

Л.М.Куклева, Н.Ю.Шавина, Н.А.Виноградова, Н.Ю.Носов, Г.А.Ерошенко, Н.П.Гусева, В.В.Кутырев

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* ИЗ ЗАБАЙКАЛЬСКОГО СТЕПНОГО ОЧАГА ЧУМЫ**

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

В статье приведена комплексная фенотипическая и генетическая характеристика штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в Забайкальском степном очаге чумы до и после смены основного носителя, произошедшей здесь в середине 60-х годов прошлого века. На основе ПЦР-анализа и мультилокусного секвенирования генов *glpD*, *melB*, *napA*, *rhaS* и *iclR*, кодирующих дифференциально значимые признаки – ферментацию глицерина, мелибиозы, рамнозы, продукцию изоцитратлиазы и денитрифицирующую активность, получены доказательства принадлежности изученных штаммов к античному биовару основного подвида возбудителя чумы. Для определения генетического родства этих штаммов использован мультилокусный VNTR-анализ по семи локусам вариабельных тандемных повторов: ms01, ms04, ms06, ms07, ms46, ms62. На основании полученных результатов установлено, что штаммы возбудителя чумы, изолированные в Забайкальском степном очаге в разные периоды его существования, составляют единую ветвь на филогенетическом дереве эволюции *Y. pestis*.

*Ключевые слова:* возбудитель чумы, природные очаги, биовары, фенотипическая и генетическая характеристика штаммов, генотипирование.

L.M.Kukleva, N.Yu.Shavina, N.A.Vinogradova, N.Yu.Nosov, G.A.Eroshenko, N.P.Guseva, V.V.Kutyrev

**Phenotypic and Molecular-Genetic Peculiarities of *Yersinia pestis* Strains from Trans-Baikal Steppe Plague Focus**

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

The paper contains the data on the complex phenotypic and genotypic characteristics of *Yersinia pestis* strains isolated in Trans-Baikal steppe plague focus before and after the succession of the main carrier which took place in the 1960s. Based on the PCR-analysis and multilocus sequence typing of *glpD*, *melB*, *napA*, *rhaA*, and *iclR* genes, encoding differentially significant properties such as glycerin, melibiose, rhamnose fermentation, isocitrate lyase production, and denitrification activity, developed are the proofs of affiliation of the studied strains to the biovariant antiqua of the plague agent main subspecies. Multilocus VNTR-analysis by seven locuses of variable tandem repeats – ms01, ms04, ms06, ms07, ms46, ms62 – has been used to establish genetic relations between the strains. Thus on the basis of the results obtained, it is established that the strains of the plague agent, isolated in the Trans-Baikal steppe focus in various periods of its existence, form one common branch on the phylogenetic tree of *Y. pestis* evolution.

*Key words:* plague agent, natural foci, biovars, phenotypic and genotypic characteristics of strains, genotyping.

Несмотря на многообразие принципов дифференциации природных очагов чумы, все основные схемы типизации были основаны на эколого-ландшафтных характеристиках территории этих очагов. В настоящее время на территории стран СНГ, включая Россию, в соответствии с унифицированной классификацией очаговых территорий, основанной на особенностях проявлений чумы в различных ландшафтных зонах, закономерностях сезонной и многолетней активности очагов различной биоценотической структуры, родовом названии основного носителя, выделены 45 очагов чумы [11]. При этом считается, что существует тесная взаимосвязь между принадлежностью штаммов *Y. pestis* к определенной внутривидовой систематической группе (подвиды и биовары) и типом основного носителя в очаге. Так, зоной циркуляции штаммов основного подвида античного биовара являются горные очаги сурчьевого типа, а средневекового биовара – очаги сусликового и песчаночьевого типов в зонах степей, полупустынь и

пустынь. Штаммы неосновных подвигов персистируют на полевках (кавказский, гиссарский, и улегейский подвиды) и пищухах (алтайский подвид).

Следует отметить, что при разработке критериев типизации территорий природных очагов и при их паспортизации использовали данные об особенностях видового спектра носителей и переносчиков, однако практически не учитывали параметры изменчивости главного компонента паразитарной системы – возбудителя чумы.

Между тем к настоящему времени накоплен большой фактический материал о фенотипических и молекулярно-генетических свойствах *Y. pestis* из природных очагов разного типа. Установлены генетические основы различного проявления дифференциально значимых биохимических признаков возбудителя чумы [2, 4, 5]. Разработана система молекулярного типирования, основанная на методах полимеразной цепной реакции, мультилокусного секвенирования и мультилокусного VNTR-анализа, которая обеспечи-

вает определение подвиговой, биоварной и очаговой принадлежности штаммов возбудителя чумы [3]. На основе разработанного стандартного алгоритма молекулярного типирования определены стандартные генотипы штаммов *Y. pestis* разных биоваров основного подвида и неосновных подвигов [3].

Накопленные знания позволяют подойти к решению вопроса о типизации природных очагов с учетом фенотипических и генетических особенностей штаммов возбудителя чумы, циркулирующих на конкретной энзоотической территории. Возникает возможность выявления взаимосвязи между внутривидовой принадлежностью штаммов возбудителя чумы с типом основного носителя в очаге. Удобной моделью для выявления наличия (или отсутствия) такой взаимосвязи является Забайкальский степной очаг чумы, расположенный в степной зоне на юго-востоке Читинской области и являющийся северной окраиной Центрально-Азиатской зоны природной очаговости чумы.

В истории изучения Забайкальского природного очага чумы выделяют три основных периода [1]. Для первого периода (1911–1938 гг.) характерны активные эпизоотии на тарбаганах (*Marmota sibirica*) и систематически возникающие случаи заболевания людей, связанные с охотой на этих грызунов. Второй этап (1939–1970 гг.) связан с интенсивным промыслом и масштабными истребительными мероприятиями против сурков, что привело к их уничтожению. С 1947 по 1966 год проявления чумы в очаге не регистрировали, и очаг считался «оздоровленным» [1]. Однако в 1966 г. на северо-западной окраине очага, где истребление зверьков и блох никогда не проводили, и где сохранились единичные жилые норы тарбаганов, выявлена эпизоотия чумы в популяциях даурского суслика (*Citellus dauricus*). В ходе ее был выделен 31 штамм возбудителя чумы (14 штаммов – от сусликов, 16 – от блох и 1 – от даурской пищухи). Впоследствии эпизоотии чумы регистрировали до 1970 г., и в качестве основного носителя чумы в Забайкалье выступал даурский суслик. Третий этап, начавшийся в 1971 г., характеризуется отсутствием эпизоотий и редкой регистрацией серопозитивных проб. Таким образом, в середине 60-х годов прошлого столетия на территории Забайкальского очага произошла смена носителя (сурка на суслика), вызванная хозяйственной деятельностью населения и мероприятиями по оздоровлению очага.

Целью настоящей работы был сравнительный анализ фенотипических и генетических свойств штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в Забайкальском степном очаге чумы в разные периоды времени, для выявления у них отличий, вызванных сменой основного носителя и присущих ему переносчиков.

## Материалы и методы

**Бактериальные штаммы.** В работе изучены 11 штаммов *Yersinia pestis* основного подвида, изолиро-

ванных в разные годы в Забайкальском степном очаге чумы. Все штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий при РосНИПЧИ «Микроб». Среди изученных штаммов 4 изолята были выделены в 1923–1927 гг., из них 2 штамма *Y. pestis* – 17 (139) и 16 – от тарбагана и 2 – 95 (141) и 17/18 – от людей, больных легочной формой чумы. Остальные 7 штаммов были выделены в 1966–1970 гг. от даурских сусликов (*Y. pestis* 24, И-1251, И-1252, И-1270 и И-1996) и их блох (*Y. pestis* 2026 и 1843) после того, как в очаге поменялся основной носитель.

Культивирование штаммов, изучение их микробиологических (характер роста на жидких и плотных питательных средах, чувствительность к бактериофагам) и биохимических (ферментация глицерина, рамнозы, арабинозы и мелибиозы, денитрифицирующая активность) свойств, а также признаков, ассоциируемых с вирулентностью возбудителя чумы (пигментсорбция, зависимость от ионов  $Ca^{2+}$  при 37 °С), проводили общепринятыми методами в соответствии с рекомендациями, изложенными в практическом руководстве [6]. Питательные потребности изучали по методике, описанной ранее [6].

ПЦР проводили по стандартной методике [9]. Для амплификации фрагментов генов применяли ранее описанные праймеры [2, 4, 5, 10, 14]. Полученные в ПЦР продукты анализировали методом электрофореза в 1 % агарозном геле при напряжении 10–15 В/см. Секвенирование полученных ПЦР фрагментов генов осуществляли на генетическом анализаторе модели SEQ 8000 (Beckman Coulter). Для проведения сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей использовали алгоритм BLAST.

## Результаты и обсуждение

**Фенотипические свойства штаммов *Y. pestis* из Забайкальского степного очага.** Были изучены фенотипические свойства 11 штаммов *Y. pestis*, выделенных в Забайкальском степном очаге чумы в разные периоды времени (1923–1927 и 1966–1970 гг.). Эти штаммы представляют собой удобную модель для выявления отличий, вызванных сменой основного носителя и присущих ему переносчиков.

В результате исследований было установлено, что по культурально-морфологическим признакам все изученные штаммы из Забайкальского степного очага, изолированные как в 1923–1927, так и в 1966–1970 гг., обладали типичной для возбудителя чумы морфологией клеток и характером роста на плотных и жидких питательных средах. Все они проявляли чувствительность к чумным диагностическим фагам Покровской и Л413 С. У всех штаммов выявлена способность к пигментсорбции и зависимость от ионов  $Ca^{2+}$  при 37 °С. Установлены одинаковые потребности забайкальских штаммов в метионине, фенилаланине и треонине. При изучении биохимических свойств у всех изолятов выявлено отсутствие способности к ферментации рамнозы и мелибиозы,

Генетическая характеристика штаммов из Забайкальского степного и других природных очагов чумы

Штаммы <i>Y. pestis</i>	Происхождение, очаг	Мутации в генах				
		<i>napA</i> G→T, 613*	<i>glpD</i> -93 п.н.	<i>rhaS</i> G→A, 671	<i>melB</i> +IS285, после 73	<i>iclR</i> +CC 269-270
16	Забайкальский степной	-	-	+	+	+
17 (139)	«	-	-	+	+	+
17/18	«	-	-	+	+	+
95 (141)	«	-	-	+	+	+
И-1251	«	-	-	+	+	+
И-1252	«	-	-	+	+	+
И-1270	«	-	-	+	+	+
24	«	-	-	+	+	+
1843	«	-	-	+	+	+
2026	«	-	-	+	+	+
И-1996	«	-	-	+	+	+
А-1486, античный биовар	Алайский высокогорный	-	-	+	+	+
М567, средневековый биовар	Северо-Западный Прикаспийский степной	+	-	+	+	+
EV НИИЭГ, вакцинный, восточный биовар	о. Мадагаскар	-	+	+	+	+
1146, кавказский подвид	Зангезуро-Карабахский высокогорный	-	-	-	-	-

\*Указаны тип мутаций и ее расположение от начала гена.

но выявлена продукция изоцитратлиазы, что подтверждало их принадлежность к основному подвиду *Y. pestis*. Все изученные штаммы разлагали глицерин и, следовательно, не относились к восточному биовару. Одной из важнейших характеристик при решении вопроса о биоварной принадлежности этих штаммов служит их отношение к редукации нитратов. Проведенный анализ показал, что все изученные забайкальские штаммы, независимо от времени (1923–1927 или 1966–1970 гг.) и объекта (тарбаган, суслик или присущие им блохи) выделения, редуцировали нитраты и, следовательно, в соответствии с используемыми фенотипическими схемами классификации относились к античному биовару.

*Генетические свойства штаммов Y. pestis из Забайкальского степного очага.* Для выявления генетических особенностей штаммов *Y. pestis*, выделенных в Забайкальском очаге чумы, была изучена структура генов, дифференциальная экспрессия которых лежит в основе деления штаммов *Y. pestis* на подвиды и биовары. Для установления биоварной принадлежности определяли наличие мутаций, характерных для штаммов средневекового (замена единичного нуклеотида G→T в позиции 613 гена *napA* периплазматической нитратредуктазы) и восточного (делеция размером 93 п.н. в гене *glpD* глицерол-3-фосфатдегидрогеназы) биоваров возбудителя чумы. Кроме того, определяли присутствие мутаций, общих для всех биоваров основного подвида возбудителя чумы, что позволяет дифференцировать штаммы основного и неосновных подвидов: замена единичного нуклеотида G→A в позиции 671 регуляторного гена *rhaS*, вставка двух нуклеотидов +CC в позиции 269-270 от начала регуляторного гена *iclR*, внедре-

ние IS285 в ген *melB* галактозидпермеазы после 73 нуклеотида [2, 4, 5, 14]. В таблице представлены результаты изучения забайкальских штаммов, а также изолятов различных биоваров, использованных в качестве контрольных образцов.

Представленные в таблице данные свидетельствуют о том, что все изученные штаммы *Y. pestis* из Забайкальского степного очага, независимо от времени и источника их выделения, содержали мутации в генах *rhaS*, *melB*, *iclR*, обуславливающие отсутствие способности утилизировать, соответственно, рамнозу и мелибиозу, но синтезировать изоцитратлиазу, что характерно для всех штаммов основного подвида и отличает их от неосновных подвидов. В то же время отсутствие у этих изолятов мутаций в генах *napA* и *glpD*, что коррелирует с биохимической активностью в отношении редукации нитратов и ферментации глицерина, подтверждало их принадлежность к античному биовару.

Другие доказательства принадлежности всех изученных штаммов возбудителя чумы из Забайкальского степного очага к античному биовару были получены с использованием разработанного нами ранее способа генетической дифференциации штаммов античного и средневекового биоваров [10]. Как было показано, в штаммах средневекового биовара присутствует делеция *med36* размером 36 п.н., которая отсутствует в штаммах *Y. pestis* других подвидов и биоваров [10]. Указанная делеция была использована в качестве мишени для подтверждения принадлежности штаммов из Забайкальского степного очага чумы к античному биовару.

В ПЦР с праймерами, фланкирующими делецию *med36*, у всех изученных забайкальских изолятов

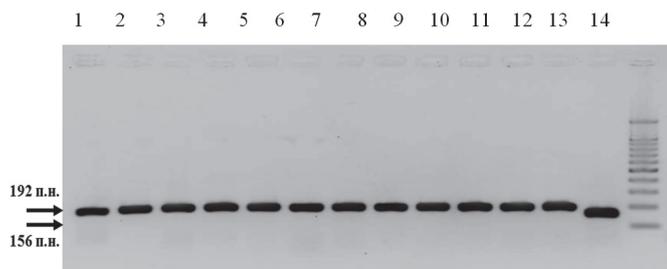


Рис. 1. Дифференциация в ПЦР с праймерами на делецию *med(36)* штаммов *Y. pestis* средневекового и античного биоваров методом гель-электрофореза

Штаммы: 1 – 24; 2 – 17 (139); 3 – И-1251; 4 – И-1252; 5 – 95 (141); 6 – 16; 7 – И-1270; 8 – 17/18; 9 – 1843; 10 – И-1996; 11 – 2026; 12 – 880 – античный биовар; 13 – M-567 – средневековый биовар; 14 – маркеры молекулярных масс (O’Range Ruler, 100 bp DNA Ladder, Fermentas). Стрелками указаны размеры, образуемых в ПЦР фрагментов

был выявлен специфический амплификат размером 192 п.н., характерный для штаммов античного биовара. У штамма средневекового биовара, использованного в качестве контрольного образца, в хромосоме обнаружена делеция величиной 36 п.н., о чем свидетельствовал размер амплификата, который составлял 156 п.н. (рис. 1).

**MLVA-анализ.** Полученные результаты на генетическом уровне подтверждают принадлежность штаммов *Y. pestis* из Забайкальского очага, выделенных до и после смены основного носителя, к античному биовару. Для генотипирования и определения филогенетического родства штаммов возбудителя чумы высокой дискриминирующей способностью обладает MLVA-анализ – метод мультилокусного анализа числа переменных тандемных повторов [12, 13].

Для определения генетического родства штаммов, циркулировавших в Забайкальском степном очаге в разные периоды времени, был проведен мультилокусный VNTR-анализ этих штаммов по семи локусам переменных тандемных повторов: *ms01*,

*ms04*, *ms06*, *ms07*, *ms46*, *ms62* и *ms70*. В ПЦР на эти VNTR-локусы использовали праймеры и условия постановки реакции, описанные в литературе [13]. Полученные в ПЦР продукты амплификации секвенировали для выявления количества VNTR-локусов. Анализ результатов секвенирования полученных ампликонов позволил сделать вывод о наличии идентичных MLVA7 генотипов у всех изученных штаммов из Забайкальского очага чумы, независимо от сроков их выделения и источников происхождения. В то же время выявлены существенные отличия полученных данных от MLVA7 генотипов штаммов из других природных очагов чумы, в том числе тех, в которых циркулируют штаммы античного биовара, например, Тувинский горный, Аксайский и Алайский высокогорные очаги.

На основании полученных данных MLVA7 анализа построена дендрограмма (рис. 2), свидетельствующая о том, что забайкальские штаммы составляют единую ветвь на филогенетическом древе эволюции *Y. pestis*.

Таким образом, с помощью традиционных микробиологических и генетических (ПЦР, мультилокусное секвенирование, мультилокусный VNTR-анализ) методов проведено изучение фенотипических и генетических свойств штаммов *Yersinia pestis* из Забайкальского степного очага чумы, выделенных до и после смены носителя и присущих ему переносчиков. Анализ полученных данных свидетельствует о стойкости сохранения комплекса фенотипических и генетических свойств штаммов *Y. pestis*, персистирующих в этом природном очаге. Полученные результаты на генетическом уровне подтверждают принадлежность штаммов *Y. pestis* из Забайкальского очага, выделенных до и после смены основного носителя, к античному биовару. Смена носителя в Забайкальском очаге не привела к изменению основных свойств циркулирующих здесь штаммов возбудителя чумы,

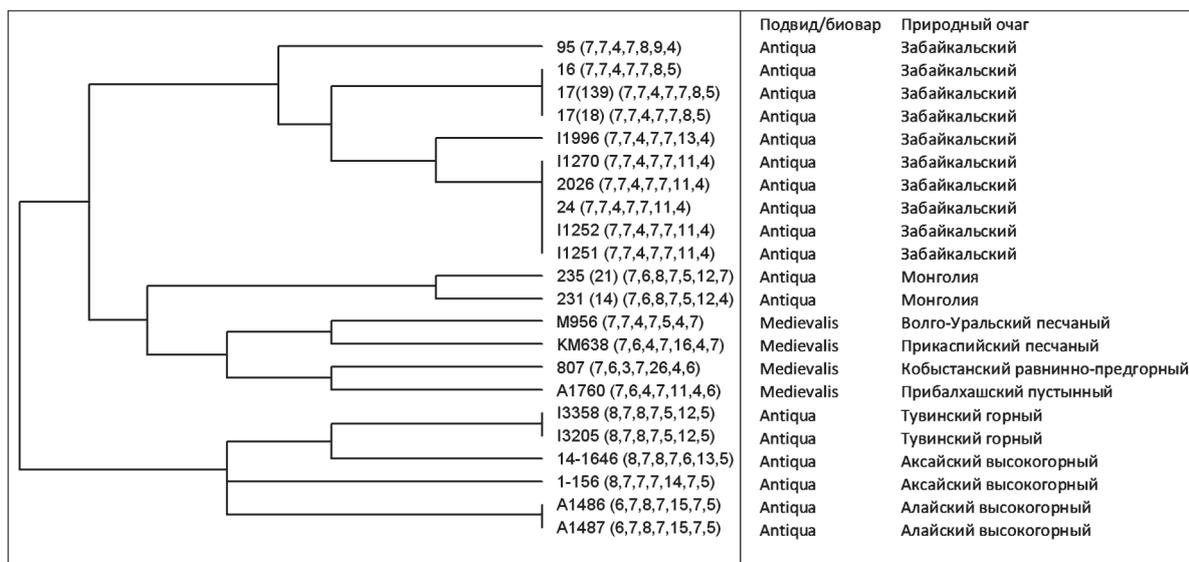


Рис. 2. Филогенетическое родство штаммов *Y. pestis* на основе варибельности 7 VNTR-локусов: *ms01*, *ms04*, *ms06*, *ms07*, *ms46*, *ms62* и *ms70*

что позволяет сделать вывод об отсутствии тесной взаимосвязи между внутривидовой систематической принадлежностью (античный или средневековый биовары) штаммов *Y. pestis* и типом основного носителя (переносчика) в природном очаге чумы. Полученные данные могут быть использованы при проведении типизации энзоотических по чуме территорий, а также при генотипировании штаммов возбудителя чумы.

Работа выполнена по государственному контракту № 53-Д от 04.06.12 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Даниленко А.Ф., Немченко Л.С. Современное состояние Забайкальского природного очага чумы на этапе оздоровления. В кн.: Актуальные проблемы профилактики особо опасных и природно-очаговых инфекционных болезней. Иркутск; 1994. С. 39–40.
2. Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Кутырев В.В. Структурный анализ генов, участвующих в ферментации мелибиозы и продукции изоцитрат-лиазы, у штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов. Генетика. 2011; 47(10):328–34.
3. Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Куклева Л.М., Павлова А.И., Краснов Я.М., Шавина Н.Ю., Гусева Н.П., Виноградова Н.А., Кутырев В.В. Стандартизированный алгоритм молекулярного типирования штаммов *Yersinia pestis*. Журн. эпидемиол., микробиол. и иммунобиол. 2012; 3:25–35.
4. Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Куклев В.Е., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Одинокоев Г.Н., Кутырев В.В. Сравнение полной нуклеотидной последовательности гена *rhaS* у штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов. Пробл. особо опасных инф. 2008; 3(97):38–42.
5. Одинокоев Г.Н., Ерошенко Г.А., Видяева Н.А., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Структурно-функциональный анализ генов *nap* оперона у штаммов *Yersinia pestis* разных подвидов. Пробл. особо опасных инф. 2008; 4(98):40–2.
6. Одинокоев Г.Н., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Павлова А.И., Кутырев В.В. Генетические основы метионинзависимости штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов. Генетика. 2011; 47(3):332–8.
7. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Медицина; 2009. 472 с.
8. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 192 с.
9. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. МУ 1.3.2569-09. М.; 2009. 42 с.
10. Павлова А.И., Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Анализ генетической изменчивости штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара из природных очагов чумы Российской Федерации и Монголии. Пробл. особо опасных инф. 2012; (114):49–53.
11. Попов Н.В., Безсмертный В.Е., Матросов А.Н., Немченко Л.С., Вержуцкий Д.Б., Малецкая О.В., Удовиков А.И., Кузнецов А.А., Князева Т.В., Шилова Л.Д., Горшенко В.В., Попов В.П., Топорков В.П., Топорков А.В., Кутырев В.В. Эпизоотическая активность природных очагов чумы Российской Федерации в 2010 г. и прогноз на 2011 г. Пробл. особо опасных инф. 2011; 1(107):31–7.
12. Сучков И.Ю., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Шилищину М.В., Мишанькин Б.Н. Мультилокусный VNTR-анализ в изучении популяционной структуры *Yersinia pestis* в природных очагах. Мол. генет. микробиол. и вирусол. 2004; 4:19–28.
13. Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoeud F., Ramiisse V., Sylvestre P., Benson G., Ramiisse F., Vergnaud G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. BMC Microbiol. 2001; 1:2.

tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. BMC Microbiol. 2001; 1:2.

14. Motin V., Georgescu A., Elliott J., Hu P., Worsham P., Ott L., Slezak T., Sokhansanj B., Regala W., Brubaker R., Garcia E. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*glpD*). J. Bacteriol. 2002; 184(4):1019–27.

### References

1. Danilenko A.F., Nemchenko L.S. [Current state of the Trans-Baikal natural plague focus at the stage of sanitation enhancement]. In: [Topical Issues of Prophylaxis of Particularly Dangerous and Natural-Focal Infectious Diseases]. Irkutsk; 1994. P. 39–40.
2. Eroshenko G.A., Odinokov G.N., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Kutyrev V.V. [Structural analysis of the genes participating in the process of melibiose fermentation and isocitrate lyase production in *Yersinia pestis* strains of the main and non-main subspecies]. Genetika. 2011; 47(10):328–34.
3. Eroshenko G.A., Odinokov G.N., Kukleva L.M., Pavlova A.I., Krasnov Ya.M., Shavina N.Yu., Guseva N.P., Vinogradova N.A., Kutyrev V.V. [Standardized algorithm of molecular typing of *Yersinia pestis* strains]. Zh. Epidemiol. Mikrobiol. Immunobiol. 2012; 3:25–35.
4. Koukleva L.M., Eroshenko G.A., Kouklev V.E., Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Odinokov G.N., Kutyrev V.V. [Comparison of complete nucleotide sequence of *rhaS* gene in the strains of plague etiological agent of main and minor subspecies]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; (97):38–42.
5. Odinokov G.N., Eroshenko G.A., Vidyayeva N.A., Krasnov Ja.M., Gouseva N.P., Kutyrev V.V. [Structural and functional analysis of *nap* operon genes in *Yersinia pestis* strains of different subspecies]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; (98):40–2.
6. Odinokov G.N., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Koukleva L.M., Shavina N.Yu., Pavlova A.I., Kutyrev V.V. [Genetic background of methionine dependency in *Yersinia pestis* strains of the main and non-main subspecies]. Genetika. 2011; 47(3):332–8.
7. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infections. Practice Guidelines]. M.: Meditsina; 2009. 472 p.
8. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors [Natural Plague Foci in the Territory of the Caucasus, Caspian sea Region, Central Asia, and Siberia]. M.: Meditsina; 2004. 192 p.
9. [Activity management of the laboratories that employ methods of nucleic acid amplification for work with materials containing microorganisms of the I–IV groups of pathogenicity]. MR 1.3.2569-09. M.; 2009. 42 p.
10. Pavlova A.I., Eroshenko G.A., Odinokov G.N., Koukleva L.M., Shavina N.Yu., Krasnov Ya.M., Kutyrev V.V. [Analysis of genetic variability of *Yersinia pestis* strains (Medieval biovar) isolated in natural plague foci of the Russian Federation and Mongolia]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2012; (114):49–53.
11. Popov N.V., Bezsmertny V.E., Matrosov A.N., Nemchenko L.S., Verzhutsky D.B., Maletskaya O.V., Udovikov A.I., Kuznetsov A.A., Knyazeva T.V., Shilova L.D., Gorshenko V.V., Popov V.P., Toporkov V.P., Toporkov A.V., Kutyrev V.V. [Epizootic activity of plague natural foci in the Russian Federation in 2010 and prognosis for 2011]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; (107):31–7.
12. Suchkov I.Yu., Vodopyanov A.S., Vodopyanov S.O., Shishiyanu M.V., Mishan'kin B.N. [Multi-locus VNTR-analysis for investigations of *Yersinia pestis* population structure in natural foci]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2004; 4:19–28.
13. Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoeud F., Ramiisse V., Sylvestre P., Benson G., Ramiisse F., Vergnaud G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. BMC Microbiol. 2001; 1:2.
14. Motin V., Georgescu A., Elliott J., Hu P., Worsham P., Ott L., Slezak T., Sokhansanj B., Regala W., Brubaker R., Garcia E. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*glpD*). J. Bacteriol. 2002; 184(4):1019–27.

### Authors:

Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Vinogradova N.A., Nosov N.Yu., Eroshenko G.A., Guseva N.P., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

### Об авторах:

Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Виноградова Н.А., Носов Н.Ю., Ерошенко Г.А., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 10.06.13.