Пути совершенствования освоения лабораторной диагностики туляремии на курсах дополнительного профессионального образования

Сазанова Е.В.,
Осина Н.А.,
Горельникова Е.А.,
Попов Ю.А.

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт “Микроб”»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 410005, г. Саратов, Российская Федерация

При подготовке специалистов различного профиля (бактериологов, генетиков, иммунологов, эпидемиологов), участвующих в проведении диагностических и экспериментальных исследований с материалом, подозрительным на зараженность или зараженным бактериями, относящимися к I–II группам патогенности, традиционно используют вирулентные штаммы *Francisella tularensis*. Однако основное направление государственной политики в области обеспечения биобезопасности РФ – исключение или максимальное снижение использования в технологических процессах патогенных микроорганизмов. Учитывая данный подход, приоритетной задачей является проведение научных исследований по замене вирулентных штаммов туляремиального микроба на вакцинные, аттенуированные или со сниженной вирулентностью.

Цель исследования – разработка критериев подбора штаммов *F. tularensis* в качестве учебных, принципа формирования и применения набора штаммов для освоения методов лабораторной диагностики туляремии.

Материал и методы. В качестве материалов использовали законодательные и подзаконные акты; нормативно-методические документы (методические указания, санитарные правила) и научные публикации в области лабораторной диагностики туляремии и обеспечения биобезопасности работ с патогенными биологическими агентами (ПБА); открытые научно-технические источники информации; программы дополнительного профессионального образования (профессиональной переподготовки и повышения квалификации) специалистов для работ с возбудителями особо опасных инфекций (ООИ) и повышения квалификации. Метод исследования: аналитический.

Результаты и обсуждение. Определены критерии подбора штаммов возбудителя туляремии для освоения методов лабораторной диагностики в рамках учебного модуля «Микробиология и лабораторный диагноз туляремии» и разработан дифференцированный подход к их применению с целью снижения вероятности лабораторного инфицирования обучающихся.

Заключение. Обоснована необходимость формирования учебного набора штаммов *F. tularensis*. Разработаны критерии отбора штаммов в качестве кандидатов в учебные – штаммы со сниженной вирулентностью, вакцинные и аттенуированные, которые позволят снизить вероятность лабораторного инфицирования слушателей курсов при освоении методов лабораторной диагностики туляремии.

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии финансовой поддержки при написании статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Вклад авторов. Концепция и дизайн исследования – Сазанова Е.В., Попов Ю.А.; сбор и обработка материала – Сазанова Е.В.; написание текста – Сазанова Е.В., Осина Н.А.; редактирование – Горельникова Е.А.

Для цитирования: Сазанова Е.В., Осина Н.А., Горельникова Е.А., Попов Ю.А. Пути совершенствования освоения лабораторной диагностики туляремии на курсах дополнительного профессионального образования // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2020. Т. 9, № 3. С. 133–138. DOI: <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2020-9-3-133-138>

Статья поступила в редакцию 03.11.2019. Принята в печать 02.07.2020.

Ключевые слова:

Francisella tularensis,
биологическая
безопасность,
подготовка
специалистов,
учебные штаммы

Ways to improve the mastering of laboratory tularemia diagnostics at vocational training courses

Sazanova E.V., Osina N.A.,
Gorel'nikova E.A., Popov Yu.A.

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", 410005,
Saratov, Russian Federation

During the training courses for the specialists of diverse expertise (bacteriologists, geneticist, immunologists, epidemiologists etc.) participating in diagnostic and experimental investigations using material suspected of contamination or contaminated with bacteria of the I–II groups of pathogenicity, virulent *Francisella tularensis* strains are conventionally utilized. However, the main direction of the national policy in the sphere of biological safety provision in the Russian Federation is the exclusion of or maximum decrease in the use of pathogenic microorganisms in technological processes. Taking into consideration the stated approach, the priority task was to conduct research on the replacement of virulent strains of tularemia microbe with vaccine ones, attenuated or with lower virulence.

The aim of the study – development of criteria for the selection of *F. tularensis* strains as academic, training ones, principle of building-up and application of the strain panel for mastering laboratory diagnostics of tularemia.

Material and methods. Legislative instruments and bylaws; normative-methodological documents (methodological regulations, sanitary rules) and scientific publications in the field of laboratory diagnostics of tularemia and biosafety provision for work with pathogenic biological agents (PBA); open access scientific-technical information sources; programs for vocational education (professional retraining and continuing education) of specialists to handle the agents of particularly dangerous infections (PDI) and capacity building served as the framework of the study. The method utilized is an analytical one.

Results and discussion. Criteria for the selection of tularemia agent strains for mastering methods of laboratory diagnostics as part of educational module "Microbiology and laboratory diagnosis of tularemia" were identified; differentiated approach to their application aimed at reducing the probability of laboratory-acquired infection of the trainees was established.

Conclusion. Substantiated is the necessity to define the teaching *F. tularensis* strains to be included into the panel. Developed are the criteria for the selection of the candidate strains – strains with lowered virulence, vaccine and attenuated strains, which allow for the decrease in the probability of laboratory infection of trainees while mastering methods of laboratory diagnostics of tularemia.

Funding. The authors state the absence of any financial support for manuscript preparation.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of financial/non-financial interests associated with preparation of the manuscript.

Contribution. Concept and design of the study is created – Sazanova E.V., Popov Yu.A.; collection and processing of the data – Sazanova E.V.; writing of the manuscript – Sazanova E.V., Osina N.A.; and editing of the paper – Gorel'nikova E.A.

For citation: Sazanova E.V., Osina N.A., Gorel'nikova E.A., Popov Yu.A. Ways to improve the mastering of laboratory tularemia diagnostics at vocational training courses. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obucheniye* [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]. 2020; 9 (3): 133–8. DOI: <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2020-9-3-133-138> (in Russian)

Received 03.11.2019. **Accepted** 02.07.2020.

Основной целью дополнительного профессионального образования (ДПО) является формирование специалиста, владеющего ключевыми профессиональными компетенциями, позволяющими осуществлять лабораторную диагностику туляремии.

В результате обучения слушатели должны приобрести базовые знания, используемые при проведении лабораторных исследований на туляремию, умение идентифицировать выделенные культуры по морфологическим, культуральным, биохимическим, антигенным, молекулярно-генетическим свойствам и навыки постановки микробиологических тестов, методы работы с лабораторными животными. Однако в Указе Президента РФ от 11.03.2019 № 97 обозначена одна из задач о необходимости максимальной замены в технологических процессах патогенных микроорганизмов на безопасные [1].

В связи с вышеизложенным обучение слушателей курсов тематического усовершенствования методам безопасной работы с возбудителями особо опасных бактериальных

инфекций по программам ДПО в противочумных учреждениях Роспотребнадзора необходимо проводить, учитывая профессиональные требования к уровню подготовки и актуальные направления государственной политики.

Для реализации поставленной цели сотрудниками отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора ранее были созданы наборы авирулентных штаммов, используемые при освоении учебных модулей «Микробиология и лабораторная диагностика холеры» и «Микробиология и лабораторная диагностика чумы» [2]. Это позволило решить важную практическую задачу обеспечения биологической безопасности – снизить вероятность лабораторного инфицирования обучающихся, минимизировав применение вирулентных штаммов. Вместе с тем необходимо продолжить работу по методическому обеспечению учебного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика туляремии», обязательного при подготовке специалистов по особо опасным инфекциям (ООИ).

Keywords:

Francisella tularensis, biological safety, training of specialists, academic, training strains

Согласно национальной классификации микроорганизмов, действующей на территории РФ, возбудитель туляремии относят ко II группе патогенности (опасности) [3]. *F. tularensis* по вероятности использования в качестве биологического оружия включена в I группу [4, 5]. Кроме того, возбудитель туляремии внесен в Список микроорганизмов, токсинов, оборудования и технологий, подлежащих экспортному контролю [6].

Природные очаги этой инфекции расположены на территории различных стран, в том числе широко распространены в Российской Федерации; устойчивы территориально, но могут трансформироваться в результате хозяйственной деятельности человека. Характеризуются динамической эпизоотической активностью и наличием эпидемических проявлений [7].

Проведение лабораторной диагностики туляремии требует грамотных действий специалистов. Одно из условий, предъявляемое к ним, – прохождение специализированных курсов с освоением методов безопасной работы и последующее повышение профессиональных компетенций [3, 8].

Согласно международной классификации, вид *F. tularensis* представлен 4 подвидами – *F. tularensis subsp. tularensis* (*nearctica*), *F. tularensis subsp. holarctica* (*palearctica*), *F. tularensis subsp. mediasiatica* и *F. tularensis subsp. novicida*.

Штаммы разных подвигов туляремиального микроба имеют высокую гомологию антигенной структуры и нуклеотидной последовательности генома, но, несмотря на это, они отличаются по вирулентности и географическому распространению [9–11]. Основываясь на данных анализа гомологии геномов возбудителя туляремии различного происхождения, выявлены области RD (region of difference, область различий), которые в разной степени делетированы у подвигов возбудителя [12]. Исключением является область RD₁, содержащая делеции у *F. tularensis holarctica*, *mediasiatica*, нуклеотидные замены у *F. tularensis novicida* и интактная у *F. tularensis tularensis* [12]. Специалистами ВОЗ предложено использовать анализ вариативности RD₁ для подвиговой дифференциации туляремиального микроба [13]. Опубликованы сообщения о выделении на территории России подвида *mediasiatica*, циркуляция которого ранее наблюдалась только в природных очагах Средней Азии [14]. Также имеются данные о выделении на территории Европы высоковирулентных штаммов *F. tularensis subsp. tularensis*, распространенных ранее исключительно только в Северной Америке [15]. Поэтому важно подобрать штаммы *F. tularensis* для изучения слушателями курсов биологических свойств всех подвигов.

Сотрудники ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора проводят обучение с учетом современных требований, предъявляемых к профессиональной деятельности специалистов при лабораторной диагностике туляремии [16, 17]. В настоящее время в процессе освоения диагностических методов используют единственный безопасный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ, относящийся к III группе патогенности, применяемый для вакцинации людей [3]. Вместе с тем данный штамм позволяет изучать биологические свойства только *F. tularensis* подвида *holarctica* и не дает возможности продемонстрировать весь спектр типичных биологических свойств иных подвигов, а также освоить комплекс базовых

методов индикации и идентификации [18]. Поэтому на практических занятиях используют также вирулентные штаммы II группы патогенности, в том числе *F. tularensis* 503/840, относящийся к подвиду *holarctica*, LD₅₀ которого для белых мышей при подкожном методе заражения составляет 5 КОЕ. Данный штамм позволяет эффективно освоить биологический метод исследования, который является обязательным в схеме диагностики, вызывая в организме биопробных лабораторных животных картину острого сепсиса со значительным накоплением бактерий в органах и тканях. При посеве тканей паренхиматозных органов на питательные среды отмечают стабильное выделение возбудителя. Однако при возникновении аварийных ситуаций штамм потенциально опасен в плане риска инфицирования обучающихся, что обуславливает необходимость его замены авирулентными или менее вирулентными.

Подбор штаммов в рамках программ (ДПО) определяет преподаватель с учетом действующих нормативно-методических документов по лабораторной диагностике туляремии и в соответствии с тематическим планом образовательного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика туляремии», разработанного специалистами противочумных учреждений [19–23]. Отсутствуют методические документы, регламентирующие критерии выбора и применение штаммов возбудителя туляремии в целях подготовки специалистов. В открытых научно-технических источниках не обнаружено информации о штаммах туляремиального микроба, используемых в учебных целях.

Все вышеизложенное свидетельствует об актуальности разработки стандартизированного научно-обоснованного подхода к совершенствованию методической базы и обеспечению биологической безопасности подготовки бактериологов по программам ДПО путем формирования учебного набора штаммов *F. tularensis*.

Цель исследования – разработка критериев подбора штаммов *F. tularensis* в качестве учебных принципов формирования и применения набора штаммов для освоения методов лабораторной диагностики туляремии.

Материал и методы

Законодательные и подзаконные акты РФ, нормативные и методические документы, научные публикации по лабораторной диагностике туляремии и биобезопасности работ с ПБА; научно-технические источники; программы профессиональной переподготовки и повышения квалификации специалистов для работ с возбудителями ООИ. Метод исследования: аналитический.

Результаты и обсуждение

Ранее проведен ретроспективный анализ аварийных ситуаций при освоении слушателями курсов профессиональной переподготовки лабораторной диагностики холеры, бруцеллеза, сибирской язвы, туляремии и чумы. Установлено, что с 1972 по 2009 г. апостериорная вероятность возникновения аварий составила $p=0,094$ для 1 слушателя курсов; периодичность при работе с возбудителем туляремии –

1 авария в 343 учебных часа или 0,08 аварии на протяжении одних курсов [24]. Полностью исключить аварийные ситуации и инфицирование при манипуляциях с патогенным биологическим материалом невозможно, тем не менее можно снизить их вероятность. Один из подходов – подбор штаммов *F. tularensis* со сниженной вирулентностью, вакцинных и аттенуированных.

Для практической реализации поставленной цели проанализированы учебные планы практических занятий в рамках образовательного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика туляремии», нормативные и информационно-методические документы, регламентирующие методы лабораторного исследования на туляремию, научно-технические источники [19–23].

Установлено, что исследования материала, зараженного или подозрительного на зараженность возбудителем туляремии, проводят в специализированных лабораториях (территориальный, региональный и федеральный уровни) Роспотребнадзора, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение и лицензию на проведение работ с ПБА II группы [19, 21, 25, 26].

Для лабораторий каждого уровня нормативно закреплён перечень проводимых ими исследований [19]. Медицинские организации территориального уровня, имеющие лицензию на работу с ПБА III–IV групп, проводят исследования сывороток крови, контроль состояния противотуляремийного иммунитета аллергологическими и иммунологическими методами [туляриновая проба, реакция агглютинации (РА), реакция объёмной агломерации, реакция непрямой геммагглютинации (РНГА), иммуноферментный анализ (ИФА)]. Центры гигиены и эпидемиологии в субъектах РФ, в структуру которых входят лаборатории ООИ, имеющие лицензию на работу с ПБА II–IV групп, осуществляют диагностические исследования материала методами индикации [полимеразной цепной реакции (ПЦР), метод флюоресцирующих антител (МФА), ИФА, РНГА и др.], постановку биологической пробы, выделение, накопление чистой культуры на питательных средах и идентификацию по сокращённой схеме.

Региональный уровень образуют подразделения противочумных учреждений Роспотребнадзора. Специалисты контролируют состояние иммунитета у вакцинированных; проводят исследование материала от больных (умерших) людей, анализ проб в ходе эпизоотологического обследования территории, окружающей среды. Диагностические исследования осуществляют с помощью методов, применяемых на территориальном уровне, дополняя следующими тестами: определение вирулентности для белых мышей и морских свинок, чувствительности к антибактериальным препаратам, типирование внутри вида. В лабораториях центров индикации, кроме перечисленного выше, осуществляют идентификацию по полной схеме [19].

Комплекс исследований на федеральном уровне включает подробное изучение молекулярно-генетических биохимических свойств выделенных штаммов возбудителя туляремии, а также генетическое типирование и секвенирование ДНК [19, 25]. В результате проведенной окончательной идентификации устанавливают подвиговую принадлежность и генотип выделенных штаммов *F. tularensis*.

Исходя из этого обучающий процесс, учитывая современные схемы лабораторной диагностики туляремии и принципы организации исследований в лабораториях разного уровня, должен включать:

- освоение бактериологического, биологического, молекулярно-генетического и иммунологических методов лабораторной диагностики туляремии, применяемых для индикации и идентификации;
- изучение видовых морфологических, культуральных, биохимических, антигенных свойств, генома возбудителя туляремии; биологических особенностей подвигов, биоваров, отдельных штаммов; алгоритма дифференциации подвигов, в том числе с использованием молекулярно-генетических технологий.

На основании предполагаемых направлений использования, перечней изучаемых биологических свойств, ключевых результатов подготовки специалистов и правил безопасной работы с тулярийным микробом были сформулированы критерии подбора штаммов в качестве учебных:

- 1) вирулентность для белых мышей (LD_{50}) при подкожном введении должна быть не менее 10^2 КОЕ [18]. За основу был взят количественный показатель «остаточная вирулентность», предъявляемый к вакцинным штаммам вследствие отсутствия четких критериев, дающих возможность разделить штаммы *F. tularensis* по вирулентности;
- 2) типичные видовые культурально-морфологические свойства определенных подвигов *F. tularensis*;
- 3) типичный набор генетических маркеров, специфичный для вида *F. tularensis* и его подвигов *F. tularensis tularensis*, *F. tularensis holarctica* $Ery^{S/R}$, *F. tularensis japonica*, *F. tularensis novicida* (RD_1 , pdr D и др.), для аттенуированных штаммов тулярийного микроба (RD_{18} , RD_{19} и др.);
- 4) способность формировать патологоанатомические изменения (картина острого сепсиса) во внутренних органах лабораторных животных;
- 5) чувствительность к антибактериальным препаратам, регламентированным для экстренной профилактики туляремии.

Все природные штаммы характеризуют по степени патогенности как более или менее патогенные для человека и животных. Наиболее безопасным для применения в учебном процессе является вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ, LD_{50} которого при подкожном введении белым мышам – не менее $1–10^2$ КОЕ. Высокую вирулентность проявляют штаммы *F. tularensis* подвида *tularensis*, вызывая развитие инфекционного заболевания от заражения одной микробной клеткой. Меньшую вирулентность проявляют штаммы подвигов *holarctica* и *mediasiatica*, LD_{50} которых для кроликов более $10^3–10^6$ КОЕ. Подвид *F. tularensis novicida* обладает сниженной вирулентностью для кроликов, LD_{50} более 10^6 КОЕ. Очевидно, что необходимость реализации учебного плана в полном объёме может обусловить включение в набор штаммов различной вирулентности и потребует рассмотрения вопроса об обеспечении условий для минимизации вероятности инфицирования обучающихся при манипуляциях с ними.

Сотрудниками ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора разработан дифференцированный подход к применению набора учебных штаммов с позиции обеспечения биологической безопасности обучающихся.

Штаммы вакцинный и аттенуированные предполагается выдавать слушателям курсов для индивидуальной работы при изучении типичных свойств возбудителя туляремии, утвержденных методов индикации, сокращенной идентификации и внутривидовой дифференциации.

Штаммы *F. tularensis* подвида *tularensis*, *F. tularensis* подвида *mediasiatica*, *F. tularensis* подвида *novicida* будут использованы преподавателями для демонстрации тестов, определяющих подвиговую принадлежность: ферментации глицерина, цитруллин-уреидазной, фосфатазной, пенициллиназной активности, выявления специфических для подвигов генетических маркеров с помощью ПЦР.

Для освоения биологического метода слушателями курсов будет использован вакцинный штамм *F. tularensis* подвида *holarctica* 15 НИИЭГ. Воспроизведение выраженных патологоанатомических изменений (картина острого

сепсиса) во внутренних органах лабораторных животных будет проводить преподаватель с применением вирулентных штаммов *F. tularensis* подвида *tularensis* или *F. tularensis* подвида *holarctica* для демонстрации на практических занятиях.

Будет применен типичный набор генетических маркеров, специфичный для вида *F. tularensis* и его подвигов *F. tularensis tularensis*, *F. tularensis holarctica* Ery^{S/R}, *F. tularensis japonica*, *F. tularensis novicida* (RD₁, pdp D и др.), для аттенуированных штаммов туляремиального микроба (RD₁₈, RD₁₉ и др.) для подготовки преподавателями проб, применяемых для обучения молекулярно-генетическим методам диагностики.

Таким образом, в работе впервые обозначены принципы формирования учебного набора штаммов, перечень критериев подбора штаммов *F. tularensis* для реализации в полном объеме плана образовательного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика туляремии», а также их дифференцированного применения с целью максимального исключения вирулентных штаммов из индивидуальной работы обучающихся, и, как следствие, снижения вероятности их лабораторного инфицирования.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Российская Федерация:

Сазанова Елена Владимировна (Elena V. Sazanova) – кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов

E-mail: rusrapi@microbe.ru

<https://orcid.org/0000-0001-9140-3910>

Осина Наталия Александровна (Natalia A. Osina) – кандидат биологических наук, заведующая отделом микробиологии

E-mail: rusrapi@microbe.ru

<https://orcid.org/0000-0003-1999-4726>

Горельникова Елена Александровна (Elena A. Gorelnikova) – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов

E-mail: rusrapi@microbe.ru

<https://orcid.org/0000-0002-9247-8380>

Попов Юрий Алексеевич (Yuri A. Popov) – доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом образовательных программ и подготовки специалистов

E-mail: rusrapi@microbe.ru

<https://orcid.org/0000-0001-7641-6334>

ЛИТЕРАТУРА

1. Об основах государственной политики Российской Федерации в области обеспечения химической и биологической безопасности на период до 2025 года и дальнейшую перспективу: указ Президента РФ от 11.03. 2019 г. № 97. URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/72092478/> (дата обращения: 17.03.2020).

2. Сазанова Е.В., Малюкова Т.А., Бойко А.В., Вахрушина Н.И., Попов Ю.А. Набор учебных штаммов для освоения лабораторной диагностики чумы // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2017. № 5 (22). С. 22–27.

3. Безопасность работ с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности): санитарные правила. СП 1.3.3118-13. // Бюллетень нормативных и методических документов Госсанэпиднадзора. 2013. № 3. С. 95–115.

4. Воробьев А.А., Боев Б.В., Бондаренко В.М., Гинцбург А.А. Проблема биотерроризма в современных условиях // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2002. № 3. С. 3–12.

5. Inglesby T.V., Dennis D.T., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S., Eitzen E. et al. Plague as a biological weapon: medical and public health management // JAMA. 2000. Vol. 283, N 17. P. 2281–2290.

6. Об утверждении Списка микроорганизмов, токсинов, оборудования и технологий, подлежащих экспортному контролю: указ Президента РФ от 20 августа 2007 г. № 1083 (с изм. от 14 ноября 2017 г.). URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_70610/ (дата обращения 05.03.2020)

7. Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н., Пакскина Н.Д., Холин А.В., Мазепа А.В. и др. Эпидемическая активность природных очагов туляремии на территории Российской Федерации в 2018 г. и прогноз ситуации на 2019 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2018. № 1. С. 32–41.

8. Об образовании в Российской Федерации: федеральный закон от 29.12.2012 № 273-ФЗ (ред. от 01.03.2020). URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_140174/ (дата обращения 05.03.2020)

9. Олсуфьев И.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. Москва: Медицина, 1975. 192 с.

10. Sjostedt A. Virulence determinants and protective antigens of *Francisella tularensis* II // Curr. Opin. Microbiol. 2003. Vol. 6, N 1. P. 66–71.

11. Titball R.W., Sjostedt A. *Francisella tularensis*: an overview // ASM News. 2003. Vol. 69, N 11. P. 558–563.

12. Broekhuijsen M., Larsson P., Johansson A., Byström M., Eriksson U., Larsson E. et al. Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis* // *J. Clin. Microbiol.* 2003. Vol. 41, N 7. P. 2924–2931.
13. WHO Guidelines on Tularaemia. Geneva : WHO, 2007. 115 p. URL: https://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_EPR_2007_7.pdf?ua=1 (дата обращения 05.03.2020)
14. Мокриевич А.Н., Кравченко Т.Б., Титарева Г.М., Бахтеева И.В., Вахрамеева Г.М., Горбатов А.А. и др. Методы изучения возбудителя туляремии : практическое пособие / под ред. И.А. Дятлова. Оболенск : ФБУН ГНЦ ПМБ, 2018. Режим доступа: по запросу на почту info@obolensk.org.
15. Gurycová D. First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe // *Eur. J. Epidemiol.* 1998. Vol. 14, N 8. P. 797–802.
16. Попов Ю.А., Малукова Т.А., Тихомирова Л.А., Кутырев В.В. Система подготовки специалистов по биологической безопасности в Российской Федерации // *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2016. Т. 5, № 1. С. 11–18.
17. Растунцева Е.В. Тихомирова Л.А., Сазанова Е.В. Алгоритмы обучения специалистов на курсах профессиональной переподготовки и повышения квалификации в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора // *Биозащита и биобезопасность.* 2014. № 6. С. 10–16.
18. Основные требования к вакцинным штаммам туляремии микроба: методические указания МУ 3.3.1.2161-07. Москва, 2007.

REFERENCES

1. On the fundamentals of the state policy of the Russian Federation in the field of chemical and biological safety for the period up to 2025 and beyond: decree of the President of the Russian Federation No. 9 of 11.03.2019. URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/72092478/> (date of access March 17, 2020) (in Russian)
2. Sazanova E.V., Malyukova T.A., Boyko A.V., Vakhrushina N.I., Popov Yu.A. A kit of practice strains for mastering laboratory diagnostics of plague. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obucheniye* [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]. 2017; 5 (22): 22–7. (in Russian)
3. Safety of work with pathogenicity groups I-II microorganisms (hazards): sanitary rules. SP 1.3.3118-13. *Byulleten' normativnykh i metodicheskikh dokumentov Gossanepidnadzora* [Bulletin of Normative and Methodical Documents of Gossanepidnadzor]. 2013; (3): 95–115. (in Russian)
4. Vorob'ev A.A., Boev B.V., Bondarenko V.M., Gintsburg A.L. The problem of bioterrorism in modern conditions. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 2002; (3): 3–12. (in Russian)
5. Inglesby T.V., Dennis D.T., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S., Eitzen E., et al. Plague as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA.* 2000; 283 (17): 2281–90.
6. On approval of the list of microorganisms, toxins, equipment and technologies subject to export control: decree Of the President of the Russian Federation of August 20, 2007 N 1083 (as amended on November 14, 2017). http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_70610/ (date of access March 3, 2020) (in Russian)
7. Kudryavtseva T.Yu., Popov V.P., Mokrievich A.N., Pakskina N.D., Kholin A.V., Mazepa A.V., et al. Epidemic activity of natural foci of tularemia on the territory of the Russian Federation in 2018 and the forecast of the situation for 2019. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2018; (1): 32–41. (in Russian)
8. On education in the Russian Federation: Federal law No. 273-FZ of 29.12.2012 (as amended on 01.03.2020). http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_140174/ (date of access March 3, 2020) (in Russian)
9. Olsuf'ev I.G. Taxonomy, microbiology and laboratory diagnostics of the tularemia pathogen. Moscow: Meditsina, 1975: 192 p. (in Russian)
10. Sjostedt A. Virulence determinants and protective antigens of *Francisella tularensis* II. *Curr Opin Microbiol.* 2003; 6 (1): 66–71.
11. Titball R.W., Sjostedt A. *Francisella tularensis*: an overview. *ASM News.* 2003; 69 (11): 558–63.
12. Broekhuijsen M., Larsson P., Johansson A., Byström M., Eriksson U., Larsson E., et al. Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *J Clin Microbiol.* 2003; 41 (7): 2924–31.
13. WHO Guidelines on Tularaemia. Geneva: WHO, 2007: 115 p. URL: https://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_EPR_2007_7.pdf?ua=1 (date of access March 3, 2020)
14. Mokrievich A.N., Kravchenko T.B., Titareva G.M., Bakhteeva I.V., Vakhrameeva G.M., Gorbato A.A., et al. Methods for studying the causative agent of tularemia: a practical guide. Edited by Academician of the Russian Academy of Sciences I.A. Dyatlov. Obolensk: FBUN GNTs PMB, 2018. Access mode: on request by mail info@obolensk.org (in Russian)
15. Gurycová D. First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe. *Eur J Epidemiol.* 1998; 14 (8): 797–802.
16. Popov Yu.A., Malyukova T.A., Tikhomirova L.A., Kutyrev V.V. System of training of specialists in biological safety in the Russian Federation. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obucheniye* [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]. 2016; (1): 11–8. (in Russian)
17. Rastuntseva E.V., Tikhomirova L.A., Sazanova E.V. Algorithms for training specialists in professional retraining and advanced training courses in the Federal State Educational Institution Rosnipchi "Microb" of Rospotrebnadzor. *Biozashchita i biobezopasnost'* [Biosecurity and Biosafety]. 2014; (6): 10–6. (in Russian)
18. Basic requirements for vaccine strains of tularemia microbe: methodical instructions MU 3.3.1.2161-07. Moscow, 2007. (in Russian)
19. Procedure for organizing and conducting laboratory diagnostics of tularemia for laboratories at the territorial, regional and Federal levels: methodical instructions MUK 4.2.2939-11. Moscow, 2011. (in Russian)
20. Epidemic surveillance of tularemia: methodical instructions MU 3.1.2007-05. Moscow, 2005. (in Russian)
21. Prevention of tularemia: sanitary rules. SP 3.1.7.2642-10. Moscow, 2010. (in Russian)
22. Determination of the sensitivity of pathogens of dangerous bacterial infections (plague, anthrax, cholera, tularemia, brucellosis, glanders, melioidosis) to antibacterial drugs: methodical instructions MUK 4.2.2495-09. Moscow, 2009. (in Russian)
23. Control of diagnostic nutrient media by biological indicators for pathogens of plague, cholera, anthrax, tularemia, brucellosis, legionellosis: methodical instructions MU 3.3.2.2124-06. Moscow, 2006. (in Russian)
24. Sazanova E.V., Bojko A.V., Malyukova T.A., Locmanova E.Yu. Ways to reduce the probability of accidents when training specialists to work with pathogens of groups I-II pathogenicity. *Biozashchita i biobezopasnost'* [Biosecurity and Biosafety]. 2012; (1): 16–20. (in Russian)
25. On improving the monitoring system, laboratory diagnostics of infectious and parasitic diseases and indication of PBA in the Russian Federation: Rospotrebnadzor order No. 1116 dated 01.12.2017. *Bakteriologiya* [Bacteriology]. 2017; 2 (4): 66–71. (in Russian)
26. Laboratory diagnostics of dangerous infectious diseases. A practical guide / edited by G. G. Onishchenko, V. V. Kutyreva. Edited by G.G. Onishchenko, V.V. Kutyrev. Moscow: Shiko, 2013: 555 p. (in Russian)