

А.И.Павлова, Г.А.Ерошенко, Г.Н.Одинок, Л.М.Куклева, Н.Ю.Шавина, Я.М.Краснов, В.В.Кутырев

## АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* СРЕДНЕВЕКОВОГО БИОВАРА ИЗ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ РОССИИ И МОНГОЛИИ

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

Проведен анализ генетических особенностей штаммов *Yersinia pestis* основного подвида, выделенных в природных очагах Российской Федерации и Монголии. Установлено, что в 7 из 9 очагов сусликового и песчаночьевого типа циркулируют штаммы средневекового биовара, имеющие типичный генотип *glpD1 napA2 rhaS1*. В Забайкальском степном очаге распространены штаммы античного биовара с генотипом *glpD1 napA1 rhaS1*. Аналогичный генотип имеют штаммы *Y. pestis* из Тувинского горного очага чумы, что коррелирует с наличием денитрифицирующей активности и отсутствием у них маркерной мутации средневекового биовара – замены единичного нуклеотида G→T в позиции 613 гена *napA* и свидетельствует о принадлежности штаммов из этого очага к античному биовару. Среди штаммов *Y. pestis*, выделенных в Монголии, выявлены два атипичных штамма, не редуцирующие нитраты, но относящиеся к античному биовару.

*Ключевые слова:* возбудитель чумы, средневековый биовар, генотипы штаммов.

A.I.Pavlova, G.A.Eroshenko, G.N.Odinokov, L.M.Koukleva, N.Yu.Shavina, Ya.M.Krasnov, V.V.Kutyrev

## Analysis of Genetic Variability of *Yersinia pestis* Strains (Medieval Biovar) Isolated in Natural Plague Foci of the Russian Federation and Mongolia

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Carried out is the analysis of genetic peculiarities of *Yersinia pestis* strains (main ssp.), isolated in natural foci of the Russian Federation and Mongolia. Determined is the fact that strains of medieval biovar characterized by typical *glpD1 napA2 rhaS1* genotype circulate in 7 out of 9 marmot and sandy-type foci. Strains of antique biovar characterized by *glpD1 napA1 rhaS1* genotype prevail in the Trans-Baikal steppe foci. *Y. pestis* strains from Tuva mountain focus have similar genotype, which correlates with denitrification activity and absence of marker mutation of medieval biovar – single nucleotide substitution G→T in the 613 position of *napA* gene, and testifies to affiliation of these strains to antique biovar. Among *Y. pestis* strains isolated in Mongolia, identified are two atypical strains incapable of reducing nitrates but pertinent to antique biovar.

*Key words:* plague agent, medieval biovar, strain genotypes.

Штаммы *Yersinia pestis* основного (высоковирулентного и эпидемически значимого) подвида делятся на три биовара – античный, средневековый и восточный, каждый из которых получил пандемическое распространение во время одной из трех прошедших пандемий чумы. Для каждого из этих биоваров характерна принадлежность к различным ландшафтно-географическим зонам и очагам определенного типа. Штаммы античного биовара распространены, как правило, в высокогорных природных очагах сурчьевого типа, в то время как штаммы средневекового биовара – в равнинно-предгорных, степных и пустынных очагах сусликового и песчаночьевого типа, а штаммы восточного биовара – в очагах крысиного типа, расположенных на морских и океанических побережьях. В природных очагах чумы в Российской Федерации и сопредельных странах циркулируют штаммы средневекового и античного биоваров, причем большую часть из этих очагов занимают штаммы средневекового биовара, которые распространены на обширных пространствах засушливых зон степей и пустынь. Причины такой широкой распространенности штаммов средневекового биовара остаются не установленными. Возможно, они связаны с изменениями в геноме штаммов средневекового биовара, которые обеспечили их лучшую адаптацию к усло-

виям почвенного биоценоза нор грызунов в засушливых зонах расположения этих очагов.

В Российской Федерации существуют 11 природных очагов чумы. Значительное большинство из них (9) составляют очаги сусликового (очаги № 01–03, 14, 15, 38, 37) и песчаночьевого (№ 16, 43) типов, в которых, как правило, циркулируют штаммы средневекового биовара [6, 7]. Штаммы этого биовара распространены и в большинстве природных очагов чумы, расположенных на пограничных с Россией территориях, в том числе в большой группе Среднеазиатских пустынных очагов (№ 18–30, 42), в Закавказских песчаночьих очагах (№ 07–13), в очаге сусликового типа в Казахстане (№ 17). В связи с этим очевидна необходимость тщательного изучения штаммов *Y. pestis* средневекового биовара, имеющих широкое распространение на территории Российской Федерации. Важным также является установление генетических особенностей штаммов средневекового биовара из разных природных очагов чумы России и сопредельных стран и определение генотипов этих штаммов, наличие которых необходимо для установления происхождения изолятов *Y. pestis* и возможных путей заноса инфекции.

В основе деления штаммов *Y. pestis* основного подвида на биовары лежат два дифференциальных

биохимических признака – ферментация глицерина и редукция нитратов. Штаммы античного биовара активны в отношении обоих этих субстратов, штаммы средневекового биовара не редуцируют нитраты, а штаммы восточного биовара не ферментируют глицерин. Отсутствие ферментации глицерина связано с наличием делеции размером 93 п.н. в гене *glpD* глицерол-3-фосфатдегидрогеназы у штаммов восточного биовара, а редукции нитратов – с наличием замены единичного нуклеотида G→T в позиции 613 гена *napA* периплазматической нитратредуктазы у штаммов средневекового биовара [5, 8–10]. За исключением последнего признака, отсутствие редукции нитратов и лежащей в его основе мутации в гене *napA*, другие различия, которые могли бы быть использованы для дифференциации средневекового и античного биоваров, не выявлены. Генетические особенности штаммов средневекового биовара из природных очагов России и сопредельных стран исследованы недостаточно. В связи с этим в данной работе нами проведен анализ генетических свойств штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из природных очагов России и некоторых сопредельных стран, и определены генотипы типичных и измененных штаммов *Y. pestis*, распространенных на этих территориях.

### Материалы и методы

*Штаммы, биохимические свойства, выделение ДНК.* Используемые в работе природные штаммы *Y. pestis* из различных очагов России и пограничных стран представлены в таблице. Штаммы выращивали на агаре Хоттингера (рН 7,2), в бульоне и на агаре LB (рН 7,2) в течение 18–24 ч при 28 °С. Изучение способности к редукции нитратов, ферментации глицерина и рамнозы проводили так, как это указано в практическом руководстве по лабораторной диагностике опасных инфекционных болезней [3]. Выделение ДНК штаммов *Y. pestis* выполняли в соответствии с методическими указаниями [4].

*ПЦР, секвенирование, биоинформационный анализ.* ПЦР проводили по стандартной методике в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Для амплификации фрагментов генов применяли ранее использованные праймеры [2, 5, 9, 10]. Полученные в ПЦР продукты анализировали методом электрофореза в 1 % агарозном геле при напряжении 10–15 В/см. Для расчета олигонуклеотидных праймеров и проведения сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей использовали программы Primer Express и алгоритм BLAST. Секвенирование полученных ПЦР фрагментов генов осуществляли на генетическом анализаторе модели «SEQ 8000» (Beckman Coulter).

### Результаты и обсуждение

В работе исследованы свойства 68 штаммов *Y. pestis* основного подвида из 9 природных очагов Российской Федерации сусликового и песчаночье

типов, а также 8 штаммов, выделенных в Монголии. Количество изученных штаммов *Y. pestis* из каждого природного очага представлено в таблице. Анализ биохимических свойств этих штаммов показал, что все они не ферментируют рамнозу (как это свойственно штаммам основного подвида), ферментируют глицерин и неоднородны по признаку редукции нитратов (таблица).

Ранее нами была разработана система мультилокусного сиквенс-типирования штаммов *Y. pestis*, основанная на вариабельности генов, кодирующих дифференциальные признаки, используемые в фенотипических схемах внутривидовой классификации возбудителя чумы [1]. В разработанной системе типирования в качестве генетического маркера средневекового биовара использована мутация – замена единичного нуклеотида G→T в позиции 613 гена *napA* периплазматической нитратредуктазы. Генотип по этому гену у штаммов античного и восточного биоваров был обозначен как *napA1* (интактный ген), а штаммов средневекового биовара – *napA2* (наличие замены нуклеотида). Аналогично этому, генотип штаммов античного и средневекового биовара по гену *glpD* был обозначен как *glpD1* (интактный ген), а восточного биовара – *glpD2* (делеция размером 93 п.н.). Для разделения штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвигов использовали замену единичного нуклеотида G→A в позиции 671 регуляторного гена *rhaS* рамнозного оперона у основного подвида (генотип *rhaS1*), которая отсутствует у штаммов неосновных подвигов (генотип *rhaS2*) – кавказского, алтайского, гиссарского и улегейского [2]. В соответствии с фенотипическими признаками характерными генотипами биоваров возбудителя чумы являются: у античного – *glpD1 napA1 rhaS1*, у средневекового – *glpD1 napA2 rhaS1* и у восточного – *glpD2 napA1 rhaS1*.

Для получения молекулярной характеристики и определения генотипов штаммов из природных очагов Российской Федерации и некоторых пограничных стран нами был проведен анализ наличия у них маркерных мутаций, типичных для разных биоваров *Y. pestis*. У всех использованных в нашей работе штаммов не выявлено в ПЦР делеции размером в 93 п.н. в гене *glpD*, и, следовательно, эти штаммы не относились к восточному биовару. Все они содержали характерную для штаммов основного подвида замену единичного нуклеотида в позиции 671 гена *rhaS*, что на генетическом уровне подтверждало их принадлежность к основному подвиду возбудителя чумы. По способности к редукции нитратов и наличию характерной делеции в позиции 613 гена *napA* среди изученных штаммов *Y. pestis* было выявлено несколько вариантов. Оказалось, что в большинстве очагов (7 из 9) сусликового и песчаночье типов в России циркулируют штаммы средневекового биовара, которые содержат характерную мутацию – замену единичного нуклеотида G→T в позиции 613 гена *napA*. Это штаммы из Централь-

Штаммы *Y. pestis* из природных очагов чумы, их фенотипическая и генетическая характеристика

| Очаги<br>(количество изученных штаммов)   | Ферментация<br>глицерина | Редукция<br>нитратов | Ферментация<br>рамнозы | <i>glpD</i> * | <i>napA</i> ** | <i>rhaS</i> *** | Генотипы                            |
|---|--------------------------|----------------------|------------------------|---------------|----------------|-----------------|-------------------------------------|
| Песчаночьего типа:                        |                          |                      |                        |               |                |                 |                                     |
| Волго-Уральский песчаный (10)             | +                        | –                    | –                      | 1             | 2              | 1               | <i>glpD1 napA2 rhaS1 – cp</i>       |
| Прикаспийский песчаный (7)                | +                        | –                    | –                      | 1             | 2              | 1               | <i>glpD1 napA2 rhaS1 – cp</i>       |
| Сусликового типа:                         |                          |                      |                        |               |                |                 |                                     |
| Центрально-Кавказский высокогорный (15)   | +                        | –                    | –                      | 1             | 2              | 1               | <i>glpD1 napA2 rhaS1 – cp</i>       |
| Терско-Сунженский низкогорный (3)         | +                        | –                    | –                      | 1             | 2              | 1               | <i>glpD1 napA2 rhaS1 – cp</i>       |
| Дагестанский равнинно-предгорный (8)      | +                        | –                    | –                      | 1             | 2              | 1               | <i>glpD1 napA2 rhaS1 – cp</i>       |
| Прикаспийский Северо-Западный степной (7) | +                        | –                    | –                      | 1             | 2              | 1               | <i>glpD1 napA2 rhaS1 – cp</i>       |
| Волго-Уральский степной (5)               | +                        | –                    | –                      | 1             | 2              | 1               | <i>glpD1 napA2 rhaS1 – cp</i>       |
| Забайкальский степной (5)                 | +                        | +                    | –                      | 1             | 1              | 1               | <i>glpD1 napA1 rhaS1 – ант</i>      |
| Тувинский горный (8)                      | +                        | +                    | –                      | 1             | 1              | 1               | <i>glpD1 napA1 rhaS1 – ант</i>      |
| Монголия (8)                              |                          |                      |                        |               |                |                 |                                     |
| 2   | +                        | –                    | –                      | 1             | 1              | 1               | <i>glpD1 napA1 rhaS1 – ант</i>      |
| 6   | +                        | +                    | –                      | 1             | 1              | 1               | <i>glpD1 napA1 rhaS1 – ант</i>      |
| CO92 (GenBank)                            | –                        | +                    | –                      | 2             | 1              | 1               | <i>glpD2 napA1 rhaS1 – вост.</i>    |
| Antiqua (GenBank)                         | +                        | +                    | –                      | 1             | 1              | 1               | <i>glpD1 napA1 rhaS1 – ант</i>      |
| Harbin35 (GenBank)                        | +                        | –                    | –                      | 1             | 1              | 1               | <i>glpD1 napA1 rhaS1 – ант</i>      |
| KIM (GenBank)                             | +                        | –                    | –                      | 1             | 2              | 1               | <i>glpD1 nap2 rhaS1 – cp</i>        |
| PestoidesF (GenBank)                      | +                        | +                    | +                      | 1             | 1              | 2               | <i>glpD1 nap2 rhaS1 – кавк. n/в</i> |

\* Отсутствие (1) или наличие (2) делеции в гене *glpD*.

\*\*Отсутствие (1) или наличие (2) замены нуклеотида в позиции 613 гена *napA*.

\*\*\*Наличие (1) или отсутствие (2) замены нуклеотида в позиции 671 гена *rhaS*.

Кавказского высокогорного, Терско-Сунженского низкогорного, Дагестанского равнинно-предгорного, Прикаспийского Северо-Западного степного, Волго-Уральского степного, Волго-Уральского песчаного и Прикаспийского песчаного очагов чумы. Они имеют типичный генотип средневекового биовара *glpD1 napA2 rhaS1* (таблица).

Два из восьми штаммов *Y. pestis*, изолированных в пограничной с Россией Монголии – *Y. pestis* 231/14 (Хэнтейский аймак) и 231 (21) (Запхинский аймак), имели другой генотип. Эти штаммы не редуцировали нитраты, на основании чего были отнесены ранее к средневековому биовару. Однако проведенное нами секвенирование гена *napA* показало, что у обоих штаммов отсутствует мутация в позиции 613 этого гена, и что их генотип идентичен штаммам античного биовара – *glpD1 napA1 rhaS1*. Аналогичное несоответствие между фенотипом и генотипом выявлено нами у выделенного в Китае штамма *Y. pestis* Harbin35, который, по данным базы NCBI GenBank, относится к средневековому биовару, но, как установлено нами при анализе его нуклеотидной последовательности, также не содержит мутации в гене *napA*, и имеет генотип античного штамма – *glpD1 napA1 rhaS1*. Таким образом, нами впервые выявлено несоответствие между дифференциальным признаком – редуцированием нитратов и наличием маркерной мутации в гене *napA*, что ставит под сомнение диагностическую значимость одного из этих маркеров.

Для того чтобы уточнить биоварную принадлежность атипичных штаммов, выделенных в Монголии

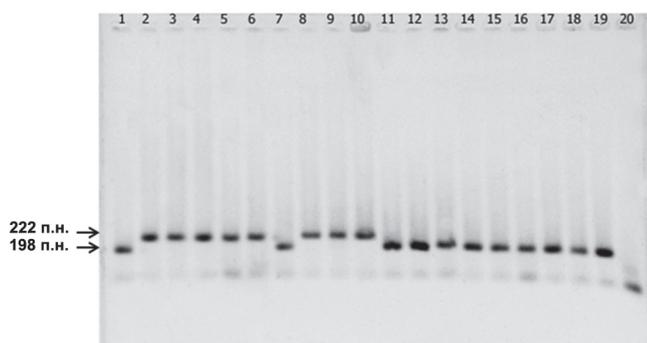
и Китае, нами был проведен поиск новых ДНК мишеней, которые могли быть использованы для дифференциации штаммов античного и средневекового биоваров. Проведенный сравнительный компьютерный анализ штаммов античного биовара *Y. pestis* Antiqua, Nepal315 (NCBI GenBank) и средневекового биовара KIM позволил нам выявить наличие делеции размером 24 п.н. после 3626563 нуклеотида у штамма KIM, которая отсутствовала у штаммов Antiqua и Nepal315. На варибельный участок генома KIM были сконструированы праймеры, имевшие следующую последовательность.

М 24-S ataccggtattttgtgc

М 24-As attaatgagacaccgcca

Подобраны оптимальные условия проведения ПЦР: 1 цикл – 94 °С в течение 5 мин, затем 35 циклов – 94 °С 45 с, 56 °С 1 мин, 72 °С 45 с и завершающий цикл – 3 мин при 72 °С.

С помощью разработанной ПЦР было исследовано наличие делеции размером 24 п.н. у штаммов основного подвида *Y. pestis*, использованных в этой работе. Оказалось, что эта делеция, обозначенная нами как М 24, отсутствовала у всех штаммов античного биовара, но присутствовала практически у всех штаммов средневекового биовара (рисунок). Эта ДНК мишень использована нами как дополнительный маркер штаммов средневекового биовара. На ее наличие были проверены атипичные штаммы, выделенные в Монголии *Y. pestis* 213/14 и 235 (21) и штамм Harbin35 из Китая (NCBI GenBank). Делеция М 24 в их геноме отсутствовала, что в комплексе с



ПЦР-анализ на наличие делеции размером 24 п.н. у штаммов *Y. pestis*:

- 1 – Терско-Сунженский низкогорный (14Д); 2–6 – Тувинский горный (И-3223, И-3358, И-2638, И-3205, 1771); 7 – Дагестанский равнинно-предгорный (С749); 8–10 – Забайкальский степной (И-1270, 1843, И-1996); 11–12 – Прикаспийский Северо-Западный степной (65(98), 177 (264)); 13–14 – Волго-Уральский степной (А-1792, 107); 15–16 – Центрально-Кавказский высокогорный (С-761, С-624); 17–18 – Волго-Уральский песчаный (М-1245, М-1274); 19 – Прикаспийский песчаный (133); 20 – отрицательный контроль

отсутствием маркерной мутации в гене *napA* доказывает принадлежность этих атипичных по признаку редукции нитратов штаммов к античному биовару.

В число 7 природных очагов чумы сусликового типа, расположенных на территории Российской Федерации, входят Забайкальский степной и Тувинский горный очаги. Фенотипический анализ штаммов *Y. pestis* из этих природных очагов чумы, показал, что они способны к редукции нитратов (таблица), что свидетельствует о том, что эти штаммы не относятся к средневековому биовару. О циркуляции штаммов *Y. pestis* античного биовара в Забайкальском степном очаге сусликового типа известно давно. Это связывают с произошедшей здесь в середине прошлого столетия сменой основного носителя. Взамен истребленного в результате хозяйственной деятельности человека монгольского сурка *Marmota sibirica* основным носителем чумы в этом природном очаге стал даурский суслик *Citellus dauricus*. В то же время смены носителя в Тувинском горном очаге не зарегистрировано, и основным носителем чумы в этом природном очаге является длиннохвостый суслик *S. undulatus*, в связи с чем остается неясным, почему штаммы из этого природного очага чумы обладают способностью к редукции нитратов, в соответствии с которой по фенотипической схеме классификации они должны быть отнесены к античному биовару.

Для определения генотипов штаммов из Забайкальского степного и Тувинского горного очагов чумы нами было проведено секвенирование гена *napA* и исследовано наличие у них делеции М 24. Как оказалось, характерная для средневекового биовара мутация (замена единичного нуклеотида G→T в позиции 613) гена *napA* у этих штаммов отсутствует, что, в комплексе с наличием у них способности к редукции нитратов, доказывает их принадлежность к античному биовару. Эта принадлежность подтверждена нами и при использовании ПЦР для выявления

делеции М 24, которая, как оказалось, отсутствует в их геноме. Полученные нами данные на генетическом уровне подтверждают принадлежность штаммов из Забайкальского степного очага чумы к античному биовару, а также впервые ставят вопрос о циркуляции штаммов античного биовара и в Тувинском горном очаге чумы сусликового типа. В отношении Тувинского горного очага чумы остается неясным вопрос о том, произошла ли здесь незарегистрированная ранее смена основного носителя, или тип носителя вообще не важен для циркуляции штаммов античного или средневекового биоваров. Полученные нами данные о циркуляции в Забайкальском степном и Тувинском горном очагах чумы сусликового типа штаммов античного биовара свидетельствуют об отсутствии жесткой корреляции между биоварной принадлежностью штаммов *Y. pestis* и типом основного носителя в очаге. Из примера Забайкальского степного очага следует, что произошедшая здесь смена носителя не привела к замене существующих на этой территории штаммов античного биовара на штаммы средневекового биовара, которые, как правило, циркулируют в очагах сусликового типа.

Результаты, полученные в этой работе, также ставят вопрос о диагностической ценности признака редукции нитратов как характерного признака средневекового биовара. Выявление нами атипичных штаммов *Y. pestis* античного биовара, не способных редуцировать нитраты, свидетельствует о необходимости использования генетического маркера – мутации (замены единичного нуклеотида G→T в позиции 613) гена *napA* для доказательства принадлежности исследуемого изолята *Y. pestis* к средневековому биовару. Эти факты еще раз подтверждают преимущество использования генетических методов дифференциации по сравнению с фенотипическими. Эти данные также требуют разработки более надежных методов разделения штаммов античного и средневекового биоваров, основанных на их генетических особенностях.

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. Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Куклева Л.М., Павлова А.И., Краснов Я.М., Шавина Н.Ю. и др. Стандартный алгоритм молекулярного типирования штаммов *Yersinia pestis*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2012; 3:25–35.
2. 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.
3. Ониценко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М: Медицина; 2009. 470 с.
4. 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.
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. *Онищенко Г.Г., Кутырев В.В.*, редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 192 с.

7. *Попов Н.В., Безсмертный В.Е., Матросов А.Н., Немченко Л.С., Вержуцкий Д.Б., Малецкая О.В.* и др. Эпизоотическая активность природных очагов чумы Российской Федерации в 2010 г. и прогноз на 2011 г. Пробл. особо опасных инф. 2011; 1(107):31–7.

8. *Deng W., Burland V., Plunkett G. et al.* Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. J. Bacteriol. 2002; 184:4601–11

9. *Motin V.L., Georgescu A.M., Elliot J.M. et al.* Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*glpD*). J. Bacteriol. 2002; 184:1019–27.

10. *Zhou D., Han Y., Song Y. et al.* DNA microarray analysis of genome dynamics in *Yersinia pestis*: insights into bacterial genome microevolution and niche adaptation. J. Bacteriol. 2004; 186:5138–46.

#### References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. *Eroshenko G.A., Odinkov G.N., Kukleva L.M., Pavlova A.I., Krasnov Ya.M., Shavina N.Yu. et al.* [Standard algorithm of molecular typing of *Yersinia pestis* strains]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2012; 3:25–35.

2. *Koukleva L.M., Eroshenko G.A., Kouklev V.E., Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Odinkov G.N., Kutyrev V.V.* [Comparison of complete nucleotide sequence of *rhaS* gene in the strains of plague etiological agent of man and minor subspecies]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; (97):38–42.

3. *Onishchenko G.G., Kutyrev V.V.*, editors [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infections. Practical Guidelines]. M.: Meditsina; 2009. 470 p.

4. [Labor management in laboratories using nucleotide acid amplification methods for work with objects containing microorganisms of I–IV groups of pathogenicity: MR 1.3.2569-09]. M.; 2009. 42 p.

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. *Onishchenko G.G., Kutyrev V.V.*, editors [Plague Natural Foci in Caucasus, Caspian Sea Region, Central Asia and Siberia]. M.: Meditsina; 2004. 192 p.

7. *Popov N.V., Bezsmertny V.E., Matrosov A.N., Nemchenko L.S., Verzhutsky D.B., Maletskaya O.V. et al.* [Epizootic activity of plague natural foci in the Russian Federation in 2010 and prognosis for 2011]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; (107):31–7.

#### Authors:

*Pavlova A.I., Eroshenko G.A., Odinkov G.N., Koukleva L.M., Shavina N.Yu., Krasnov Ya.M., Kutyrev V.V.* Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

*Павлова А.И., Ерошенко Г.А., Одиноков Г.Н., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Краснов Я.М., Кутырев В.В.* Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 05.09.12.