

15. Demidova T.N., Gorlenko V.V., Meshcheryakova I.S. Analysis of the incidence of tularemia in the Arkhangelsk region. Dal'nevostochnyj zhurnal infekcionnoj patologii. [Far East journal of infectious pathology]. 2014; 25: 60 – 62 (in Russian).
16. Demidova T.N., Meshcheryakova I.S. the current situation on tularemia in the North-West Federal district of the Russian Federation. Infekcionniye bolezni. [Infectious diseases]. Moscow. 2015: 106 (in Russian).
17. Methodical instructions MI 3.1.2007-05. Moscow. Rospotrebnadzor. 2005: 59 (in Russian).

## Биологические свойства штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ со сниженной экспрессией гена *sodB*, кодирующего железозависимую супероксиддисмутазу

М.А. Сотникова (marik\_suharikelf@mail.ru), Т.Б. Кравченко, И.В. Бахтеева,  
Р.И. Миронова, Т.И. Комбарова (kombarova.tatyana@yandex.ru), А.Н. Мокриевич  
(mokrievich@obolensk.org), В.М. Павлов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии  
и биотехнологии», г. Оболensk

### Резюме

Ранее нами было показано, что замена в гене *sodB* штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ нуклеотидов в стартовом кодоне и кодоне, кодирующем лейцин, приводила к снижению количества фермента железозависимой супероксиддисмутазы (FeSOD) в делящихся бактериальных клетках и повышению чувствительности бактерий к окислительному стрессу.

В данной работе на мышинной модели экспериментальной туляремии была оценена эффективность иммунного ответа, формируемого мутантным штаммом *F. tularensis* 15/*sodBII*, при заражении вирулентным штаммом *F. tularensis* Schu S4. Показано, что степень защиты, оцениваемая по обсемененности печени и селезенки инфицированных животных, была значительно более выражена у мышей, вакцинированных мутантным штаммом, в отличие от родительского, что позволяет рассматривать модифицированный штамм *F. tularensis* 15/*sodBII* в качестве перспективного кандидата для создания новой туляремийной вакцины.

**Ключевые слова:** туляремия, вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ, Fe-супероксиддисмутаза, протективный иммунитет

### The Biological Properties of the Strain *Francisella tularensis* 15 NIEG with Decreased Gene Expression *sodB*, Encoding Fe-Dependent Superoxide Dismutase

M.A. Sotnikova (marik\_suharikelf@mail.ru), T.B. Kravchenko, I.V. Bakhteeva, R.I. Mironova,  
T.I. Kombarova (kombarova.tatyana@yandex.ru), A.N. Mokrievich (mokrievich@obolensk.org), V.M. Pavlov

State Research Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology

142279, Moscow reg., Serpukhov dist., Obolensk, info@obolensk.org +7(4967)36-00-10

### Abstract

**Relevance.** Superoxide anion has bactericidal properties and is also an important inducer of proinflammatory cytokines in macrophages. We have created *F. tularensis* 15/*sodBII* strain with transiently decreased FeSOD synthesis level and more sensitive to oxidative stress. So we suggest that the modified vaccine strain have lower reactogenicity.

**Goal.** Studying of effect of *sodB* gene expression modulation on biological properties of vaccine *F. tularensis* strain 15 NIEG.

**Materials and methods.** *F. tularensis* survival in macrophage-like cell line J774.1A and in spleen and liver of infected mice were analyzed through colony-forming unit enumeration. Strains reactogenicity was assessed by the dynamics of change in weight of infected mice. Efficacy of immune response generated by mutant strain of *F. tularensis* 15/*sodBII* was estimated with virulent *F. tularensis* strain Schu S4 infection in the BALB/c mice model.

**Results.** Degree of protection was significantly more pronounced in the mice vaccinated with the strain *F. tularensis* with decreased *sodB* gene expression in comparison with parental *F. tularensis* strain NIEG 15.

**Conclusions.** The modified strain of *F. tularensis* 15/*sodBII* may be consider as a promising variant for development of a new tularemia vaccine with reduced reactogenicity.

**Key words:** tularemia, vaccine strain *Francisella tularensis* 15 NIEG, Fe-superoxide dismutase, protective immunity

## Введение

Туляремия – зооантропонозная инфекция, возбудителем которой является бактерия *Francisella tularensis*. Природный резервуар возбудителя – мелкие грызуны и лагоморфы. Передача возбудителя человеку происходит через кровососущих насекомых, клещей и инфицированную воду [1].

Для профилактики туляремии в России и ряде стран СНГ используется живая тулярийная вакцина, созданная на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ [2]. Данный вакцинный штамм авирулентен для людей, кроликов и морских свинок, но вирулентен для мышей [1]. Среди ферментов тулярийного микроба жизненно важную роль играет железозависимая супероксиддисмутаза (FeSOD), инактивирующая токсичный супероксид-анион [3, 4]. Этот анион может возникать как в процессе окислительного взрыва при фагоцитозе бактерий клетками макроорганизма, так и в процессе жизнедеятельности самого микроорганизма [5], в частности, в результате переноса электрона с  $Fe^{+2}$  на молекулу кислорода (реакции Фентона). Снижение количества этого фермента в бактериальной клетке приводит, с одной стороны, к уменьшению скорости инактивации супероксид-аниона, с другой стороны, к увеличению количества свободных ионов железа, вызывающего увеличение продукции супероксид-аниона. Повышение количества супероксид-аниона в клетке оказывает негативное влияние на микробную клетку, приводя к повреждению бактериальных структур, что, в свою очередь, индуцирует повышенный синтез белков теплового шока [4].

Ранее нами было показано, что в гене *sodB*, кодирующем фермент FeSOD вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, замены нуклеотидов в стартовом и ближайшем к нему кодоне, кодирующем лейцин, приводит к 50% снижению супероксиддисмутазной активности бактерий, находящихся в логарифмической фазе роста, и повышению чувствительности полученного модифицированного штамма *F. tularensis* 15/*sodBII* к окислительному стрессу [6].

**Цель работы** – определить с использованием мышиной модели экспериментальной туляремии влияние модификации гена *sodB* на иммуногенность и протективность штамма *F. tularensis* 15/*sodBII*.

## Материалы и методы

**Бактериальные штаммы и плазмиды.** В работе использовали следующие бактериальные штаммы из государственной коллекции «ГКПМ-Оболensk»: вакцинный штамм *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ, его модифицированный вариант *F. tularensis* 15/*sodBII* со сниженной активностью FeSOD [6], тест-заражающий штамм *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu.

**Клеточные линии.** Мышиная макрофагоподобная клеточная линия J774.1A получена из Российской коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН.

**Среды и условия культивирования.** Штаммы *F. tularensis* культивировали при температуре 37 °C на плотной питательной среде FT-агар производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ГНЦ ПМБ, Оболensk, Россия) с добавлением антибиотика полимиксина В до 100 мкг/мл.

Линию клеток J774.1A культивировали в среде DMEM (Gibco, США) с добавлением 10% инактивированной фетальной сыворотки теленка, 2 mM L-глутамин и 0,2% бикарбоната натрия при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub> в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Sanyo, США). Клетки выращивали в пластиковых флаконах и 24-луночных планшетах для культур тканей (Corning Costar, США).

**Животные.** В экспериментах использовали инбредных мышей линии BALB/c (ФИБХ Питомник «Пушино», МО, г. Пушино). Вес мышей составлял 18 – 20 г, возраст – 6 – 8 недель. Содержание и манипуляции с животными проводили в соответствии с методическими рекомендациями: «Использование современных средств содержания животных» (ФБУН «ГНЦ ПМБ» № 7 от 11.09.2013 г.); «Порядок работы с СПФ животными в современных исследованиях» (ФБУН ГНЦ ПМБ № 7 от 11.09.2013 г.) и с соблюдением требований санитарных правил: СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I – II групп патогенности (опасности)», Москва, 2003; СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций», Москва, 2008.

**Размножение *F. tularensis* в клетках линии J774.1A.** Для экспериментов клетки снимали с пластиковой подложки флакона с 0,25%-м раствором трипсина в растворе Версена (ПанЭКО, Россия) и в концентрации 1 – 4 × 10<sup>5</sup> кл/мл помещали в планшет по 1 мл в лунку. Клетки инкубировали 24 ч для кондиционирования и формирования монослоя в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при температуре 37 °C.

Суспензию бактериальных клеток в концентрации 5 × 10<sup>8</sup> КОЕ/мл вносили в лунки планшета с монослоем клеток J774.1A из расчета 100 бактериальных клеток на 1 макрофаг. Бактерии инкубировали с клетками J774.1 в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37 °C в течение 3 ч. После инкубации монослой отмывали от нефагоцитированных бактерий забуференным физиологическим раствором (ЗФР) троекратно. Затем клетки J774.1A инкубировали в течение 24 часов для внутриклеточного размножения *F. tularensis*.

Определение количества живых бактерий в макрофагах проводили методом высевов. Для этого клеточный монослой через 3 или 24 ч после инфицирования лизировали добавлением 0,5 мл дистиллированной воды в лунку и делали высевы десятикратных серийных разведений клеточного лизата на чашки с FT-агаром. Подсчет количества колоний проводили через трое суток роста.

**Заражение мышей штаммами *F. tularensis*.** Ночную агаровую культуру *F. tularensis* суспендировали в 3ФР до концентрации  $5 \times 10^9$  КОЕ/мл по стандарту мутности (ОСО 42-28-85-2012 ФГБУ «НЦЭСМП») и готовили ряд десятикратных разведений в 3ФР.

Мышам вводили бактериальную суспензию из соответствующего разведения внутрикожно в область хвоста по 0,1 мл. За животными наблюдали в течение 21 суток. Величины  $LD_{50}$  штаммов рассчитывали по формуле G. Kerber в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [7].

**Определение обсемененности органов.** У 3-х мышей из каждой экспериментальной группы после эвтаназии ингаляцией  $CO_2$  проводили забор селезенки и печени. Органы гомогенизировали в 3ФР, делали высевы из десятикратных разведений гомогенатов на чашки с FT-агар по 0,2 мл. Подсчет колоний на агаре проводили через 72 ч инкубации чашек при 37 °C.

**Определение веса мышей.** Взвешивание животных проводили на электронных весах Scout ProSPU («Ohaus», США) с точностью измерения 0,1 г. Мышей взвешивали группами в одно и то же время суток.

**Оценка титра специфических антител к антигенам *F. tularensis*.** Пробы крови для получения сывороток отбирали у мышей на 28 сутки после иммунизации. Титр антител к туляреминым антигенам определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) [8].

**Оценка протективности штаммов *F. tularensis*.** Мыши (по 6 животных в группе) были иммунизированы внутрикожно введением бактериальных суспензий штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* 15/sodBII в объеме 0,1 мл. На 28 сутки после иммунизации иммунных и контрольных животных заражали штаммом *F. tularensis* Schu подкожно в паховую область дозой  $3 \times 10^3$  КОЕ/мышь (3000 DCL) в объеме 0,2 мл

суспензии. За экспериментальными животными наблюдали в течение 21 суток.

**Статистическая обработка.** Данные анализировали с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel.

### Результаты и обсуждение

Способность размножаться в фагоцитах является необходимым свойством вакцинного штамма туляремиального микроба. Изучаемый штамм *F. tularensis* 15/sodBII захватывался клетками макрофагоподобной линии J774.1A с той же эффективностью, что и штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Через 24 часа наблюдали внутриклеточное размножение бактерий обоих штаммов, однако количество высеваемых бактерий штамма *F. tularensis* 15/sodBII было в 2 раза меньше, чем штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ (рис. 1).

Полученные данные показывают, что снижение уровня экспрессии гена *sodB* в штамме *F. tularensis* 15/sodBII не влияет на захват макрофагами модифицированных бактерий, но замедляет их внутриклеточное размножение в 2 раза.

Известно, что вакцинный штамм 15 НИИЭГ обладает умеренной вирулентностью для мышей [1]. Сравнение вирулентности штамма *F. tularensis* 15/sodBII и родительского вакцинного штамма показало, что изучаемый штамм менее вирулентен (табл. 1).

Данные таблицы показывают, что подавление трансляционной активности с мРНК гена *sodB* штамма *F. tularensis* 15/sodBII, приводящее к уменьшению количества синтезируемого фермента SOD, снижает вирулентность модифицированного штамма, по сравнению с родительским приблизительно в 10 раз. Полученные данные соотносятся с результатами по размножению бактерий в макрофагах. Модифицированный штамм оказался менее способен к размножению в макрофагах в результате большей восприимчивости к действию

**Рисунок 1.**

**Эффективность захвата и размножения штаммов *F. tularensis* в клетках мышинной макрофагоподобной линии J774.1A**

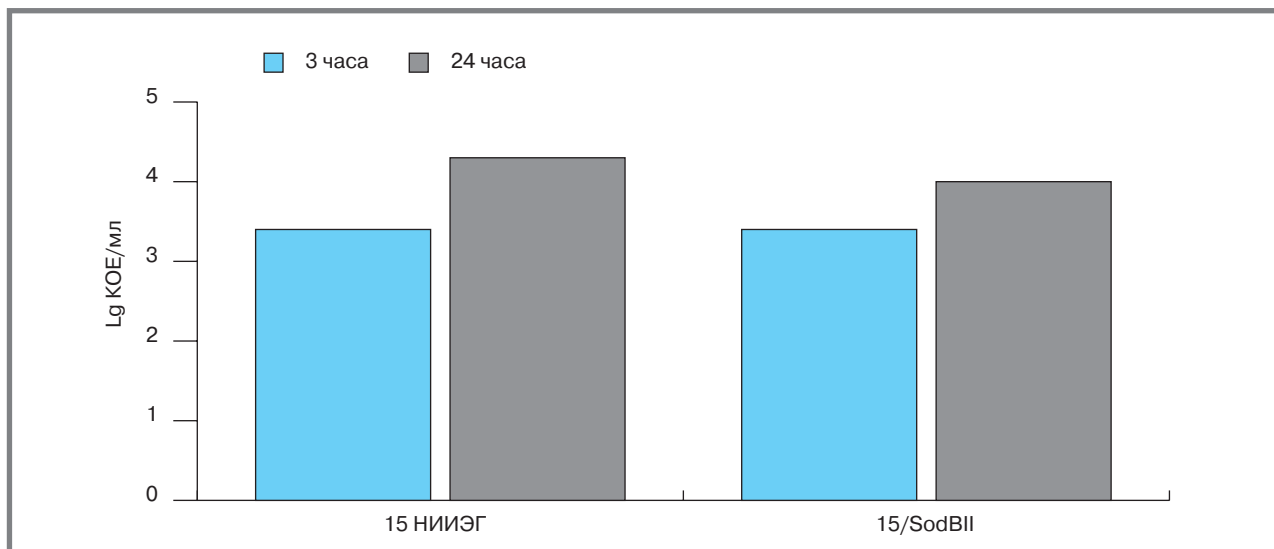


Таблица 1.

Вирулентность штаммов *F. tularensis* 15/sodBII и 15 НИИЭГ для мышей линии BALB/c при внутрикожном введении

Мыши BALB/c	Доза заражения, КОЕ/животное	Число павших животных/общее количество	Средние сроки гибели животных, сутки	Значение LD <sub>50</sub> , КОЕ
<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	10 100 1000	0/5 3/5 5/5	– 9,3 8,6	52 (13 ÷ 206)
<i>F. tularensis</i> 15/sodBII	16 160 1600 16 000	0 1/6 5/6 6/6	– 8,0 8,4 6,2	506 (127 ÷ 2014)

агрессивной внутримакрофагальной среды, что обусловило снижение его вирулентности для мышей по сравнению с родительским штаммом.

Ранее было показано, что при сублетальных дозах заражения мышей линии BALB/c вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ в организме животных в течение первых 7-и суток происходит размножение туляремиального микроба, а затем, по мере формирования иммунного ответа, количество бактерий в организме снижается к 21-м суткам [9]. Нами была проведена сравнительная оценка динамики обсемененности печени и селезенки мышей после заражения изучаемыми штаммами. Данные по высевам бактерий из органов приведены на рисунке 2.

На рисунке 2 видно, что снижение количества синтезируемого фермента FeSOD в бактериальных клетках модифицированного штамма *F. tularensis* 15/sodBII в некоторой степени приводило к снижению способности бактерий к размножению в исследуемых органах, что следует из уменьшения обсемененности органов на всех этапах формирования иммунного ответа по сравнению с вакцинным штаммом.

Одним из интегральных показателей реактогенности вакцинных штаммов является динамика изменения веса экспериментальных животных после введения изучаемого штамма [9]. Сравнение изменения веса мышей, инфицированных штаммами *F. tularensis* 15/sodBII и *F. tularensis* 15 НИИЭГ, не выявило существенных отличий, но у мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/sodBII наблюдалось более медленное восстановление веса (рис. 3). Тем не менее, к 15 дню после иммунизации средний вес мышей в обеих экспериментальных группах был одинаковым.

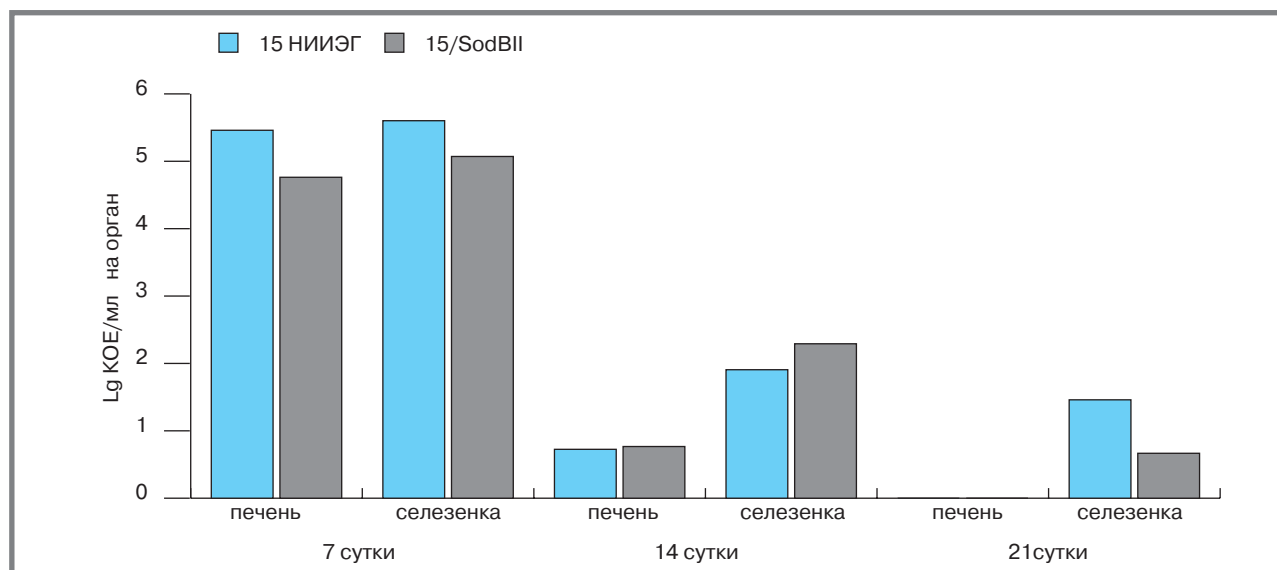
Сравнение титра специфических антител у групп мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/sodBII и туляремиальным вакцинным штаммом в дозах 80 КОЕ и 160 КОЕ соответственно, показало двукратное снижение титра при введении *F. tularensis* 15/sodBII (1/80 по сравнению 1/160 для *F. tularensis* 15 НИИЭГ). Возможной причиной такого отличия является меньшая обсемененность органов экспериментальных животных, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/sodBII.

Для сравнительного изучения эффективности протективного иммунитета мышей, иммунизирован-

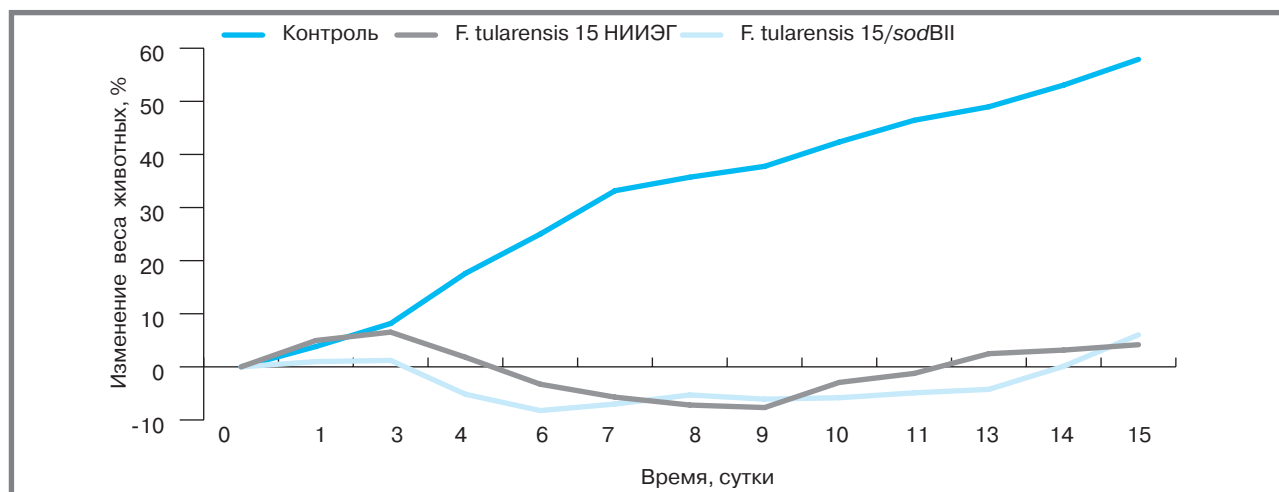
Рисунок 2.

Динамика обсемененности органов иммунных мышей.

Доза иммунизации для *F. tularensis* 15/sodBII – 145 КОЕ/мышь, для *F. tularensis* 15 НИИЭГ – 80 КОЕ/мышь



**Рисунок 3.**  
**Динамика изменения веса мышей линии BALB/с, иммунизированных штаммами *F. tularensis*, по отношению к весу перед иммунизацией (%).**  
**Доза иммунизации штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *F. tularensis* 15/sodBII – 100 КОЕ/мышь**



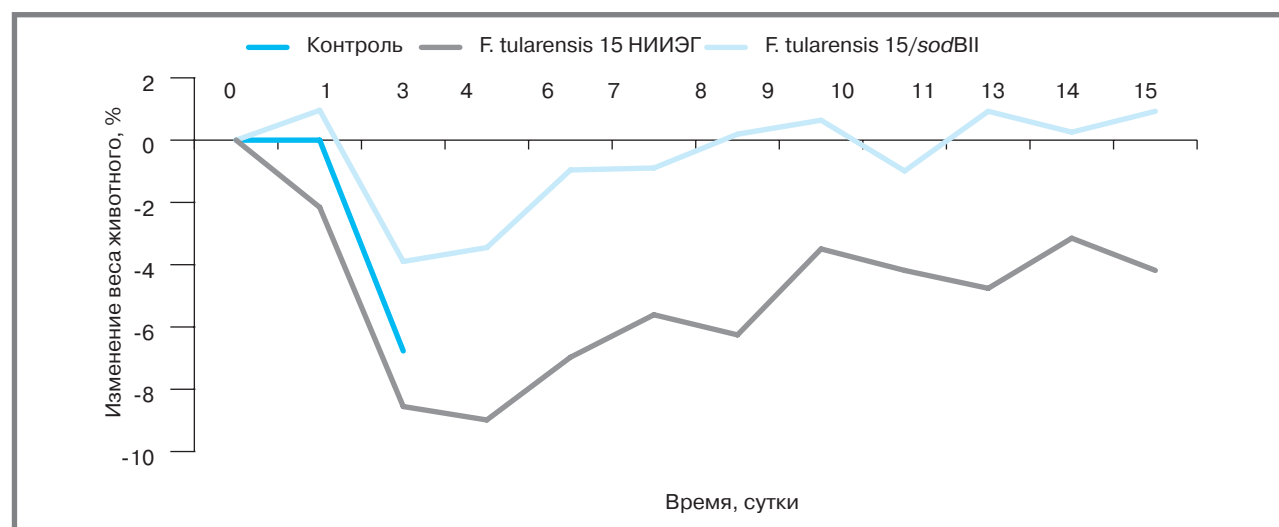
ных штаммами *F. tularensis* 15/sodBII и *F. tularensis* 15 НИИЭГ, был использован высоковирулентный штамм *F. tularensis* Schu. Заражение проводили через 28 дней после иммунизации. В течение времени наблюдения (21 день) мыши в экспериментальных иммунных группах оставались живыми, что указывало на наличие напряженного протективного иммунитета как у мышей, иммунизированных родительским вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, так и у мышей, иммунизированных модифицированным штаммом *F. tularensis* 15/sodBII. Контрольные неиммунные мыши погибли на 4 сутки после заражения.

Для получения более полной картины реакции иммунных мышей на заражение определяли вес мышей в течение 15 дней. Анализ изменения веса мышей после заражения показал, что у иммунных мышей развитие инфекционного процесса сопровож-

далось снижением веса, который уже на 3 – 4 сутки после инфицирования во всех группах достигал наименьшего значения (рис. 4).

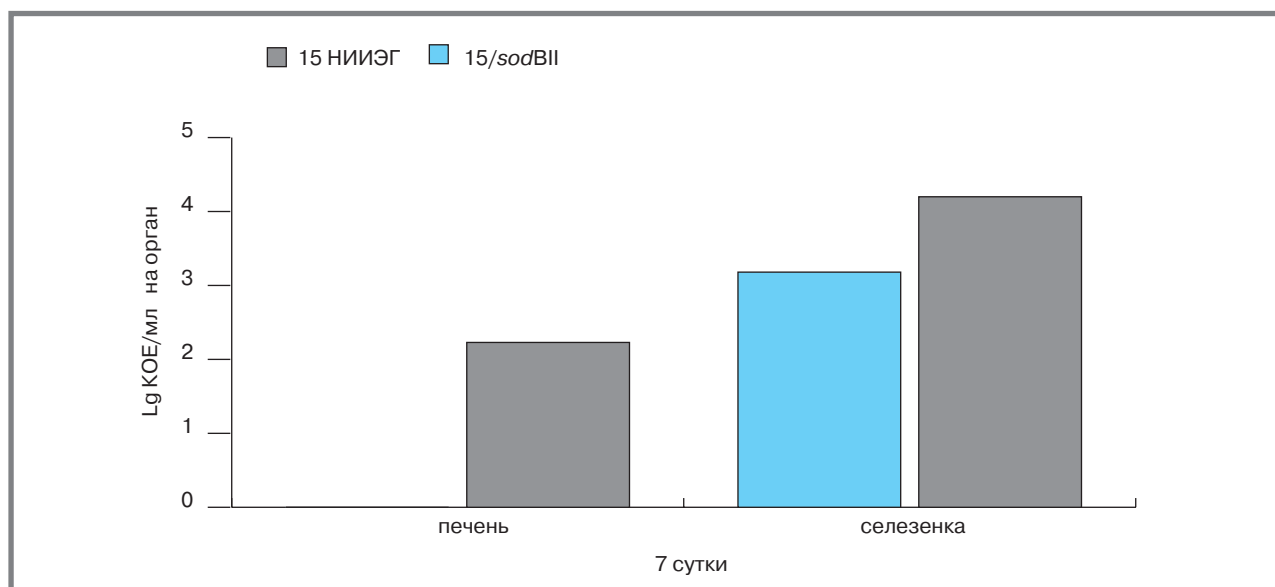
В группе животных, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/sodBII, вес снижался на 4% по отношению к началу инфекционного процесса, тогда как в группе, иммунизированной штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, снижение веса было более выражено и достигало 9%. К 15 суткам вес животных в группе, иммунизированной *F. tularensis* 15/sodBII, вернулся к исходным значениям, а в группе, иммунизированной штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, вес животных был все еще меньше исходного. Полученные результаты указывают на менее тяжелый инфекционный процесс у группы животных, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/sodBII. Сравнение обсемененности печени и селезенки мышей в экспериментальных группах на

**Рисунок 4.**  
**Динамика изменения веса иммунных мышей линии BALB/с, зараженных штаммом *F. tularensis* Schu, по отношению к весу перед заражением (%). Доза заражения 3000 КОЕ/мышь**





**Рисунок 5.**  
Обсемененность органов иммунных мышей на 7 сутки  
после введения 3000 КОЕ/мышь вирулентного штамма *F. tularensis* Schu



7 сутки после заражения показало повышенную защиту от диссеминации возбудителя в органах мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/sodBII (рис. 5). Это явление более ярко выражено при сравнении обсеменённости печени. У мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/sodBII, печень практически свободна от бактерий тест-заражающего штамма.

Суммируя полученные данные, можно сказать, что у мышей, иммунизированных модифицированным штаммом *F. tularensis* 15/sodBII, напряженность протективного иммунитета выше, чем у мы-

шей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ, при этом он менее вирулентен для мышей, чем родительский вакцинный штамм.

Таким образом, нами показано, что модификация гена *sodB*, приводящая к транзитному снижению количества синтезируемого фермента FeSOD в логарифмической фазе роста штамма *F. tularensis* 15/sodBII [6], улучшает его иммуногенные свойства, а данный методический приём полезен для проведения исследований в области, касающейся создания современной живой туляремийной вакцины.

## Литература

- Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. Москва. Медицина. 1975
- Медуницын Н.В. Вакцинология. 2-е, перераб. и доп. Москва. Триада-X. 2004: 448.
- Bakshi C.S., Malik M., Regan K., Melendez J.A., Metzger D.W., Pavlov V.M. et al. Superoxide dismutase B gene (*sodB*)-deficient mutants of *Francisella tularensis* demonstrate hypersensitivity to oxidative stress and attenuated virulence. *J. Bacteriol.* 2006; 188 (17): 6443 – 6448.
- Bakshi C.S., Malik M., Mahawar M., Kirimanjeswara G.S., Hazlett K.R., Palmer L.E. et al.: An improved vaccine for prevention of respiratory tularemia caused by *Francisella tularensis* SchuS4 strain. *Vaccine.* 2008; 26: 5276 – 5288.
- Miller R.A., Britigan B.E. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997: 1 – 18.
- Сухов М.А., Вахрамеева Г.М., Кравченко Т.Б., Мокриевич А.Н., Павлов В.М., Дятлов И.А. Конструирование и изучение свойств вариантов штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ со сниженной экспрессией гена *sodB*, кодирующего Fe-супероксиддисмутазу. *Биотехнология.* 2015; 4: 16 – 27.
- Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Ленинград: Медицинская литература; 1987: 184.
- Мокриевич А.Н., Титарева Г.М., Комбарова Т.И., Ганина Е.А., Кравченко Т.Б., Бахтеева И.В. и др. Иммуногенность и реактогенность штамма *Francisella tularensis* 15/23-1 recA, кандидата для создания новой живой туляремийной вакцины. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* 2015; 6 (85): 74 – 86.
- Комбарова Т.И., Павлов В.М., Кравченко Т.Б., Титарева Г.М., Бахтеева И.В., Борзилов А.И. и др. Сравнительная оценка реактогенности туляремийной вакцины на различных биомоделях. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* 2013; 4: 54 – 62.

## References

- Olsuf'ev N.G. Taxonomy, microbiology and laboratory diagnosis of tularemia pathogen. Moscow. Medicina. [Medicine]. 1975 (in Russian).
- Medunitsyn N.V. Vaccinology. 2nd, Revised. and ext. Moscow. Triada-X. [Triad-X] 2004: 448 (in Russian).
- Bakshi C.S., Malik M., Regan K., Melendez J.A., Metzger D.W., Pavlov V.M. et al. Superoxide dismutase B gene (*sodB*)-deficient mutants of *Francisella tularensis* demonstrate hypersensitivity to oxidative stress and attenuated virulence. *J. Bacteriol.* 2006; 188 (17): 6443 – 6448.
- Bakshi C.S., Malik M., Mahawar M., Kirimanjeswara G.S., Hazlett K.R., Palmer L.E. et al. An improved vaccine for prevention of respiratory tularemia caused by *Francisella tularensis* SchuS4 strain. *Vaccine.* 2008; 26: 5276 – 5288.
- Miller R.A., Britigan B.E. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997: 1 – 18.
- Sukhov M.A., Vahrameeva G.M., Kravchenko T.B., Mokrievich A.N., Pavlov V.M., Dyatlov I.A. Design and study of a strain of *Francisella tularensis* 15 NIEG properties options NIEG with decreased gene expression *sodB*, encoding Fe-superoxide dismutase. *Biotechnologiya.* [Biotechnology]. 2015; 4: 16 – 27 (in Russian).
- Ashmarin I.P., Vorobyov A.A. Statistical methods in microbiological research. Leningrad: Medicinskaja literatura. [Medical literature]; 1987: 184 (in Russian).
- Mokrievich A.N., Titareva G.M., Kombarova T.I., Ganina E.A., Kravchenko T.B., Bakhteeva I.V. et al. Immunogenicity and reactogenicity of *Francisella tularensis* strain 15/23-1 recA, the candidate for a new live tularemia vaccine. *Jepidemiologija i Vakcinoprofilaktika.* [Epidemiology & Vaccinal prevention]. 2015; 6 (85): 74 – 86 (in Russian).
- Kombarova T.I., Pavlov V.M., Kravchenko T.B., Titareva G.M., Bakhteeva I.V., Borsilov A.I. et al. Comparative assessment of reactogenicity tularemia vaccine at different biomodels. *Jepidemiologija i Vakcinoprofilaktika.* [Epidemiology & Vaccinal prevention]. 2013; 4: 54 – 62 (in Russian).