

Фено- и генотипический портрет штаммов *Yersinia pestis* филогрупп 2.MED4 и 2.MED1 – этиологических агентов вспышек чумы XX века в Прикаспийском регионе

А. Н. Балыкова[#] , П. А. Горюнова , Л. М. Куклева , Н. С. Червякова ,
Г. А. Ерошенко 

Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Университетская ул., д. 46, Саратов 410005, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Проведен сравнительный анализ фенотипических и генотипических характеристик штаммов возбудителя чумы филогрупп 2.MED4 и 2.MED1 средневекового биовара основного подвида из эпидемически активных в XX веке очагов чумы Прикаспийского региона. По результатам анализа определены биохимические свойства, питательные потребности и плазмидный профиль штаммов филогрупп 2.MED4 и 2.MED1 средневекового биовара *Y. pestis*. Выявлена генетическая вариативность в генах *hemS*, *caf1M* и *ssaJ*, ассоциированных с вирулентностью, у штаммов линии 2.MED. Полученные данные по фенотипическим и генотипическим характеристикам средневекового биовара могут найти свое применение в лабораторной диагностике чумного микроба и внесут вклад в исследование преобразований генома в процессе микроэволюции этого высоковирулентного биовара.

Ключевые слова: чума, штамм *Yersinia pestis*, средневековый биовар, природные очаги

Получено: 10 ноября 2022

Принято к печати: 9 декабря 2022

Опубликовано: 2 февраля 2023

#Автор, ответственный за переписку: Балыкова Алина Николаевна, научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора, Университетская ул., д. 46, Саратов, 410005 Россия, e-mail: alinabalnik@gmail.com

Цитирование: Балыкова АН, Горюнова ПА, Куклева ЛМ, Червякова НС, Ерошенко ГА. Фено- и генотипический портрет штаммов *Yersinia pestis* филогрупп 2.MED4 и 2.MED1 – этиологических агентов вспышек чумы XX века в Прикаспийском регионе. MIR J 2023; 10(1), 13-19. doi: 10.18527/2500-2236-2023-10-1-13-19.






Авторские права: © 2023 Балыкова и др. Эта статья публикуется в свободном доступе в соответствии с лицензией Creative Commons AttributionNonCommercial-ShareAlike 4.0 International Public License (CC BY-NC-SA), которая позволяет неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любых носителях при условии, что указываются автор и источник публикации, а материал не используется в коммерческих целях.

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

Финансирование: Исследование выполнено в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.



Pheno- and genotypic characteristics of *Yersinia pestis* strains of phylogroups 2.MED4 and 2.MED1 – etiological agents of plague outbreaks of the 20th century in the Caspian Sea region

Alina N. Balykova[#] , Polina A. Goryunova , Lyubov M. Kukleva , Nadezhda S. Chervyakova , Galina A. Eroshenko 

Russian Anti-Plague Institute ‘Microbe’, Rospotrebnadzor, Saratov, 410005 Russia

ABSTRACT

We performed a comparative analysis of the phenotypic and genotypic characteristics of strains of the plague pathogen of phylogroups 2.MED4 and 2.MED1 of the medieval biovar of the main subspecies from epidemically active plague foci in the Caspian Sea region in the XX century. According to the results of the analysis, biochemical properties, nutritional requirements and plasmid profile of strains of phylogroups 2.MED4 and 2.MED1 of the medieval biovar of *Y. pestis* were determined. Genetic variability in the *hemS*, *caf1M*, and *ssaJ* genes associated with the virulence in strains of the 2.MED lineage was revealed. The data obtained on the phenotypic and genotypic characteristics of the medieval biovar of the plague microbe can be used in laboratory diagnostics of the plague microbe and will contribute to the study of genome changing in the process of microevolution of this highly virulent biovar.

Keywords: plague, *Yersinia pestis* strains, medieval biovar, natural foci

Received: November 10, 2022

Accepted: December 9, 2022

Published: February 2, 2023

#For correspondence: Alina Balykova, researcher, molecular microbiology laboratory, Russian Anti-Plague Institute ‘Microbe’, Rospotrebnadzor, Saratov, 410005 Russia, e-mail: alinabalnik@gmail.com

Citation: Balykova AN, Goryunova PA, Kukleva LM, Chervyakova NS, Eroshenko GA. Pheno- and genotypic characteristics of *Yersinia pestis* strains of phylogroups 2.MED4 and 2.MED1 – etiological agents of plague outbreaks of the 20th century in the Caspian Sea region. *MIR J* 2023; 10(1), 13-19. doi: 10.18527/2500-2236-2023-10-1-13-19.

Copyright: © 2023 Balykova et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International Public License (CC BYNC-SA), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, as long as the material is not used for commercial purposes, provided that the original author and source are cited.



Conflict of interests: The authors declare no conflicts of interest.

Funding: This research was funded by the Industrial Branch Program of Rospotrebnadzor 2021-2022.

ВВЕДЕНИЕ

Чума – зоонозная природно-очаговая особо опасная инфекционная болезнь, этиологическим агентом которой является грамотрицательная бактерия *Yersinia pestis*. Чума оставила беспрецедентный след в истории всего человечества, и тысячелетия спустя она по-прежнему сохраняет свой пандемический потенциал и способна привести к чрезвычайным ситуациям в области здравоохранения. Вид *Y. pestis* включает несколько основных филогенетических линий, одна из которых – 2.MED (средневековый биовар) – является возбудителем в очагах чумы в Российской Федерации и сопредельных государствах на общей площади 1959965 км² [1, 2]. Для штаммов этого биовара характерна экологическая пластичность, его популяции

существуют в очагах различного типа: пустынных, полупустынных, горных, высокогорных, равнинных, в том числе и с высокой степенью аридизации, в которых не циркулируют другие биовары и подвиды *Y. pestis* [1-5]. Согласно историческим данным, наибольшую активность в XX веке *Y. pestis* проявила в очагах Прикаспийского региона, где в первой половине этого века произошли вспышки чумы с высоким процентом летальности [5]. Методами полногеномного SNP-анализа и филогенетической реконструкции 38 штаммов *Y. pestis* средневекового биовара нами установлено, что этиологическими агентами этих вспышек чумы в северной части Прикаспия были штаммы *Y. pestis* средневекового биовара филогрупп

2.MED1 и ранее не известной филогруппы 2.MED4 [3, 4]. При сравнении корового генома (от англ. core) выявлены отличия по SNP-профилю: 2.MED1 содержит 14 SNPs, а 2.MED4 – 9 SNPs. Уникальные полиморфизмы корового генома, отличающие новую филогруппу, находятся в генах, кодирующих биохимические процессы. Целью нашего исследования было проведение сравнительного анализа фено- и генотипических свойств штаммов *Y. pestis* филогрупп 2.MED1 и 2.MED4, вызвавших крупные вспышки чумы в Северном Прикаспии в первой половине XX века.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовано 85 штаммов *Y. pestis* филогрупп 2.MED1 и 2.MED4 из природных очагов чумы Прикаспия, выделенных в 1912–2015 гг. от носителей, переносчиков, человека. Из них 18 штаммов (1917–50 гг.) относились к филогруппе 2.MED4. Географическое распространение и источник изоляции изученных штаммов показаны на Рис. 1.

Культивирование штаммов осуществлялось на агаре или бульоне LB (pH 7.2) при температуре 28°C или

37°C в течение 24–48 ч. Для определения ферментативной активности использовали набор жидких сред Гисса и коммерческие стрипы API 20E (Bio Merieux, Франция). Для определения денитрифицирующей активности в 5 мл бульона LB с 0.1% азотнокислого калия (KNO_3) засеивали 10^8 КОЕ/мл *Y. pestis* и культивировали в течение 72 ч при 28°C. Учет осуществлялся после добавления 0.5 мл реактива Грисса: среда, содержащая штамм с денитрифицирующей активностью, приобретала малиновый цвет. Штаммы средневекового биовара не способны к восстановлению нитратов [6].

Определение питательных потребностей штаммов проводили по способу, предложенному R. Brubaker [7], с некоторыми изменениями [8]. Визуализацию результатов по установлению питательных потребностей штаммов *Y. pestis* из очагов Прикаспия в виде тепловой карты (heatmap) матрицы корреляции выполняли с помощью библиотеки seaborn v0.11.2.

Проверку способности штаммов образовывать пигментированные колонии проводили в трех параллельных посевах на среде LB с добавлением красителя Конго красного. Взвесь суточной культуры с концентрацией 5×10^5 КОЕ/мл (0.1 мл) распределяли по

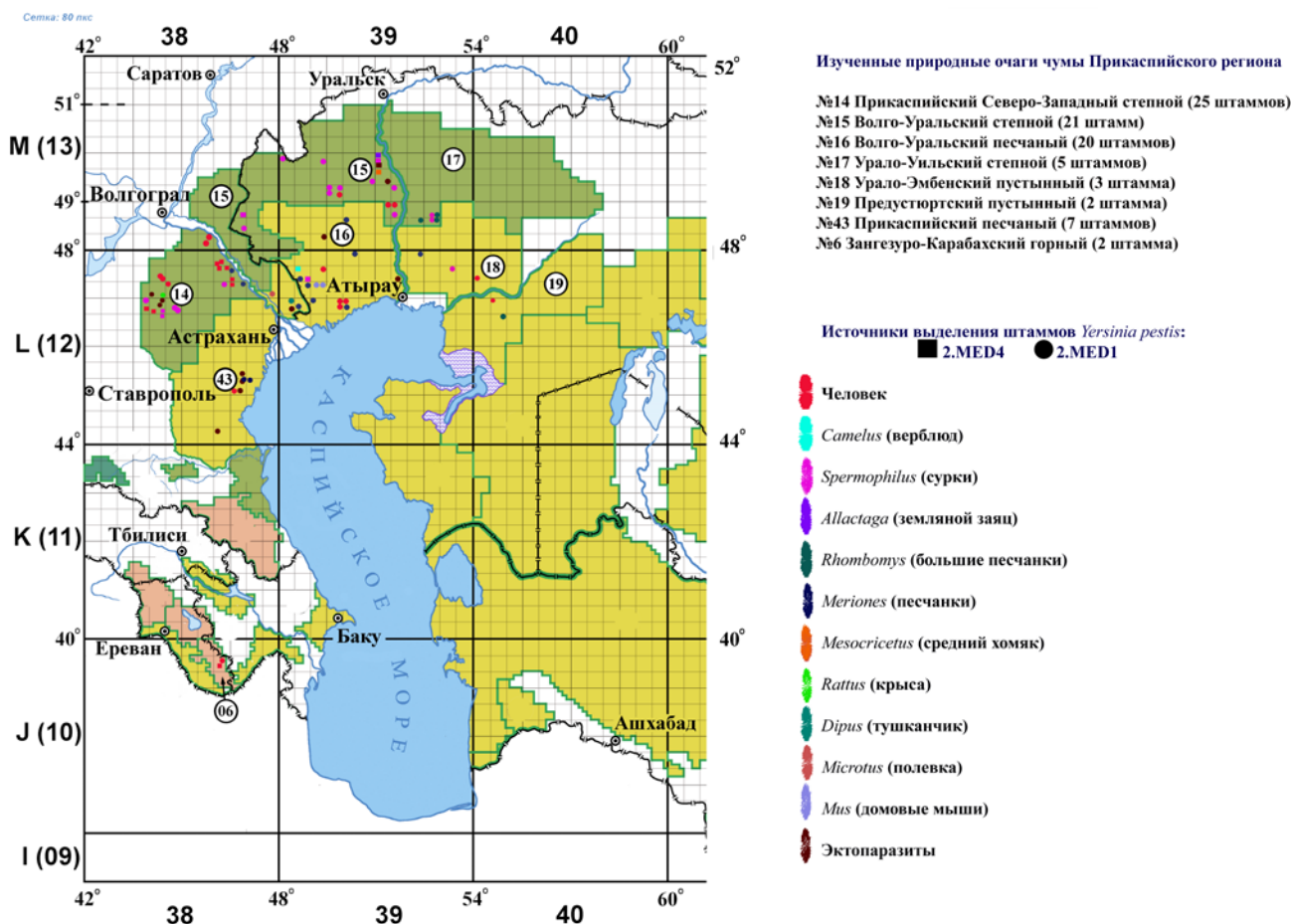


Рис. 1. Географическое распространение и источник изоляции изученных штаммов *Y. pestis* филогрупп 2.MED1 и 2.MED4. Номера очагов чумы соответствуют принятой в РФ классификации [5].

поверхности агаровой пластины, инкубировали при 28°C в течение суток с последующим выдерживанием в течение 2-10 суток при температуре 4°C. Учет результатов проводили по наличию выросших пигментированных колоний, наличие бесцветных колоний означало отсутствие или неактивность области пигментации [6].

Для проверки зависимости роста штаммов чумного микроба от присутствия в среде ионов кальция использовали среду Higuchi & Smith (магниево-оксалатный агар). Из каждого разведения взвеси суточной культуры (1×10^5 , 1×10^4 и 5×10^5 КОЕ/мл) высевали 0.1 мл на плотную питательную среду. Учет выросших Ca^{2+} -независимых колоний проводили через 48 ч инкубации при 37°C. Последующий учет Ca^{2+} -зависимых колоний осуществляли после инкубации при 28°C в течение суток. В качестве контрольного образца для определения признака пигментации и Ca^{2+} -зависимости использовался *Y. pestis* EV НИИЭГ [6]. Плазмидный профиль штаммов *Y. pestis* определяли по методике Kado и Liu [9]. Сравнение 78 генов жизнеобеспечения и вирулентности штаммов *Y. pestis* филогрупп 2.MED4 и 2.MED1 проводили, выравнивая участки генов на референсную последовательность *Y. pestis* CO92 (номер доступа в GenBank NC_003143.1) с помощью программы MEGA X, exonerate [10] и алгоритма BLAST. Полногеномные последовательности исследованных геномов были депонированы нами ранее в NCBI GenBank [1, 3, 4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биохимические свойства, питательные потребности, пигментсорбция и зависимость от ионов Ca^{2+}

В этой работе исследованы штаммы *Y. pestis* основного подвида, выделенные за период 1912-2015 гг. от носителей, переносчиков и человека в 8 очагах чумы Прикаспийского региона: Прикаспийском Северо-Западном степном (25 шт.), Волго-Уральском степном (21 шт.), Волго-Уральском песчаном (20 шт.), Урало-Уильском степном (5 шт.), Урало-Эмбенском пустынном (3 шт.), Предустюртском пустынном (2 шт.), Прикаспийском песчаном (7 шт.), Зангезуро-Карабахском горном (2 шт.). По биохимическим свойствам все изученные штаммы имели типичный фенотип средневекового биовара: денитрификация⁻, ферментация глицерина⁺, рамнозы⁻, арабинозы⁺. При использовании API 20E теста установлено, что у 18% исследованных штаммов *Y. pestis* наблюдалось наличие β -галактозидазной активности (расщепление

субстрата ONPG – орто-нитрофенил- β -галактозида – с высвобождением о-нитрофенола и галактозы). Также у 5% штаммов отмечена способность к ферментации амигдалина (гликозида, АМУ). Такие штаммы были выделены на территории Прикаспийского Северо-Западного степного (11 шт.), Волго-Уральского степного (4 шт.), Волго-Уральского песчаного (2 шт.) и Зангезуро-Карабахского горного (2 шт.) очагов чумы. По результатам анализа питательных потребностей 85 штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского региона установлено, что независимо от географического района они имели идентичные питательные потребности по фенилаланину, метионину и треонину (рис. 1А, Б). У большинства штаммов из очагов чумы Прикаспия присутствует также ауксотрофность по цистеину, только 9% от исследованной выборки в нем не нуждались. У ряда штаммов из очагов Прикаспия обнаружена потребность в лейцине (9 шт.), что согласуется с результатами других работ [7]. У штаммов первой половины XX века выявлены потребности в аргинине (4 шт.) и серине (3 шт.). Различий в питательных потребностях у штаммов филогрупп 2.MED1 и 2.MED4 не установлено. Генетические причины ауксотрофности по аргинину, серину и лейцину у ряда штаммов 2.MED1 и 2.MED4 первой половины XX века предстоит выяснить в дальнейшем. Визуализацию результатов по определению питательных потребностей штаммов *Y. pestis* из очагов Прикаспия в виде матрицы корреляции (тепловой карты, heatmap) проводили с помощью библиотеки seaborn v0.11.2, основанной на matplotlib, в python 3.9.0. (рис. 2А, Б). Подсчет частоты встречаемости питательной потребности по каждой аминокислоте осуществляли по каждому исследованному очагу (рис. 1Б).

По результатам проведенных анализов установлено, что штаммы филогрупп 2.MED4 и 2.MED1 имеют близкий профиль биохимической активности, что свидетельствует о фенотипической близости этих популяций, связанной с адаптацией к одинаковым ландшафтным, экологическим и фаунистическим условиям в природных очагах чумы.

У всех 85 исследованных штаммов *Y. pestis* были изучены признаки, ассоциируемые с вирулентностью возбудителя чумы, – пигментсорбция и зависимость роста от присутствия в среде ионов Ca^{2+} . Утрата этих признаков приводит к аттенуации штаммов чумного микроба. Анализ наличия способности у штаммов *Y. pestis* поглощать пигмент на среде LB с добавлением Конго красного показал, что у ряда штаммов отсутствовала способность к сорбции красителя, что проявлялось в их росте в виде колоний белого цвета. Пигментированные колонии отсутствовали у 8 штаммов,

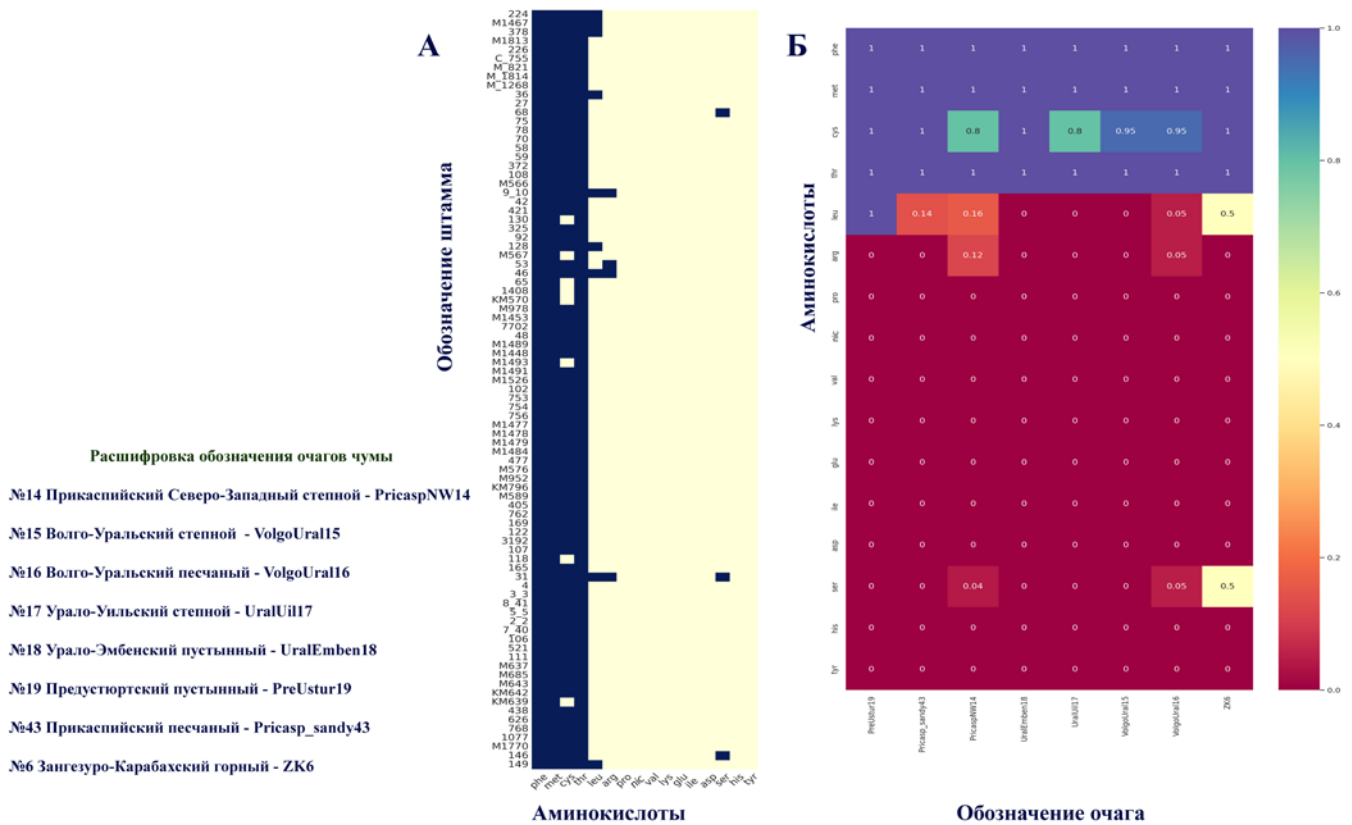


Рис. 2. Анализ питательных потребностей штаммов *Yersinia pestis* из очагов чумы Прикаспия. **А.** Матрица корреляции по питательным потребностям штаммов *Y. pestis* из очагов Прикаспия в виде тепловой карты (heatmap), построенная с помощью библиотеки seaborn v0.11.2, основанной на matplotlib, в python 3.9.0. Слева от матрицы по вертикали указаны штаммы возбудителя чумы, снизу по горизонтали – символы использованных аминокислот. Nic – никотинамид. **Б.** Матрица частоты встречаемости питательной потребности по каждой аминокислоте в природных очагах чумы.

у 24 штаммов отмечена гетерогенность по этому признаку (80-90% Pgm⁺; 60-70% Pgm⁻). Потеря *pgm* области (102 т.п.н.), ответственной за проявление этого признака, у части изученных штаммов ранних годов выделения могла произойти вследствие ее неустойчивости (гомологичной рекомбинации между двумя копиями фланкирующих элементов IS100). Анализ зависимости роста штаммов *Y. pestis* от присутствия ионов Ca²⁺ на среде Higuchi & Smith при 37°C показал, что 2 штамма *Y. pestis* средневекового биовара филогруппы 2.MED1 первой половины XX века не имеют этой зависимости, что свидетельствует о возможной утрате детерминанты вирулентности – плазмиды Ca²⁺-зависимости pCD1.

Плазмидный скрининг штаммов *Y. pestis* филогрупп 2.MED4 и 2.MED1

Для возбудителя чумы, помимо кольцевой хромосомной ДНК, характерно наличие трёх резидентных плазмид. Родоспецифической является плазида Ca²⁺-зависимости pCD1. У *Y. pestis* также есть видоспецифические плазмиды: pMT1 – фракционная

и pPCP1 – плазида пестициногенности. Все три плазмиды содержат гены вирулентности, необходимые для реализации инфекционного процесса или трансмиссивной передачи чумы с помощью блох. По результатам скрининга выявлено, что у 16 штаммов первой половины XX века отсутствует плазида пестициногенности pPCP1. Это могло произойти вследствие длительного хранения без лиофилизации. Штаммы были изолированы из разных источников на территории Прикаспийского Северо-Западного степного (5), Волго-Уральского степного (4) и Волго-Уральского песчаного (7) очагов чумы. Плазмиды Ca²⁺-зависимости pCD1 лишены 2 штамма *Y. pestis* 2.MED1 средневекового биовара первой половины XX века, что коррелирует с полученными результатами анализа зависимости роста при 37°C на среде Higuchi&Smith от присутствия ионов Ca²⁺. Плазида pCD1 кодирует гены, которые участвуют в механизмах проявления вирулентности чумного микроба, при ее потере штамм становится авирулентным. Остальные изученные штаммы возбудителя чумы средневекового биовара обладали всеми тремя плазмидами и являлись вирулентными.

Изучение генетических детерминант вирулентности и «домашнего хозяйства» штаммов Y. pestis филогруппы 2.MED4 в сравнении с другими штаммами средневекового биовара

Нами проведен сравнительный анализ 78 генов вирулентности и «домашнего хозяйства» у штаммов *Y. pestis* филогруппы 2.MED4 и штаммов других ветвей средневекового биовара, полногеномные последовательности которых были депонированы нами ранее в базе данных NCBI GenBank [1, 3, 4]. С помощью программ MEGA X, exonerate и алгоритма BLAST были проанализированы гены, кодируемые хромосомой (43 гена) и тремя плазмидами возбудителя чумы: рMT1 (3 гена), рCD1 (29 генов), рPCP1 (3 гена). Гены, расположенные на хромосоме, вовлечены в механизмы проявления вирулентности, энергетического обмена, мембранного транспорта и борьбы за выживание в условиях дефицита питательных веществ: это гены хромосомной области пигментации, адгезины – рН6 антиген и Ail белок, различные ферменты, белки-транспортёры, мембранные белки и регуляторы транскрипции. В хромосомном гене *hemS*, кодирующем гемодеградирующий фактор, найдена синонимичная замена (111, С → Т). Данная замена присутствует у всех филогенетических ветвей средневекового биовара (Таблица 1).

По результатам сравнительного анализа последовательности нуклеотидов генов *caf1AM* (ген капсулообразования) и *umt* («мышинный» токсин), кодируемых плазмидой рMT1, выявлена несинонимичная замена (G → A, 29; nsSNP: G → E, 10) в нуклеотидной последовательности гена *caf1M* периплазматического шаперона (в составе оперона *caf1* капсулообразования) у штаммов 2.MED4 по сравнению с 2.MED1 и другими филогенетическими ветвями *Y. pestis*. Замена находится в 10-й аминокислоте белковой последовательности и, по всей видимости, не нарушает функциональной активности белка, что было

подтверждено иммунохроматографическим тестом на наличие капсульного антигена F1 (производство Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболенск). Из генов, расположенных на плазмиде рCD1, было проанализировано 29 генов, кодирующих вирулон Yop (*yopEHIJKMT, ypkA*), компоненты системы секреции III типа (*ycsBCDEFGKLOPQRSTUYVX, ssaJ, lcrRO*), V антиген (*lcrV*). В гене *ssaJ* плазмиды рCD1, кодирующем белок аппарата секреции III типа семейства YscD / HrpQ, найдена инсерция цитозина (C) в 272 положении. Данная инсерция привела к мутации сдвига рамки считывания (от англ. frameshift) и нарушению функции гена. Поскольку аппарат Ysc состоит из 25 белков, вполне вероятно, что выполнение функции гена *ssaJ* могли взять на себя другие белки этого комплекса. Мутация специфична для средневекового биовара ветвей 2.MED1, 2.MED2, 2.MED3, 2.MED4, но не 2.MED0 (Таблица 1). В генах активатора плазмидогена (*pla*), пестицина (*pst*), белка иммунности к пестицину (*pim*), расположенных на плазмиде рPCP1, вариабельности у штаммов средневекового биовара обнаружено не было. Исследованные гены вирулентности и «домашнего хозяйства» показали высокую степень консервативности, что объясняется важностью их продуктов для процесса патогенеза и обеспечения жизнедеятельности, а также эволюционной молодостью средневекового биовара чумного микроба.

Таким образом, в этой работе выполнен анализ фенотипических и генотипических характеристик штаммов *Y. pestis* средневекового биовара филогрупп 2.MED1 и 2.MED4, которые являлись этиологическими агентами вспышек чумы в начале XX века в Прикаспии, для определения их феногенетического портрета. По результатам комплексного исследования биохимических свойств и питательных потребностей 85 штаммов *Y. pestis* из очагов Прикаспия значимых отличий на фенотипическом уровне между штаммами 2.MED4 и 2.MED1 обнаружено не было. Выявлено, что

Таблица 1. Выявленные SNPs у штаммов *Y. pestis* средневекового биовара

Расположение гена	Ген, тип SNP, замены ^a	Кодируемый продукт	Филогенетическая принадлежность
Хромосома	<i>hemS</i> 111, С → Т синонимичная	Гемодеградирующий фактор	Специфична для 2.MED
рMT1	<i>caf1M</i> 29, G → A несинонимичная Глицин G → Глутаминовая к-та E	Периплазматический шаперон (в составе оперона капсульного антигена F1)	Специфична для 2.MED4
рCD1	<i>ssaJ</i> инсерция C (272)	Белок аппарата секреции III типа, семейство YscD / HrpQ	Специфична для 2.MED1, 2.MED2, 2.MED3, 2.MED4

^a замены указаны относительно позиции в гене референсного штамма *Y. pestis* CO92 (AL590842.1).

все изученные штаммы 2.MED4 и 2.MED1 из этих природных очагов проявляют питательную потребность в метионине, фенилаланине и треонине. Большинство штаммов из исследованной выборки нуждались в цистеине, только у 9% штаммов эта потребность отсутствовала. Установлены дополнительные потребности штаммов *Y. pestis* из Прикаспийского региона первой половины XX века в R (аргинин) – 4 шт. – и S (серин) – 3 шт. У некоторых штаммов первой половины XX века отсутствуют плазмиды пестициногенности pPCP1 и Ca²⁺-зависимости pMT1. При проверке свойства пигментсорбции установлено, что у ряда штаммов отсутствует хромосомная область пигментации. При анализе 78 генов, ассоциированных с вирулентностью, и генов жизнеобеспечения получены новые данные по генетической изменчивости гена *hemS* гемодеградирующего фактора у штаммов средневекового биовара, гена *caf1M* периплазматического шаперона в составе оперона синтеза фактора вирулентности-белковой капсулы F1 у филогруппы 2.MED4 чумного микроба и гена *ssaJ* аппарата секреции III типа из семейства YscD / HrpQ у штаммов филогенетических ветвей 2.MED1, 2.MED2, 2.MED3, 2.MED4 средневекового биовара.

Отсутствие значимых фенотипических различий в дифференциальных биохимических свойствах между филогруппами 2.MED4 и 2.MED1 можно объяснить коротким периодом их дивергенции, а также одинаковыми условиями существования в природных экосистемах Прикаспийского региона. Согласно полученным нами результатам в этой и других работах, а также данным эпизоотологического мониторинга, можно предположить симпатрический сценарий образования этих популяций средневекового биовара [3-5]. Последствия обнаруженных однонуклеотидных замен в генах вирулентности и жизнеобеспечения, обусловивших дивергенцию этих филогрупп, еще предстоит выявить. Дальнейшее исследование фенотипических и генотипических особенностей штаммов средневекового биовара *Y. pestis* позволит определить генетические основы причин ауксотрофности и особенностей биохимического профиля этого биовара, что может быть использовано в лабораторной диагностике чумного микроба, а также для характеристики родственных отношений этих высоковирулентных популяций *Y. pestis* в современный период.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Kutyrev VV, Eroshenko GA, Motin VL, Nosov NY, Krasnov JM, Kukleva LM et al. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States. *Front Microbiol* 2018; 9(1106), 1-11. doi: 10.3389/fmicb.2018.01106.
2. Попов НВ, Ерошенко ГА, Карнаухов ИГ, Кузнецов АА, Матросов АН, Иванова АВ и др. Эпидемиологическая ситуация по чуме в 2020 г. Прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы Российской Федерации и других стран СНГ на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций* 2021; 1, 52-62. doi: 10.21055/0370-1069-2021-1-52-62.
3. Eroshenko GA, Popov NV, Al'khova ZV, Kukleva LM, Balykova AN, Chervyakova NS et al. Evolution and circulation of *Yersinia pestis* in the Northern Caspian and Northern Aral Sea regions in the 20th-21st centuries. *PLoS ONE* 2021; 16(2), e0244615. doi: 10.1371/journal.pone.0244615.
4. Balykova AN, Kukleva LM, Naryshkina EA, Eroshenko GA, Kutyrev VV. Five Draft Genome Sequences of Historical *Yersinia pestis* Strains of Phylogroups 2.MED4 and 2.MED1 of the Medieval Biovar. *Microbiol Resour Announc* 2022; 11(5), e0004422. doi: 10.1128/mra.00044-22.
5. Кадастр эпидемических и эпизоотических проявлений чумы на территории Российской Федерации и стран ближнего зарубежья (с 1876 по 2016 год). Под ред. акад. РАМН В. В. Кутырева и проф. А. Ю. Поповой. Саратов: ООО «Амирит», 2016. 248 с.
6. Онищенко ГГ, Кутырев ВВ. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Изд. 2-е перераб. и доп. М.: ЗАО «Шико», 2013. 560 с.
7. Brubaker R. Interconversion of Purine Mononucleotides in *Pasteurella pestis*. *Infect Immun* 1970; 1(5), 446-54. doi: 10.1128/iai.1.5.446-454.1970.
8. Куклева ЛМ, Одинокоев ГН, Шавина НЮ, Ерошенко ГА, Кутырев ВВ. Сравнительный анализ питательных потребностей штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов и генетические причины их ауксотрофности. *Проблемы особо опасных инфекций* 2013; 2, 33-6. doi: 10.21055/0370-1069-2013-2-33-36.
9. Kado C, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981; 145(3), 1365-73. doi: 10.1128/jb.145.3.1365-1373.1981.
10. Slater GS, Birney E. Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. *BMC Bioinformatics* 2005; 6, 31. doi: 10.1186/1471-2105-6-31.