https://doi: 10.31631/2073-3046-2019-18-1-50-54.

Перспективный подход к оценке качества вакцины чумной живой по показателю иммуногенности

С. Е. Гостищева*, Н. В. Абзаева, Е. Л. Ракитина, Д. Г. Пономаренко, М. В. Костюченко, О. В. Логвиненко, А. Н. Куличенко

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь

Резюме

Цель исследования *– изучение возможности применения антиген-стимулированных клеточных тестов in vitro и технологии цитометрического анализа для контроля иммуногенной активности производственных серий вакцины чумной живой.* ***Материалы и методы.*** *В качестве биомоделей использовали белых лабораторных мышей, иммунизированных коммерческим препаратом вакцины чумной живой из штамма Yersinia pestis EV линии НИИЭГ в дозах – 8 x 10^2, 4 x 10^3, 2 x 10^4 и 1 x 10^5 живых микробных клеток. Кровь для исследования брали у интактных мышей и на 7, 14 и 21 сут после иммунизации. Интенсивность антигенреактивности лимфоцитов определяли в клеточных тестах in vitro, анализируя маркер ранней активации (CD45+CD3+CD25+) лимфоцитов с использованием конъюгированных с флуорохромами моноклональных антител. В качестве специфического антигена использовали комплекс водорастворимых антигенов чумного микроба.* ***Результаты и обсуждение.*** *В результате исследования показано, что у животных, вакцинированных дозами 4 x 10^3 – 1 x 10^5 живых микробных клеток, наивысший уровень экспрессии лимфоцитами маркера активации при антигенной стимуляции in vitro регистрируется на 14 сут после иммунизации, при этом количество CD25-позитивных лимфоцитов в среднем в 6,8 раз выше, чем в контрольной группе. Установлена высокая степень прямой связи (коэффициент корреляции r = 1,000) количества выживших животных с увеличением уровня лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации – CD25. Предлагаемая методика может быть использована в качестве дополнительного теста при изучении степени иммуногенности новых (кандидатных) вакцин против чумы.*

Ключевые слова: *иммуногенность, противочумный иммунитет, проточная цитофлуориметрия, маркер активации лимфоцитов, комплекс водорастворимых антигенов Yersinia pestis*

Конфликт интересов. *Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов*

Для цитирования: *Гостищева С. Е., Абзаева Н. В., Ракитина Е. Л. и др. Перспективный подход к оценке качества вакцины чумной живой по показателю иммуногенности. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2019; 18 (1): 50-54. https://doi: 10.31631/2073-3046-2019-18-1-50-54.*

Research objective *– studying of a possibility of application antigen – stimulated cellular in vitro tests and technology of the cytometric analysis for control of immunogene activity of batches of vaccine plague live.* ***Materials and methods.*** *As biomodels used white laboratory mice, immunized commercial medicine of vaccine of the plague NIIEG line, live from a strain of Yersinia pestis EV, in doses – 8 x 10^2, 4 x 10^3, 2 x 10^4 and 1 x 10^5 of living microbic cells. Blood for a research was taken from intact mice and on 7, 14 and 21 days after immunization. The intensity of an antigenreaktivnost of lymphocytes was defined in cellular in vitro tests, analyzing a marker of early activation (CD45+CD3+CD25+) of lymphocytes with use of the monoclonal antibodies conjugated from fluorokhroma. As specific antigen used a complex of water-soluble antigens of a plague microbe.* ***Results.*** *As a result of a research it is shown that at the animals vaccinated by doses 4 x 10^3 – 1 x 10^5 living microbic cells, the highest level of an expression activation marker lymphocytes at anti-gene stimulation of in vitro is registered on 14 days after immunization, at the same time the quantity of CD25 – positive lymphocytes are on average 6.8 times higher, than in control group. High degree of direct link (coefficient of correlation of r = 1,000) quantities of the survived animals with increase in level of lymphocytes, expressiruyushchy markers of early activation – CD25 is established.* ***Conclusions.*** *The offered technique can be used as the additional test when studying degree of immunogenicity of new (kandidatny) vaccines against plague.*

Key words: *immunogenicity, immunity against plague, flowing tsitofluorimetriya, marker of activation of lymphocytes, complex of water-soluble antigens Yersinia pestis, white mice*

No conflict of interest to declare.

For citation: *Gostischeva S. E., Abzaeva N. V., Rakitina E. L. et al. Perspectives approach to the assessment of the quality of the vaccine plague live in terms of immunogenicity. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2019; 18 (1): 50-54. (In Russ). https://doi: 10.31631/2073-3046-2019-18-1-50-54.*

* *Для переписки: Гостищева Светлана Евгеньевна, биолог научно-производственной лаборатории чумных вакцин Ставропольского противочумного институт. 355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13–15; +7 8652-26-20-50. chumnpl@yandex.ru, stavnipchi@mail.ru*
© Гостищева С. Е. и др.
** *For correspondence: Gostischeva Svetlana – biologist Scientific and production laboratory plague vaccine Stavropol Plague Control Research Institute. 355035, Russian Federation, Stavropol, St. Soviet, 13–15; +7 (865-2) 26-20-50; chumnpl@yandex.ru, stavnipchi@mail.ru*
© Gostischeva S. E. et al.

Введение

Иммунологическая активность – один из основных характеристик вакцины, отражающий ее профилактическую эффективность. Для вакцины чумной живой показатель иммуногенной активности, то есть способность создавать длительный (до 1 года) и достаточный по напряженности иммунитет, измеряется в $ЕД_{50}$ и не должен превышать 1×10^4 живых микробных клеток (ж.м.к.) для морских свинок и 4×10^4 ж.м.к. для белых мышей [1]. Контроль качества производственных серий вакцины против чумы проводится в соответствии с нормативной документацией на препарат (ПР, ФСП) и предполагает проведение двух этапов – иммунизация и последующее заражение лабораторных животных.

Существенный недостаток регламентированного метода оценки иммуногенности вакцины чумной живой – это необходимость длительного (21 день) содержания зараженных возбудителем чумы животных в специальных условиях, обеспечивающих соблюдение требований биобезопасности при работе с ПБА I группы, и исключение потенциальной опасности работ с вирулентным штаммом чумного микроба.

Наряду с регламентированным способом определения иммуногенности предлагается метод, основанный на количественном учете «феномена переживания» белых мышей. Показатели иммуногенности, полученные при использовании предлагаемого метода, строго коррелируют с показателями $ЕД_{50}$ изучаемых культур [2].

Несмотря на целый ряд исследований, направленных на разработку информативных методов контроля *in vitro* иммуногенной активности вакцины против чумы, ни один из них так и не нашел практического применения.

В последние годы в лабораторную практику для исследования иммунологической эффективности вакцинации активно внедряются клеточные тесты антиген-стимуляции *in vitro*, основанные на проточно-цитометрическом анализе [3–6]. Технология проточной цитометрии имеет ряд преимуществ, в частности возможность обеспечить количественную оценку и воспроизводимость результатов измерений; анализировать минимальные концентрации клеток и растворенных аналитов в образце; ускорить проведение анализа; использовать компьютерную технику для регистрации, обработки, накопления и хранения информации; организовать внутренний и внешний лабораторный контроль качества исследований. По данным современной литературы, диагностически информативным показателем клеточной антигенреактивности на ранних сроках после иммунизации может выступать маркер активации лимфоцитов CD25 – высокоаффинный рецептор интерлейкина 2 (IL-2Ra), экспрессирующийся активированными Т-лимфоцитами. Проведенные ранее исследования указывают на возможность и перспективу использования антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* для оценки формирования поствакцинального противочумного иммунитета в ранние сроки после иммунизации [7–9].

Таким образом, разработка методов контроля иммуногенности и, соответственно, качества вакцинных препаратов – это актуальная задача, решение которой позволит создать эффективные способы оценки протективного действия вакцин.

Цель исследования – изучение возможности применения антиген-стимулированных клеточных тестов *in vitro* и технологии цитометрического анализа для контроля иммуногенной активности производственных серий вакцины чумной живой.

Материалы и методы

В качестве биомодели использовали белых лабораторных мышей. Животных разделили на 4 группы по 30 особей в каждой. Иммунизировали коммерческим препаратом вакцина чумная живая из штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ в дозах – 8×10^2, 4×10^3, 2×10^4 и 1×10^5 ж.м.к. – подкожно в объеме 0,2 мл.

Кровь для исследования брали из сердца в объеме 1,0–1,5 мл в утренние часы; до вакцинации у интактных животных (контрольная группа), а так же на 7, 14 и 21 сутки после иммунизации (у 6 животных из каждой группы). Опыты проведены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕС) и одобренных комитетом по биомедицинской этике НИИ физиологии СО РАМН.

Постановку реакции для выявления маркеров активации лимфоцитов осуществляли в течение 24 ч после взятия крови. Интенсивность антигенреактивности лимфоцитов определяли в клеточных тестах *in vitro*, анализируя количество CD45 + CD3 + CD25 + лимфоцитов с использованием конъюгированных с флуорохромами моноклональных антител (Beckman Coulter, США). В качестве специфического антигена использовали комплекс водорастворимых антигенов чумного микроба (ВрАг), приготовленный по методике Е. Н. Афанасьева [10]. В контрольной пробе с целью выявления возможной спонтанной активации лимфоцитов клетки обрабатывали стерильным 0,9% изотоническим раствором натрия хлорида.

Учет результатов производили с помощью проточного цитометра FACS Calibur с программным обеспечением CellQuestPro (Becton Dickinson, США).

Для выявления связи протективного иммунитета против чумы с уровнем интенсивности экспрессии маркеров активации на 21 сутки после иммунизации животных из всех групп (по 6 особей из каждой группы) заражали подкожно вирулентным штаммом *Y. pestis* 231 в дозе 200 ДЦЛ. Через 21 сутки после заражения рассчитывали $ЕД_{50}$ по формуле

G. Kärber (в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева):

$$\lg ЕД_{50} = \lg Д_n - S(\Sigma L_i - 0,5), \text{ где}$$

S – логарифм кратности разведений;
$\lg Д_n$ – логарифм максимальной иммунизирующей (фактической) дозы;
L_i – отношение числа животных, выживших при иммунизации данной дозой к общему числу, которым эта доза была введена;
индекс i – соответствует номеру дозы, если считать наименьшую из испытанных доз первой;
ΣL_i – сумма значений, найденных для всех испытанных доз.

Ранговый коэффициент корреляции Спирмена подсчитывали по формуле:

$$p = 1 - \frac{6 \times \sum d^2}{n(n^2 - 1)},$$

где $\sum d^2$ – сумма квадратов разностей рангов, а n – число парных наблюдений.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием стандартных статистических программ, определяли среднее значение анализируемого показателя (M), ошибку средней арифметической (m). Достоверность уровня различий сравниваемых величин оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

У интактных животных количество лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации при воздействии ВрАг, составило 4,33 ± 0,51%, при воздействии 0,9% раствором натрия хлорида – 3,82 ± 0,38%.

Во все периоды обследования животных спонтанной активации лимфоцитов не зафиксировано.

На 7, 14 и 21 сутки у животных, иммунизированных вакциной против чумы дозой 8×10^2 ж.м.к., содержание лимфоцитов, экспрессирующих рецептор CD25 после стимуляции клеток комплексом водорастворимых антигенов оставалось на уровне контрольных значений.

У мышей, иммунизированных дозой 4×10^3 ж.м.к., на 14 сутки содержание лимфоцитов, экспрессирующих маркер ранней активации, после стимуляции антигеном повышалось и составляло 33,53 ± 4,88%. Количество антигенстимулированных клеток у животных, иммунизированных дозой 2×10^4 ж.м.к., на 14 сутки достигало 39,28 ± 6,58%, на 21 сут. – 16,37 ± 3,35%.

При иммунизации самой высокой дозой 1×10^5 ж.м.к., увеличение лимфоцитов, экспрессирующих рецептор CD25 в условиях

Рисунок 1.
Динамика количества специфически активированных лимфоцитов (CD25-позитивных) в крови у животных из групп сравнения
Figure 1. Dynamics of the number of specifically activated lymphocytes (CD25-positive) in the blood of animals from the comparison groups

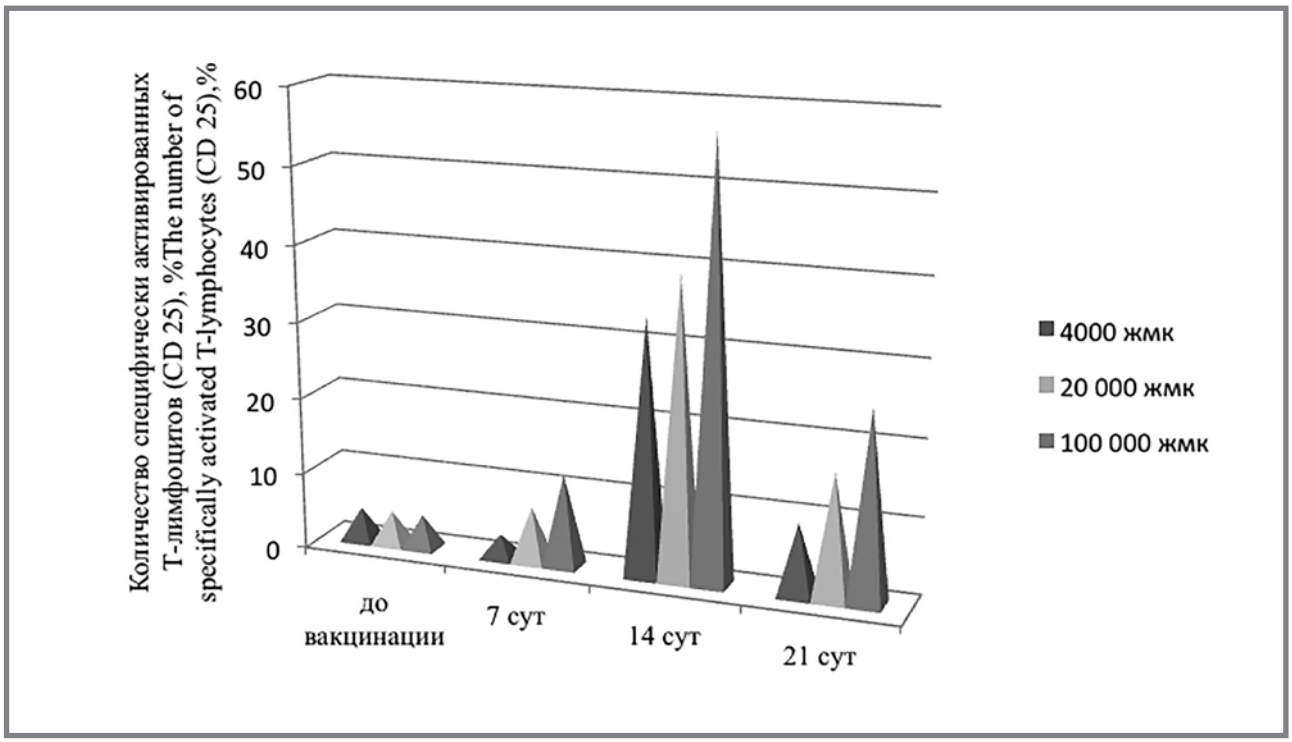

Таблица 1.
Сравнительная оценка показателей иммуногенности вакцины чумной живой
Table 1. Comparative evaluation of the immunogenicity of the plague vaccine alive

Доза иммунизации, ж.м.к. Dose of immunization, g.m.k.	Лимфоциты экспрессирующие CD25, % Lymphocytes expressing CD25, %				Определение иммуногенности вакцины чумной живой с использованием биопробы Determination of the immunogenicity of the plague vaccine live using a bioassay		
	до вакцинации before vaccination	ч/з 7 сут после вакцинации 7 days after vaccination	ч/з 14 сут после вакцинации 14 days after vaccination	ч/з 21 сут после вакцинации 21 days after vaccination	количество животных в опыте number of animals in the experiment	количество выживших животных number of surviving animals	$ЕД_{50}$, ж.м.к. g.m.k.
800	4,33±0,48	3,58±0,22	4,29±0,47	3,91±0,64	6	0	13420
4 000		3,04±0,75	33,54±4,46	9,40±1,89	6	1	
20 000		7,15±0,85	39,28±6,01	16,36±3,00	6	3	
100 000		12,09±1,10	56,81±5,33	24,91±2,04	6	6	

стимуляции ВрАг, отмечалось на 7, 14 и 21 сутки до 12,09 ± 1,20%; 56,88 ± 5,84% и 24,91 ± 2,23%, что статистически выше контрольных значений.

Анализ результатов исследования показал, что у животных, вакцинированных дозами 4×10^3, 2×10^4 и 1×10^5 ж.м.к., наивысший уровень экспрессии лимфоцитами маркера активации при антигенной стимуляции *in vitro* регистрировался на 14 сутки после иммунизации (рис. 1).

Для определения возможности применения ранее описанной методики в качестве контроля протективного действия вакцины против чумы проводили сравнительное изучение уровня интенсивности экспрессии маркера ранней активации и наличия поствакцинального иммунитета, определяемого по показателю $ЕД_{50}$. Для подтверждения напряженности иммунитета на 21 сутки после иммунизации (срок формирования поствакцинального иммунитета против чумы) по 6 животных каждой группы заражали подкожно 200 ДЦЛ вирулентного штамма *Yersinia pestis* 231. $ЕД_{50}$ рассчитывали через 21 сутки после заражения по приведенной выше формуле.

Количество выживших в опыте животных сравнивали с повышением уровня лимфоцитов, экспрессирующих антигенспецифические рецепторы CD25, рассчитывая коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Установлена очень высокая степень прямой связи (коэффициент корреляции r = 1,000) количества выживших животных с увеличением уровня лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации. Полученные данные по количеству выживших животных в каждой группе вакцинированных коррелируют с изменением количества CD25-лимфоцитов (табл. 1).

Анализ результатов проведенных исследований показал, что при воздействии *in vitro* комплекса антигенов чумного микроба (ВрАг) на лимфоциты иммунизированных против чумы биомоделей, наблюдается статистически значимое ($p > 0,05$) усиление экспрессии маркера ранней активации – CD25. Экспериментально установлено, что интенсивность антигенреактивности лимфоцитов четко коррелирует с иммунизирующей дозой. При увеличении концентрации живых микробных клеток *Y. pestis* EV во вводимой животным вакцине в крови у биомоделей отмечается пропорциональное повышение количества CD25- лимфоцитов после симуляции ВрАг в условиях *in vitro*.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования продемонстрировали возможность и перспективу применения антиген-специфического клеточного теста *in vitro* с детекцией CD25 на активированных лимфоцитах для оценки степени формирования иммунного ответа при вакцинации против чумы.

Предложенный новый подход для оценки специфической активности противочумной вакцины имеет ряд преимуществ:

- не требует проведения исследований с заражением экспериментальных (вакцинированных) животных высоковирулентным штаммом возбудителя чумы;
- может быть выполнен в сжатые сроки (24 ч);
- дает возможность количественно оценить активность специфического клеточного иммунитета, как ведущего звена иммунной защиты против чумы.

В перспективе предложенный подход можно использовать в качестве дополнительного контрольного теста при изучении степени иммуногенности новых (кандидатных) вакцин против чумы в сравнении с зарегистрированными препаратами и для специалистов, проводящих исследования в области

определения иммуногенности вакцин с использованием антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* и проточно-цитометрического анализа.

Литература

1. *Фармакопейная статья предприятия ФСП 42-8654-07 ЛСР-005759/08-220708 «Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций». Ставрополь; 2007.*
2. *Апарин Г.П., Вершинина Т.И. Методические рекомендации по определению степени иммуногенности авирулентных штаммов чумного микроба для белых мышей. Иркутск; 1984.*
3. *Костюченко М.В., Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л. и др. Перспектива оценки антигенреактивности лимфоцитов in vitro для диагностики острого бруцеллеза // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 1. С. 91–96.*
4. *Рыжикова С.Л., Дружинина Ю.Г., Рябичева Т.Г. и др. Продукция цитокинов клетками крови как показатель напряженности поствакцинального клеточного иммунитета // Цитокины и воспаление. 2009. Т. 8, № 1. С. 57–61.*
5. *Саркисян Н.С., Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В., и др. Интенсивность специфической сенсибилизации и иммунный статус у больных бруцеллезом // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 4. С. 365–372.*
6. *Щуковская Т.Н., Фирстова В.В., Кравцов А.Л. и др. Оценка приобретенного иммунитета против сибирской язвы по степени повреждения лейкоцитов крови in vitro антраксином // Проблемы особо опасных инфекций. 2007. № 93. С. 81–84.*
7. *Куличенко А.Н., Абзаева Н.В., Гостищева С.Е. и др. Использование антигенспецифических клеточных тестов in vitro для оценки формирования поствакцинального противочумного иммунитета // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 2. С. 203–208.*
8. *Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self // J Nat Immunol. 2005. Vol. 6, N 4. P. 345–352.*
9. *Firstova V.V., Mokrievich A.N., Pavlov V.M., et al. Immunological Markers that Correlate with Protection Immunity Against Tularemia Infection // Advances in Experimental Medicine and Biology. 2014. N 808. P. 15–23.*
10. *Афанасьев Е.Н., Таран И.Ф., Тюменцева И.С. Антигенная структура бруцелл. Сообщ. I. Сравнительная оценка методов выделения водорастворимых антигенов бруцелл. Ставрополь; 1986.*

References

1. *Pharmacopoeial article of the enterprise FSP 42-8654-07 LSR-005759/08-220708 Vaccine plague alive, lyophilizate for the preparation of suspension for injections, cutaneous scarification and inhalation; 2007. (In Russ.)*
2. *Aparin GP, Vershinina TI. Methodological recommendations for determining the degree of immunogenicity of avirulent strains of plague microbe for white mice. Irkutsk; 1984. (In Russ.)*
3. *Kostyuchenko MV, Ponomarenko DG, Rakitina EL, et al. The prospect of evaluating the antigen reactivity of lymphocytes in vitro for the diagnosis of acute brucellosis. Infekciya i immunitet [Infection and immunity]. 2017;7(1):91–96. (In Russ.)*
4. *Ryzhikova SL, Druzhinina YuG, Ryabicheva TG, et al. Production of cytokines by blood cells as an indicator of the intensity of postvaccinal cellular immunity. Citokiny i vospalenie [Cytokines and inflammation]. 2009;8(1):57–61. (In Russ.)*
5. *Sarkisyan NS, Ponomarenko DG, Logvinenko OV, et al. Intensity of specific sensitization and immune status in patients with brucellosis. Medicinskaya immunologiya [Medical immunology]. 2016;18(4):365–372. (In Russ.)*
6. *Shchukovskaya TN, Firstova VV, Kravtsov AL. Evaluation of acquired immunity against anthrax in terms of the degree of damage of blood leukocytes in vitro with anthraxin. Problemy osobo opasnyh infekcij [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2007;93:81–84. (In Russ.)*
7. *Kulichenko AN, Abzaeva NV, Gostishcheva SE, et al. Use of antigen-specific cell tests in vitro to assess the formation of post-vaccinal antiplague immunity. Infekciya i immunitet [Infection and immunity]. 2017;7(2):203–208. (In Russ.)*
8. *Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. J Nat Immunol. 2005; 6(4):345–352. doi: 10.1038/ni1178*
9. *Firstova VV, Mokrievich AN, Pavlov VM, et al. Immunological Markers that Correlate with Protection Immunity Against Tularemia Infection. Advances in Experimental Medicine and Biology. 2014;808:15–23. doi: 10.1007/978-81-322-1774-9_2.*
10. *Afanasiev EN, Taran IF, Tyumentseva IS. Antigenic structure of Brucella. Messaging. I. Comparative evaluation of methods for the isolation of water-soluble antigens brutsell. Stavropol; 1986. (In Russ.)*

Об авторах

- **Светлана Евгеньевна Гостищева** – биолог Научно-производственной лаборатории чумных вакцин Ставропольского противочумного института, 355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13–15. chumnpl@yandex.ru или stavnipchi@mail.ru. Тел./факс: +7 (865-2) 26-20-50.+7 906-472-08-28
- **Наталья Вячеславовна Абзаева** – к. б. н., заведующая Научно-производственной лаборатории чумных вакцин Ставропольского противочумного института, тел.: +7 909-750-92-38
- **Екатерина Львовна Ракитина** – к. м. н., врач клинической лабораторной диагностики сектора ИиПООИз лаборатории бруцеллеза Ставропольского противочумного института
- **Дмитрий Григорьевич Пономаренко** – к. б. н., заведующий лабораторией бруцеллеза Ставропольского противочумного института
- **Марина Владимировна Костюченко** – биолог лаборатории бруцеллеза Ставропольского противочумного института
- **Ольга Васильевна Логвиненко** – к. б. н., заведующий сектором лаборатории бруцеллеза Ставропольского противочумного института
- **Александр Николаевич Куличенко** – член-корр. РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор института Ставропольского противочумного института. 355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13–15. chumnpl@yandex.ru или stavnipchi@mail.ru. Тел./факс: +7 (865-2) 26-20-50.

Поступила: 7.09.2018. **Принята к печати:** 15.01.2019.

About the Authors

- **Svetlana E. Gostischeva** – biologist of scientific and production laboratory of plague vaccines of Stavropol Plague Control Research Institute. 355035, Russian Federation, Stavropol, St. Soviet, 13–15. +7 (865-2) 26-20-50. chumnpl@yandex.ru, stavnipchi@mail.ru
- **Natalia V. Abzaeva** – Cand. Sci. (Biol.), head of the production laboratory of plague vaccine research and production of Stavropol Plague Control Research Institute.
- **Ekaterina L. Rakitina** – Cand. Sci. (Med.), doctor of clinical laboratory diagnostics, sector IiPOOIz laboratory brucellosis of Stavropol Plague Control Research Institute.
- **Dmitry G. Ponomarenko** of Cand. Sci. (Biol.) – head of the laboratory of brucellosis of Stavropol Plague Control Research Institute.
- **Marina V. Kostuchenko** – biologist of laboratory brucellosis of Stavropol Plague Control Research Institute.
- **Olga V. Logvinenko** – Cand. Sci. (Biol.), head of sector of laboratory brucellosis laboratory of Stavropol Plague Control Research Institute.
- **Alexander N. Kulichenko** – Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Med.), Professor, Director of the Institute of Stavropol Plague Control Research Institute. 355035, Russian Federation, Stavropol, St. Soviet, 13–15. +7 (865-2) 26-20-50, chumnpl@yandex.ru, stavnipchi@mail.ru

Received: 7.09.2018. **Accepted:** 15.01.2019.