

DOI: 10.21055/0370-1069-2018-4-69-74

УДК 616.98:579.841.95

В.Ю. Охупкина, Н.В. Пяткова, Г.В. Барамзина, О.О. Фоменков, А.К. Федотов

**ОПЫТ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ***Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Киров, Российская Федерация*

Поддержание микроорганизмов в жизнеспособном состоянии при сохранении исходных практически важных свойств является важнейшей проблемой микробиологии. **Целью** настоящих исследований стало изучение сохранности основных биологических свойств лиофилизированных культур 18 штаммов разных подвидов возбудителя туляремии из коллекции микробных культур филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров) с различными условиями предварительной подготовки (с анимализацией через организм морских свинок и без нее). Сроки хранения микробов при отрицательных температурах составили от 5 до 50 лет. **Материалы и методы.** В соответствии с общепринятыми методиками определялась выживаемость микробов в процессе высушивания и последующего хранения, оценивались и сравнивались с паспортными данными морфологические, культуральные, биохимические, антигенные, патогенные свойства культур штаммов *F. tularensis* с различными сроками хранения и условиями подготовки к лиофилизации. **Результаты и обсуждение.** Проведенные исследования показали, что, при условии предварительной стабилизации свойств штаммов возбудителя туляремии методом анимализации, хранение в лиофилизированном состоянии при отрицательных температурах под вакуумом продолжительностью до 50 лет практически в полной мере предохраняет их от изменения фенотипических свойств. В то же время после лиофилизации многократно субкультивированных на плотных питательных средах культур без признаков исходного нарушения свойств обнаруживались явления диссоциации, снижение титров культур в реакции агглютинации от 2 до 4 раз, повышение на порядок величин показателя ЛД<sub>50</sub>.

**Ключевые слова:** штамм *F. tularensis*, анимализация, лиофилизация, культурально-морфологические, биохимические, антигенные, патогенные свойства, диссоциация.

*Корреспондирующий автор:* Охупкина Вероника Юрьевна, e-mail: 23527@mail.ru.

*Для цитирования:* Охупкина В.Ю., Пяткова Н.В., Барамзина Г.В., Фоменков О.О., Федотов А.К. Опыт длительного хранения штаммов возбудителя туляремии. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2018; 4:69–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-4-69-74

V.Yu. Okhapkina, N.V. Pyatkova, G.V. Baramzina, O.O. Fomenkov, A.K. Fedotov

**Long-Term Storage of Tularemia Agent Strains***Affiliated Branch of the «48<sup>th</sup> Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov, Russian Federation*

**Abstract.** Keeping microorganisms alive, saving initial practically vital properties, is a major issue in microbiology. **Objective** of this research was to study preservation of the key biological properties of lyophilized cultures of 18 *F. tularensis* strains of different subspecies from the cultures collection of the «48 Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation under varying conditions of preliminary preparation (including animalization through the guinea pigs' body or without it). The microbe storage life at below-freezing temperatures ranged from 5 to 50 years. **Materials and methods.** The survival of microbes in the process of drying and subsequent storage was determined in accordance with the commonly-accepted methods; morphological, cultural, biochemical, antigenic, and pathogenic properties of *F. tularensis* strain cultures with different storage term and conditions for preparation to lyophilization were assessed and compared with datasheet specification. **The results and conclusions.** The research showed that under preliminary stabilization of *F. tularensis* strain properties using animalization, the storage in lyophilized state at below-freezing temperatures under vacuum for up to 50 years or less protected them from changes in phenotypic properties. At the same time, after lyophilization of cultures, which were repeatedly sub-cultured on dense nutrient media without initial signs of properties' breach, phenomena of dissociation, the decrease in titers of cultures in the agglutination reaction from 2 to 4 times, and an increase in LD50 index by times were found.

**Keywords:** *F. tularensis* strain, animalization, freeze-drying, cultural-morphological, biochemical, antigenic, pathogenic properties, dissociation.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

*Corresponding author:* Veronika Yu. Okhapkina, e-mail: 23527@mail.ru.

*Citation:* Okhapkina V.Yu., Pyatkova N.V., Baramzina G.V., Fomenkov O.O., Fedotov A.K. Long-Term Storage of Tularemia Agent Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2018; 4:69–74. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2018-4-69-74

*Received* 01.06.18. *Revised* 14.06.18. *Accepted* 29.11.18.

Туляремия представляет собой типичное природно-очаговое зоонозное заболевание, распространенное в большинстве регионов мира. Существующая эпидемическая опасность возбудителя туля-

ремии обусловлена высокой восприимчивостью человека к заражению данным микроорганизмом, множественностью путей передачи инфекции в естественных условиях, устойчивостью и активностью

природных очагов, расширением ареала обитания подвидов *Francisella tularensis* [1–4]. В связи с этим интерес к проведению исследований с данным патогеном не ослабевает.

Поддержание микроорганизмов в жизнеспособном состоянии при сохранении исходных практически важных свойств является важнейшей проблемой микробиологии. Одним из основных способов хранения микробных культур в течение продолжительного периода времени, обеспечивающим минимизацию количества генераций штаммов, является лиофилизация, которая позволяет получать большое количество удобных для хранения и транспортировки аликвот микробной культуры (герметизированных ампул) с одинаковыми свойствами [5]. Многие микроорганизмы, в том числе и возбудитель туляремии, могут сохраняться подобным образом достаточно долго [6–8].

Следует отметить, что, по сравнению с другими методами хранения (например, низкотемпературная консервация), сублимационное высушивание характеризуется несколько большим повреждающим действием на микробную клетку [9]. При этом качество получаемых лиофилизированных культур определяется не только техническими характеристиками оборудования и тщательным соблюдением параметров технологического процесса. Огромное значение также имеет методология подготовки микробных культур к лиофилизации и закладке на хранение. Реализация способа хранения культур штаммов патогенных микроорганизмов в лиофилизированном состоянии представляет собой сложный комплекс мероприятий, предполагающий использование для каждого конкретного возбудителя эффективных схем восстановления и стабилизации исходных свойств; сбалансированных питательных сред, обеспечивающих достаточный уровень накопления микробной массы при сохранении стабильности основных биологических свойств микробов; оптимальных по составу защитных сред, условий подготовки и режимов хранения микробных культур.

В процессе лабораторной работы с микробными культурами отмечается вполне закономерное развитие различных по степени выраженности изменений биологических свойств возбудителя. Для восстановления свойств коллекционных культур патогенных микроорганизмов в процессе подготовки к лиофилизации наилучшим образом зарекомендовали себя пассажи через организм восприимчивого животного, обеспечивающие достаточный для практической деятельности уровень однородности микробной популяции. Этот методический подход впервые применен еще в 80-е годы XIX века Л.С. Ценковским, он же ввел для его обозначения понятие «анимализация» [10]. Активное изучение методологии анимализации осуществлялось специалистами нашего института еще в 40–50-е годы прошлого века, в этот же период разработаны различные ее варианты в зависимости от биологиче-

ских особенностей штаммов возбудителя, которые применяются до настоящего времени [11, 12].

### Материалы и методы

В исследованиях использовали 18 штаммов разных подвидов возбудителя туляремии из коллекции микробных культур Филиала Федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров) с различными условиями предварительной подготовки (с анимализацией через организм морских свинок и без нее).

Для стабилизации агаровых культур штаммов использовалась разработанная М.М. Файбичем сахарозо-желатиновая лиопротекторная среда [12]. Высушивание проводили в ампулах лабораторного изготовления в объеме 0,5 мл на коллекторной сушильной установке системы К.Е. Долинова

Штаммы хранились в лиофильно высушенном состоянии в ампулах при температуре  $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$  ниже нуля под вакуумом в течение продолжительного времени (от 5 до 50 лет).

Комплексную оценку основных биологических свойств указанных штаммов проводили в соответствии с общепринятыми методиками, изложенными в «Практическом руководстве...» [13]. Для выращивания культур франциселл использовали коммерческую сухую среду FT-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск). Для определения ферментативной активности культур применяли коммерческие среды Гисса (ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск) с добавлением пептона и цистеина в концентрациях 10,0 и 0,5 г/л соответственно. Антигенные свойства оценивали по величине титра культуры в развернутой реакции агглютинации с сывороткой туляремийной диагностической гипериммунной лабораторного изготовления. Наличие признаков диссоциации изучали при постановке агглютинационной пробы с 0,002 % раствором трипафлавина. При оценке биохимических свойств использовали сертифицированные реактивы в пределах срока годности. Вирулентные свойства микробных культур оценивали при подкожном заражении белых аутбредных мышей обоего пола массой  $(20 \pm 2)$  г по величине показателя ЛД<sub>50</sub>. При работе с животными следовали Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123, г. Страсбург, 18.03.1986 г.), Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях (Официальный журнал Европейского Союза, 22.09.2010 г.).

Перед проведением исследований лиофилизированную культуру каждого штамма в количестве трех ампул ресуспендировали в физиологическом растворе хлористого натрия с добавлением 10 % сы-

воротки крупного рогатого скота для микробиологических целей. В полученных суспензиях определяли содержание живых микробов и рассчитывали их выживаемость после хранения. Затем их высевали на FT-агар в пробирках (для накопления биомассы) и чашках (для получения изолированных колоний) и выращивали при температуре (37±1) °С в течение 48–72 ч. Для дальнейшего изучения использовали культуры первой генерации со среды в пробирках.

Все полученные результаты сравнивали с исходными паспортными данными изучаемых штаммов, а также характеристиками эталонных культур на момент их приготовления.

### Результаты и обсуждение

В табл. 1 и 2 представлены результаты изучения сохранности свойств микробов в длительно хранившихся лиофилизированных эталонных культурах штаммов возбудителя туляремии, которые перед высушиванием предварительно стабилизировали методом анимализации.

Все изученные штаммы сохранили жизнеспособность, при этом уровень выживаемости зависел не столько от сроков хранения, сколько определялся особенностями самих штаммов. Оценка культурально-морфологических свойств показала,

что на FT-агаре в чашках все штаммы формировали гладкие блестящие полусферические с медовым оттенком колонии в S-форме диаметром 1,0–1,5 мм. Колонии культур штаммов, относящихся к подвиду *F. tularensis* subsp. *novicida*, отличались более крупными размерами и морфологически представляли собой R-форму. В мазках, окрашенных по Граму, культуры всех штаммов *F. tularensis* представляли собой мелкие грамотрицательные коккобактерии. Наличие признаков диссоциации в культурах штаммов при постановке триафлавиновой пробы не выявлено, за исключением изолятов подвида *F. tularensis* subsp. *novicida*.

При характеристике биохимических свойств культур штаммов *F. tularensis* обнаружено, что по способности ферментировать глюкозу, лактозу, сахарозу и глицерин, наличию фосфатазной и цитруллинуреидазной активности, продукции сероводорода все они имели типичные для своих подвигов свойства. Отмечалось лишь небольшое снижение интенсивности реакций разложения, выявляемых по степени окрашивания субстратов.

При изучении антигенных свойств культур установлено, что все они агглютинировались специфической диагностической гипериммунной сывороткой до титра 1:1600 – 1:3200, что практически соответствовало данным паспортизации эталонных культур

Таблица 1/Table 1

Характеристика основных биологических свойств эталонных культур штаммов *F. tularensis* subsp. *tularensis* и *F. tularensis* subsp. *novicida* после длительного хранения в лиофилизированном состоянии

Characteristics of key biological properties of reference *F. tularensis* subsp. *tularensis* and *F. tularensis* subsp. *novicida* strain cultures after long-term storage in lyophilized state

Показатель (свойство)	Величина показателя (описание свойства) для эталонной культуры подвида ... штамма ...								
	<i>tularensis</i>						<i>novicida</i>		
	Nevada 14	BH 8859	7000	B-251-K	SchuSD	B 399	402	403	
Срок хранения, лет	39	40	39	39	23	35	45	45	
Выживаемость микробов ..., процент, X <sub>cp</sub> ±I <sub>95</sub>	после высушивания	35,2±6,5	26,6±5,3	30,3±6,9	27,9±5,3	29,4±6,8	31,0±7,5	18,5±3,7	21,0±3,0
	после хранения	31,9±3,9	4,5±2,0	14,6±3,8	12,2±2,9	19,7±4,7	10,2±1,8	4,3±1,6	3,7±1,0
Титр в реакции агглютинации со специфической сывороткой	1:3200	1:1600	1:3200	1:3200	1:1600	1:1600	1:400	1:400	
Способность разлагать углеводы:	глюкозу	+	+	+	+	+	+	+	+
	мальтозу	+	+	+	+	+	+	-	-
	сахарозу	-	-	-	-	-	-	-	+
	лактозу	-	-	-	-	-	-	-	-
	глицерин	+	+	+	+	+	+	-	-
Образование сероводорода на среде с цистеином	+	+	+	+	+	+	+	+	
Фосфатазная активность	+	+	+	+	+	+	+	+	
Цитруллинуреидазная активность	+	+	+	+	+	+	+	+	
Вирулентность для белых мышей при подкожном заражении, живые микробы	1	2	1	1	1	1	725	913	

Примечание: «+» – наличие свойства; «-» – отсутствие свойства

Таблица 2/Table 2

Характеристика основных биологических свойств эталонных культур штаммов *F. tularensis* subsp. *holarctica* и *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* после длительного хранения в лиофилизированном состоянииCharacteristics of key biological properties of reference *F. tularensis* subsp. *holarctica* and *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* strain cultures after long-term storage in lyophilized state

Показатель (свойство)	Величина показателя (описание свойства) для эталонной культуры подвида ... штамма ...									
	<i>holarctica</i>								<i>holarctica</i> <i>var. japonica</i>	<i>mediasiatica</i>
	Ond.4 №16	19	32	7	134	141	503	15 НИИЭГ	Kosho	543
Срок хранения, лет	34	34	26	50	50	25	13	15	23	13
Выживаемость микробов ..., процент, $X_{cp} \pm I_{95}$										
	после высушивания	27,8±4,2	35,0±7,0	38,4±6,9	26,4±5,7	26,0±4,6	25,5±3,8	42,5±9,1	52,9±8,8	23,9±6,6
после хранения	9,3±1,3	11,5±2,8	12,0±3,1	17,7±2,9	12,2±2,4	13,0±4,0	18,3±3,7	24,8±4,5	11,0±3,0	15,3±4,3
Титр в реакции агглютинации со специфической сывороткой	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600	1:3200	1:3200	1:3200	1:3200	1:3200	1:3200
Способность разлагать углеводы:										
	глюкозу	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	мальтозу	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	сахарозу	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	лактозу	-	-	-	-	-	-	-	-	-
глицерин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Образование сероводорода на среде с цистенином	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Фосфатазная активность	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Цитруллинуреидазная активность	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Вирулентность для белых мышей при подкожном заражении, живые микробы	1	1	1	4	3	4	1	251	1	1

Примечание: «+» – наличие свойства; «-» – отсутствие свойства.

на момент их приготовления. Лишь у двух изолятов ВН 8859 и SchuSD *F. tularensis* subsp. *tularensis* титры в реакции агглютинации снизились в 2 раза. Для изолятов подвида *F. tularensis* subsp. *novicida* данный показатель был закономерно ниже, но при этом не отличался от исходных величин. Патогенные свойства культур всех изученных штаммов сохранились практически на исходном уровне.

В табл. 3 представлены результаты аналогичных исследований с имеющимися в распоряжении лиофилизированными культурами штаммов В 399, SchuSD *F. tularensis* subsp. *tularensis* и 503, 15 НИИЭГ *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Культуры подверглись десятикратным пересевам на искусственных питательных средах, не имели исходных признаков нарушения стабильности свойств и были высушены без предварительной подготовки (проведения анимализации). Несмотря на то, что сроки хранения указанных культур составили всего лишь от 5 до 7 лет и они характеризовались достаточно высокими уровнями выживаемости микробов, от-

мечается значительное нарушение стабильности их свойств. Обнаруживаются признаки диссоциации при постановке трипафлавиновой пробы, от 2 до 4 раз снизились титры культур в реакции агглютинации, на порядок увеличились величины показателя ЛД<sub>50</sub>.

Таким образом, проведенные исследования показали важную роль и необходимость использования анимализации для стабилизации свойств культур возбудителя туляремии при подготовке к сублимационному высушиванию и дальнейшему хранению. Изучение анимализированных культур штаммов разных подвигов данного возбудителя, хранившихся в лиофилизированном состоянии в течение длительного периода времени (до 50 лет), позволяет сделать заключение о сохранности их культурально-морфологических, биохимических, антигенных и патогенных свойств.

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



Таблица 3/Table 3

**Характеристика основных биологических свойств культур штаммов *F. tularensis* subsp. *tularensis* и *F. tularensis* subsp. *holarctica* после хранения в лиофилизированном состоянии без предварительной анимализации**  
**Characteristics of key biological properties of reference *F. tularensis* subsp. *tularensis* and *F. tularensis* subsp. *holarctica* strain cultures after storage in lyophilized state without preliminary animalization**

Показатель (свойство)	Величина показателя (описание свойства) для культуры подвида... штамма ...			
	<i>holarctica</i>		<i>tularensis</i>	
	503	15 НИИЭГ	SchuSD	B 399A-Cole
Срок хранения, лет	5	7	5	5
Выживаемость микробов ..., процент, X±I <sub>95</sub>				
после высушивания	38,5	57,9	29,2	37,0
после хранения	27,9	42,2	20,3	27,2
Характер роста на плотной питательной среде в чашках через 72 ч инкубации	Колонии в S-форме диаметром 1,0 мм	Колонии в S-форме диаметром 1,0 мм	Колонии в S-форме диаметром 1,0 мм	Колонии в S-форме диаметром 1,0 мм
Реакция с раствором трипафлавина	Слабо положительная	Отрицательная	Отрицательная	Слабо положительная
Титр в реакции агглютинации со специфической сывороткой	1:800	1:800	1:800	1:800
Способность разлагать углеводы:				
глюкозу	+	+	+	+
мальтозу	+	+	+	+
сахарозу	-	-	-	-
лактозу	-	-	-	-
глицерин	-	-	+	+
Образование сероводорода на среде с цистеином	+	+	+	+
Фосфатазная активность	-	-	+	+
Цитруллинуреидазная активность	-	-	+	+
Вирулентность для белых мышей при подкожном заражении, живые микробы	23	2400	19	31

Примечание: «+» – наличие свойства; «-» – отсутствие свойства

**Список литературы**

1. Кудрявцева Т.Ю., Транквилевский Д.В., Мокриевич А.Н., Попов В.П., Морозова Н.С., Зароченцев М.В., Мазела А.В., Окунев Л.П., Холин А.В., Косилко С.А., Федоров Ю.М., Храмов М.В., Дятлов И.А. Эпизоотическая и эпидемиологическая ситуация по туляремии в Российской Федерации в 2015 г. и прогноз на 2016 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 1:28–32. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-28-32.

2. Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С., Кудрявцева Т.Ю., Уланова Г.И., Карбышева С.Б., Миронова Р.И., Вахрамеева Г.М., Губарева Т.И., Павлов В.М., Дятлов И.А. Выделение среднеазиатского подвида туляреминого микроба на территории Алтайского края. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 1:66–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-66-69.

3. Whipp M.J., Davis J.M., Lum G., de Boer J., Zhou Y., Bearden S.W., Petersen J.M., Chu M.C., Hogg G. Characterization of a *novicida*-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. *J. Med. Microbiol.* 2003; 52:839–42. DOI: 10.1099/jmm.0.05245-0.

4. WHO Guidelines on Tularemia. Epidemic and Pandemic Alert and Response; 2007. 115 p.

5. Guidance for the operation of biological research centres (BRCs) Part 2. Microorganisms 2007. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.oecd.org/sti/biotech/38777417> (дата обращения 05.11.2015 г.).

6. Куллетская М.Б., Нетрусов А.И. Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов после 50 лет хранения. *Микробиология*. 2011; 80(6):842–6.

7. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Детушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития. *Известия ВУЗов*. 2009; 4:99–121.

8. Соловьев В.А., Саяпина Л.В., Осина Н.А., Давыдов Д.С., Бондарев В.П. Характеристика фенотипических и генетических свойств вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15НИИЭГ с длительными сроками хранения. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 4:91–95. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-91-95.

9. Грачева И.В., Осин А.В. Механизмы повреждений бак-

терий при лиофилизации и протективное действие защитных сред. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 3:5–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-5-12.

10. Метелкин А.И. Л.С. Ценковский – основоположник отечественной школы микробиологов, 1822–1897. М.: Медгиз; 1950. С. 227–56.

11. Салтыков Р.А., Моторная В.П., Сиротюк Л.В. Опыт 25-летнего изучения стабильности свойств туляреминых вакцинных штаммов. *Микробиология*. 1972; 12:64–70.

12. Файбич М.М. Стабилизация вакцинных препаратов в процессе высушивания и хранения. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1968; 2:59–66.

13. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных и инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.

**References**

1. Kudryavtseva T.Yu., Trankvilevsky D.V., Mokrievich A.N., Popov V.P., Morozova N.S., Zarochentsev M.V., Mazepa A.V., Okunev L.P., Kholin A.V., Kosilko S.A., Fedorov Yu.M., Khramov M.V., Dyatlov I.A. [Epizootic and Epidemic Situation on Tularemia in the Russian Federation in 2015 and Prognosis for 2016]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 1:28–32. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-28-32.

2. Mokrievich A.N., Timofeev V.S., Kudryavtseva T.Yu., Ulanova G.I., Karbysheva S.B., Mironova R.I., Vakhrameeva G.M., Gubareva T.I., Pavlov V.M., Dyatlov I.A. [Isolation of Central Asian Subspecies of Tularemia Agent in the Altai Territory]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; 1:66–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-66-69.

3. Whipp M.J., Davis J.M., Lum G., de Boer J., Zhou Y., Bearden S.W., Petersen J.M., Chu M.C., Hogg G. Characterization of a *novicida*-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. *J. Med. Microbiol.* 2003; 52:839–42. DOI: 10.1099/jmm.0.05245-0.

4. WHO Guidelines on Tularemia. Epidemic and Pandemic Alert and Response; 2007. 115 p.
5. Guidance for the operation of biological research centres (BRCs) Part 2. Microorganismsdomen 2007. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.oecd.org/sti/biotech/38777417> (дата обращения 05.11.2015 г.).
6. Kupletskaya M.B., Netrusov A.I. [Livability of lyophilized microorganisms after 50 years of storage]. *Mikrobiologiya*. 2011; 80(6):842–6.
7. Pokhilenko V.D., Baranov A.M., Detushev K.V. [Long-term storage methods for collection cultures of microorganisms and development trends]. *Izvestiya VUZov*. 2009; 4:99–121.
8. Solov'ev E.A., Sayapina L.V., Osina N.A., Davydov D.S., Bondarev V.P. [Characteristics of Phenotypic and Genetic Properties of Francisella tularensis 15 NIEG Vaccine Strain with an Extended Storage Period]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; 4:91–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-91-95.
9. Gracheva I.V., Osin A.V. [Mechanisms of Damaging Bacteria during Lyophilization and Protective Activity of Shielding Media]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 3:5–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-5-12.
10. Metelkin A.I. [Tsenkovsky L.S. – the Founder of the National Microbiologists School, 1822–1897]. M.: "Medgiz". 1950. P. 227–56.
11. Saltykov R.A., Motornaya V.P., Sirotiyuk L.V. [25-year studies of the stability of tularemia vaccine strains' properties]. *Mikrobiologiya*. 1972; 12:64–70.
12. Faibich M.M. [Stabilization of vaccinal preparations in the process of drying and storing]. *Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii i Immunobiologii*. 1968; 2:59–66.
13. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. M.: "Shiko" CJSC; 2013. 560 p.

**Authors:**

Okhapkina V.Yu., Pyatkova N.V., Baramzina G.V. Fomenkov O.O., Fedotov A.K. Affiliated Branch of the «48<sup>th</sup> Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Kirov, Russian Federation.

**Об авторах:**

Охалкина В.Ю., Пяткова Н.В., Барамзина Г.В., Фоменков О.О., Федотов А.К. Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации. Киров, Российская Федерация.

Поступила 01.06.18.

Отправлена на доработку 14.06.18.

Принята к публ. 29.11.18.