

УДК 616.932:616-07

Т.В.Аленкина¹, Г.В.Бочкарева¹, Л.В.Саяпина², И.В.Касина², И.В.Шульгина¹, О.А.Лобовикова¹,
Е.Г.Абрамова¹, О.В.Громова¹, А.К.Никифоров¹

**РАЗРАБОТКА И ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ВНЕДРЕНИЯ ПРЕПАРАТА
«ИММУНОГЛОБУЛИНЫ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИЕ ХОЛЕРНЫЕ O139»**

¹ ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов;

² ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», Москва

Разработан новый препарат, предназначенный для индикации и идентификации возбудителя холеры O139 серогруппы в мазках из различных материалов и чистых культур методом флуоресцирующих антител. Диагностикум прошел все этапы Государственных приемочных испытаний, в результате которых был оценен как высокоспецифичный, так как не выявлял штаммы, не относящиеся к *Vibrio cholerae* O139 серогруппы в концентрации бактерий 10^8 в 1 мл. Чувствительность с чистыми культурами холерных вибрионов O139 серогруппы составляла $5 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^6$ м.к./мл, при исследовании биологических объектов – 10^6 – 10^7 м.к./мл, объектов внешней среды – $5 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^6$ м.к./мл. Была определена перспективность применения иммуноглобулинов в практике здравоохранения и даны рекомендации к регистрации в Российской Федерации в качестве изделия медицинского назначения.

Ключевые слова: иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие холерные O139, *V. cholerae* O139, метод флуоресцирующих антител, государственные испытания

T.V.Alenkina¹, G.V.Bochkareva¹, L.V.Sayapina², I.V.Kasina², I.V.Shul'gina¹, O.A.Lobovikova¹, E.G.Abramova¹,
O.V.Gromova¹, A.K.Nikiforov¹

**Development and Main Stages of Introduction of the Preparation “Cholera O139 Diagnostic
Fluorescent Immunoglobulins”**

¹Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov; ²Research Center for Evaluation of Products for Medical Application, Moscow

Developed was a new preparation intended for cholera O139 agent indication and identification in the smears and pure cultures, using fluorescent antibodies method. The diagnosticum underwent State validation procedure, and was evaluated as a highly specific preparation. Its sensitivity was shown to be equal to $5 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^6$ m.c./ml for pure cultures of *V. cholerae* O139, 10^6 – 10^7 – for biological objects and $5 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^6$ – for environmental objects. Application of the preparation for practical purposes was considered to be promising, and it was recommended for State registration as a product of medical application.

Key words: cholera O139 diagnostic fluorescent immunoglobulins, *V. cholerae* O139, fluorescent antibodies method, State validation procedure.

Появление в 1992 г. холерного вибриона O139 серогруппы, который явился причиной вспышки диарейных заболеваний, принявших в дальнейшем характер крупных эпидемий, опровергло долго существовавшее представление о том, что только холерные вибрионы O1 группы способны вызывать эпидемии и пандемии [5, 6], и вызвало необходимость создания препаратов для обнаружения данного патогена.

Первым препаратом для детекции *Vibrio cholerae* O139, зарегистрированным в Российской Федерации (РУ ФСР № 2008/03209) и внесенным в перечень препаратов для диагностики холеры, стала разработанная в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» сыворотка диагностическая холерная не O1 группы O139 адсорбированная кроличья для реакции агглютинации (РА) на стекле [4].

Однако достоверность лабораторной диагностики холеры «Бенгал» может быть достигнута при комплексном применении различных методов – от классической реакции агглютинации до тест-систем,

разработанных на основе таких современных технологий, как гибридная биотехнология, или с помощью генодиагностических методов [1, 2, 10]. В то же время при конструировании диагностических препаратов немаловажным фактором является их доступность для практического здравоохранения.

Метод флуоресцирующих антител (МФА) занимает ведущее место в индикации возбудителей особо опасных инфекционных заболеваний благодаря высокой иммунологической чувствительности в сочетании с точностью микроскопического анализа. Чувствительность МФА при приготовлении мазков из взвеси бактерий составляет $1 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^5$ м.к./мл. Метод надежно зарекомендовал себя при обнаружении возбудителя холеры O1 серогруппы. Отсутствие подобного диагностикума для индикации *V. cholerae* O139 обусловило актуальность работ в этом направлении.

Целью исследований была разработка препарата для индикации и идентификации *V. cholerae* O139 в

прямом МФА и внедрение его в практику здравоохранения.

Основные этапы работы заключались в разработке биотехнологической схемы получения диагностикума, проведении всех этапов Государственных испытаний и регистрации препарата в качестве изделия медицинского назначения (ИМН).

Материалы и методы

В качестве животных-продуцентов гипериммунных холерных O139 сывороток были использованы кролики породы шиншилла массой (2,5±0,5) кг. Иммунизацию проводили препаратом О-антигена, выделенного ультрафильтрацией из формализованного безмикробного супернатанта штамма *V. cholerae* O139 MO-45. Данный антиген характеризуется тем, что на всех стадиях очистки сохраняет однофазное растворенное состояние. Однородность фазового состояния при выделении О-антигена позволяет сохранять неизменной нативную конформацию его специфических эпитопов, определяющих серологическую активность липополисахаридного комплекса [7].

Активность и специфичность полученных сывороток определяли в объемной РА и оценивали в соответствии с нормативной документацией (НД) на аналогичные препараты.

Адсорбентами являлись формализованные клетки штаммов *V. cholerae* не O1 169-68 O22 серогруппы, *V. cholerae* O1 M-41 (Огава) и 569В (Инаба), выращенные методом глубинного культивирования. Свойства адсорбентов стабилизировали лиофилизацией.

Контроль специфической активности гипериммунных сывороток и экспериментальных серий препарата иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих холерных O139 кроличьих адсорбированных проводили на штаммах *V. cholerae* O139 серогруппы: P-16064, P-16131, 1306, 1311, AP-1. Специфичность препарата изучали на штаммах *V. cholerae cholerae* 1488a (Инаба), M-47 (Огава); *V. cholerae eltor* 118 (Инаба), 7/96 (Огава), а также *V. cholerae* не O1 N СТС 4716 (O4), B-4202-64 (O5), 7007-62 (O6), 11416-62 (O13), B 5267-64 (O18), KM-24 (O22), 14438-62 (O24), 12630-62 (O28), 161-68 (O29), 152-68 (O34), 14520 (O41). Все штаммы были получены из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Культуры холерных вибрионов выращивали при температуре (37±1) °С в течение 18–20 ч на жидких и плотных питательных средах – мясопептонном бульоне Мартена, бульоне Хоттингера, агаре Мартена и Хоттингера, pH всех сред – 7,7±0,1.

Бактериальные суспензии с концентрацией 10⁹ м.к./мл готовили на 0,9 % растворе натрия хлорида по оптическому стандарту мутности бактериальных взвесей 5 единиц.

Иммуноглобулиновую фракцию из сыворотки животных выделяли однократным осаждением 3М

раствором (NH₄)₂SO₄ при 45 % насыщении.

Конъюгирование иммуноглобулинов с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) («Sigma», США) проводили по методу J.D.Marshall *et al.* (1958).

Освобождение иммуноглобулиновой фракции от (NH₄)₂SO₄, а также удаление ФИТЦ, химически не связанного с белком, осуществляли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 в 0,5 М натрий карбонат-бикарбонатном буфере при pH 9,2±0,1.

Уровень специфической активности и специфичности изготовленных серий иммуноглобулинов определяли в прямом МФА. Степень яркости свечения бактерий оценивали по общепринятой 4-крестовой системе: 4 креста – сверкающая флуоресценция оболочки микробной клетки, четко контрастирующая с темным телом клетки; 3 креста – яркая флуоресценция оболочки микробной клетки; 2 или 1 крест – слабое свечение всей клетки или едва заметные контуры. Препарат в рабочем разведении должен обеспечивать специфическое свечение *V. cholerae* O139 интенсивностью 3–4 креста. Свечение на 1–2 креста является неспецифическим и не учитывается.

Результаты и обсуждение

Для выполнения поставленной цели необходимым условием являлось получение качественного сырья – гипериммунной кроличьей сыворотки с минимальным содержанием гетерологичных антител. Первоначальные опыты по созданию флуоресцирующих иммуноглобулинов к *V. cholerae* O139 на основе кроличьей сыворотки O139, полученной с использованием корпускулярного О-антигена бескапсульного варианта штамма *V. cholerae* O139 P-16064, показали, что основной недостаток выделенных иммуноглобулинов заключался в необходимости проведения неоднократных адсорбций препарата с целью удаления гетерологичных антител. Присутствие большого количества перекрестно реагирующих антител в сыворотке-полуфабрикате было обусловлено не только высоким генетическим сродством холерных вибрионов O139 и O22 серогрупп (более 90 %), но и структурными изменениями в составе О-антигена под воздействием высокой температуры, поскольку при изготовлении корпускулярного О-антигена способом инактивации микробной клетки является кипячение в течение 2 ч. При такой обработке неизбежна частичная деградация терминальных строгоспецифичных полисахаридных боковых цепей, в результате чего обнажаются участки липополисахарида (коровая часть), являющиеся группоспецифическими антигенными детерминантами [11].

Немаловажным фактором, предопределяющим интенсивность антителообразования, является физическое состояние антигена, а также степень его очистки. На основании этого в качестве альтернативы был выбран растворимый О-антиген, полученный способом [7].

Подбор способов аппликации О-антигена, доз и

кратности введения определил наиболее оптимальную схему иммунизации – 2-цикловая схема иммунизации большими дозами О-антигена (до 8 мг) при внутривенном способе введения. Активность холерных О139 сывороток, полученных по такой схеме, составляла в объемной РА 1:1600–1:2000. Неспецифические реакции со штаммами холерных вибрионов О1 и О22 серогрупп у 59,22 % продуцентов отсутствовали, у 40,78 % находились на уровне 1:200. Таким образом, сыворотки-полуфабрикаты от кроликов, иммунизированных О-антигеном, полученным способом [7], по активности и специфичности соответствовали требованиям, предъявляемым к качеству полуфабриката для изготовления флуоресцирующих иммуноглобулинов. Минимальная активность сывороток-полуфабрикатов, пригодных для последующего изготовления иммуноглобулинов флуоресцирующих холерных О139, была установлена в пределах 1:400.

Изучение сывороток, полученных от 87 кроликов-продуцентов в непрямом МФА с холерными вибрионами О2–О82 серогрупп, показало отсутствие перекрестных реакций с указанными штаммами, за исключением *V. cholerae* не О1 169-68, относящегося к О22 серогруппе, и подтвердило высокую специфичность полуфабрикатов, применяемых для изготовления препарата. Штамм *V. cholerae* не О1 169-68 был внесен в технологическую схему в качестве адсорбента. Кроме того, результаты тестирования сывороток послужили основанием для внесения в НД в качестве контрольных культур, помимо холерных вибрионов классического и эльтор биоваров сероваров Инаба и Огава, только 11 штаммов *V. cholerae* не О1 серогруппы – О4, О5, О6, О13, О18, О22, О24, О28, О29, О34, О41, наиболее часто встречающиеся на территории Российской Федерации, а также штамм *V. cholerae* не О1 КМ-24 (357) О22 серогруппы.

Диагностические препараты, как правило, изготавливают из полуфабрикатов, подвергшихся хранению при температуре 2–8 °С не менее 6 мес. [8]. Целью такого выдерживания является, во-первых, физическое просветление сывороток благодаря оседанию на дно бутылки белков макроглобулиновой природы. Во-вторых, стабилизация активности полуфабриката. Титр сыворотки, первое время падающий иногда весьма резко, к концу 3–6-го месяца становится относительно устойчивым. В дальнейшем возможно снижение активности лишь в небольших пределах (до 10 % за год).

Изучение стабильности свойств гипериммунных холерных О139 кроличьих сывороток в процессе хранения показало, что 100 % исследованных полуфабрикатов сохраняли первоначальную активность в течение 5 лет (срок наблюдения). У 92 % сывороток наблюдалось снижение уровня гетерологичных антител на 1–2 порядка в течение 3 и более месяцев. Это объясняется тем, что в условиях гипериммунизации в организме продуцента вырабатываются специфические антитела, относящиеся к классу G. IgG являют-

ся пространственно стабильными молекулами и характеризуются устойчивостью к физико-химическим воздействиям. Неспецифические антитела, идентифицированные как IgM [8], быстрее разрушаются в процессе хранения вследствие своей лабильности, а также образуют конгломераты и выпадают в осадок. На основании полученных данных был установлен срок, необходимый для стабилизации сывороток-полуфабрикатов, – не менее 3 мес.

Как правило, для изготовления флуоресцирующих диагностических препаратов используют не цельную иммунную сыворотку, а выделяют ее глобулиновую фракцию для последующего присоединения флуорохрома [3]. Этим достигается концентрирование активных иммунных белков для конъюгации, а удаление балластных белков альбуминовой фракции, во-первых, позволяет снизить неспецифические реакции, обусловленные высокой реакционной способностью альбумина, во-вторых, уменьшает расход флуорохрома.

Для выделения иммуноглобулиновой фракции оптимальным оказался метод осаждения сульфатом аммония, который обеспечивал хорошую степень очистки, высокий выход и сохранение иммунологической активности антител.

После конъюгирования холерных О139 иммуноглобулинов с ФИТЦ следовал этап адсорбции формализированными клетками гетерологичных штаммов. Перекрестно реагирующие антитела полностью удалялись в результате одной адсорбции. В 96,4 % случаев это не влияло на специфическую активность иммуноглобулинов. В 3,6 % случаев отмечалось снижение специфической активности иммуноглобулинов в 2 раза.

Лиофилизацию препарата осуществляли в течение (34±2) ч. В качестве стабилизатора использовали 0,9 % сахарозы и 0,1 % натрия тиосульфата. Герметизацию ампул с сухим препаратом проводили под вакуумом.

Изготовленный по данной технологии препарат представлял собой аморфную массу оранжевого цвета, характеризовался хорошей растворимостью – в течение 1 мин. После растворения – опалесцирующая жидкость желто-зеленого цвета. Потеря в массе при высушивании не превышала 2,5 %, рН 8,0–9,5, содержание белка от 0,7 до 1,5 %, молярное соотношение ФИТЦ/белок от 5,0 до 14,0. Специфическая активность лиофилизированных иммуноглобулинов составляла 1:64–1:128.

Экспериментальные серии иммуноглобулинов изучали в лабораторных испытаниях с 22 штаммами *V. cholerae* О139, выделенными от больных и вибрионосителей и 20 авирулентными штаммами *V. cholerae* О139, выделенными из объектов внешней среды (вода), специфичность – с холерными вибрионами серогрупп: О2-О83, О1 классического и эльтор биоваров сероваров Инаба и Огава, холерными вибрионами в R-форме, а также с микроорганизмами семейств *Vibrionaceae*, *Pseudomonaceae* и *Enterobacteriaceae*.

Показатели стабильности иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих холерных O139

№ серии	Контроль при выпуске, через	Растворимость, с (норма* – в течение 3 мин)	pH (норма – от 8,0 до 9,5)	Белок, % (норма – от 0,7 до 1,5 %)	Молярное соотношение ФИТЦ/белок (норма – от 5,0 до 14,0)	Специфическая активность препарата в рабочем разведении (норма – не менее 3+)	Потеря в массе при высушивании (норма – не более 2,5 %)
01	При выпуске	30	8,0	1,3	7,5	4+	0,25
	2 года	30	8,1	1,3	7,5	4+	0,25
	2 года 6 мес.	30	8,0	1,3	7,5	4+	0,25
02	При выпуске	30	8,0	1,3	6,96	4+	0,85
	2 года	30	8,0	1,3	7,0	4+	0,85
	2 года 6 мес.	30	8,1	1,3	7,0	4+	0,85
03	При выпуске	10	9,1	0,7	8,0	4+	1,26
	2 года	10	9,1	0,7	8,0	4+	1,26
	2 года 6 мес.	10	9,1	0,7	8,0	4+	1,26
04	При выпуске	20	9,1	0,7	8,0	4+	2,13
	2 года	20	9,1	0,7	8,0	4+	2,13
	2 года 3 мес.	20	9,1	0,7	8,0	4+	2,13
05	При выпуске	20	9,1	1,1	11,8	4+	1,4
	2 года	20	9,1	1,1	11,8	4+	1,4

*Норма указана в соответствии с требованиями технических условий.

Результаты испытаний показали, что эффективность выявления холерных вибрионов O139 серогруппы составила 100 % независимо от источника выделения штаммов, а также подтвердили высокую специфичность нового препарата, поскольку отсутствовали перекрестные реакции с другими микроорганизмами.

Для установления срока годности изучали стабильность физико-химических (растворимость, pH, содержание белка, молярное соотношение ФИТЦ/белок, потеря в массе при высушивании) и биологических свойств (специфическая активность и специфичность) экспериментальных серий препарата, хранившихся при температуре от 0 до 8 °С. Иммуноглобулины сохраняли все физико-химические и биологические характеристики в течение 2,5 лет (таблица). На основании этого был установлен срок годности – 2 года.

Три экспериментальные серии иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих холерных O139 были представлены на Государственные испытания. Первый этап (приемочные испытания) включал экспертизу проектов НД и лабораторную оценку качества экспериментальных серий препарата с использованием коллекционных штаммов. В ходе испытаний препарат показал высокую специфичность, так как не выявлял штаммы, не относящиеся к *V. cholerae* O139 серогруппы, в концентрации бактерий 10^8 м.к./мл. Чувствительность с чистыми культурами холерных вибрионов O139 серогруппы составила $5 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^6$ м.к./мл. В рабочем разведении препарат давал свечение на 4–3 креста.

Второй этап (испытания по медицинскому применению – полевые испытания) проходил на двух клинических базах и заключался в исследовании клинического материала от людей (испражнения, рвотные массы) и проб из объектов окружающей среды (вода и смывы). По результатам полевых ис-

пытаний препарат признан высокоспецифичным, так как не выявлял в клиническом материале и пробах из объектов окружающей среды холерные вибрионы O1 и не O1/O139 серогрупп в концентрации 10^8 м.к./мл. Чувствительность составляла 10^6 – 10^7 м.к./мл при исследовании испражнений и рвотных масс, $5 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^6$ м.к./мл – в пробах воды и смывах.

Заключительным этапом испытаний была экспертиза качества, эффективности и безопасности. По результатам Государственных испытаний препарат «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие холерные O139 адсорбированные кроличьи, лиофилизат для диагностических целей» был признан перспективным и зарегистрирован в качестве изделия медицинского назначения в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения и социального развития (РУ № ФСР 2010/09364).

Таким образом, в результате проведенных исследований разработан новый препарат, предназначенный для выявления и идентификации возбудителя холеры O139 серогруппы в мазках из различных материалов и чистых культур прямым МФА. Внедрение в практику иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих холерных O139 позволит повысить эффективность лабораторной диагностики холеры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева Л.П., Мазрухо Б.Л., Маркина О.В. и др. Получение диагностических флуоресцирующих моноклональных иммуноглобулинов к *Vibrio cholerae* O139 серовара. Клиническая диагностика. 2002; 12:50–1.
2. Алексеева Л.П., Сальникова О.И., Мазрухо Б.Л., Маркина О.В., Чемисова О.С., Лобанов В.В. Моноклональные антитела к липополисахариду *Vibrio cholerae* O139. Биотехнология. 2002; 2:79–84.
3. Гольдин Р.Б., Белецкая Л.В., Крюкова И.Н. и др. Иммунолюминесценция в медицине. М., 1977. 240 с.
4. Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Дятлов И.А., Елисеев Ю.Ю., Киреев М.Н., Космоенко О.Л. Способ получения O-антигена холерного очищенного. Патент РФ 2143280, опубл. 27.12.1999. Бюл. № 56.
5. Ломов Ю.М. Эволюция возбудителя холеры и прогноз по этой инфекции на ближайшее будущее. Эпидемиол. и инф. бол.

2004; 1:7–12.

6. *Онищенко Г.Г., Ганин В. С., Голубинский Е.П.* Вибрионы не O1 серологической группы и их значение в патологии человека. М.; 2001. 384 с.

7. *Онищенко Г.Г., Кутырев В.В.*, редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. М.: Медицина; 2009. 472 с.

8. *Смирнов В.В., Чаплинский В.Я., Андреева З.М.* и др. Научные основы производства диагностических препаратов. Киев, 1980. 195 с.

9. *Смирнова Н.И.* Возбудитель холеры новой O139-серогруппы: молекулярно-генетические особенности и происхождение. Мол. генет. микробиол. и вирусол. 2002; 3:23–33.

10. *Федорова В.А., Громова О.В., Девдариани З.Л.* Иммуноферментная тест-система для детекции *Vibrio cholerae* O139. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобил. 1998; 5:77–80.

11. *Яровая Л.М., Аleshkin В.А.* Новые данные о химической структуре липополисахаридов и практические перспективы. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобил. 1991; 3:73–8.

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

1. *Alekseeva L.P., Mazrukho B.L., Markina O.V. et al.* [Obtaining of monoclonal fluorescent diagnostic immunoglobulins for *Vibrio cholerae* O139]. Clin. Lab. Diagn. 2002; 12:50–1.

2. *Alekseeva L.P., Sal'nikova O.I., Mazrukho B.L., Markina O.V., Chemisova O.S., Lobanov V.V.* [Monoclonal antibodies for *Vibrio cholerae* O139 lipopolysaccharide]. Biotekhnologiya. 2002; 2:79–84.

3. *Goldin R.B., Beletskaya L.V., Kryukova I.N. et al.* [Immunoluminescence in Medicine]. М.: 1977. 240 p.

4. *Gromova O.V., Dzhaparidze M.N., Dyallov I.A., Eliseev Yu.Yu., Kireev M.N., Kosmoenko O.L.* [Method of obtaining of cholera purified O-antigen]. RF Patent 2143280.

5. *Lomov Yu.M.* [Cholera agent evolution and prognosis on this infection for the nearest future]. Epidemiol. Infek. Bol. 2004; 1:7–12.

6. *Onishchenko G.G., Ganin V.S., Golubinsky E.P.* [Non-O1 Vibrios and Their Impact in Human Pathology]. М.; 2001. 384 p.

7. *Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V.*, editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases]. М.; 2009. 472 p.

8. *Smirnov V.V., Chaplinsky V.Ya., Andreeva Z.M. et al.* [Scientific Bases of Diagnostic Preparations Production]. Kiev; 1980. 195 p.

9. *Smirnova N.I.* [Cholera agent of the new O139 serogroup: molecular genetic peculiarities and origin]. Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 2002; 3:23–33.

10. *Fedorova V.A., Gromova O.V., Devdariani Z.L.* [Immuno-enzyme test-system for *Vibrio cholerae* O139 detection]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1998; 5:77–80.

11. *Yarovaya L.M., Aleshkin V.A.* [New data on chemical structure of lipopolysaccharides and practical prospects]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1991; 3:73–8.

Authors:

Alenkina T.V., Bochkareva G.V., Shul'gina I.V., Lobovikova O.A., Abramova E.G., Gromova O.V., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrap@microbe.ru

Sayapina L.V., Kasina I.V. Research Center for Evaluation of Products for Medical Application. Moscow.

Об авторах:

Аленкина Т.В., Бочкарева Г.В., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Абрамова Е.Г., Громова О.В., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Саяпина Л.В., Касина И.В. Научный центр экспертизы средств медицинского применения. Москва.

Поступила 15.12.11.