 2012, 415 с.
20. Домарадский ИВ. Чума. М.: «Медицина»; 1998, 176 с.
21. Кравцов АЛ. Проточно-цитофлуориметрическое исследование бактерицидных гранул в фагоцитах крови животных с различной видовой чувствительностью к экспериментальному заражению чумой. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2015;1:23-31.
22. Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. Clin Microbiol Rev. 2003 Jul;16(3):379-414. DOI: 10.1128/CMR.16.3.379-414.2003
23. Дмитриевский АМ. Профилактика и меры борьбы с чумой. Материалы межгосударственной научной конференции, посвященной 100-летию открытия возбудителя чумы (6-7 сентября 1994 г., Алматы). Алматы, 1994, с. 15-16.
24. Анисимов АП. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 1. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2002;3:3-23.
25. Сомова ЛМ, Шубин ФН, Дробот ЕИ, Плехова НГ, Ляпун ИН. Плазмид-ассоциированная вирулентность *Yersinia pseudotuberculosis* и инфекционный процесс. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2016;6:74-85. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-6-74-85
26. Brodsky IE, Medzhitov R. Reduced secretion of YopJ by *Yersinia* limits *in vivo* cell death but enhances bacterial virulence. PLoS Pathog. 2008;4:e1000067. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000067
27. Monack D, Falkow S. Apoptosis as a common bacterial virulence strategy. Int J Med Microbiol. 2000 Mar;290(1):7-13. DOI: 10.1016/S1438-4221(00)80096-X
28. Сазанова ЕВ, Шмелькова ТП, Кравцов АЛ, Малюкова ТА, Попов ЮА. Проточно-цитофлуориметрический анализ цитотоксичности штаммов *Yersinia pestis*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2017;6:3-9. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-6-3-9
29. Пустовалов ВЛ, Васильева ГИ, Киселева АК. Устойчивость к фагоцитозу вирулентных штаммов чумного микроба в зависимости от температуры культивирования. Вопросы профилактики природноочаговых инфекций. Саратов, 1983.
30. Pujol C, Grabenstein JP, Perry RD, Bliska JB. Replication of *Yersinia pestis* in interferon gamma-activated macrophages requires *ripA*, a gene encoded in the pigmentation locus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Sep 6;102(36):12909-14. DOI: 10.1073/pnas.0502849102
31. Torres R, Swift RV, Chim N, Wheatley N, Lan B, Atwood BR, et al. Biochemical, structural and molecular dynamics analyses of the potential virulence factor RipA from *Yersinia pestis*. PLoS One. 2011;6(9):e25084. DOI: 10.1371/journal.pone.0025084
32. Torres R, Chim N, Sankaran B, Pujol C, Bliska JB, Goulding CW. Structural insights into RipC, a putative citrate lyase β subunit from a *Yersinia pestis* virulence

- operon. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2012 Jan 1;68(Pt 1):2-7. DOI: 10.1107/S1744309111048056
33. Southern SJ, Scott AE, Jenner DC, Ireland PM, Norville IH, Sarkar-Tyson M. Survival protein A is essential for virulence in *Yersinia pestis*. Microb Pathog. 2016 Mar;92:50-53. DOI: 10.1016/j.micpath.2015.12.013
 34. Sha J, Agar LS, Baze WB, Olano JP, Fad AA, Erova TE, et al. Braun lipoprotein (Lpp) contributes to virulence of *Yersiniae*: potential role of Lpp in inducing bubonic and pneumonic plague. Infect Immun. 2008 Apr;76(4):1390-409. DOI: 10.1128/IAI.01529-07
 35. Tidhar A, Flashner Y, Cohen S, Levi Y, Zauberman A, Gur D, et al. The NlpD lipoprotein is a novel *Yersinia pestis* virulence factor essential for the development of plague. PLoS One. 2009 Sep 14;4(9):e7023. DOI: 10.1371/journal.pone.0007023
 36. Seo KS, Kim JW, Park JY, Viall AK, Minnich SS, Rohde HN, et al. Role of a new intimin/invasin-like protein in *Yersinia pestis* virulence. Infect Immun. 2012 Oct;80(10):3559-69. DOI: 10.1128/IAI.00294-12
 37. Sha J, Kirtley LM, van Lier CJ, Wang S, Erova TE, Kozlova EV, et al. Deletion of the Braun lipoprotein-encoding gene and altering the function of lipopolysaccharide attenuate the plague bacterium. Infect Immun. 2013 Mar;81(3):815-28. DOI: 10.1128/IAI.01067-12
 38. Dentovskaya SV, Ivanov SA, Kopylov PKh, Shaikhutdinova RZ, Platonov ME, Kombarova TI, Gapeľ'chenkova TV, Balakhonov SV, Anisimov AP. Selective Protective Potency of *Yersinia pestis* Δ nlpD Mutants. Acta Naturae. 2015 Jan-Mar;7(1):102-8.
 39. Lathem WW, Price PA, Miller VL, Goldman WE. A plasminogen-activating protease specifically controls the development of primary pneumonic plague. Science. 2007 Jan 26;315(5811):509-13. DOI: 10.1126/science.1137195
 40. Eren E, van den Berg B. Structural basis for activation of an integral membrane protease by lipopolysaccharide. J Biol Chem. 2012 Jul 6;287(28):23971-6. DOI: 10.1074/jbc.M112.376418
 41. Kolodziejek AM, Hovde CJ, Minnich SA. *Yersinia pestis* Ail: multiple roles of a single protein. Front Cell Infect Microbiol. 2012 Aug 6;2:103. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00103
 42. Ke Y, Chen Z, Yang R. *Yersinia pestis*: mechanisms of entry into and resistance to the host cell. Front Cell Infect Microbiol. 2013 Dec 24;3:106. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00106
 43. Pierson DE. Mutations affecting lipopolysaccharide enhance ail-mediated entry of *Yersinia enterocolitica* into mammalian cells. J Bacteriol. 1994 Jul;176(13):4043-51. DOI: 10.1128/jb.176.13.4043-4051.1994
 44. Sebbane F, Jarrett C, Gardner D, Long D, Hinnebusch B. Role of the *Yersinia pestis* plasminogen activator in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(14):5526-5530. DOI: 10.1073/pnas.0509544103
 45. Sodeinde OA, Subrahmanyam YV, Stark K, Quan T, Bao Y, Goguen JD. A surface protease and the invasive character of plague. Science. 1992;258(5084):1004-7. DOI: 10.1126/science.1439793
 46. Hinnebusch BJ, Jarrett CO, Callison JA, Gardner D, Buchanan SK, Plano GV. Role of the *Yersinia pestis* Ail protein in preventing a protective polymorphonuclear leukocyte response during bubonic plague. Infect Immun. 2011;79(12):4984-9. DOI: 10.1128/IAI.05307-11
 47. Курбанов АИ. Антиоксидантные ферменты микроорганизмов как потенциальные факторы патогенности. Международный медицинский журнал. 2009;15(1):136-9.
 48. Beaman B, Black C, Doughty F, Beaman L. Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*: importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils. Infect Immun. 1985;47:135-41.
 49. Mandell G. Catalase, superoxide dismutase and virulence in *Staphylococcus aureus*: *in vitro* and *in vivo* studies with emphasis on staphylococcal-leukocyte interaction. J Clin Invest. 1975;55:561-66.
 50. Rockenmacher M. Relationship of catalase activity to virulence in *Pasteurella pestis*. Proc Soc Exp Biol Med. 1949;71:99-101.
 51. Джапаридзе МН. Влияние условий выращивания на каталазную активность чумного и псевдотуберкулезного микробов. Труды института «Микроб». 1960;4:148-51.
 52. Видяева НА, Гаева АВ, Куклева ЛМ, Одинокоев ГН, Кутырев ВВ. Сравнительная характеристика антиокислительных ферментов штаммов *Yersinia pestis* различных подвидов и *Yersinia pseudotuberculosis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2008;96:29-32.
 53. Garcia E, Nedialkov YA, Elliott J, Motin VL, Brubaker RR. Molecular characterization of KatY (antigen 5), a thermoregulated chromosomally encoded catalase-peroxidase of *Yersinia pestis*. J Bacteriol. 1999 May;181(10):3114-22. DOI: 10.1128/JB.181.10.3114-3122.1999
 54. Marcheva D, Nicolova S, Veljanov D. О распространении каталазной активности у бактерий рода *Yersinia*. Докл. Болг. АН. 1988;41(3):57-60.
 55. Mehig R, Brubaker R. Major stable peptides of *Yersinia pestis* synthesized during the low-calcium response. Infect Immun. 1993;61(1):13-22.
 56. Perry R, Fetherston J. Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. Microbes Infect. 2011;13(10):808-17. DOI.org/10/106/j.micinf.2011.04.008
 57. Radka CD, DeLucas LJ, Wilson LS, Lawrenz MB, Perry RD, Aller SG. Crystal structure of *Yersinia pestis* virulence factor YfeA reveals two polyspecific metal-binding sites. Acta Crystallogr D Struct Biol. 2017 Jul 1;73(Pt 7):557-572. DOI: 10.1107/S2059798317006349
 58. Bobrov AG, Kirillina OA, Fosso MY, Fetherston JD, Miller MC, VanCleave TT, et al. Zinc transporters YbtX and ZnuABC are required for the virulence of *Yersinia pestis* in bubonic and pneumonic plague in mice. Metallomics. 2017;9(6):757-772. DOI: 10.1039/c7mt00126f
 59. Thulasiraman V, McCutchen-Maloney SL, Motin VL, Garcia E. Detection and identification of virulence factors in *Yersinia pestis* using SELDI ProteinChip system. Biotechniques. 2001 Feb;30(2):428-32. DOI: 10.2144/01302pf02
 60. Chromy BA, Choi MW, Murphy GA, Gonzales AD, Corzett CH, Chang BC, Fitch JP, McCutchen-Maloney SL. Proteomic characterization of *Yersinia pestis* virulence. J Bacteriol. 2005 Dec;187(23):8172-80. DOI: 10.1128/JB.187.23.8172-8180.2005
 61. Кравцов АН, Тынянова ВИ, Зюзина ВП. Повышение вирулентности бактерий *Yersinia pestis* при инкубации клеток в гемолизированных эритроцитах крови человека. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1993;4:3-9.
 62. Тынянова ВИ, Демидова ГВ, Зюзина ВП, Анисимов БИ, Плетницкий АЭ. Гликолипид – биоактиватор токсических субстанций чумного микроба. Биотехнология. 1999;2:28-33.
 63. Тынянова ВИ, Зюзина ВП, Демидова ГВ, Соколова ЕП. Специфичность иммуномодулирующего действия эндотоксина чумного микроба. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016;3:104-12.
 64. Куляш ГЮ, Головки ЕМ, Ляпин МН. Изучение белковой экспрессии *Yersinia pestis* в динамике длительного культивирования *in vivo*. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 1991;8:16-20.
 65. Spinner JL, Carmody AB, Jarrett CO, Hinnebusch BJ. Role of *Yersinia pestis* toxin complex family proteins in resistance to phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. Infect Immun. 2013;81(11):4041-52. DOI: 10.1128/IAI.00648-13
 66. Vadyvaloo V, Jarrett C, Sturdevant DE, Sebbane F, Hinnebusch BJ. Transit through the flea vector induces a pretransmission innate immunity resistance phenotype in *Yersinia pestis*. PLoS Pathog. 2010;6(2): e1000783. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000783
 67. Lawrenz MB, Lenz JD, Miller VL. A novel autotransporter adhesin is required for efficient colonization during bubonic plague. Infect Immun. 2009 Jan;77(1):317-26. DOI: 10.1128/IAI.01206-08
 68. Perry RD, Craig SK, Abney J, Bobrov AG, Kirillina O, Mier I, et al. Manganese transporters Yfe and MntH are Fur-regulated and important for the virulence of

- Yersinia pestis*. Microbiology (Reading). 2012 Mar;158(Pt 3):804-815. DOI: 10.1099/mic.0.053710-0
69. Haneda T, Ishii Y, Danbara H, Okada N. Genome-wide identification of novel genomic islands that contribute to *Salmonella* virulence in mouse systemic infection. FEMS Microbiol Lett. 2009 Aug;297(2):241-9. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01686.x
 70. Shi L, Adkins JN, Coleman JR, Schepmoes AA, Dohnkova A, Mottaz HM, et al. Proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolated from RAW 264.7 macrophages: identification of a novel protein that contributes to the replication of serovar typhimurium inside macrophages. J Biol Chem. 2006 Sep 29;281(39):29131-40. DOI: 10.1074/jbc.M604640200
 71. Tormo A, Almirón M, Kolter R. *surA*, an *Escherichia coli* gene essential for survival in stationary phase. J Bacteriol. 1990 Aug;172(8):4339-47. DOI: 10.1128/jb.172.8.4339-4347.1990
 72. Hantke K, Braun V. Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane. Eur J Biochem. 1973 Apr;34(2):284-96. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1973.tb02757.x
 73. Lange R, Hengge-Aronis R. The *nlpD* gene is located in an operon with *rpoS* on the *Escherichia coli* chromosome and encodes a novel lipoprotein with a potential function in cell wall formation. Mol Microbiol. 1994 Aug;13(4):733-43. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00466.x
 74. Бухарин ОВ, Бойко АВ, Журавлева ЛА. Факторы персистенции и (или) патогенности вибрионов и аэромонад различной экологической принадлежности. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1998;5:30-33.
 75. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. Science. 2017 Apr 28;356(6336):438-442. DOI: 10.1126/science.aam9321
- virulent and avirulent strains of *Yersinia pestis*, determination of their plasmid profile. Patent for the invention RUS 2473701 27.01.2013. (In Russian).
13. Solomentsev VI, Kadnikova LA, Kislichkina AA, Mayskaya NV, Kombarova TI, Platonov ME, et al. Comparative sequencing of transcriptomes of *Yersinia pestis* subsp. *microti* bv. *ulegeica*, different by virulence for guinea pigs. Bacteriology. 2017;2(2):30-5. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-30-35 (In Russian).
 14. Andersson JA, Sha J, Erova TE, Fitts EC, Ponnusamy D, Kozlova EV, Kirtley ML, Chopra AK. Identification of New Virulence Factors and Vaccine Candidates for *Yersinia pestis*. Front Cell Infect Microbiol. 2017 Oct 17;7:448. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00448
 15. Podladchikova ON. Modern views on molecular mechanisms of plague pathogenesis. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections). 2017;3:33-40. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-33-40 (In Russian).
 16. Galindo CL, Sha J, Moen ST, Agar SL, Kirtley ML, Foltz SM, et al. Comparative global gene expression profiles of wild-type *Yersinia pestis* C092 and its braun lipoprotein mutant at flea and human body temperatures. Comp Funct Genomics. 2010;2010:342168. DOI: 10.1155/2010/342168
 17. Kim TJ, Chauhan S, Motin VL, Goh EB, Igo MM, Young GM. Direct transcriptional control of the plasminogen activator gene of *Yersinia pestis* by the cyclic AMP receptor protein. J Bacteriol. 2007 Dec;189(24):8890-900. DOI: 10.1128/JB.00972-07
 18. Zhan L, Yang L, Zhou L, Li Y, Gao H, Guo Z, et al. Direct and negative regulation of the *sycO-ypkA-yopJ* operon by cyclic AMP receptor protein (CRP) in *Yersinia pestis*. BMC Microbiol. 2009 Aug 25;9:178. DOI: 10.1186/1471-2180-9-178
 19. Dyatlov IA, Kutuyev VV, Khramov MV. Nutrient media for isolation, cultivation and identification of pathogens of particularly dangerous bacterial infections. Moscow, 2012, 415 p. (In Russian).
 20. Domaradskii IV. The plague. Moscow: "Meditsina" Publ.; 1998, 176 p. (In Russian).
 21. Kravtsov AL. Flow-cytofluorometric study of bactericidal granules in blood phagocytes of animals with various species sensitivity to experimental plague infection. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2015;1:23-31. (In Russian).
 22. Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. Clin Microbiol Rev. 2003 Jul;16(3):379-414. DOI: 10.1128/CMR.16.3.379-414.2003
 23. Dmitrovskii AM. Prevention and measures to combat the plague. Proceedings of the Scientific Conference dedicated to the 100th anniversary of the discovery of the causative agent of the plague (September 6–7, 1994, Almaty). Almaty, 1994, pp. 15–16. (In Russian).
 24. Anisimov AP. *Yersinia pestis* factors, assuring circulation and maintenance of the plague pathogen in natural foci ecosystems. Report 1. Molecular Genetics, Microbiology and Virology (Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya). 2002;3:3-23. (In Russian).
 25. Somova LM, Shubin FN, Drobot EI, Plekhova NG, Lyapun IN. Plasmid-associated virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* and infectious process. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2016;6:74-85. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-6-74-85 (In Russian).
 26. Brodsky IE, Medzhitov R. Reduced secretion of YopJ by *Yersinia* limits *in vivo* cell death but enhances bacterial virulence. PLoS Pathog. 2008;4:e1000067. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000067
 27. Monack D, Falkow S. Apoptosis as a common bacterial virulence strategy. Int J Med Microbiol. 2000 Mar;290(1):7-13. DOI: 10.1016/S1438-4221(00)80096-X
 28. Sazanova EV, Shmelkova TP, Kravtsov AL, Malyukova TA, Popov YuA. Flow-cytofluorimetric analysis of cytotoxicity of *Yersinia pestis* strains. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2017;6:3-9. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-6-3-9 (In Russian).
 29. Pustovalov VL, Vasil'eva GI, Kiseleva AK. Resistance to phagocytosis of virulent strains of the plague microbe depending on the cultivation temperature. Issues of prevention of natural focal infections. Saratov, 1983. (In Russian).

References

1. Sanitary and epidemiological requirements for the prevention of infectious diseases. SanPiN 3.3686-21. (In Russian).
2. Organization and conduct of epidemiological surveillance in natural plague foci on the territory of the Russian Federation. MU 3.1.3.2355-08. (In Russian).
3. Ben-Gurion R, Hertman J. Bacteriocin-like material produced by *Pasteurella pestis*. J Gen Microbiol. 1958 Oct;19(2):289-97. DOI: 10.1099/00221287-19-2-289
4. Higuchi KA, Smith JL. Studies on the nutrition and physiology of *Pasteurella pestis*. VI. A differential plating medium for the estimation of the mutation rate to avirulence. J Bacteriol. 1961 Apr;81(4):605-8. DOI: 10.1128/jb.81.4.605-608.1961
5. Jackson S, Burrows TW. The virulence-enhancing effect of iron on nonpigmented mutants of virulent strains of *Pasteurella pestis*. Br J Exp Pathol. 1956 Dec;37(6):577-83.
6. Madison RR. Fibriolytic specificity of *Bacterium pestis*. Proc Soc Exp Biol Med. 1936;34(3):301-2.
7. Aparin GP, Timofeeva LA. K metodike opredeleniya virulentnosti chumnogo mikroba. Proceedings of Irkutsk Antiplague Institute. 1969;8:35-7. (In Russian).
8. Laboratory diagnostics of dangerous infectious diseases. Edited by Onishchenko GG, Kutuyev VV. Moscow, 2013, 560 p. (In Russian).
9. Russel WMS, Burch R. The Principles of Humane Experimental Technique. London: Methuen and Co. Ltd. 1959, pp. 252.
10. Flecknell P. Replacement, reduction and refinement. ALTEX. 2002;19(2):73-8.
11. Bulgakova EG, Sukhonosov IYu, Kutuyev VV. A method for determining the loss of virulence by plague microbe strains due to the loss of pigmentation area. Patent for the invention RUS 2288275 27.11.2006. (In Russian).
12. Kuklev VE, Osina NA, Bugorkova TV, Kutuyev VV. A set and a method for accelerated identification of a plague microbe with simultaneous differentiation of

30. Pujol C, Grabenstein JP, Perry RD, Bliska JB. Replication of *Yersinia pestis* in interferon gamma-activated macrophages requires *ripA*, a gene encoded in the pigmentation locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Sep 6;102(36):12909-14. DOI: 10.1073/pnas.0502849102
31. Torres R, Swift RV, Chim N, Wheatley N, Lan B, Atwood BR, et al. Biochemical, structural and molecular dynamics analyses of the potential virulence factor RipA from *Yersinia pestis*. *PLoS One*. 2011;6(9):e25084. DOI: 10.1371/journal.pone.0025084
32. Torres R, Chim N, Sankaran B, Pujol C, Bliska JB, Goulding CW. Structural insights into RipC, a putative citrate lyase β subunit from a *Yersinia pestis* virulence operon. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2012 Jan 1;68(Pt 1):2-7. DOI: 10.1107/S1744309111048056
33. Southern SJ, Scott AE, Jenner DC, Ireland PM, Norville IH, Sarkar-Tyson M. Survival protein A is essential for virulence in *Yersinia pestis*. *Microb Pathog*. 2016 Mar;92:50-53. DOI: 10.1016/j.micpath.2015.12.013
34. Sha J, Agar LS, Baze WB, Olano JP, Fad AA, Erova TE, et al. Braun lipoprotein (Lpp) contributes to virulence of *Yersiniae*: potential role of Lpp in inducing bubonic and pneumonic plague. *Infect Immun*. 2008 Apr;76(4):1390-409. DOI: 10.1128/IAI.01529-07
35. Tidhar A, Flashner Y, Cohen S, Levi Y, Zauberman A, Gur D, et al. The NlpD lipoprotein is a novel *Yersinia pestis* virulence factor essential for the development of plague. *PLoS One*. 2009 Sep 14;4(9):e7023. DOI: 10.1371/journal.pone.0007023
36. Seo KS, Kim JW, Park JY, Viall AK, Minnich SS, Rohde HN, et al. Role of a new intimin/invasin-like protein in *Yersinia pestis* virulence. *Infect Immun*. 2012 Oct;80(10):3559-69. DOI: 10.1128/IAI.00294-12
37. Sha J, Kirtley LM, van Lier CJ, Wang S, Erova TE, Kozlova EV, et al. Deletion of the Braun lipoprotein-encoding gene and altering the function of lipopolysaccharide attenuate the plague bacterium. *Infect Immun*. 2013 Mar;81(3):815-28. DOI: 10.1128/IAI.01067-12
38. Dentovskaya SV, Ivanov SA, Kopylov PKh, Shaikhutdinova RZ, Platonov ME, Kombarova TI, Gapel'chenkova TV, Balakhonov SV, Anisimov AP. Selective Protective Potency of *Yersinia pestis* Δ nlpD Mutants. *Acta Naturae*. 2015 Jan-Mar;7(1):102-8.
39. Lathem WW, Price PA, Miller VL, Goldman WE. A plasminogen-activating protease specifically controls the development of primary pneumonic plague. *Science*. 2007 Jan 26;315(5811):509-13. DOI: 10.1126/science.1137195
40. Eren E, van den Berg B. Structural basis for activation of an integral membrane protease by lipopolysaccharide. *J Biol Chem*. 2012 Jul 6;287(28):23971-6. DOI: 10.1074/jbc.M112.376418
41. Kolodziejek AM, Hovde CJ, Minnich SA. *Yersinia pestis* Ail: multiple roles of a single protein. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012 Aug 6;2:103. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00103
42. Ke Y, Chen Z, Yang R. *Yersinia pestis*: mechanisms of entry into and resistance to the host cell. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 Dec 24;3:106. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00106
43. Pierson DE. Mutations affecting lipopolysaccharide enhance ail-mediated entry of *Yersinia enterocolitica* into mammalian cells. *J Bacteriol*. 1994 Jul;176(13):4043-51. DOI: 10.1128/jb.176.13.4043-4051.1994
44. Sebbane F, Jarrett C, Gardner D, Long D, Hinnebusch B. Role of the *Yersinia pestis* plasminogen activator in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(14):5526-5530. DOI: 10.1073/pnas.0509544103
45. Sodeinde OA, Subrahmanyam YV, Stark K, Quan T, Bao Y, Goguen JD. A surface protease and the invasive character of plague. *Science*. 1992;258(5084):1004-7. DOI: 10.1126/science.1439793
46. Hinnebusch BJ, Jarrett CO, Callison JA, Gardner D, Buchanan SK, Plano GV. Role of the *Yersinia pestis* Ail protein in preventing a protective polymorphonuclear leukocyte response during bubonic plague. *Infect Immun*. 2011;79(12):4984-9. DOI: 10.1128/IAI.05307-11
47. Kurbanov AI. Antioxidant enzymes of microorganisms as potential factors of pathogenicity. *International Medical Journal*2009;15(1):136-9. (In Russian).
48. Beaman B, Black C, Doughty F, Beaman L. Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*: importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun*. 1985;47:135-41.
49. Mandell G. Catalase, superoxide dismutase and virulence in *Staphylococcus aureus*: *in vitro* and *in vivo* studies with emphasis on staphylococcal-leukocyte interaction. *J Clin Invest*. 1975;55:561-66.
50. Rockenmacher M. Relationship of catalase activity to virulence in *Pasteurella pestis*. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1949;71:99-101.
51. Dzhaparidze MN. Influence of growing conditions on catalase activity of plague and pseudotuberculous microbes. *Proceedings of the Microbe Institute*.1960;4:148-51. (In Russian).
52. Vidyayeva NA, Gaeva AV, Koukleva LM, Odinkov GN, Kutyrev VV. Comparative characteristics of antioxidative enzymes of *Yersinia pestis* strains of different subspecies and *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections)*. 2008;96:29-32. (In Russian).
53. Garcia E, Nedialkov YA, Elliott J, Motin VL, Brubaker RR. Molecular characterization of KatY (antigen 5), a thermoregulated chromosomally encoded catalase-peroxidase of *Yersinia pestis*. *J Bacteriol*. 1999 May;181(10):3114-22. DOI: 10.1128/JB.181.10.3114-3122.1999
54. Marcheva D, Nicolova S, Veljanov D. O rasprostraneni katalaznoi aktivnosti u bakterii roda *Yersinia*. *Dokl. Bolg. AN*. 1988;41(3):57-60. (In Russian).
55. Mehig R, Brubaker R. Major stable peptides of *Yersinia pestis* synthesized during the low-calcium response. *Infect Immun*. 1993;61(1):13-22.
56. Perry R, Fetherston J. Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. *Microbes Infect*. 2011;13(10):808-17. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.04.008
57. Radka CD, DeLucas LJ, Wilson LS, Lawrenz MB, Perry RD, Aller SG. Crystal structure of *Yersinia pestis* virulence factor YfeA reveals two polyspecific metal-binding sites. *Acta Crystallogr D Struct Biol*. 2017 Jul 1;73(Pt 7):557-572. DOI: 10.1107/S2059798317006349
58. Bobrov AG, Kirillina OA, Fosso MY, Fetherston JD, Miller MC, VanCleave TT, et al. Zinc transporters YbtX and ZnuABC are required for the virulence of *Yersinia pestis* in bubonic and pneumonic plague in mice. *Metallomics*. 2017;9(6):757-772. DOI: 10.1039/c7mt00126f
59. Thulasiraman V, McCutchen-Maloney SL, Motin VL, Garcia E. Detection and identification of virulence factors in *Yersinia pestis* using SELDI ProteinChip system. *Biotechniques*. 2001 Feb;30(2):428-32. DOI: 10.2144/01302pf02
60. Chromy BA, Choi MW, Murphy GA, Gonzales AD, Corzett CH, Chang BC, Fitch JP, McCutchen-Maloney SL. Proteomic characterization of *Yersinia pestis* virulence. *J Bacteriol*. 2005 Dec;187(23):8172-80. DOI: 10.1128/JB.187.23.8172-8180.2005
61. Kravtsov AN, Tynyanova VI, Zyuzina VP. Povyshenie virulentnosti bakterii *Yersinia pestis* pri inkubatsii kletok v gemolizirovannykh eritrotsitakh krovi cheloveka. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1993;4:3-9. (In Russian).
62. Tynyanova VI, Demidova GV, Zyuzina VP, Anisimov BI, Pletnitskii AE. Glikolipid – bioaktivator toksicheskikh substantsii chumnogo mikroba. *Biotechnologiya (Biotechnology)*. 1999;2:28-33. (In Russian).
63. Tynyanova VI, Zyuzina VP, Demidova GV, Sokolova EP. Specificity of immune modulating effect of *Yersinia pestis* endotoxin. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2016;3:104-12.
64. Kulyash GYu, Golovko EM, Lyapin MN. Izuchenie belkovoi ekspressii *Yersinia pestis* v dinamike dlitel'nogo kul'tivirovaniya *in vivo*. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology (Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya)*. 1991;8:16-20. (In Russian).

65. Spinner JL, Carmody AB, Jarrett CO, Hinnebusch BJ. Role of *Yersinia pestis* toxin complex family proteins in resistance to phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun*. 2013;81(11):4041-52. DOI: 10.1128/IAI.00648-13
66. Vadyvaloo V, Jarrett C, Sturdevant DE, Sebbane F, Hinnebusch BJ. Transit through the flea vector induces a pretransmission innate immunity resistance phenotype in *Yersinia pestis*. *PLoS Pathog*. 2010;6(2): e1000783. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000783
67. Lawrenz MB, Lenz JD, Miller VL. A novel autotransporter adhesin is required for efficient colonization during bubonic plague. *Infect Immun*. 2009 Jan;77(1):317-26. DOI: 10.1128/IAI.01206-08
68. Perry RD, Craig SK, Abney J, Bobrov AG, Kirillina O, Mier I, et al. Manganese transporters Yfe and MntH are Fur-regulated and important for the virulence of *Yersinia pestis*. *Microbiology (Reading)*. 2012 Mar;158(Pt 3):804-815. DOI: 10.1099/mic.0.053710-0
69. Haneda T, Ishii Y, Danbara H, Okada N. Genome-wide identification of novel genomic islands that contribute to *Salmonella* virulence in mouse systemic infection. *FEMS Microbiol Lett*. 2009 Aug;297(2):241-9. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01686.x
70. Shi L, Adkins JN, Coleman JR, Schepmoes AA, Dohnkova A, Mottaz HM, et al. Proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolated from RAW 264.7 macrophages: identification of a novel protein that contributes to the replication of serovar typhimurium inside macrophages. *J Biol Chem*. 2006 Sep 29;281(39):29131-40. DOI: 10.1074/jbc.M604640200
71. Tormo A, Almirón M, Kolter R. *surA*, an *Escherichia coli* gene essential for survival in stationary phase. *J Bacteriol*. 1990 Aug;172(8):4339-47. DOI: 10.1128/jb.172.8.4339-4347.1990
72. Hantke K, Braun V. Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur J Biochem*. 1973 Apr;34(2):284-96. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1973.tb02757.x
73. Lange R, Hengge-Aronis R. The *nlpD* gene is located in an operon with *rpoS* on the *Escherichia coli* chromosome and encodes a novel lipoprotein with a potential function in cell wall formation. *Mol Microbiol*. 1994 Aug;13(4):733-43. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00466.x
74. Bukharin OV, Boiko AV, Zhuravleva LA. Factors of persistence and (or) pathogenicity in vibrios and aeromonads belonging to different ecotopes. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 1998;5:30-33. (In Russian).
75. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*. 2017 Apr 28;356(6336):438-442. DOI: 10.1126/science.aam9321

Информация об авторах:

Сазанова Елена Владимировна, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5230
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Малюкова Татьяна Анатольевна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5230
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Information about authors:

Elena V. Sazanova, PhD (Biological Sciences), Researcher of the Department of Educational Programs and Training of Specialists, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of the Rospotrebnadzor
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5230
E-mail: rusrapi@microbe.ru

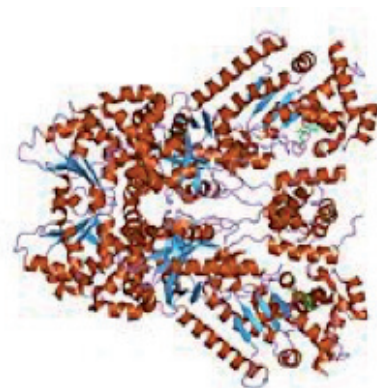
Tatyana A. Malyukova, MD, PhD, Leading Researcher of the Department of Educational Programs and Training of Specialists, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of the Rospotrebnadzor
Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5230
E-mail: rusrapi@microbe.ru

НОВОСТИ НАУКИ

Новое исследование показывает, как европейцы выработали большую сопротивляемость сибирской язве

На протяжении тысячелетий люди и сибирская язва развивались совместно. Согласно исследованию в *Nature Communications* из лаборатории Чарльза Данко, это привело к тому, что у людей, особенно у людей европейского происхождения, вырабатывалось меньше рецепторов сибирской язвы, которые позволяют болезни закрепиться в организме.

Развитие животноводства и охоты увеличило подверженность человека зоонозным патогенам. Чтобы понять, как зоонозное заболевание могло повлиять на эволюцию человека, изучали изменения экспрессии у человека рецептора токсина сибирской язвы 2 (ANTXR2), который кодирует белок клеточной поверхности, необходимый для токсинов вирулентности *Bacillus anthracis*, вызывающих сибирскую язву. В иммунных клетках ANTXR2 подавляется в 8 раз во всех доступных человеческих образцах по сравнению с нечеловеческими приматами, что указывает на регуляторные изменения на ранней стадии эволюции современного человека. Обнаружены множественные генетические признаки, согласующиеся с недавним положительным отбором, приводящим к специфическому для Европы снижению экспрессии ANTXR2 во множестве тканей, пораженных токсинами сибирской язвы. Эти наблюдения соответствуют модели, в которой люди адаптировались к болезни сибирской язвы после ранних экологических изменений, связанных с охотой, а также во второй период адаптации после подъема современного сельского хозяйства.



Choate LA, Barshad G, McMahon PW, Said I, Rice EJ, Munn PR, Lewis JJ, Danko CG. Multiple stages of evolutionary change in anthrax toxin receptor expression in humans. *Nat Commun*. 2021 Nov 15;12(1):6590. DOI: 10.1038/s41467-021-26854-z.