

БИОТЕХНОЛОГИЯ СТАБИЛИЗАЦИИ ЖИВЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В БИОМАССЕ И В ПРЕПАРАТЕ ЧУМНОЙ ВАКЦИНЫ

Д.А. Будыка, Н.В. Абзаева, С.Е. Гостищева, Е.Л. Ракитина, Г.Ф. Иванова, А.А. Фисун

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Резюме. За многие годы производственного выпуска чумной вакцины хорошо отработана технология ее изготовления. Технологический цикл производства препарата состоит из регламентированных этапов, однако несмотря на их эффективность, возникает необходимость модернизации производственного процесса, например, для производства вакцины в небольших количествах. Наши исследования были направлены на получение экспериментальных образцов чумной вакцины с меньшим, по сравнению с коммерческой вакциной, количеством доз в ампуле, приготовленных в условиях производства биомассы в аппарате (АКМ-Ш) поверхностным методом выращивания с использованием всех регламентированных технологических этапов, исключая этап объединения содержимого двух смывов и последующее дополнительное разведение суспензии клеток стабилизатором. Однако сам момент сведения и последующего приготовления такой вакцины нами исключен, так как биомасса второго смыва в количественном отношении является готовым сырьем для препарата с уменьшенной дозировкой. Преимущества получения вакцины со сниженным числом доз непосредственно из биомассы второго смыва с концентрацией микробных клеток *Yersinia pestis* EV 20–40 × 10⁹ существенно упрощают биотехнологию изготовления такого препарата. Полученные экспериментальные серии вакцины были исследованы по основным регламентированным показателям: оптическая концентрация, жизнеспособность, термостабильность, потеря в массе при высушивании. Для выбраковки недостаточно жизнеспособных микробных клеток с целью последующей стабилизации показателя жизнеспособности в течение срока хранения, полуфабрикат вакцины с высоким исходным показателем жизнеспособности дополнительно подвергали воздействию экстремальной температуры (37±1)°С в течение 24 ч. Следует отметить, что все экспериментальные образцы сохранили показатель жизнеспособности не ниже регламентируемого (25%) на протяжении опыта, в отличие от коммерческого препарата. Для выяснения стабильности препарата при хранении (в течение 3 лет) был проведен сравнительный анализ жизнеспособности экспериментальных и коммерческих серий. Для оценки поствакцинального иммунитета был проведен анализ иммунного ответа на введение чумной вакцины с помощью проточного цитометра FACSCalibur, учитывая, что эта технология обладает высокой специфичностью, чувствительностью и информативностью. Что касается иммуногенных свойств, то данный показатель регистрируется на весьма высоком уровне как на белых мышах, так и на морских свинках. Таким образом, основные биологические показатели получен-

Адрес для переписки:

Гостищева Светлана Евгеньевна
355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13–15,
ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора.
Тел./факс: +7 (8652) 26-20-50 (служебн.).
E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Contacts:

Svetlana E. Gostischeva
355035, Russian Federation, Stavropol, Sovetskaya st., 13–15,
Stavropol Plague Control Research Institute.
Phone/fax: +7 (8652) 26-20-50 (office).
E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Библиографическое описание:

Будыка Д.А., Абзаева Н.В., Гостищева С.Е., Ракитина Е.Л., Иванова Г.Ф., Фисун А.А. Биотехнология стабилизации живых микроорганизмов в биомассе и в препарате чумной вакцины // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 1. С. 87–92. doi: 10.15789/2220-7619-2016-1-87-92

Citation:

Budika D.A., Abzaeva N.V., Gostischeva S.E., Rakitina E.L., Ivanova G.F., Fisun A.A. Living microorganism's stabilization in biomass biotechnology and plague vaccine preparation // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2016, vol. 6, no. 1, pp. 87–92. doi: 10.15789/2220-7619-2016-1-87-92

ных препаратов (жизнеспособность, термостабильность, стабильность при хранении) превышают таковые у коммерческого аналога и обеспечивают эффективную иммунологическую перестройку и высокую иммуногенность в эксперименте на животных.

Ключевые слова: биотехнология, вакцина чумная живая, жизнеспособность, иммуногенность, термостабильность, моноклональные антитела.

LIVING MICROORGANISM'S STABILIZATION IN BIOMASS BIOTECHNOLOGY AND PLAGUE VACCINE PREPARATION

Budika D.A., Abzaeva N.V., Gostischeva S.E., Rakitina E.L., Ivanova G.F., Fisun A.A.

Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. Over the years, the production release of the plague vaccine is well developed its technology. The technological cycle of production of the preparation consists of regulated steps, however, despite their effectiveness it is necessary to modernize the manufacturing process, for example, solutions for some of the pressing needs of the customers, in particular, small groups of immunization. Our research has focused on obtaining experimental samples plague vaccine smaller compared to the commercial vaccine, the number of doses per vial prepared in a biomass production unit (ACM-Sh) surface by cultivation using all regulated processing steps, except step of combining content two swabs, and then an additional dilution of the cell suspension stabilizer. However, the time information and the subsequent preparation of such a vaccine is excluded us, since biomass is the second flush in quantitative terms is a ready raw material for the preparation of reduced dosage. The benefits of receiving the vaccine reduced the number of doses directly from the biomass of the second flush with the concentration of microbial cells *Yersinia pestis* EV 20–40 × 10⁹ biotechnology greatly simplify the manufacture of such a preparation. The experimental vaccine series were tested by major regulated parameters: optical concentration, vitality, thermal stability, the loss on drying. In addition, the vaccine was prefabricated with high baseline viability to extreme temperatures (37±1)°C for 24 hours to exclude enough viable microbial cells for subsequent stabilization indicator of viability during storage. It should be noted that all the experimental samples preserved viability index not lower regulated (25%) during the experiment, in contrast to the commercial preparation. To determine the stability of the formulation during storage (over 3 years) was a comparative analysis of the viability of the experimental and commercial lots. To assess post vaccination immune analyzed the immune response to the introduction of a plague vaccine using FACSCalibur flow cytometer, considering that this technology has a high specificity, sensitivity and informativity. With regard to the immunogenic properties, the active component is recorded at a very high level as the white mice, and guinea pigs. Thus, the main biological indicators derived preparations (viability, thermal stability, storage stability) exceed those of commercial analog and provide effective immunological alterations and highly immunogenic in experimental animals.

Key words: biotechnology, vaccine plague live, viability, immunogenicity, thermal stability, monoclonal antibodies.

Введение

В комплексе иммунопрофилактических мероприятий уровень эффективности вакцинного препарата является определяющим. Если с иммуноуправляемыми инфекциями все ясно, то усилия исследователей прикладываются там, где иммунопрофилактика не в состоянии обеспечить абсолютной защиты против опасного заболевания.

Разработка вакцинного препарата против чумы соответствует этому постулату. Совершенствование выпускаемого препарата вакцины чумной живой реализуется в нескольких главных направлениях. Данная работа посвящена отработке и внедрению методологии, направленной в конечном итоге на стабилизацию живых микробных клеток вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV в дозе вакцины на максимально регламентированном уровне.

Вкратце механизм противочумного иммунитета можно свести к клеточно-гуморальной природе [2, 3]. Сам препарат в этом контексте представляет из себя комбинацию живых и убитых вакцинных микробных клеток, лиофилизированных в защитной среде. Очевидно, что в патогенезе живых бактериальных вакцин вообще и живой чумной вакцины в частности лежит способность вакцинных клеток приживаться в месте введения и инвазировать, то есть распространяться, по крайней мере, в регионарные лимфоидные ткани периферической системы иммунитета, обеспечивая эффективную иммунологическую ее перестройку. Наверняка известное количество иммуногенов представляют также и убитые микробы в составе комбинации, однако так называемая бустер-иммунизация обеспечивается живыми микробами вакцинного штамма в биомассе.

Следовательно, показатель жизнеспособности микробных клеток вакцинного штамма ха-

рактирует возможность живой вакцины осуществлять в привитом организме весь комплекс реакций. Таким образом, иммуногенность является зависимой в указанном контексте.

Ранее авторами были обоснованы целесообразность и иммунологическая эффективность применения для вакцинации мини-коллективов контейнеров со сниженным количеством доз, достигаемые снижением оптического стандарта с последующим уменьшением объема суспензии при розливе [1, 4, 5]. Такое уменьшение существенно повышает устойчивость конечного продукта на технологических этапах розлива и лиофилизации, увеличивает стабильность при хранении и снижает диапазон колебаний количества живых микробов в дозе. Это достигается за счет более сбалансированного соотношения защитной среды (среды высушивания) и клеток [1, 6].

Резюмируя вышесказанное, нами представлены возможности воздействия в качестве рычагов некоторых биотехнологических приемов, позволивших оказать существенное положительное влияние на ключевые показатели качества (жизнеспособность, термостабильность, стабильность при хранении) клеток вакцинного штамма с последующей оценкой их иммунологического воздействия в эксперименте на животных.

Материалы и методы

Технологический цикл производства препарата вакцины чумной живой состоит из регламентированных этапов, включающих в себя получение посевного материала, выращивание биомассы на плотной питательной среде в аппарате культивирования микробной массы Шестеренко (АКМ-Ш), приготовление вакцинной взвеси, розлив, лиофилизацию, опай и контроль полуфабриката препарата [5].

В соответствие с биотехнологией, смыв биомассы с АКМ-Ш проводится защитной средой последовательно двукратно, при этом получается две емкости с вакцинной суспензией. Уменьшение концентрации суспензии в ампуле достигалось на этапе соединения содержимого двух смывов, когда отбирали часть полученной суспензии и разбавляли ее стабилизатором (средой высушивания) до требуемой расчетной, после чего разливали в ампулы по 1 мл.

Однако учитывая, что концентрация клеток полученной биомассы различается в несколько раз и составляет $100-150 \times 10^9$ м.к./мл для первой емкости и $20-40 \times 10^9$ м.к./мл для второй, представляется возможным существенно упростить процесс изготовления такой вакцины, исключив момент соединения двух полученных суспензий в одну и разведения биомассы средой

высушивания. Так как параметры бакмассы второго смыва количественно соответствуют необходимым для получения вакцины со сниженным числом доз, очевидной стала целесообразность приготовления препарата вакцины со сниженным количеством доз непосредственно из него, минуя этап сведения и последующее дополнительное разведение суспензии стабилизатором.

Полученные таким образом экспериментальные серии вакцины были исследованы по основным показателям качества: жизнеспособность и термостабильность (бактериологический метод); потеря в массе при высушивании (весовой метод); иммуногенность (биологический метод).

Был проведен анализ иммунного ответа на введение чумной вакцины с помощью проточного цитометра FACSCalibur (Becton Dickinson, США) по универсальной программе Cell Quest. Исследования выполняли с использованием моноклональных антител к антигенам лимфоцитов мыши $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$ фирмы Invitrogen (США). Эта технология обладает высокой специфичностью и чувствительностью, применима для целого ряда лабораторных и клинических исследований и позволяет определять субпопуляционный состав лимфоцитов в крови биопробных животных.

Для оценки поствакцинального иммунитета в качестве модели для изучения изменений иммунобиологических показателей использовали белых мышей. Препарат вводился подкожно в дозе 1×10^5 микробных клеток. Кровь исследовали на 7, 14, 21 и 28 сут. Статистическую обработку проводили общепринятым методом (Ашмарин И.П., Воробьев А.А., 1962).

Результаты и обсуждение

Нами были получены три экспериментальные серии из емкости второго смыва и изучены основные показатели их качества в сравнении с полученным в том же производственном цикле коммерческим препаратом (табл. 1).

Анализ полученных данных показал, что серии со сниженным количеством доз полностью отвечают регламентированным нормам, при этом являясь более устойчивыми к процессу лиофилизации, что обеспечивает повышенный показатель жизнеспособности ($t \geq 2,0$) и несколько более высокую термостабильность.

Что касается иммуногенных свойств, то данный показатель регистрируется на весьма высоком уровне как на белых мышах, так и на морских свинках. Регламентируемая величина ED_{50} для белых мышей не может превышать показатель 40 000, а для морских свинок — 10 000 живых микробных клеток.

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ СЕРИЙ СО СНИЖЕННЫМ ЧИСЛОМ ДОЗ

Показатели качества	Опыт 1		Опыт 2		Опыт 3	
	Коммерческая серия	Экспериментальная серия	Коммерческая серия	Экспериментальная серия	Коммерческая серия	Экспериментальная серия
Оптическая концентрация, млрд/мл	75	35	60	35	50	25
Жизнеспособность, %	33,0±1,2	38,1±2,3	25,8±3,1	41,5±0,9	30,9±1,4	36,3±2,2
Термостабильность, сут	8,7	10,1	7,6	10,4	8,1	11,1
Потеря в массе при высушивании, %	1,5	0,8	1,1	1,2	1,5	1,6
Иммуногенность, ED ₅₀	б/м — 8312 м/св — 5443	б/м — 7921 м/св — 3249	б/м — 5391 м/св — 5417	б/м — 6244 м/св — 3277	б/м — 6983 м/св — 3177	б/м — 5418 м/св — 4895

ТАБЛИЦА 2. АНАЛИЗ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ВАКЦИНЫ ИЗ БИОМАССЫ ВТОРОГО СМЫВА ПОСЛЕ ДОЗИРОВАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭКСТРЕМАЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ (37±1)°С

Серии	Жизнеспособность, %				
	исходная	12 ч	24 ч	36 ч	48 ч
Экспериментальные	41,5±0,9	37,6±1,3	37,2±0,9	33,3±2,5	25,8±4,1
Коммерческая	25,8±3,1	21,8±1,7	20,8±2,2	18,5±1,9	17,2±3,3

ТАБЛИЦА 3. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПРЕПАРАТА ВАКЦИНЫ ЧУМНОЙ ЖИВОЙ, ПРИГОТОВЛЕННОЙ ИЗ БИОМАССЫ ВТОРОГО СМЫВА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ) В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ (4±2)°С

Исследовано серий	Жизнеспособность, %		
	исходная	срок хранения	
		1 год	2 года
Экспериментальная вакцина			
1	38,1±2,3	34,3±0,4	30,1±2,0
2	41,5±0,9	39,2±2,1	36,8±0,9
3	36,3±2,2	35,2±2,0	32,2±2,2
Итого	38,6±1,5	36,2±1,5	33,0±2,0
Коммерческая вакцина — контрольные образцы			
1	33,0±1,2	28,1±1,3	25,2±1,4
2	25,8±3,1	24,1±1,4	20,3±1,6
3	30,9±1,4	28,1±0,8	24,2±1,2
Итого	29,9±2,1	26,8±1,3	23,3±1,5

ТАБЛИЦА 4. АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛИМФОЦИТОВ В ПРОЦЕССЕ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ВВЕДЕНИИ БЕЛЫМ МЫШАМ ЧУМНОЙ ВАКЦИНЫ

Сутки, серия	7 сут		14 сут		21 сут		28 сут		Контроль
	2	6	2	6	2	6	2	6	
CD3 ⁺	70,12±4,58	67,16±2,82	75,12±2,27	73,02±3,06	63,57±1,28	71,96±2,17	64,63±0,86	62,81±0,79	66,53±2,60
CD4 ⁺	27,93±1,96	27,70±3,67	32,09±1,35	26,79±3,53	36,12±0,82	24,85±1,98	28,33±1,33	25,69±0,72	33,68±1,29
CD8 ⁺	39,59±5,98	38,65±3,33	39,96±2,99	39,43±1,80	26,41±0,50	40,11±2,52	34,37±1,85	35,61±1,17	34,37±1,36
CD19 ⁺	19,91±2,49	22,51±3,03	19,87±0,77	23,37±1,59	23,84±1,59	16,47±3,36	25,22±0,35	24,80±0,90	18,31±1,37

В ранее проведенных исследованиях нами была показана целесообразность воздействия экстремальной температурой (37 ± 1)°С в течение 24 ч на полуфабрикат вакцины с высоким исходным показателем жизнеспособности для выбраковывания недостаточно жизнеспособных микробных клеток с целью последующей стабилизации показателя жизнеспособности в течение срока хранения. Взятая в эксперимент вакцина второго смыва обладала показателями, рекомендуемыми для дальнейшей закалки, и ее полуфабрикат (3 серии) был подвергнут воздействию повышенной температуры с контролем жизнеспособности в различные временные отрезки (табл. 2).

Как и ранее, анализ полученных данных показал, что 24 ч температурного воздействия являются оптимальным сроком для стабилизации свойств препарата. Следует отметить, что, в отличие от коммерческого препарата, все экспериментальные образцы сохранили показатель жизнеспособности не ниже регламентируемого (25%) на протяжении опыта.

Срок хранения коммерческого препарата чумной вакцины составляет три года при хранении в условиях «холодовой цепи». Для выяснения стабильности препарата при хранении, был проведен сравнительный анализ жизнеспособности экспериментальных и коммерческих серий в период срока наблюдения (табл. 3).

Результаты показали, что вакцина второго смыва обладает более стабильными свойствами по сравнению с коммерческой.

При анализе механизмов развития иммунного ответа, были проанализированы два варианта экспериментальной вакцины, сходных по жизнеспособности и несколько отличных по оптическому стандарту. Полученные данные (табл. 4) позволяют судить об определенной волнообразной динамике исследуемых показателей.

При сравнении двух образцов статистически достоверной разницы в показателях Т- и В-лимфоцитов выявлено не было, что указывает на идентичный иммунный ответ лабораторных животных на введение вакцин.

При исследовании на 7, 14 и 21 сут отмечалось повышение уровня CD3⁺ (Т-лимфоциты) у всех вакцинированных животных. Причем на 21 сут, на пике иммуногенеза, наблюдалось статистически достоверное повышение клеток, экспрессирующих рецепторы CD3⁺ и CD8⁺ в 6 серии. В эти же сроки наблюдалась достоверная разница в показателе CD4⁺ в сторону снижения. Здесь была наиболее выражена иммунная перестройка по Т-лимфоцитам. Возможно, это связано с относительно большим количеством живых микробных клеток в иммунизирующей дозе данной серии препарата при меньшей его оптической плотности.

К 28 сут отмечалось повышение показателя CD19⁺ (В-лимфоциты); все показатели Т-лимфоцитов выравнивались и практически приближались к контрольным.

Выводы

Резюмируя вышесказанное, можно говорить о том, что разрабатываемые нами биотехнологические приемы решают вопросы повышения и сохранения показателя живых микробных клеток комплексно, начиная с оптимизации биотехнологических методов, получения биомассы, оптимизации ее биологических и физических свойств и заканчивая стабилизацией их в процессе лиофильной консервации и последующего хранения.

Иммунологическая эффективность препарата обусловлена высокими и стабильными условиями его биологических параметров и является зависимой в сложном взаимоотношении микробных клеток (и прежде всего живых) вакцинного штамма и макроорганизма.

Список литературы/References

1. Будыка Д.А. Экспериментальное обоснование снижения общей концентрации микробов и объема суспензии в контейнере в технологии живой чумной вакцины EB // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2002. № 3–4. С. 42–45. [Budika D.A. Experimental substantiation of reducing the overall concentration of bacteria and the amount of slurry in the container in the technology of live plague vaccine EB. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccines*, 2002, no. 3–4, pp. 42–45. (In Russ.)]
2. Будыка Д.А., Ракитина Е.Л., Фисун А.А., Абзаева Н.В. Изучение в эксперименте иммунологической активности вакцины чумной живой, подвергнутой воздействию экстремальной температуры // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2015. Т. 14, № 4. С. 75–79. [Budika D.A., Rakitina E.L., Fisun A.A., Abzaeva N.V. The study of experimental immunological activity of the vaccine plague live exposed to extreme temperature. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccines*, 2015, vol. 14, no. 4, pp. 75–79. (In Russ.)]
3. Будыка Д.А., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Гостищева С.Е., Фисун А.А., Ляпустина Л.В. Сравнительный анализ экспериментальных серий вакцины чумной живой по показателям жизнеспособности и термостабильности // Проблемы особо опасных инфекций. 2009. № 102. С. 68–71. [Budika D.A., Abzaeva N.V., Ivanova G.F., Gostisheva S.E., Fisun A.A., Lyapustina L.V. Comparative analysis of experimental series of the vaccine plague live in terms of viability and thermal stability. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2009, no. 102, pp. 68–71. (In Russ.)]

4. Печникова И.В., Тинкер А.И. Выживаемость микробов в сухой чумной вакцине ЕВ в зависимости от их оптической плотности до лиофилизации // Проблемы особо опасных инфекций. 1974. № 5. С. 64–68. [Pechnikova I.V., Tinker A.I. The survival of microbes in dry plague vaccine EB depending on the optical density before lyophilization. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 1974, no. 5, pp. 64–68. (In Russ.)]
5. Промышленный регламент на производство вакцины чумной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций ПР 01897080–09–09. Ставрополь, 2009. 252 с. [Industrial regulations for live plague vaccine production, lyophilizate for suspension for preparing of suspension for injection, epicutaneous scarification application and inhalation PR 01897080–09–09. *Stavropol*, 2009. 252 p.]
6. Файбич М.М. Стабилизация вакцинных препаратов в процессе высушивания и хранения // Успехи микробиологии. 1983. № 18. С. 193–215. [Faybich M.M. Stabilization of vaccines during drying and storage. *Uspekhi mikrobiologii = The Successes of Microbiology*, 1983, no. 18, pp. 193–215. (In Russ.)]

Авторы:

Будыка Д.А., д.м.н., ведущий научный сотрудник, зав. научно-производственной лабораторией чумных вакцин ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия;

Абзаева Н.В., к.б.н., старший научный сотрудник научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия;

Гостищева С.Е., научный сотрудник научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия;

Ракитина Е.Л., к.м.н., ведущий научный сотрудник сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний лаборатории бруцеллеза ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия;

Иванова Г.Ф., к.м.н., научный сотрудник научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия;

Фисун А.А., научный сотрудник научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия.

Authors:

Budika D.A., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Head of the Laboratory of Plague Vaccine Research and Production, Stavropol Plague Control Research Institute of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Stavropol, Russian Federation;

Abzaeva N.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Plague Vaccine Research and Production, Stavropol Plague Control Research Institute of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Stavropol, Russian Federation;

Gostischeva S.E., Researcher, Laboratory of Plague Vaccine Research and Production, Stavropol Plague Control Research Institute of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Stavropol, Russian Federation;

Rakitina E.L., PhD (Medicine), Leading Researcher, Department of Clinical Immunology and Pathomorphology of Especially Dangerous Infectious Diseases Laboratory of Brucellosis, Labor Institute of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Stavropol, Russian Federation;

Ivanova G.F., PhD (Medicine), Researcher, Laboratory of Plague Vaccine Research and Production, Stavropol Plague Control Research Institute of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Stavropol, Russian Federation;

Fisun A.A., Researcher, Laboratory of Plague Vaccine Research and Production, Stavropol Plague Control Research Institute of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Stavropol, Russian Federation.

Поступила в редакцию 30.07.2015
Отправлена на доработку 12.10.2015
Принята к печати 02.12.2015

Received 30.07.2015
Revision received 12.10.2015
Accepted 02.12.2015