

Е.А.Соловьев¹, Л.В.Саяпина¹, Н.А.Осина², Д.С.Давыдов¹, В.П.Бондарев¹**ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕНОТИПИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВАКЦИННОГО ШТАММА *FRANCISELLA TULARENSIS* 15 НИИЭГ С ДЛИТЕЛЬНЫМИ СРОКАМИ ХРАНЕНИЯ**¹ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России», Москва, Российская Федерация; ²ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Изучены культурально-морфологические, биохимические и генетические свойства лиофилизированных культур вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, наработанных в течение 60 лет и депонированных в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Проведенные исследования показали, что хранение штаммов в лиофилизированном состоянии при пониженной температуре не в полной мере предохраняет их от изменения генетических и фенотипических свойств. Установлено, что штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ 1953, 1966, 1969, 2003 и 2012 гг. высушивания при культивировании на питательной среде Ft-agar с добавлением крови и без нее по степени диссоциации (87–99 %) SR-колоний сохранял свои иммуногенные свойства. При этом штамм 1990 г. содержал нормированное количество (не менее 80 %) иммуногенных колоний на питательной среде с добавлением крови и не соответствовал требованиям без крови. Выявленное снижение от 70 до 75 % SR-колоний у штамма 1987 г. при культивировании с добавлением крови и без нее свидетельствует о снижении его иммуногенных свойств. По данным RAPD и ERIC типирования, показана высокая стабильность генома лиофилизированных в разные годы культур *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Вакцинный штамм туляремийного микроба имеет уникальные RAPD и ERIC профили, незначительное изменение которых отмечено при хранении субкультуры патогена в высушенном состоянии.

Ключевые слова: вакцинный штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, культурально-морфологические, биохимические и генетические свойства, диссоциация.

Е.А.Solov'ev¹, L.V.Sayapina¹, N.A.Osina², D.S.Davydov¹, V.P.Bondarev¹**Characteristics of Phenotypic and Genetic Properties of *Francisella tularensis* 15 NIEG Vaccine Strain with an Extended Storage Period**¹Scientific Center on Expertise of Medical Application Products, Moscow, Russian Federation; ²Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Investigated have been cultural-morphological, biochemical and genetic properties of lyophilized cultures of *F. tularensis* 15 NIEG vaccine strain, accumulated within 60-years term and deposited at the State Collection of Pathogenic Microorganisms of Scientific Center on Expertise of Medical Application Products. The studies undertaken have demonstrated that storing of the strains in such a form at low temperatures, does not prevent changes of their genetic and phenotypic properties to the full extent. It is established that *F. tularensis* 15 NIEG strain lyophilized in 1953, 1966, 1969, 2003 and 2012 maintains its immunogenic properties when cultivated on nutrient media Ft-agar with or without addition of blood, based on dissociation rates (87–99 %) of SR-colonies. While *F. tularensis* 15 NIEG strain 1990 contains specified amounts (not less than 80 %) of immunogenic colonies if cultivated on nutrient media with the addition of blood, and fails to meet the requirements – if cultivated without. Identified in *F. tularensis* 15 NIEG strain 1987 SR-colony decrement of 70–75 % in case of cultivation with or without addition of blood testifies to the deterioration of its immunogenic properties. RAPD and ERIC typing has showed high stability of the genome of *F. tularensis* 15 NIEG cultures lyophilized at different times. Tularemia microbe vaccine strain has unique RAPD and ERIC profiles, insignificant alteration of which is observed upon storage of pathogen subculture in the dried form.

Key words: *F. tularensis* 15 NIEG vaccine strain, cultural-morphological, biochemical and genetic properties, dissociation.

Возбудитель туляремии *Francisella tularensis* обладает высокой устойчивостью во внешней среде, множественностью путей передачи, вирулентностью и контагиозностью, что представляет значительную угрозу для населения. Разработка Б.Я.Эльбертом и Н.А.Гайским в 1934 г. высокоэффективной живой туляремийной вакцины и дальнейшее ее использование в СССР позволило снизить ежегодную заболеваемость туляремией с десятков тысяч случаев до уровня спорадической, а также увеличить средний период между вспышками с трех до десяти лет [2, 8, 9].

Вместе с тем изменяющиеся особенности эпизоотического и эпидемического проявлений в

современных условиях антропогенной трансформации окружающей среды, широкое распространение и устойчивость природных очагов туляремии в России сохраняют актуальность данной проблемы для здравоохранения. Как следствие – снижение в последние годы числа вакцинированных людей, резкая урбанизация заболеваемости туляремией. На долю городского населения приходится от 70 до 80 % от числа больных туляремией. В России в 1995 г. зарегистрировано 379 случаев, в 2005 г. – 881 случай на территории 35 субъектов; в 2013 г. только в Ханты-Мансийском автономном округе заболело 1015 человек [3, 7].

Известно, что изготовление живых вакцин требует систематического наблюдения за стабильностью вакцинных штаммов из-за возможных изменений их свойств, в процессе хранения и производства препарата [5]. Некоторые исследователи считают, что применение туляреминой вакцины в течение столь длительного периода привело не только к изменению свойств первоначально полученной вакцины, но и в значительной степени увеличило риск утраты вакцинного штамма [1, 4]. Данное положение подтверждается тем, что используемый на протяжении многих лет штамм *F. tularensis* 15 и 15 НИИЭГ неоднократно подвергался восстановлению иммуногенных свойств (например, в 1954, 1962, 1990, 2003 гг.).

В литературе описан случай производства вакцины из лиофилизированного штамма *F. tularensis* 15, хранившегося в течение 12 лет без должного изучения его свойств, что привело к практически полной его диссоциации (количество иммуногенных клеток в вакцине составляло всего 2–3 %). В связи с этим потребовалось длительное восстановление его иммуногенных свойств путем многократного пассирования на животных, после чего он использовался в производстве как «штамм *F. tularensis* 15 – восстановленный» [6].

На основании многолетнего изучения сохранности основных свойств вакцинного штамма при хранении в условиях температурного режима –18 °С, установлен срок его годности в течение 10 лет. Однако до сих пор сравнительных исследований культур штамма, лиофилизированных в разное время и хранящихся в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, не проводилось.

Учитывая вышеизложенное, целью настоящего исследования явилось изучение стабильности культурально-морфологических, биохимических и генетических свойств культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ различных лет высушивания (более 60 лет), применявшегося в производстве живой туляреминой вакцины.

Материалы и методы

В работе изучены 8 лиофилизированных культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, находящихся в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России и имеющих различные сроки хранения (от 1 года до 60 лет) при температуре не менее –18 °С.

Перед проведением исследования культурально-морфологических свойств, включая степень диссоциации, лиофилизированные культуры штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ ресуспендировали 0,9 % раствором натрия хлорида и культивировали при температуре (37±1) °С в течение 48 ч на питательной среде ФТ-агар как с добавлением 5 % дефибринированной крови барана, так и без нее. Все исследования проводили с использованием культуры II пассажа.

Для определения ферментативной активности

культур, в том числе образования сероводорода и индола, использовали питательную среду Dawns, модульный анализатор бактериологический bioMerieux «VITEK® 2 Systems», аналитические карты типа bioMerieux GN (21341) и системы индикаторные бумажные (СИБ) коммерческого производства.

Серологические свойства штаммов изучали в реакции агглютинации с применением ОСО 42-28-409-09 сыворотки диагностической туляреминой сухой для реакции агглютинации.

ERIC- и RAPD-типирования культур туляреминого микроба проводили в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» с использованием праймеров ERIC IR, ERIC II, Universal M13, T3, T7, предложенные V.A. de la Puente-Redondo *et al.* [10]. Работу выполняли в соответствии с рекомендациями авторов: реакционная смесь содержала праймеров в количестве 15 пМоль, дНТФ – 0,2 мМоль, ионов Mg^{2+} – 2,5 мМоль, фермента DreamTaq-ДНК-полимеразы (Fermentas, США) – 4 ед., программа для праймеров ERIC IR, ERIC II – 95 °С – 5 мин, 90 °С – 30 с, 50 °С – 30 с, 52 °С – 1 мин, 72 °С – 1 мин (30 циклов) 72 °С – 8 мин; для праймеров Universal M13, T3, T7 – 94 °С – 5 мин, 94 °С – 5 мин, 40 °С – 5 мин, 72 °С – 5 мин (2 цикла) 94 °С – 1 мин, 60 °С – 1 мин, 72 °С – 1 мин (35 циклов) 72 °С – 5 мин. Амплификацию осуществляли на термоциклере Veriti (LifeTechnology, США), учет результатов проводили в 2 % агарозном геле при градиенте напряжения 5 В/см в течение 2 ч.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов подтверждали в соответствии с требованиями ОФС 42-0066-07 методом прямого посева на тиюгликолевую среду в условиях инкубирования посевов при температурах от 30 до 35 °С для выявления аэробных и анаэробных микроорганизмов, от 20 до 25 °С для выявления грибов. После инкубирования проводили оценку однородности тинкториальных свойств культур и микроскопию мазков. Обработку результатов исследований осуществляли с помощью общепринятых статистических методов.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что внешний вид всех лиофилизированных культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в ампулах имел вид пористой массы белого с желтоватым оттенком цвета, что соответствует нормативным требованиям по данному показателю. Фенотипические свойства культур вакцинного штамма разных лет высушивания приведены в таблице.

Сравнительное изучение культурально-морфологических свойств показало, что на ФТ-агаре (с кровью и без крови) после инкубирования при температуре (37±1) °С в течение 48 ч все культуры штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ вырастали в виде беловато-серых, блестящих, круглых колоний. Отмечено, что на ФТ-агаре с добавлением дефибринированной крови колонии были более однородными, диаметром от

Результаты изучения культурально-морфологических свойств вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ разных лет высушивания

Наименование показателя	Норма	Год высушивания штамма							
		1953	1966	1969	1987	1990	2003	2012	2013
Диссоциация колоний на Ft-агаре с кровью	SR-колоний не менее 80 %	91	97	93	75	82	87	95	95
Диссоциация колоний на Ft-агаре без крови		76	93	92	70	68	91	94	.*
Количество выросших колоний на Ft-агаре с кровью	Не менее 40 % (из 100 м.к./0,1 мл)	94±8,6	99±14,5	86±13,3	101±14,9	98±5,2	93±3,8	91±7,5	.*
Количество выросших колоний на Ft-агаре без крови	Не менее 40 % (из 100 м.к./0,1 мл)	76±12,7	97±11,1	76±11,4	80±11,3	94±8,6	61±4,4	118±5,3	.*
Значение критерия Стьюдента**, рассчитанное по экспериментальным данным $t_{\text{эсп}}$	$t_{\text{табл}}=2,306$ (для $f=8$ и $P \geq 0,95$)	1,17	0,11	0,57	1,12	0,4	5,5	2,94	.*
Отсутствие патогенных микроорганизмов и грибов	Чистая культура <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ (полиморфные Грам «-» коккобактерии)	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Грамм «+» кокки, Грамм «-» палочки	Соответствует

* Не изучалось.

**Значение критерия Стьюдента, рассчитанное по экспериментальным данным для показателя «количество выросших колоний» для культур штамма 1953 г. ($t_{\text{эсп}}=1,17$), 1966 г. ($t_{\text{эсп}}=0,11$), 1969 г. ($t_{\text{эсп}}=0,57$), 1987 г. ($t_{\text{эсп}}=1,12$), 1990 г. ($t_{\text{эсп}}=0,4$) меньше, чем табличное равное $t_{\text{табл}}=2,306$ для числа степеней свободы $f=8$ и уровня значимости $\alpha=0,05$.

1 до 2,5 мм с отчетливо выраженной типичной для туляремии морфологией, на питательной среде без крови – от 2,5 до 3 мм. В мазках, окрашенных по Граму, все культуры штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ представляли собой полиморфные грам-отрицательные коккобактерии.

Степень диссоциации штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, которую оценивают по формированию при культивировании SR-колоний белого цвета, является важнейшим показателем, свидетельствующим о развитии иммунологических реакций, обеспечивающих формирование полноценного противотуляремии иммунитета [5].

Проведенными исследованиями установлено, что культуры штамма 1953, 1966, 1969, 2003 и 2012 гг. высушивания имели в своем составе от 87 до 99 % иммуногенных (белые) колоний (норма не менее 80 %) и меньшее количество (от 1 до 13 % соответственно) неиммуногенных (серые) колоний в R-форме. В то же время штамм 1987 г., выращенный на обеих питательных средах, содержал от 70 до 75 % SR-колоний. Выявлено, что штамм 1990 г. высушивания при культивировании на FT-агаре с кровью соответствовал нормативным требованиям по степени диссоциации, а на FT-агаре без крови имел в своем составе 68 % SR-колоний. Рассчитанное по экспериментальным данным для показателя «количество выросших колоний» для культур штаммов, лиофилизированных в период с 1953 по 1990 год, значение критерия Стьюдента было меньше, чем табличное равное $t_{\text{табл}}=2,306$ для числа степеней свободы $f=8$ и уровня значимости $\alpha=0,05$. Таким образом, изменение степени диссоциации указанных культур было незначительными, а для культур 2003 и 2012 гг. – статистически значимым (при доверительной вероятности $P \geq 0,95$).

Выявление степени иммуногенности по диссоциации разных культур вакцинного штамма имеет большое значение не только для их сравнительной оценки, но и для своевременного выявления измене-

ния иммуногенности штамма, используемого в производстве живой туляремии вакцины.

При характеристике биохимических свойств культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ на питательной среде Dawns и при использовании коммерческих СИБ и диагностических систем bioMerieux Vitek выявлено, что все они имели типичные для голарктического подвида свойства: ферментировали с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, маннозу с разной степенью активности и не ферментировали глицерин и мочевины. Исследуемые штаммы образовывали сероводород и не образовывали индол. При этом наблюдалось существенное снижение интенсивности реакций, выявляемых по слабому окрашиванию используемых субстратов. Также нестабильной была ферментативная активность штаммов в отношении маннита, трегалозы, целлобиозы, галактозы и сахарозы. Ложноположительные реакции не выявлены. В целом, совпадение биохимического профиля с типовым для *F. tularensis* подвида *holarctica* составило от 90 до 99 % для штаммов, лиофилизированных в 1963, 1966, 1969, 2003 гг. Ферментативная активность производственных штаммов 1987, 1990 и 2012 гг. высушивания была атипичной и/или слишком низкой для достоверной оценки подлинности.

Нами отмечено, что наиболее активными были культуры штаммов 1953, 1966 и 1969 гг. высушивания, так как при их исследовании наблюдалось наиболее интенсивное желтое окрашивание питательной среды Dawns, что свидетельствует об активности сахаролитических ферментов бактерий. При посеве других культур питательная среда имела слабый желтовато-зеленый цвет. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что исследованные образцы характеризуются пониженной реакционной способностью. Это указывает на необходимость совершенствования методов восстановления культур вакцинного штамма и строгого соблюдения условий культивирования и пробоподготовки.

Антигенные свойства культур штамма *F. tularensis*

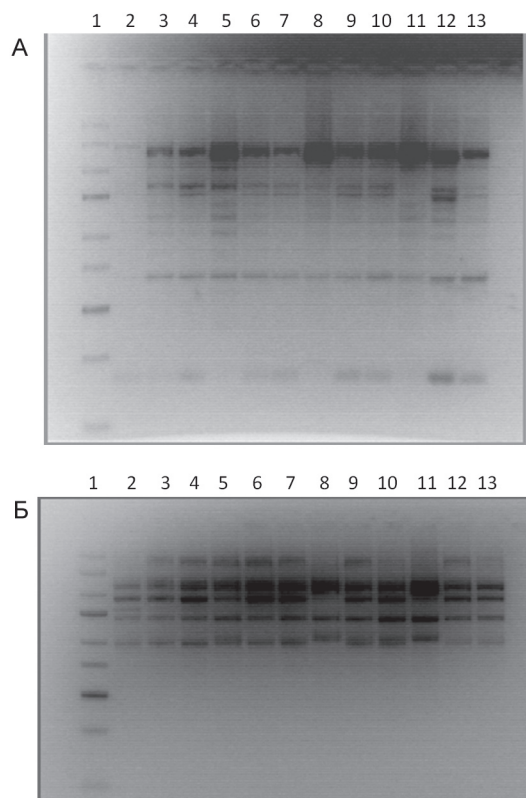


Рис. 1. Результаты ERIC (А) и RAPD с праймерами ТЗ-Т7 (Б) типирования культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ с различным сроком хранения в лиофильном состоянии и после двух пассажей на плотной питательной среде (Ft-агар):

1 – маркер молекулярных масс (100, 300, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 5000); 2 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (1990 г.), нативная культура; 3 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (1990 г.), 1-й пассаж; 4 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (1990 г.), 2-й пассаж; 5 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (2003 г.), нативная культура; 6 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (2003 г.), 1-й пассаж; 7 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (2003 г.), 2-й пассаж; 8 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (2012 г.), нативная культура; 9 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (2012 г.), 1-й пассаж; 10 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (2012 г.), 2-й пассаж; 11 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (2013 г.), нативная культура; 12 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (2013 г.), 1-й пассаж; 13 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (2013 г.), 2-й пассаж

15 НИИЭГ изучали с помощью ОСО сыворотки диагностической туляреминой агглютинирующей. Исследование показало идентичность серологических свойств культур, которые агглютинировались ОСО сыворотки туляреминой до титра 1:1600.

Важным производственным показателем, влияющим в дальнейшем на качество живой туляреминой вакцины, является отсутствие в культуре вакцинного штамма посторонней микрофлоры и грибов. Из 8 изученных культур штамма 7 соответствовали предъявляемым требованиям и представляли собой чистую культуру туляреминого микроба, так как в посевах не обнаружен рост посторонних микроорганизмов и грибов (таблица). Испытание не выдержала культура 2012 г. высушивания. В посевах на тиогликолевой среде был выявлен нетипичный для туляреминого микроба рост в виде помутнения среды, хлопьев и осадка. В мазках, окрашенных по Граму, обнаружены грамположительные кокки и грамотрицательные палочки. При повторном испытании новых образцов штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ подтвердилась контаминация посторонней микрофлорой. Учитывая

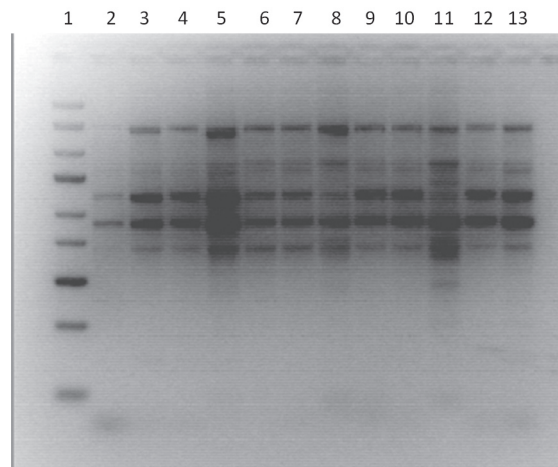


Рис. 2. Результаты RAPD с праймером М-13 типирования культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ с различным сроком хранения в лиофильном состоянии и после двух пассажей на плотной питательной среде:

1 – маркер молекулярных масс (100, 300, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 5000); 2 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (1990 г.), нативная культура; 3 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (1990 г.), 1-й пассаж; 4 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (1990 г.), 2-й пассаж; 5 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (2003 г.), нативная культура; 6 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (2003 г.), 1-й пассаж; 7 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (2003 г.), 2-й пассаж; 8 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (2012 г.), нативная культура; 9 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (2012 г.), 1-й пассаж; 10 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (2012 г.), 2-й пассаж; 11 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (2013 г.), нативная культура; 12 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (2013 г.), 1-й пассаж; 13 – *F. tularensis* 15 НИИЭГ (2013 г.), 2-й пассаж

вышеизложенное, было рекомендовано приготовить новую серию производственного штамма.

Результаты исследования культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ 1990, 2003, 2012 и 2013 гг. высушивания с помощью ПЦР со случайными праймерами Universal M13, T3, T7 и праймерами на основе последовательности ERIC показали высокую генетическую однородность изученных культур вне зависимости от сроков их хранения (рис. 1, 2).

При RAPD типировании с праймерами ТЗ-Т7 во всех случаях отмечено формирование фрагментов размером ~ 1000, 1400, 1900, 2200, 4000 п.н., с праймером Universal M13 – ~ 750, 900, 1300, 1600, 3000 п.н. При изучении распространения ERIC последовательностей на электрофореграмме выявлены локусы размером ~ 730, 1500, 1600, 2100, 2800 п.н. Полученные результаты указывают на то, что штамм имеет уникальные RAPD и ERIC профили, которые отличаются от таковых для штаммов туляреминого микроба разных подвидов, полученные V.A. de la Puente-Redondo *et al.* [10]. При этом данные профили не имели отличий для всех изученных культур. Последующие после вскрытия ампулы, 2-кратные пассажи культур на плотной питательной среде, также не привели к изменению RAPD и ERIC профилей.

Полученные данные свидетельствуют о достаточно высокой стабильности генома лиофилизированных культур вакцинного штамма при длительном хранении. В ряде случаев при изучении ДНК, выделенной из содержимого ампул, отмечено образование дополнительных фрагментов низкой интенсивности. Однако при исследовании препаратов ДНК, получен-

ных из культур вакцинного штамма, высеванных на плотную питательную среду, формирование таких локусов не зафиксировано. Выявленные отличия могут быть связаны с наличием в лиофилизате незначительного количества погибших клеток туляремийного микроба, ДНК которых могла быть подвергнута деградации.

Изучение стабильности культур вакцинного штамма по генетическим свойствам показало, что исследуемые штаммы имеют практически одинаковые ERIC- и RAPD-профили, характерные для штаммов туляремийного микроба подвида *holarctica*. Несмотря на то, что данные подходы не обладают высокой дискриминирующей способностью при исследовании штаммов туляремийного микроба, они в полной мере могут показать возможные изменения в геноме вакцинных штаммов туляремийного микроба под воздействием неблагоприятных факторов при длительном хранении.

Следует также отметить отсутствие в настоящее время единых методических подходов к алгоритму приготовления, изучения, поддержания и хранения живых вакцинных штаммов, что затрудняет проведение подобных работ и интерпретацию полученных данных.

Таким образом, изучение культур вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, хранившихся в лиофилизированном состоянии в течение длительного периода времени (до 60 лет), позволяет сделать заключение, что фенотипические свойства большинства культур штаммов соответствуют современным требованиям, предъявляемым к вакцинному штамму *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Вместе с тем полученные данные свидетельствуют о нестабильности свойств отдельных культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ по культурально-морфологическим свойствам и степени диссоциации в зависимости от состава используемых питательных сред, а также вариативности единичных фрагментов ДНК при длительном хранении.

Отсутствие в настоящее время единых методических требований к поддержанию вакцинных штаммов показывает необходимость разработки документа по алгоритму изготовления, изучения, поддержания и хранения вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кисличкин Н.Н., Кисличкина О.И. Живая туляремийная вакцина Nik-sp. *Francisella tularensis*. Патент РФ № 2308969, опубл. 27.10.2007.
2. Мещерякова И.С. Туляремия: современная эпидемиология и вакцинопрофилактика (к 80-летию создания первой туляре-

мийной лаборатории в России. *Эпидемиол. и вакцинопрофилактика*. 2010; 2:17–22.

3. Никифоров В.В., Кареткина Г.Н. Туляремия: от открытия до наших дней. *Инф. бол.* 2007;5(1):67–76.

4. Олсуфьев Н.Г. Туляремия. М.; 1960. 459 с.

5. Саяпина Л.В., Соловьев Е.А., Горяев А.А., Бондарев В.П. Изучение иммунобиологических свойств вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в условиях длительного хранения. *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 2:87–91.

6. Сиротюк Л.В. Биологические свойства туляремийных вакцинных штаммов НИИЭГ. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1964; 10:116–20.

7. Транквилевский Д.В., Удовиков А.И., Попов В.П., Захаров К.С., Попов Н.В., Безсмертный В.Е. Состояние численности грызунов и эпидемиологическая обстановка по туляремии на территории Российской Федерации во втором полугодии 2014 г. и прогноз на 2015 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 1:30–5.

8. Ellis J., Oyston P.C.F., Green M., Titball R.W. Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15(40):631–46.

9. Cole L.E., Elkins K.L., Michalek S.M., Qureshi N., Eaton L.J., Rallabhandi P., Cuesta N., Vogel, S.N. Immunologic consequences of *Francisella tularensis* live vaccine strain infection: role of the innate immune response in infection and immunity. *J. Immunol.* 2006; 176:6888–99.

10. de la Puente-Redondo V.A., del Blanco N.G., Gutiérrez-Martín C.B., García-Peña F.J., Rodríguez Ferri E.F. Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(3):1016–22.

References

1. Kislichkin N.N., Kislichkina O.I. [Live tularemia vaccine Nik-sp. *Francisella tularensis*]. RF Patent 2308969. 27.10.2007.

2. Meshcheryakova I.S. [Tularemia: modern epidemiology and preventive vaccination (To the 80th Anniversary since the first tularemia laboratory foundation in Russia)]. *Epidemiol. Vaksino prof.* 2010; 2:17–22.

3. Nikiforov V.V., Karetkina G.N. [Tularemia: since the discovery up to the present day]. *Infek. Bol.* 2007; 5(1):67–76.

4. Olsuf'ev N.G. [Tularemia]. M.; 1960. 459 p.

5. Sayapina L.V., Solov'ev E.A., Goryaev A.A., Bondarev V.P. [Studies of immunobiological properties in *Francisella tularensis* vaccine strain 15 NIIEG under extended storage conditions]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; 2:87–91.

6. Sirotyuk L.V. [Biological properties of tularemia vaccine strains NIIEG]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1964; 10:116–20.

7. Trankvilevsky D.V., Udobikov A.I., Popov V.P., Zakharov K.S., Popov N.V., Bezsmertny V.E. [Situation on rodents abundance and epidemiological situation on tularemia in the territory of the Russian Federation in the second half of 2014, and prognosis for 2015]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; 1:30–5.

8. Ellis J., Oyston P.C.F., Green M., Titball R.W. Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15(40):631–46.

9. Cole L.E., Elkins K.L., Michalek S.M., Qureshi N., Eaton L.J., Rallabhandi P., Cuesta N., Vogel, S.N. Immunologic consequences of *Francisella tularensis* live vaccine strain infection: role of the innate immune response in infection and immunity. *J. Immunol.* 2006; 176:6888–99.

10. de la Puente-Redondo V.A., del Blanco N.G., Gutiérrez-Martín C.B., García-Peña F.J., Rodríguez Ferri E.F. Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(3):1016–22.

Authors:

Solov'ev E.A., Sayapina L.V., Davydov D.S., Bondarev V.P. Scientific Center on Expertise of Medical Application Products. 8, Petrovsky Bulvar, Moscow, 127051, Russian Federation. E-mail: Sayapina@xpmc.ru

Osina N.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru

Об авторах:

Соловьев Е.А., Саяпина Л.В., Давыдов Д.С., Бондарев В.П. Научный центр экспертизы средств медицинского применения. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8. E-mail: Sayapina@xpmc.ru

Осина Н.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Поступила 19.06.15.