ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА, ОБУСЛОВЛЕННОГО FRANCISELLA TULARENSIS РАЗНЫХ ПОДВИДОВ

Бугоркова С.А., Осина Н.А.

FUNCTIONAL MORPHOLOGY OF LIVER CELLS IN A MODEL OF INFECTION CAUSED BY FRANCISELLA TULARENSIS SUBSPECIES DIFFERENT

Bugorkova S.A., Ossina N.A.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (директор – академик РАН, профессор В.В. Кутырев), г. Саратов.

Проведен сравнительный анализ морфофункциональных изменений в гепатоцитах и клетках ретикулоэндотелиальной системы печени биомодели при заражении культурами туляремийного микроба штаммов разных подвидов. Экспериментальный инфекционный процесс воспроизводили на модели лабораторных мышей. В работе использовали штаммы туляремийного микроба голарктического, неарктического и среднеазиатского подвидов. При гистологическом исследовании применяли стандартную гистологическую окраску и метод импрегнации срезов азотнокислым серебром. Выявлены изменения ряда морфометрических и морфофункциональных параметров состояния гепатоцитов, клеток ретикулоэндотелиальной системы печени биомодели, которые могут иметь решающее значение в лимитировании адаптивных и регенераторных потенций организма-«хозяина» при инокуляции туляремийного микроба штаммов разных подвидов. Совокупность полученных данных позволяет рассматривать их как основу для дальнейшего изучения пато- и морфогенеза инфекционного процесса, обусловленного туляремийными микробами разных подвидов и поиска прогностических критериев оценки тяжести течения экспериментальной туляремии.

Ключевые слова: *туляремийный микроб, клетки печени, AgNOR's*

Proveden sravnitel'nyj analiz morfofunktsional'nykh izmenenij v gepatotsitakh i kletkakh retikuloehndotelial'noj sistemy pecheni biomodeli pri zarazhenii kul'turami tulyaremijnogo mikroba shtammov raznykh podvidov. EHksperimental'nyj infektsionnyj protsess vosproizvodili na modeli laboratornykh myshej. V rabote ispol'zovali shtammy tulyaremijnogo mikroba golarkticheskogo, nearkticheskogo i sredneaziatskogo podvidov. Pri gistologicheskom issledovanii primenyali standartnuyu gistologicheskuyu okrasku i metod impregnatsii srezov azotnokislym serebrom. Vyyavleny izmeneniya ryada morfometricheskikh i morfofunktsional'nykh parametrov sostoyaniya gepatotsitov, kletok retikuloehndotelial'noj sistemy pecheni biomodeli, kotorye mogut imet' reshayushhee znachenie v limitirovanii adaptivnykh i regeneratornykh potentsij organizma-«khozyaina» pri inokulyatsii tulyaremijnogo mikroba shtammov raznykh podvidov. Sovokupnost' poluchennykh dannykh pozvolyaet rassmatrivat' ikh kak osnovu dlya dal'nejshego izucheniya pato- i morfogeneza infektsionnogo protsessa, obuslovlennogo tulyaremijnymi mikrobami raznykh podvidov i poiska prognosticheskikh kriteriev otsenki tyazhesti techeniya ehksperimental'noj tulyaremii.

Klyuchevye slova: *tulyaremijnyj mikrob, kletki pecheni, AgNOR's*

A comparative analysis of morphological and functional changes in hepatocytes and cells of the reticuloendothelial system of the liver during infection biomodel cultures tularemia microbe strains of different subspecies. Experimental infection reproduced on the model of laboratory mice. In work used tularensis strains of the Holarctic, Nearctic and Central Asian subspecies. Histological study used a standard color and histological sections impregnation method with silver nitrate. The changes in number of morphometric and morphological and functional parameters of the state of hepatocytes, cells of the reticuloendothelial system of the liver biomodel that may be crucial in limitation of adaptive and regenerative potentials organism "master" when inoculated tularemia microbe strains of different subspecies. The data obtained allows us to consider them as a basis for further study of patho- and morphogenesis of infection caused by tularemia microbes of different subspecies and search prognostic evaluation criteria of severity of experimental tularemia.

Key words: *Francisella tularensis, cells of the liver, AgNOR's*

Введение. Вид Francisella tularensis представлен четырьмя подвидами: F. tularensis subsp. tularensis (тип А), F. tularensis subsp. holarctica (тип В), F. tularensis subsp. mediaasiatica и F. tularensis subsp. Novicida. Подвиды туляремийного микроба, несмотря на сходную антигенную структуру, отличаются между собой не только по месту их выделения, привязанному к определенным регионам в мире, но и по вирулентности [1,2]. Научные результаты свидетельствуют о том, что патогенность бактерий, в том числе и F. tularensis, является биологически сложным полидетерминантным признаком, находящимся под контролем регуляторных систем как хромосомных, так и плазмидных генов, ответственных за синтез макромолекул, принимающих участие в развитии генерализованного инфекционного процесса в макроорганизме [3,4].

В реализации патогенных потенций микроба на ранних стадиях экспериментальной туляремии у мышей особое место отведено поражению печени [5], а в исследованиях российских ученых отмечается ряд особенностей присущих течению туляремии, обусловленной заражением культурами разных подвидов микроба [6].

Цель исследования - сравнительный анализ морфофункциональных изменений в гепатоцитах и клетках ретикулоэндотелиальной системы печени биомодели при заражении культурами туляремийного микроба штаммов разных подвидов.

Материал и методы исследования. Лабораторных белых мышей (30 особей) с массой тела 18-20 г подкожно заражали туляремийным микробом вирулентных штаммов разных подвидов в дозе 100 м.к.: 1-я группа - F.tularensis ssp. holarctica 503/840; 2-я группа - F.tularensis ssp. tularensis B 399 A'Cole; 3-я группа - F.tularensis ssp. mediasiatica A-179. Животным 4-ой группы вводили в дозе 1х107 м.к. культуру вакцинного штамма F.tularensis ssp. holarctica 15 НИИЭГ. Интактным животным (ИК) аналогично опытным инокулировали физиологический раствор. Работу с животными выполняли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных приказом Министерства Здравоохранения СССР от 12.08.1977 года. Наблюдение за животными осуществляли в течение 14 суток, выводя их из эксперимента посредством хлороформового наркоза по мере нарастания тяжести клинического состояния. Мышей вскрывали и регистрировали патологоанатомическую картину. Для гистологического и морфометрического исследования забирали кусочки печени в 10 % водный нейтральный раствор формалина. Дальнейшую проводку и заливку гистологического материала проводили по стандартной схеме [7]. Готовые полутонкие парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, области ядрышкового организатора (AgNOR) в гепатоцитах выявляли при окраске азотнокислым серебром по W. Howell, D. Black [8], применяя набор готовых реагентов «AgNOR» фирмы BioVitrum. Морфометрическое исследование выполняли с помощью программы «Денситоморфометрия - ДДМ» (версия 2.1.0.0 аппаратно-программного комплекса МЕКОС-Ц). Подсчет клеточных элементов, определение размера клеток и структур в органе выполняли при увеличении в 200-1000 раз в 10 полях зрения правильно ориентированных срезов или при подсчете не менее 100 клеточных элементов. Оценку активности ядрышковых организаторов проводили при увеличении в 1000 раз с масляной иммерсией, используя микроскоп «Olympus CX41». В ядрах гепатоцитов подсчитывали число ядрышек, количество афинных к серебру гранул, определяя характер их расположения. Статистическую обработку полученных результатов выполняли с помощью программы Microsoft Excel 2010 или статистическим пакетом в рамках возможностей, предусмотренных денситоморфометрической программой.

Результаты исследования и их обсуждение. При макроскопическом исследовании отмечали различной степени выраженности нарушения гемодинамики и признаки дистрофических изменений в паренхиматозных органах. В большей степени страдала печень лабораторных мышей, чаще указанные изменения регистрировали у животных 1- ой и 3-ей группы. Известно, что в основе срыва адаптации макроорганизма лежат, в том числе, и глубокие нарушения морфофункционального состояния клеток печени. При гистологическом исследовании в ответ на введение туляремийного микроба вирулентных штаммов разных подвидов, помимо специфического гранулематоза (рис. 1), был выявлен комплекс неспецифических изменений ткани печени, включающих нарушения в системе кровообращения органа, повреждение гепатоцитов и реакции со стороны клеток ретикулоэндотелиальной системы (клеток Купфера), выраженность которых, в определенной мере, была обусловлена подвидовой принадлежностью культур, используемых для заражения.

Так, заражение мышей культурой вирулентного штамма голарктического подвида F.tularensis 503/840 приводило к развитию в печени выраженной дистрофии гепатоцитов, вплоть до необратимых некротических изменений клеток, приводящих местами к нарушению нормальной архитектоники органа, и происходящих на фоне различной степени выраженности гемодинамических расстройств в системе оттока и гемоциркуляции. Изменение морфофункционального

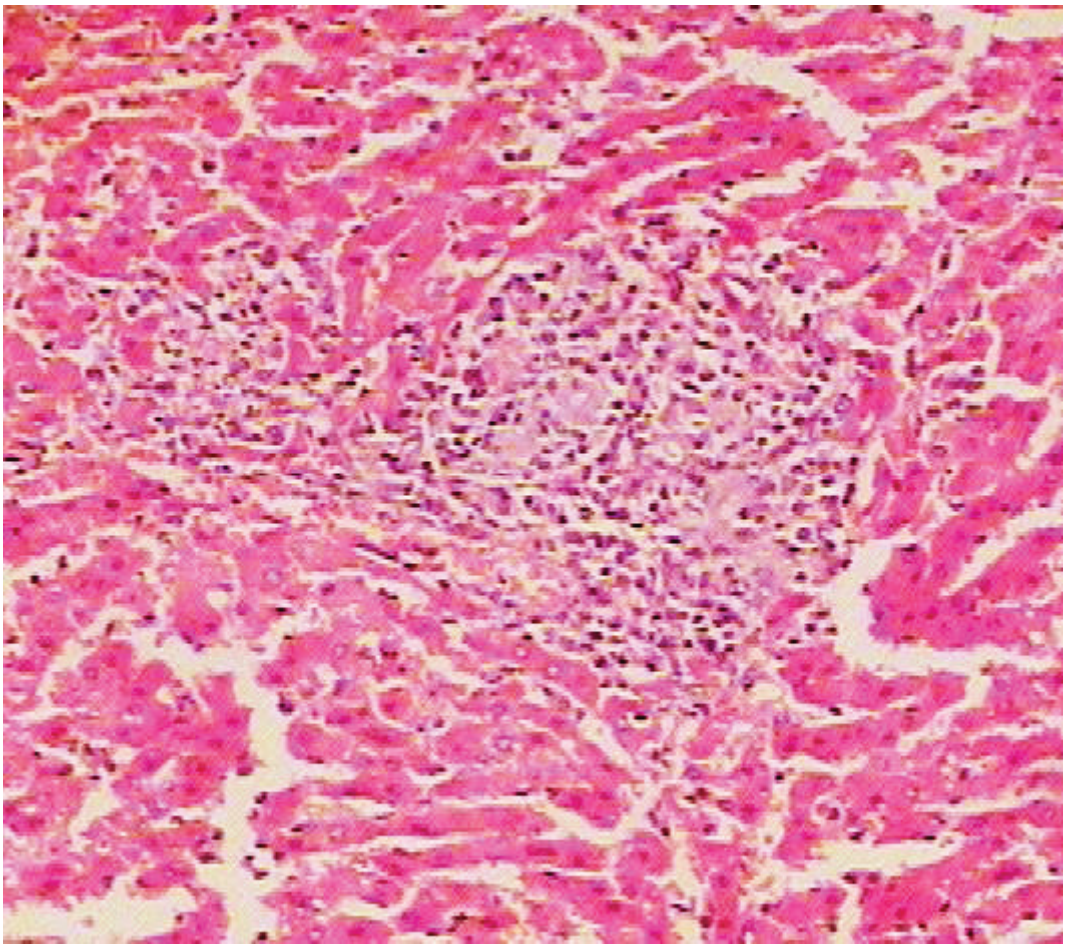

Рис. 1. Эпителиоидно-клеточная гранулема в печени. Лабораторная белая мышь. Подкожное заражение Francisella tularensis голарктического подвида. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.100.

состояния гепатоцитов сопровождалось понижением ядерно-цитоплазматического индекса (ЯЦИ) в 1,5 раза по сравнению с интактным контролем (ИК – 0,21). Наблюдали признаки угнетения функциональной активности ядер гепатоцитов, что проявлялось уменьшением их размера, конденсацией хроматина, уменьшением среднего количества ядрышек на ядро в 1,7 раза, а AgNOR в них в 1,8 раза по сравнению с ИК (таблица). Характеристика состояния ядерного аппарата гепатоцитов при импрегнации срезов печени серебром дает возможность оценить, как общее состояние белкового синтеза в клетках, так и косвенно определить внутриядерную локализацию и уровень активности генов рРНК, а, следовательно, получить информацию о ядрышко-ядерных и ядерно-цитоплазматических взаимоотношениях. Это позволяет получать дополнительную информацию об изменении функциональной активности клеток при патологическом процессе. В строме органа наблюдали умеренную лимфогистиоцитарную инфильтрацию с примесью полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) и регистрировали крупные с широкой зоной распада гранулы (S=14486,01+10899,08 мкм^2), не менее 4-х на срез. Отмечали уменьшение количества клеток Купфера в 3,4 раза по сравнению с аналогичным показателем в ИК (2,6+0,71 и 8,8+0,56 соответственно).

Заражение животных культурой штамма неарктического подвида F.tularensis A'Cole приводило к неравномерному нарушению гемодинамики в печени. Наблюдали, чередование полей с запустевшими центральными венами и внутридольковыми гемокапиллярами (ВДГК) и очаги резкого полнокровия в системе циркуляции крови в печеночных дольках. Дистрофическое нарушение функционального состояния гепатоцитов было выраженным. При относительной вакуолизации ядер клеток, ядрышки в них располагались равномерно (рис. 2). Среднее количество ядрышек на ядро в 1,4 раза было ниже, а AgNOR в них несколько выше, в чем у животных из группы ИК (таблица). На фоне множественных (до 17 на срез) не крупных с узкой зоной распада гранулем (S=12890,85+5572,50 мкм^2) встречались очаги

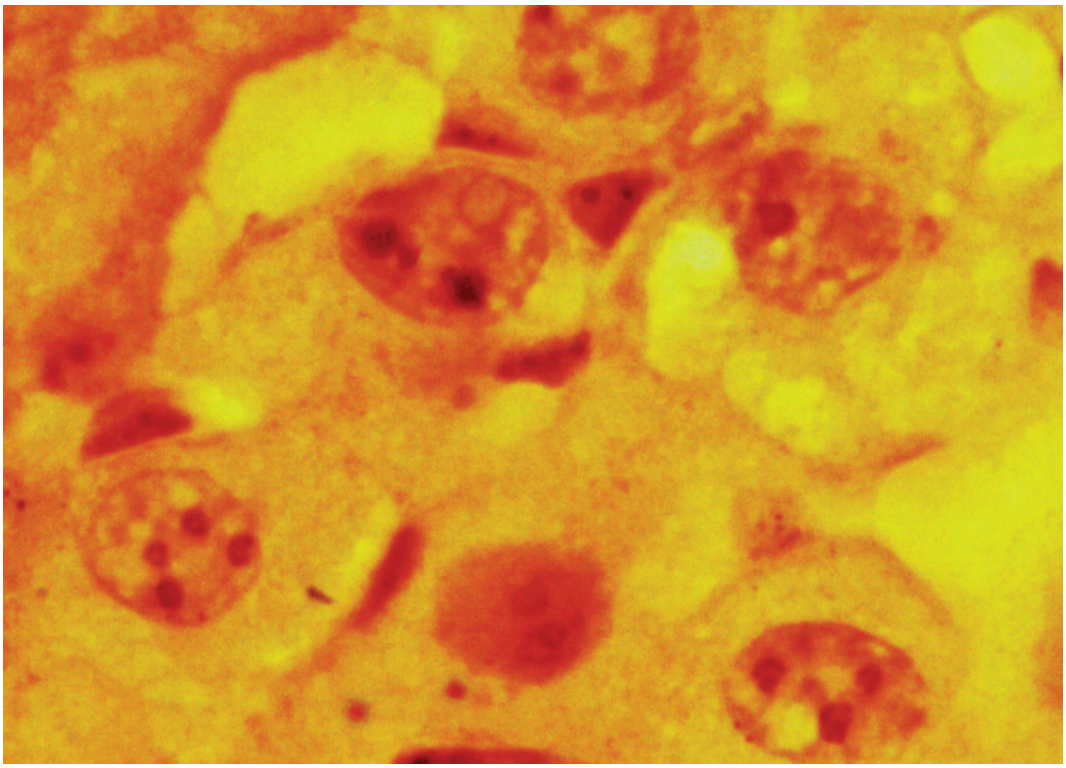

Рис. 2. Нуклеолярный аппарат гепатоцитов. Лабораторная белая мышь, зараженная Francisella tularensis неарктического подвида.Импрегнация азотнокислым серебром. Ув.1000.

лимфогистиоцитарной инфильтрации вокруг сосудов. Характерным был состав гранулем, как и при заражении туляремийным микробом голарктического подвида, более 50 % клеток составляли элементы лимфоидного ряда, а четверть приходилась на гистиоциты, чуть чаще регистрировали макрофаги и плазмоциты, единичные ПМЯЛ. Количество клеток Купфера лишь в 1,4 раза было ниже контрольных показателей (6,2+1,4).

В ответ на заражение туляремийным микробом штамма среднеазиатского подвида у мышей наблюдали по периферии крупных очагов выраженной дистрофии гепатоцитов, сопровождающихся вакуолизацией цитоплазмы и гипертрофией ядер в них, зоны полнокровия в системе ВДГК. Изменение морфофункционального состояния гепатоцитов заключалось в уменьшении ЯЦИ в 1,4 раза по сравнению с ИК, и незначительном снижении количества ядрышек в ядрах на фоне активации AgNOR (таблица). В преимущественно лимфогистиоцитарных инфильтратах стромы чаще встречались ПМЯЛ, отмечали значительное

Таблица.

Характеристика морфофункционального состояния гепатоцитов мышей, зараженных Francisella tularensis разных подвидов

Группа	Количество (M+m)			Площадь гепатоцита в мкм^2 (M+m)		
	ядер на 1 клетку	ядрышек на 1 ядро	ядрышек с AgNOR	ядра	цитоплазмы	ЯЦИ
I-я	1,12+0,08	2,82+0,64*	1,15+0,85	273,36+97,9	1954,36+308,96	0,14
II-я	1,22+0,42	3,4+0,32	2,75+1,25	304,61+72,14	1668,58+300,69	0,18
III-я	1,62+0,54	3,6+0,93	4,25+1,75*	347,42+112,47*	2285,62+699,06*	0,15
IV-я	1,17+0,37	4,1+1,17	3,0+1,3	266,53+52,47	1245,56+280,77	0,21
ИК	1,13+0,34	4,9+0,32	2,05+0,86	278,45+34,78	1319,48+391,16	0,21

Условные обозначения: * Достоверность результатов по отношению к контролю $p<0,05$.

количество гранулем (до 20 на срез) различных размеров, но с небольшими зонами некроза (минимальный размер – 2881,72 мкм^2, максимальный – 73470,27 мкм^2). Количество клеток Купфера снижалось до 5,8+8,1, что в 1,5 раза было ниже, чем у животных из группы ИК.

Изменения на введение лабораторным мышам туляремийного микроба вакцинного штамма голарктического подвида были умеренными. Наблюдали относительное полнокровие, как центральных вен, так и ВДГК, дистрофические изменения гепатоцитов носили очаговый характер, но встречались группы клеток с явлениями некробиоза, чаще расположенные вблизи сосудов. В этих же зонах регистрировали клеточную инфильтрацию лимфогистиоцитарного характера с примесью единичных ПМЯЛ. Функциональные характеристики гепатоцитов достоверно не отличались от показателей в группе ИК, регистрировали незначительное угнетение клеток Купфера (6,6+1,5). В срезах органа встречались единичные, мелкие (10164,55+3033,52 мкм^2) лимфогистиоцитарного характера гранулемы без зон распада.

Несмотря на то, что ЛПС туляремийного микроба не является типичным провоспалительным эндотоксином [9], доказано, что туляремийный микроб, независимо от подвидовой принадлежности, в условиях in vivo стимулирует синтез медиаторов воспаления (ИЛ-1, ФНОα, ИФН-γ) [10]. При экспериментальной туляремии у мышей гранулематозно-некротические изменения в печени коррелируют с изменением уровня органоспецифических ферментов аланинтрансферазы и лактатдегидрогеназы в сыворотке крови и выявлением специфических маркеров на клетках ретикулоэндотелиальной системы органа [5]. Ретикулоэндотелиальные клетки печени, фагоцитируя патоген, выделяют целый ряд активных компонентов для стимуляции синтеза гепатоцитами ферментов детоксикации и острофазных белков [9]. Так ФНОα, секретируемый этими клетками in vivo, вызывает апоптоз гепатоцитов [11]. В тоже время сам бактериальный ЛПС воздействует на клетки Купфера через рецепторный аппарат (СД14, Toll-like R4 и ЛПС-связывающий белок) и инициирует высокий уровень продукции цитокинов дендритными клетками [12]. В условиях гибели гепатоцитов, характеристика пролиферативного потенциала этих клеток, представляется одним из важных механизмов репаративных процессов в органе. Таким образом, в сложном цитокиновом каскаде межклеточного взаимодействия оценка реакции клеток Купфера и характеристика функционального состояния гепатоцитов, включая анализ изменений ядерного организатора клеток, играют не последнюю роль и позволяют косвенно судить о процессах адаптации и дезадаптации в органе.

Таким образом, установленные изменения ряда морфометрических и морфофункциональных параметров состояния клеток печени биомодели могут иметь решающее значение в лимитировании адаптивных и регенераторных потенций организма «хозяина» при инокуляции туляремийного микроба штаммов разных подвидов, а, следовательно, и в исходе инфекционного процесса. Совокупность полученных данных представляет основу для дальнейшего изучения патогенетических потенций туляремийного микроба и поиска прогностических критериев оценки тяжести течения экспериментального патологического процесса.

ЛИТЕРАТУРА:

1.Дубровина В.И. Особенности влияния липополисахарида туляремийного микроба разных подвидов на метаболическую активность фагоцитов in vitro / В.И. Дубровина, Ж.А. Коновалова, В.Б. Николаев, В.В. Войткова, С.А.Татарников, А.В. Мазепа, Е.Ю. Марков, Ю.О. Попова, О.В. Юрьева // Пробл. особо опасных инфекций.- 2011.- Вып. 108. - С. 57-60.

2.Svensson K. Landscape epidemiology of tularemia outbreaks in Sweden / K. Svensson, E. Bäck, H. Eliasson, L. Berglund, M. Granberg, L. Karlsson, P. Larsson, M. Forsman, A. Johansson // Emerg. Infect. Dis.- 2009.- V. 15(12). – P. 1937-47.

3.Barker J. R. Molecular and genetic basis of pathogenesis in Francisella tularensis / J. R. Barker, K. E. Klose // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2007. - V. 11059.- P. 138-159.

4.Brotcke A. Identification of MglA-regulated genes reveals novel virulence factors in Francisella tularensis / A. Brotcke, D.S. Weiss, C.C. Kim, P. Chain, S. Malfatti, E. Garcia, D.M. Monack // Infect. Immun. — 2006. — V. 74 (12). - P. 6642-6655.

5.Rasmussen J.W. Mac-1+ cells are the predominant subset in the early hepatic lesions of mice infected with Francisella tularensis / J.W. Rasmussen, J. Cello, H. Gil, C.A. Forestal, M.B. Furie, D.G. Thanassi, J.L. Benach // Infect. Immun. 2006. - V. 74 (12). - P. 6590-6508.

6.Саппо С. Г. Характеристика патогенности возбудителя туляремии разных подвидов по экспериментально-морфологическим данным / С.Г. Саппо, С.А. Татарников, А.В. Мазепа // Деп. В ВИНИТИ - Иркутск, 2009. - 35 с. - Библиогр.: 32 назв. - Рус. - 353 - В2009.

7.Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. Из-во: СпецЛИТ, 2010, 96 с.

8.Howell W. M. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. / W.M. Howell, D.A. Black // Experientia.- 1980. - V. 36. - P. 1014—1015.

9.Harada K. Lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through toll-like receptors and molecules in cultured biliary epithelial cells / K. Harada, S. Ohira, K. Isse, S. Ozaki, Y. Zen, Y. Sato, Y. Nakanuma // Lab. Invest. – 2003. – V. 83 (11). – P. 1657-1667.

10.Дубровина В.И. Влияние туляремийного микроба разных подвидов на функциональную активность иммунокомпетентных клеток экспериментальных животных / В.И. Дубровина, С.А. Татарников, Ж.А. Коновалова, В.В. Войткова, А.В. Мазепа, С.В.Лукьянова, В.Н. Рычкова, А.И. Бельков, Т.Т. Шкаруба // Пробл. особо опасных инфекций.- 2010.- Вып. 4 (106). – С. 51-53.

11.Jones B.A. Bile salt-induced apoptosis of hepatocytes involves activation of protein kinase C / B.A. Jones, Y.P. Rao, R.T. Stravitz, G.J. Gores // Am. J. Physiol. 1997.- V. 272(5).- P. 1109-1115.

12.Ashtekar A.R. TLR4-mediated activation of dendritic cells by the heat shock protein DnaK from Francisella tularensis / A.R. Ashtekar, P. Zhang, J. Katz, C.C. Deivanayagam, P. Rallabhandi, S.N. Vogel, S.M. Michalek // J. Leukoc. Biol. 2008 Dec; 84(6): 1434-46.

REFERENCES:

1. Dubrovina V.I. Osobennosti vliyaniya lipopolisakharida tulyaremijnogo mikroba raznykh podvidov na metabolicheskuyu aktivnost' fagotsitov in vitro / V.I. Dubrovina, ZH.A. Konovalova, V.B. Nikolaev, V.V. Vojtkova, S.A.Tatarnikov, A.V. Mazepa, E.YU. Markov, YU.O. Popova, O.V. YUr'eva // Probl. osobo opasnykh infektsij.- 2011.- Vyp. 108. - S. 57-60.

2. Svensson K. Landscape epidemiology of tularemia outbreaks in Sweden / K. Svensson, E. Bäck, H. Eliasson, L. Berglund, M. Granberg, L. Karlsson, P. Larsson, M. Forsman, A. Johansson // Emerg. Infect. Dis.- 2009.- V. 15(12). – P. 1937-47.

3. Barker J. R. Molecular and genetic basis of pathogenesis in Francisella tularensis / J. R. Barker, K. E. Klose // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2007. - V. 11059.- P. 138-159.

4. Brotcke A. Identification of MglA-regulated genes reveals novel virulence factors in Francisella tularensis / A. Brotcke, D.S. Weiss, C.C. Kim, P. Chain, S. Malfatti, E. Garcia, D.M. Monack // Infect. Immun. — 2006. — V. 74 (12). - P. 6642-6655.

5. Rasmussen J.W. Mac-1+ cells are the predominant subset in the early hepatic lesions of mice infected with Francisella tularensis / J.W. Rasmussen, J. Cello, H. Gil, C.A. Forestal, M.B. Furie, D.G. Thanassi, J.L. Benach // Infect. Immun. 2006. - V. 74 (12). - P. 6590-6508.

6. Sappo S. G. KHarakteristika patogennosti vozbuditelya tulyaremii raznykh podvidov po ehksperimental'no-morfologicheskim dannym / S.G. Sappo, S.A. Tatarnikov, A.V. Mazepa // Dep. V VINITI - Irkutsk, 2009. - 35 s. - Bibliogr.: 32 nazv. - Rus. - 353 - V2009.

7. Korzhevskij D.EH., Gilyarov A.V. Osnovy gistologicheskoj tekhniki. Iz-vo: SpetsLIT, 2010, 96s.

8. Howell W. M. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. / W.M. Howell, D.A. Black // Experientia.- 1980. - V. 36. - P.1014—1015.

9. Harada K. Lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through toll-like receptors and molecules in cultured biliary epithelial cells / K. Harada, S. Ohira, K. Isse, S. Ozaki, Y. Zen, Y. Sato, Y. Nakanuma // Lab. Invest. – 2003. – V. 83 (11). – P. 1657-1667.

10. Dubrovina V.I. Vliyanie tulyaremijnogo mikroba raznykh podvidov na funktsional'nuyu aktivnost' immunokompetentnykh kletok ehksperimental'nykh zhivotnykh / V.I. Dubrovina, S.A. Tatarnikov, ZH.A. Konovalova, V.V. Vojtkova, A.V. Mazepa, S.V.Luk'yanova, V.N. Rychkova, A.I. Bel'kov, T.T. SHkaruba // Probl. osobo opasnykh infektsij.- 2010.- Vyp. 4 (106). – S. 51-53.

11. Jones B.A. Bile salt-induced apoptosis of hepatocytes involves activation of protein kinase C / B.A. Jones, Y.P. Rao, R.T. Stravitz, G.J. Gores // Am. J. Physiol. 1997.- V. 272(5).- P. 1109-1115.

12. Ashtekar A.R. TLR4-mediated activation of dendritic cells by the heat shock protein DnaK from Francisella tularensis / A.R. Ashtekar, P. Zhang, J. Katz, C.C. Deivanayagam, P. Rallabhandi, S.N. Vogel, S.M. Michalek // J. Leukoc. Biol. 2008 Dec; 84(6): 1434-46.

Авторская справка:

1. Бугоркова Светлана Александровна – доктор медицинских наук, зав. лабораторией патоморфологии отдела иммунологии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», 410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46, (8452)515212, моб. телефон: +79276212410, E-mail: spivakovski65@mail.ru

2. Осина Наталья Александровна – кандидат биологических наук, зав. лабораторией молекулярной диагностики ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», 410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46.