

Е.В.Сазанова, В.Е.Куклев, Т.А.Малюкова, Л.М.Куклева, А.Н.Малахаева, Н.И.Вахрушина

## ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В УЧЕБНОМ ПРОЦЕССЕ

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

**Цель исследования.** Детекция основных генов вирулентности хромосомной и плазмидной локализации штаммов возбудителя чумы – кандидатов в учебные. **Материалы и методы.** В работе использовано 18 штаммов *Yersinia pestis*. Исследования проводили с помощью набора реагентов для идентификации штаммов *Y. pestis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени («Ген *Yersinia pestis* идентификация – РФФ»). **Результаты и обсуждение.** В ходе исследования штаммы возбудителя чумы, подобранные в качестве кандидатов в учебные, были охарактеризованы по составу основных генов вирулентности хромосомной и плазмидной локализации. Работу проводили с помощью набора реагентов для идентификации штаммов *Y. pestis* методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени. На основании оценки молекулярно-генетических свойств штаммов возбудителя чумы были выделены генетические варианты, в геноме которых зафиксировали отсутствие одной или нескольких основных детерминант вирулентности, наиболее перспективные для использования с целью снижения биологических рисков обучающих технологий на практических занятиях при освоении учебного модуля «Микробиология и лабораторный диагноз чумы».

**Ключевые слова:** ПЦР-анализ, *Yersinia pestis*, учебные штаммы, биологическая безопасность.

Корреспондирующий автор: Сазанова Елена Владимировна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

E.V.Sazanova, V.E.Kuklev, T.A.Malyukova, L.M.Kukleva, A.N.Malakhaeva, N.I.Vakhrushina

## Characteristics of Molecular-Genetic Properties of Plague Agent Strains – Promising for Application with Educational Purposes

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

Training of specialists in advanced methods of plague laboratory diagnostics and in the safety of works with its agent is associated with the necessity to select strains for educational purposes, allowing for the reduction of risk of laboratory infection at tutorials. Deployment of avirulent strains or those with attenuated virulence is the guiding principle in the case. **Objective** of the study is to detect basic virulence genes of chromosomal and plasmid localization in plague agent strains – candidates to be used for educational purposes. **Materials and methods.** Utilized have been 18 strains of *Yersinia pestis*. Investigations have been carried out with the help of reagent panel for identification of *Y. pestis* strains using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) with hybridization-fluorescent registration of results (“Gene *Yersinia pestis* Identification – HFR”). **Results and discussion.** In the course of the study, the strains, selected as the prospective ones, have been characterized by composition of the key virulence genes of chromosomal and plasmid localization. The operation has been performed by means of the reagent panel for identification of *Y. pestis* strains using RT-PCR with hybridization-fluorescent registration of results. Consequently to the assessment of molecular-genetic properties of plague agent strains, distinguished have been genetic variants (the genome of which lacks one or more key virulence determinants) which are the most relevant in the reduction of biological risks of training technologies at tutorials within the frames of the educational course “Microbiology and laboratory diagnostics of plague”.

**Key words:** PCR-analysis, *Yersinia pestis*, strains used for educational purposes, biological safety.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Elena V. Sazanova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

**Citation:** Sazanova E.V., Kuklev V.E., Malyukova T.A., Kukleva L.M., Malakhaeva A.N., Vakhrushina N.I. Characteristics of Molecular-Genetic Properties of Plague Agent Strains – Promising for Application with Educational Purposes. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 2:83–86. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-83-86

Природные очаги чумы зарегистрированы на всех континентах, кроме Австралии и Антарктиды. На территории стран Содружества Независимых Государств расположено 45 природных очагов чумы, в том числе 11 – в Российской Федерации. По данным ВОЗ, в мире в среднем ежегодно регистрируют около 2000 случаев чумы у людей, часть из которых имеет летальный исход. С 1999 г. по настоящее время в странах ближнего зарубежья (Казахстан, Киргизия) неоднократно фиксировали заболевания людей чумой. В Российской Федерации в 1979 г. заражение человека чумой было зафиксировано в

Республике Калмыкия на фоне резкой активизации Прикаспийского песчаного природного очага чумы, а в сентябре 2014 г. – на территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага [2].

Для предупреждения возникновения чумы, а также завоза и распространения из стран ближнего и дальнего зарубежья в Российской Федерации и странах Таможенного союза внедрены и успешно реализуются Международные медико-санитарные правила (ММСП, 2005 г.), являющиеся стандартизирующим инструментом глобальной и национальной готовности к предупреждению и ответным мерам на

чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения. Разработанная методология внедрения ММСП на национальном уровне базируется на преобразовании на инновационной основе организационного, методологического, технологического, материально-технического, кадрового, производственного (МИБП), нормативно-методического обеспечения системы предупреждения, надзора и контроля чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, имеющих национальное и международное значение. При этом одним из актуальных мероприятий является обучение специалистов современным методам лабораторной диагностики чумы и безопасной работы с возбудителем болезни. Вместе с тем национальная концепция обеспечения биологической безопасности определяет необходимость максимального сокращения использования в технологических процессах патогенных микроорганизмов [1, 6]. В сфере снижения биологических рисков обучающих технологий это означает необходимость подбора штаммов возбудителя чумы в качестве учебных и применения их при реализации программ дополнительного профессионального образования.

Слушатели курсов при освоении учебного модуля «Микробиология и лабораторный диагноз чумы» проводят исследования на пробах-имитаторах патогенных биологических агентов (ПБА) методами, включенными в регламентированную схему лабораторной диагностики, в том числе биологическим методом [4, 5, 8].

Методические рекомендации по приготовлению проб-имитаторов ПБА предлагают использование штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ [9]. Однако это не позволяет обучающимся изучить биологические свойства всех подвигов возбудителя чумы в полном объеме. Кроме того, используемый вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ при имитации чумы у лабораторных животных не позволяет стабильно получать типичную патоморфологическую картину, а также выделять микроорганизмы при посеве паренхиматозных органов.

Ранее нами были предложены критерии подбора учебных штаммов и определены принципы формирования из них специализированного набора с целью обучения. основополагающим принципом является использование авирулентных штаммов или штаммов со сниженной вирулентностью [11].

В соответствии с предложенными критериями нами были подобраны 19 штаммов возбудителя чумы – кандидатов в учебные, из числа хранящихся в Государственной коллекции патогенных бактерий (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»). Однако было установлено, что у 72 % штаммов отсутствуют данные о наличии генетических маркеров вирулентности и срок их хранения составляет от 9 до 60 лет. Следовательно, необходимо провести оценку аутентичности штаммов – кандидатов в учебные для получения представления об их вирулентности в настоящий момент.

Цель исследования – охарактеризовать штаммы возбудителя чумы – кандидаты в учебные по составу основных генов вирулентности хромосомной и плазмидной локализации.

## Материалы и методы

В работе использовано 18 штаммов *Yersinia pestis*, подобранные согласно выработанным критериям и на основании изученных морфологических, культуральных, биохимических свойств. Из них 13 штаммов выделены на территории природных очагов; 2 штамма – кандидаты в вакцинные, не прошедшие государственные испытания; 2 авторских экспериментальных штамма, входящие в изогенную систему на основе высоковирулентного штамма *Y. pestis* 231; 1 штамм, резистентный к бактериофагам, применяемым в схеме лабораторной диагностики чумы (таблица). Штаммы *Yersinia pestis* выращивали на агаре Хоттингера, рН 7,2, при температуре (28±1) °С в течение 48 ч.

Исследования проводили с помощью набора реагентов для идентификации штаммов *Y. pestis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени («Ген *Yersinia pestis* идентификация – РГФ») по следующей программе: 1 цикл – 95 °С 15 мин, затем 10 циклов: 95 °С – 30 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 30 с и еще 35 циклов: 95 °С – 20 с, 56 °С – 20 с, 72 °С – 20 с. Флуоресценцию измеряли при 56 °С по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange.

Идентификация чумного микроба с помощью данного набора реагентов основана на одновременной амплификации фрагментов следующих генов: *pla* (плазида pPst), хромосомного локуса *3a*, *cafI* (плазида pFra), *hmsH* (*hms*-локус хромосомной области пигментации) и двух генетических маркеров, ассоциированных с вирулентностью: *irp2* (остров высокой патогенности) и *lcrV* (плазида pCad).

## Результаты и обсуждение

В ходе исследования у 18 штаммов установлено наличие хромосомного видоспецифичного фрагмента *3a* (таблица), что подтверждало отнесение их к виду *Y. pestis* и соответствовало паспортным данным.

Все изученные с помощью ПЦР штаммы содержали ген *cafI* – маркер плазмиды pFra. Вместе с тем у девяти штаммов выявлено отсутствие плазмиды pPst (гена *pla*), у четырех – плазмиды pCad (гена *lcrV*), у десяти – *ybt*- и/или *hms*-регионов области пигментсорбции острова патогенности (генов *hmsH* и/или *irp2*).

Как известно, видоспецифичная плазида pPst содержит ген *pla*, кодирующий синтез специфичных для возбудителя чумы белков: бактериоцина – пестицина и активатора плазминогена. Активатор плазминогена в условиях 37 °С осуществляет инвазию

Характеристика штаммов *Yersinia pestis* с помощью набора реагентов «Ген *Yersinia pestis* идентификация – РГФ»

Штамм	Генетические маркеры					
	<i>3a</i> (хромосома)	<i>pla</i> (плазмида pPst)	<i>cafI</i> (плазмида pFra)	<i>lcrV</i> (плазмида pCad)	<i>irp2</i> (хромосомный остров патогенности)	<i>hmsH</i> (хромосомный остров патогенности)
<i>Y. pestis</i> 14/44	+	+	+	+	-	-
<i>Y. pestis</i> 707 Касуга	+	+	+	-	+	+
<i>Y. pestis</i> M-1813	+	+	+	+	-	-
<i>Y. pestis</i> 7896	+	-	+	+	+	+
<i>Y. pestis</i> 290 (1499)	+	-	+	+	+	+
<i>Y. pestis</i> 100P6(36M5)	+	+	+	+	-	-
<i>Y. pestis</i> 652 «Гризель»	+	-	+	+	+	+
<i>Y. pestis</i> 780 (K-1)	+	-	+	+	-	-
<i>Y. pestis</i> 471 Овсепсика	+	-	+	+	+	+
<i>Y. pestis</i> KM 260 (5)	+	+	+	-	+	+
<i>Y. pestis</i> M-1815	+	+	+	+	-	-
<i>Y. pestis</i> 521 (2101)	+	+	+	+	-	-
<i>Y. pestis</i> M-1814	+	+	+	+	-	-
<i>Y. pestis</i> 6483 АМО	+	-	+	+	+	+
<i>Y. pestis</i> 22 (22)	+	-	+	+	-	-
<i>Y. pestis</i> 835 2 «РВС»	+	-	+	+	+	+
<i>Y. pestis</i> KM- 130 (3)	+	-	+	-	-	-
<i>Y. pestis</i> A-819	+	+	+	-	-	-

тканей теплокровных организмов за счет прикрепления к внеклеточному матриксу, а также разрушает фибриновые пленки, облегчая выход возбудителя из очага воспаления и его дальнейшее распространение. В условиях 28 °С реализуется плазмокоагуляционная активность, которая важна для обеспечения специфического трансмиссивного пути передачи возбудителя чумы. Таким образом, продукция плазмиды pPst играет важную роль в патогенезе чумы, но не является основной детерминантой вирулентности [3, 10, 12, 14, 15].

Видоспецифичная плазмида возбудителя чумы pFra кодирует продукцию капсульного антигена (FI), его транспорт на поверхность клетки и сборку капсулы, а также синтез мышинового токсина. Значение FI в патогенезе связано с антифагоцитарными свойствами – противодействием фагоцитозу возбудителя чумы нейтрофилами и моноцитами, но не макрофагами. Наличие этого антигена не всегда коррелирует с вирулентностью, следовательно, он не относится к числу основных факторов вирулентности [3, 10, 12, 14, 15].

Плазмида pCad, которая является общим репликоном для всех патогенных иерсиний, несет одну из главных детерминант вирулентности – ген *lcrV* [7].

Одним из основных генетических детерминант вирулентности хромосомной локализации является ген *irp2*, расположенный в пределах *ybt*-региона острова высокой патогенности [3, 10, 12, 14, 15]. Гены пигментации, или хранения гемина, *hms* (5 генов) видоспецифичны. В 1992 г. В.В.Кутыревым и соавт. было показано, что фактор пигментации не имеет значения для вирулентности, но важен для приживания и размножения возбудителя чумы в преджелудке блохи, а

также для образования блока преджелудка. Результаты представлены в диссертационном исследовании.

В ходе ПЦР-анализа определены следующие генетические варианты изученных штаммов возбудителя чумы: pFra<sup>+</sup>pPst<sup>+</sup>pCad<sup>+</sup>Pgm<sup>-</sup> (6 штаммов); pFra<sup>+</sup>pPst<sup>+</sup>pCad<sup>-</sup>Pgm<sup>+</sup> (2 штамма); pFra<sup>+</sup>pPst<sup>-</sup>pCad<sup>+</sup>Pgm<sup>+</sup> (6 штаммов); pFra<sup>+</sup>pPst<sup>-</sup>pCad<sup>+</sup>Pgm<sup>-</sup> (2 штамма); pFra<sup>+</sup>pPst<sup>-</sup>pCad<sup>-</sup>Pgm<sup>-</sup> (1 штамм); pFra<sup>+</sup>pPst<sup>+</sup>pCad<sup>-</sup>Pgm<sup>-</sup> (1 штамм) (таблица).

Однако при анализе полученных результатов у штамма KM130(3) установлено несоответствие генетических характеристик, полученных в результате ПЦР-анализа, и содержащихся в паспорте. Согласно паспорту штамм характеризуется как pCad<sup>+</sup>, а по данным ПЦР – pCad<sup>-</sup>. Для уточнения сведений проведен плазмидный скрининг [13], который подтвердил наличие плазмиды pCad. Причиной, по которой она не была обнаружена при ПЦР-анализе, является делеция фрагмента гена *lcrV*, комплементарного праймерам и зонду в использованном наборе реагентов.

Таким образом, на основании ПЦР-анализа изучаемые штаммы *Y. pestis* были дифференцированы на имеющие детерминанты вирулентности хромосомной (Pgm<sup>+</sup> – *irp2* и *hmsH*) и плазмидной локализации (pCad<sup>+</sup>) и штаммы, в геноме которых наблюдается отсутствие одной или нескольких детерминант вирулентности.

Для использования в качестве учебных наиболее перспективными являются следующие генетические варианты штаммов: Pgm<sup>-</sup> (*hmsH<sup>-</sup>*, *irp2<sup>-</sup>*) pCad<sup>+</sup> (*lcrV<sup>+</sup>*) или Pgm<sup>+</sup> (*hmsH<sup>+</sup>*, *irp2<sup>+</sup>*) pCad<sup>-</sup> (*lcrV<sup>-</sup>*).

Однако наличие детерминант вирулентности не позволяет дать окончательную характеристику виру-

лентности штаммов. Регламентированный подход к оценке вирулентности штаммов возбудителя чумы, включает комплексное исследование *in vitro*, а также *in vivo* на лабораторных животных. В связи с тем, что многие из исследованных штаммов имеют срок хранения в ГКПБ более 9 лет, целесообразно провести контроль их вирулентности с помощью методов, регламентированных действующими нормативно-методическими документами (определить вирулентность *in vitro*, установить LD<sub>50</sub>, оценить патоморфологическую картину чумы, развивающуюся при заражении ими лабораторных животных), а также оценить стабильность выделения возбудителя из паренхиматозных органов.

Таким образом, на основании ПЦР-анализа из исследованной группы штаммов *Y. pestis* отобраны генетические варианты, в геноме которых наблюдается отсутствие одной или нескольких основных детерминант вирулентности. Для оценки степени вирулентности конкретных штаммов необходимо установить LD<sub>50</sub> для лабораторных животных, а также определить вирулентность *in vitro* регламентированными методами. Штаммы, отнесенные к группам авирулентных (LD > 10<sup>5</sup> м.к.) и слабовирулентных (LD > 10<sup>6</sup> м.к.), сформируют группу наиболее перспективных для использования в качестве учебных с целью снижения биологических рисков обучающих технологий на практических занятиях при освоении учебного модуля «Микробиология и лабораторный диагноз чумы».

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Концепция Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации». [http://fcgie.ru/DOC/170712/post\\_74r.pdf](http://fcgie.ru/DOC/170712/post_74r.pdf) (дата обращения 11.03.2016 г.).
2. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Щучинов Л.В., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Денисов А.В., Шарова И.Н., Попов Н.В., Кузнецов А.А. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 1. Эпидемиологические и эпизоотологические особенности проявлений чумы в Горно-Алтайском высокогорном (Сайлюгемском) природном очаге чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 4: 9–16.
3. Кутырев В.В., Проценко О.А. Классификация и молекулярно-генетические исследования *Y. pestis*. *Пробл. особо опасных инф.* 1998; 78:11–22.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. 2-е изд. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
5. Организация и проведение эпизоотологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации: МУ 3.1.3.2355-08. М., 2009. 103 с.
6. Основы государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2025 года и дальнейшую перспективу. <http://docs.cntd.ru/document/499057916> (дата обращения 11.03.2016 г.).
7. Попов Ю.А., Проценко О.А., Анисимов П.И., Кокушкин А.М., Можаров О.Т. Обнаружение плазмид пестициногенности чумного микроба методом электрофореза в агарозном геле. В кн.: Профилактика особо опасных инфекций. Саратов; 1980. С. 20–25.
8. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики чумы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: МУК 4.2.2940-11. М., 2011. 55 с.

9. Приготовление проб с имитаторами патогенных биологических агентов: МУ 4.2.1103-02. М., 2002.
10. Проценко О.А., Анисимов П.И., Можаров О.Т., Коннов Н.П., Попов Ю.А., Кокушкин А.М. Выявление и характеристика плазмид чумного микроба, детерминирующих синтез пестицина I, антигена фракция I и экзотоксина «мышинного» токсина. *Генетика*. 1983; 19(7):1081–90.
11. Сазанова Е.В., Малукова Т.А., Попов Ю.А. Учебные штаммы *Yersinia pestis*: критерии подбора, принципы применения. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 3:38–41.
12. Hinnebusch B.J., Rudolph A.E., Cherepanov P., Dixon J.E., Schwan T.G., Forsberg A. Role of *Yersinia murine* toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. *Science*. 2002; 296:733–35. DOI: 10.1126/science.1069972.
13. Kado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 1981; 145 (3):1365–73.
14. Kutyrev V.V., Mehig R.J., Motin V.L., Pokrovskaya M.S., Smirnov G.B., Brubaker R.R. Expression of the plague plasminogen activator in *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1999; 67:1359–67.
15. Perry R.D., Fetherston J.D. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997; 10:35–66.

#### References

1. [Conception of the Federal Target Program “National system of chemical and biological safety of the Russian Federation”]. (Cited 11 Mar 2016). Available from: [http://fcgie.ru/DOC/170712/post\\_74r.pdf](http://fcgie.ru/DOC/170712/post_74r.pdf).
2. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakschina N.D., Shchuchinov L.V., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Rozhdvestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Denisov A.V., Sharova I.N., Popov N.V., Kuznetsov A.A. [Infection of an individual with plague in the Gorno-Altai high-mountain natural focus in 2014. Communication 1. Epidemiological and epizootological peculiarities of plague manifestations in the Gorno-Altai high-mountain (Sailyugemsky) natural plague focus]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 4:9–16.
3. Kutyrev V.V., Protsenko O.A. [Classification and molecular-genetic investigations of *Yersinia pestis*]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1998; 78:11–22.
4. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory diagnostics of dangerous infectious diseases: practice guidelines. 2<sup>nd</sup> edition]. М.: “Shiko”; 2013. 560 p.
5. [Organization and carrying out of epidemiological surveillance in the natural plague foci in the territory of the Russian federation]. MR 3.1.3.2355-08. М.; 2009. 103 p.
6. [Basic Principles of the State Policy in the provision of chemical and biological safety of the Russian Federation for the period until 2025 and prospective further on]. (Cited 11 Mar 2016). Available from: <http://docs.cntd.ru/document/499057916>.
7. Popov Yu.A., Protsenko O.A., Anisimov P.I., Kokushkin A.M., Mozharov O.T. [Detection of pesticinogenicity plasmids in plague microbe using agarose gel electrophoresis]. In: [Prophylaxis of Particularly Dangerous Infections]. Saratov; 1980. P. 20–5.
8. [Procedure of organization and carrying out of laboratory diagnostics of plague for the territorial, regional, and federal facilities]. MR 4.2.2940-11. М.; 2011. 55 p.
9. [Preparation of samples with surrogates of pathogenic biological agents]. MR 4.2.1103-02. М.; 2002.
10. Protsenko O.A., Anisimov P.I., Mozharov O.T., Konnov N.P., Popov Yu.A., Kokushkin A.M. [Detection and characteristics of plague microbe plasmids, determining synthesis of pesticin I, antigen fraction I, and exotoxin of “murine toxin”]. *Genetika*. 1983; 19(7):1081–90.
11. Sazanova E.V., Malyukova T.A., Popov Yu.A. [Dummy *Yersinia pestis* strains: selection criteria, usage guidelines]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 3:38–41.
12. Hinnebusch B.J., Rudolph A.E., Cherepanov P., Dixon J.E., Schwan T.G., Forsberg A. Role of *Yersinia murine* toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. *Science*. 2002; 296:733–35. DOI: 10.1126/science.1069972.
13. Kado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 1981; 145 (3):1365–73.
14. Kutyrev V.V., Mehig R.J., Motin V.L., Pokrovskaya M.S., Smirnov G.B., Brubaker R.R. Expression of the plague plasminogen activator in *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1999; 67:1359–67.
15. Perry R.D., Fetherston J.D. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997; 10:35–66.

#### Authors:

Sazanova E.V., Kuklev V.E., Malyukova T.A., Kukleva L.M., Malakhaeva A.N., Vakhruzhina N.I. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

#### Об авторах:

Сазанова Е.В., Куклев В.Е., Малукова Т.А., Куклева Л.М., Малахаева А.Н., Вахружина Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 26.08.15.