

Н.А.Осина, А.М.Сеничкина, Т.В.Бугоркова, С.А.Щербакова

РАЗРАБОТКА АМПЛИФИКАЦИОННЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ

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

Разработан способ обнаружения ДНК туляремийного микроба методом ПЦР с электрофоретическим и гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов. В качестве ДНК-матрицы выбраны гены *iglBC*, которые являются видоспецифичными для возбудителя туляремии. На основе полученных результатов созданы препараты для выявления ДНК туляремийного микроба в биологическом материале и объектах окружающей среды методом ПЦР с учетом результатов методом электрофореза и в режиме реального времени: «Ген *Francisella tularensis* – РЭФ» и «Ген *Francisella tularensis* – РФФ» соответственно. Определена форма комплектации данных тест-систем. Чувствительность и специфичность сконструированных наборов определена при исследовании бактериальных взвесей туляремийного микроба, суспензий органов мелких млекопитающих, клещей, блох, комаров, проб почвы, воды открытых водоемов, мокроты и крови человека, искусственно контаминированных возбудителем туляремии. Установлена высокая чувствительность – $1 \cdot 10^3$ м.к./мл и специфичность – 100 % разработанных тест-систем вне зависимости от вида исследуемого материала.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, ДНК, ПЦР в режиме реального времени, детекция, наборы реагентов.

N.A.Osina, A.M.Senichkina, T.V.Bugorkova, S.A.Shcherbakova

Development of Amplification Test-Systems for Tularemia Agent Detection

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

Developed is the method for tularemia microbe DNA detection using PCR with electrophoretic and hybridization-fluorescent registration of results. *iglBC* genes have been chosen as DNA-matrixes, being species-specific ones for tularemia agent. Based on the results obtained constructed have been preparations for tularemia microbe DNA detection in biological material and environmental samples applying PCR with electrophoretic registration of results and real-time PCR: “Gene *Francisella tularensis* – REP” and “Gene *Francisella tularensis* RHF”, respectively. Identified are the package contents to be included into the test-systems. Sensitivity and specificity of the designed panels are validated through investigations of tularemia agent bacterial emulsions and suspensions from small mammals’ organs, from ticks, fleas and mosquitoes, as well as through studies of soil and surface water samples, sputum and human blood probes, experimentally contaminated with tularemia agent. Test-systems demonstrate high sensitivity ($1 \cdot 10^3$ microbe cells/ml) and specificity (100 %), irrespective of the type of test material.

Key words: *Francisella tularensis*, DNA, real-time PCR, detection, reagent panels.

По данным Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2013 году», за последние годы отмечается активизация природно-очаговых болезней, расширяется их ареал. В 2012 г. заболеваемость туляремией увеличилась по сравнению с 2011 г. в 2,2 раза. Последняя вспышка данной инфекции зарегистрирована в 2013 г. в Ханты-Мансийском автономном округе, где число заболевших составило 1005 человек. Кроме того, возбудитель туляремии, по причине высокой контагиозности, отнесен к наиболее опасным агентам биотерроризма [1].

Поэтому крайне важным остается своевременное выявление патогена в биологическом материале и объектах окружающей среды. Одним из наиболее перспективных подходов для индикации туляремийного микроба представляется полимеразная цепная реакция. Получены многочисленные подтверждения эффективности применения данного приема для выявления возбудителя туляремии в пробах крови, суспензиях клещей, органов мелких млекопитающих, а также для идентификации выделенных культур туляремийного микроба [3, 5, 6].

В отечественных и зарубежных документах по ла-

бораторной диагностике туляремии ПЦР рассматривается как один из методов индикации ДНК *Francisella tularensis* в исследуемом материале от человека и животных, объектах окружающей среды. Однако на момент начала исследования в Российской Федерации отсутствовали зарегистрированные диагностические препараты для генной диагностики туляремии, а в большинстве из представленных работ описаны только методические приемы по выявлению патогена.

Целью работы является разработка диагностических препаратов для выявления ДНК *F. tularensis* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным и электрофоретическим учетом результатов.

Материалы и методы

В работе использовано 173 штамма микроорганизмов, из них 101 – *F. tularensis* (подвидов *tularensis*, *holarctica* (биоваров *japonica*, *Ery^v*, *Ery^s*), *mediasiatica* и *novicida*) и 72 штамма гетерологичных микроорганизмов, представителей родов *Yersinia spp.* – 12, *Brucella spp.* – 10, *Bacillus spp.* – 10, *Escherichia spp.* – 10, *Vibrio spp.* – 8, *Salmonella spp.* – 10, *Pseudomonas spp.* – 12. Все штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Штаммы микроорганизмов выращивали на питательных средах: *F. tularensis* – на среде питательной для выделения возбудителя туляремии FT (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), pH 7,2.; *Brucella spp.* – на эритроагаре (НИИ им. Мечникова, Москва), pH 7,2 при температуре (37±1) °С в течение 48 ч; *Yersinia spp.*, *Escherichia spp.* и *Bacillus spp.* – на среде Хоттингера, pH 7,2; *Vibrio spp.* – на агаре из сердечной мышцы, pH 7,6 при температуре (37±1) °С в течение 24 ч.

Бактериальные взвеси клеток готовили в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-85-П (10МЕ)), что соответствует $5 \cdot 10^9$ м.к./мл для *F. tularensis*, $1,6 \cdot 10^9$ – для возбудителя бруцеллеза, $1 \cdot 10^9$ – для других гетерологичных микроорганизмов. Для *V. cholerae* микробную взвесь готовили по отраслевому стандартному образцу мутности 5 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-86-П (5МЕ)), что соответствует $1,1 \cdot 10^9$ м.к./мл. Затем проводили 10-кратные разведения подготовленных суспензий в 0,9 % растворе натрия хлорида до конечной концентрации *F. tularensis* $1 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^2$ м.к./мл, гетерологичных микроорганизмов $1 \cdot 10^4$ м.к./мл. Количество клеток в приготовленных разведениях проверяли путем посева 0,1 мл микробной взвеси каждого тест-штамма из разведений $1 \cdot 10^3$ м.к./мл на соответствующие плотные питательные среды.

Пробы суспензий печени и селезенки мыши, клещей, блох и комаров, крови и мокроты человека, почвы и воды открытых водоемов искусственно контаминировали *F. tularensis* 15 НИИЭГ до конечной концентрации $1 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^3$ м.к./мл. Дополнительно исследовали нативные образцы указанного биологического материала и объектов окружающей среды.

Обеззараживание проб осуществляли в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Выделение ДНК осуществляли с помощью наборов «ДНК-сорб В», «Рибо-сорб», «Рибо-преп». Работу проводили в соответствии с инструкциями к указанным препаратам.

Постановку ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов осуществляли на приборе типа RotorGene («Qiagen», Германия), а с электрофоретической детекцией – на амплификаторе Терцик МС2 («ДНК-технология», Россия). Учет результатов осуществляли гибридационно-флуоресцентным методом с детекцией продукта амплификации в режиме реального времени и с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле.

Результаты и обсуждение

Процесс конструирования амплификационных тест-систем включает в себя определение способа выявления ДНК патогена методом ПЦР, оценку специфичности и чувствительности реакции при исследовании чистых культур микроорганизмов, а также проб био-

логического материала и объектов окружающей среды, искусственно контаминированных возбудителем, комплектацию экспериментальных серий препарата и изучение его диагностической ценности и сроков годности. Поэтому первым этапом нашей работы стала разработка ПЦР с гибридационно-флуоресцентным и электрофоретическим учетом результатов для выявления ДНК туляремийного микроба.

Отличительной особенностью представителей рода *Francisella* (*F. tularensis*, *F. philomiragia*, *F. noatunensis*, *F. hispaniensis*, *F. haliotidica*) является их высокая степень генетического сходства. Так, гены 16S рДНК характеризуются высокой гомологией как между отдельными видами (*F. tularensis* и *F. philomiragia*), так и между близкородственными возбудителями туляремии микроорганизмами (*Wolbachia persica* и др. эндосимбионты клещей родов *Amblyomma*, *Ornithodoros* и *Dermacentor*) [4, 7]. Использованный ранее в качестве ДНК-мишени при выявлении туляремийного микроба методом ПЦР ген *lpaA*, кодирующий синтез предшественника мембранного белка 17 кДа (Tul4), обнаружен у штаммов *F. philomiragia*, а его последовательность схожа с участками генома эндосимбионтов клещей рода *Dermacentor* [2, 3, 5, 6]. Все это не позволяет рассматривать эти локусы как специфичные для *F. tularensis*.

Установлена возможность обнаружения ДНК *F. tularensis* методом ПЦР на основании амплификации фрагмента гена *fopA*, кодирующего белок внешней мембраны, и генов *iglBC*, отвечающих за синтез белков, необходимых для внутриклеточного роста патогена [2, 7]. Анализ нуклеотидных последовательностей данных локусов с помощью алгоритма BLAST и базы данных GenBank NCBI показал, что ген *fopA* у разных штаммов туляремийного микроба идентичен на 90 % и имеет мозаичную структуру, в которой гомологичные участки протяженностью 200–300 п.н. чередуются с аналогичными по размеру вариabельными. В то же время полиморфизм генов *iglBC* составляет всего 1 % и затрагивает 21 нуклеотид у всех подвидов. Поэтому в качестве ДНК-матрицы нами для дальнейшей работы выбраны *iglBC* гены.

С помощью программного обеспечения на сайте www.genscript.com, программы GeneRanger 3.1., алгоритма BLAST и базы данных GenBank NCBI подобраны специфичные праймеры и зонд формата TaqMan. Характеристика выбранных олигонуклеотидов представлена в табл. 1.

Подобранные праймеры YFt1s–YFt1a обеспечивают амплификацию фрагмента *iglBC* генов размером 268 п.н., а для образования флуоресцентного сигнала в состав зонда с 5'-конца введена флуоресцентная метка ROX, а с 3'-конца – BHQ2.

В ходе последующих экспериментов определены оптимальные условия ПЦР с выбранными праймерами и зондом с электрофоретическим и гибридационно-флуоресцентным учетом результатов. Из данных табл. 1 видно, что нуклеотидная последовательность праймеров и зондов имеет высокое сходство с ДНК человека и мыши, поэтому особое внимание уделено определению специфичности реакции при исследова-

Характеристика праймеров и зонда, подобранных на основе *iglBC* генов туляремиального микроба

Наименование праймера	Размер, п.н.	% GC	Температура отжига, °С	Гомология с ДНК		Гомология с ДНК	
				<i>F. tularensis</i> всех подвидов, %	<i>F. philomiragia</i> / <i>F. noatunensis</i> , %	Гомология с ДНК человека/мыши, %	
YFt1s	26	46	58	100	15/19	69/65	
YFt1a	24	50	58	100	83/91	83/75	
FT	25	44	62	100	40/40	68/68	

нии нативных проб биологического материала, не содержащих ДНК возбудителя туляремии.

Материалом для анализа служили препараты ДНК, выделенные из бактериальных суспензий туляремиального микроба с концентрацией $1 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^2$ м.к./мл, *Y. pseudotuberculosis* – $1 \cdot 10^4$, суспензий печени, селезенки белой мыши и клещей. Для проведения ПЦР использовали 3 фермента для обычной реакции: «ДиаТак-полимераза» (ИнтерЛабСервис, Россия), Taq ДНК-полимераза с буфером AS (СибЭнзим, Россия), Taq ДНК-полимераза рекомбинантная (Fermentas, США), 4 фермента для осуществления амплификации в режиме «горячего старта»: TaqF ДНК-полимераза (ИнтерЛабСервис, Россия), Hot-Start Taq ДНК-полимераза (СибЭнзим, Россия), Taq ДНК-полимераза Maxima Hot-Start (Fermentas, США), Syn Taq ДНК-полимераза с ингибирующими активностью фермента антителами (Синтол, Россия), а также соответствующий для каждого фермента 10-кратный буферный раствор, 25 или 50 мМоль раствор магния хлорида, 25 мМоль раствор ДНТФ каждого из производителей, праймеры и зонд с концентрацией 100 пМоль/мкл. Для исключения возможных сложностей при комплектации готового препарата мы не применяли способ проведения реакции по типу «горячего старта», при котором компоненты реакционной смеси разделены слоем парафина.

Из представленных в табл. 2 данных видно, что наименьшее количество ложноположительных ответов при исследовании суспензии органов белой мыши и клещей отмечено при использовании Taq ДНК-полимеразы рекомбинантной (Fermentas, США), Hot-Start Taq ДНК-полимеразы (СибЭнзим, Россия), Syn Taq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами (Синтол, Россия), Taq ДНК-полимеразы Maxima Hot-Start (Fermentas, США).

Однако чувствительность реакции с некоторыми из этих ферментов не всегда составляла $1 \cdot 10^3$ м.к./мл. На основании полученных результатов для дальнейшей работы выбраны Hot-Start Taq ДНК-полимераза и Syn Taq ДНК-полимераза.

В дальнейших экспериментах варьировали концентрации праймеров от 8 до 15 пМоль, зонда – от 4 до 8 пМоль, ионов Mg^{2+} – от 2 до 3 мМоль, фермента – 1–2 ед. Установлено, что для проведения ПЦР с учетом результатов методом электрофореза в составе реакционной смеси должно быть не менее 10 пМоль каждого праймера, а при гибридационно-флуоресцентной детекции – содержание праймеров и зонда составляет 8 и 4 пМоль соответственно.

Вне зависимости от способа учета результатов оптимальная концентрация ионов магния составляет 2 мМоль, фермента – 1 ед. Высокую чувствительность и специфичность реакции обеспечивает не только подобранный состав реакционной смеси, но и программа амплификации. В данном случае разработаны условия проведения реакции с электрофоретическим учетом результатов на амплификаторах с матричным и активным режимом термоциклирования и в режиме реального времени на приборах типа RotorGene (табл. 3).

При проведении ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов важны значения пороговой линии Threshold и Ct, при которых реакция считается положительной. Установлено, что для учета результатов реакции с выбранными праймерами и зондом эти показатели составляют 0,1 и не более 32 соответственно. Определены значения других функций, которые используются программным обеспечением термоциклеров типа RotorGene для учета флуоресценции: активизация «Slope Correct»/«Коррек. уклона», «More settings»/«Outlier

Таблица 2

Эффективность ПЦР с подобранными праймерами и зондом при использовании различных ферментов

Наименование проб	Концентрация, м.к./мл	Кол-во	Наличие амплификации фрагмента <i>iglBC</i> генов размером 268 п.н./специфичной флуоресценции по каналу ROX при проведении реакции с ферментом						
			I	II	III	IV	V	VI	VII
Бактериальные суспензии <i>F. tularensis</i>	$1 \cdot 10^4$	10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	$1 \cdot 10^3$	10	7/8	6/6	9/10	9/10	10/10	8/9	10/10
	$1 \cdot 10^2$	10	0/5	0/5	0/5	1/6	3/6	0/2	2/5
Бактериальные суспензии <i>Y. pseudotuberculosis</i>	$1 \cdot 10^4$	10	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Суспензия печени и селезенки белой мыши	н/и	10	1/1	0/1	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0
Суспензия клещей	н/и	10	1/2	1/2	0/0	2/2	0/0	0/0	0/0

Примечания: I – «ДиаТак-полимераза», II – Taq ДНК-полимераза с буфером AS, III – Taq ДНК-полимераза рекомбинантная, IV – TaqF ДНК-полимераза, V – Hot-Start Taq ДНК-полимераза, VI – Taq ДНК-полимераза Maxima Hot-Start, VII – Syn Taq ДНК-полимераза с ингибирующими активностью фермента антителами; н/и – не используется.

Программа амплификации с использованием подобранных праймеров и зонда

Тип ПЦР	Программа амплификации
ПЦР-ЭФ	95 °С – пауза, 95 °С – 5/5 мин, 5 циклов: 95 °С – 40/10 с, 62 °С – 40/10 с, 72 °С – 40/10 с, 30 циклов: 95 °С – 30/7 с, 60 °С – 30/7 с, 72 °С – 30/7 с, 72 °С – 5 мин
ПЦР-РВ	95 °С – 5 мин, 10 циклов: 95 °С – 30 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 30 с, 35 циклов: 95 °С – 20 с, 56 °С – 20 с, 72 °С – 20 с Детекция флуоресцентного сигнала при температуре 56 °С во втором блоке циклирования по каналу Orange/ROX

Примечание. Через дробь указаны данные продолжительности этапа при использовании активного и матричного режимов термоденатурации.

Removal)»/«Устранение выбросов» – 5 %.

Чувствительность и специфичность разработанных ПЦР вне зависимости от условий регистрации результатов составила $1 \cdot 10^3$ м.к./мл и 100 % соответственно как при исследовании чистых культур, так и проб биологического материала.

На основании полученных результатов нами разработаны два генодиагностических препарата: «Набор реагентов для выявления ДНК *Francisella tularensis* методом полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов (Ген *Francisella tularensis* – РЭФ)» и «Набор реагентов для выявления ДНК *Francisella tularensis* методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов (Ген *Francisella tularensis* – РГФ)». В их состав вошли все реагенты необходимые для проведения анализа. С целью минимизации операций при сборке реакционной смеси из реагентов для ПЦР подготовлены две смеси: ПЦР-смесь 1 – праймеры, дНТФ, натрия азид; ПЦР-смесь 2 – 2,5-кратный буфер. В ходе тестирования такой формы комплектации в течение 9 месяцев показано сохранение заявленной чувствительности наборов – $1 \cdot 10^3$ м.к./мл и специфичности – 100 % в течение 6 месяцев.

На следующем этапе нами определена чувствительность и специфичность разработанных наборов реагентов. Для этого исследовали бактериальные суспензии 101 штамма туляремийного микроба (*tularensis* – 10, *holarctica* – 87, *mediasiatica* – 2 и *novicida* – 2), 72 штаммов гетерологичных микроорганизмов (представителей родов *Yersinia spp.*, *Brucella spp.*, *Bacillus spp.*, *Escherichia spp.*, *Vibrio spp.*) и 100 проб суспензий внутренних органов мелких млекопитающих, клещей, блох, комаров, крови человека, искусственно контаминированных *F. tularensis*. Во всех случаях вне зависимости от вида материала подтверждена чувствительность, специфичность и воспроизводимость сконструированных наборов реагентов.

Таким образом, нами разработан способ выявления ДНК туляремийного микроба методом ПЦР с электрофоретическим и гибридационно-флуоресцентным учетом результатов, где в качестве ДНК-матрицы использованы видоспецифичные гены *igIBC*, специфичные для вида *F. tularensis*, созданы наборы реагентов для его осуществления. Показана высокая чувствительность ($1 \cdot 10^3$ м.к./мл) и специфичность (100 %) созданных амплификационных тест-систем как при исследовании чистых культур микроорганизмов, так и проб биологического материала и объектов окружающей среды, искусственно инфицированных возбудителем туляремии.

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы)».

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воробьев А.А., Боев Б.В., Бондаренко В.М., Гинзбург А.Л. Проблема биотерроризма в современных условиях. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2002; 3:3–12.
2. Emanuel P.A., Bell R., Dang J.L., McClanahan R., David J.C., Burgess R.J., Thompson J., Collins L., Hadfield T. Detection of *Francisella tularensis* within infected mouse tissues by using a hand-held PCR thermocycler. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(2):689–93.
3. Johansson A., Berglund L., Eriksson U., Goransson I., Wollin R., Forsman M., Tarnvik A., Sjostedt A. Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(1):22–6.
4. Kugeler K.J. Discrimination between *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts when screening ticks by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 7(11):7594–7.
5. Long G.W., Oprandy J.J., Narayanan R.B., Fortier A.H., Porter K.R., Nacy C.A. Detection of *Francisella tularensis* in blood by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31(1):152–4.
6. Sjostedt A., Eriksson U., Berglund L., Tarnvik A. Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(5):1045–8.
7. Versage J.L., Severin D.D., Chu M.C., Petersen J.H. Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:5492–9.

References

1. Vorob'ev A.A., Boev B.V., Bondarenko V.M., Ginzburg A.L. [Biотerrorism issue under current conditions]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2002; 3:3–12.
2. Emanuel P.A., Bell R., Dang J.L., McClanahan R., David J.C., Burgess R.J., Thompson J., Collins L., Hadfield T. Detection of *Francisella tularensis* within infected mouse tissues by using a hand-held PCR thermocycler. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(2):689–93.
3. Johansson A., Berglund L., Eriksson U., Goransson I., Wollin R., Forsman M., Tarnvik A., Sjostedt A. Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(1):22–6.
4. Kugeler K.J. Discrimination between *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts when screening ticks by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 7(11):7594–7.
5. Long G.W., Oprandy J.J., Narayanan R.B., Fortier A.H., Porter K.R., Nacy C.A. Detection of *Francisella tularensis* in blood by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31(1):152–4.
6. Sjostedt A., Eriksson U., Berglund L., Tarnvik A. Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(5):1045–8.
7. Versage J.L., Severin D.D., Chu M.C., Petersen J.H. Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:5492–9.

Authors:

Osina N.A., Senichkina A.M., Bugorkova T.V., Shcherbakova S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Осина Н.А., Сеничкина А.М., Бугоркова Т.В., Щербакова С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 18.11.14.