DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-50-55

УДК 616.98:579.841.95

О.А. Волох, С.В. Борисова, Д.Н. Бибиков, Е.М. Кузнецова, Ю.И. Самохвалова, Н.Г. Авдеева, А.В. Комиссаров, А.К. Никифоров

ЭЛЕКТРООПТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ВАКЦИННОГО ШТАММА ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель. Изучить возможность применения электрооптического анализа для оценки жизнеспособности клеток вакцинного штамма туляремийного микроба на этапах получения экспериментальной живой туляремийной вакцины. **Материалы и методы.** Объектом исследования стала культура клеток *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. Исследования проводились на всех этапах получения экспериментальной живой туляремийной вакцины по усовершенствованной технологии: выращивание, концентрирование, диафильтрация, сведение со средами высушивания, стабилизация, хранение (срок наблюдения два года). Электрооптический анализ по показателю «анизотропия поляризуемости» бактериальной клетки производился с помощью устройства EloTrace (EloSystems, Германия). Общую концентрацию клеток измеряли денситометрически при 590 нм и спектрометрически при 650 нм, оценку жизнеспособности проводили высевом на пластинки с FT-агаром. **Результаты и обсуждение.** В ходе эксперимента показано, что изменение анизотропии поляризуемости клетки при частотах 900 кГц и 2100 кГц, отражающее состояние цитоплазмы и цитоплазматической мембраны соответственно является самым ранним ответом на изменения жизненных показателей бактериальной культуры в процессе выращивания. В свою очередь, снижение жизнеспособности клеток *F. tularensis* происходило гораздо раньше, чем снижение концентрации клеток. Показано сохранение жизнеспособности клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ на всех этапах получения экспериментальной живой туляремийной вакцины. Электрооптический анализ позволяет регистрировать изменения жизненных показателей клеток микроорганизма в режиме реального времени, тогда как оценка жизнеспособности бактериологическим методом занимает 5 сут. Различные этапы производства туляремийной вакцины влияют на жизненные показатели клеток *F. tularensis*, а электрооптический анализ является перспективным методом контроля показателя «Специфическая активность (количество живых микробных клеток)».

Ключевые слова: Francisella tularensis, электрооптический анализ, живая туляремийная вакцина, специфическая активность.

Корреспондирующий автор: Волох Оксана Александровна, e-mail: lhv@microbe.ru.

Для цитирования: Волох О.А., Борисова С.В., Бибиков Д.Н., Кузнецова Е.М., Самохвалова Ю.И., Авдеева Н.Г., Комиссаров А.В., Никифоров А.К. Электрооптический анализ жизнеспособности клеток вакцинного штамма туляремийного микроба. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020; 3:50–55. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-50-55

Поступила 18.03.20. *Отправлена на доработку* 13.05.20. *Принята к публ.* 08.09.20.

O.A. Volokh, S.V. Borisova, D.N. Bibikov, E.M. Kuznetsova, Yu.I. Samokhvalova, N.G. Avdeeva, A.V. Komissarov, A.K. Nikiforov

Electro-Optical Analysis of Cell Viability of Tularemia Microbe Vaccine Strain

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

Abstract. **Objective**: to study the possibility of applying electro-optical analysis for the assessment of cell viability of tularemia microbe vaccine strain at different stages of experimental live tularemia vaccine production. **Materials and methods.** The research object was a cell culture of *Francisella tularensis* 15 NIIEG. Investigations were carried out at all stages of experimental live tularemia vaccine (ELTV) manufacturing according to an advanced technology: cultivation, concentrating, diafiltration, mixing with drying media, stabilization, and storage (two-year period of observation). Electro-optical analysis by the parameter "polarizability anisotropy" of bacterial cell was conducted with the help of EloTrace (EloSystems, Germany). Total concentration of cells was evaluated using density metering at 590 nm and spectrometry – at 650 nm. Viability was assessed through inoculation of plates with FT-agar. **Results and discussion.** The experiment has demonstrated that the change in polarizability anisotropy of the cell at the frequencies of 900 kHz and 2100 kHz, reflecting the state of cytoplasm and cytoplasmic membrane, respectively, is the earliest response to changes in vital indicators of bacterial culture in the process of cultivation. Thereby, the decrease in viability of *F. tularensis* cells occurrs well before the decrease in cell concentration. We have shown the preservation of viability of *F. tularensis* 15 NIIEG cells at all stages of experimental live tularemia vaccine production. Electro-optical analysis allows for registering the changes in vital parameters of microorganism cells in real-time mode, while the assessment of viability applying bacteriological method takes up to 5 days. Different stages of tularemia vaccine manufacturing have impact on the vital indicators of *F. tularensis* cells, and electro-optical analysis is a prospect method of control of such parameter as "Specific activity (the number of live microbial cells)".

Key words: Francisella tularensis, electro-optical analysis, live tularemia vaccine, specific activity.

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

Corresponding author: Oksana A. Volokh, e-mail: lhv@microbe.ru.

Citation: Volokh O.A., Borisova S.V., Bibikov D.N., Kuznetsova E.M., Samokhvalova Yu.I., Avdeeva N.G., Komissarov A.V., Nikiforov A.K. Electro-Optical Analysis of Cell Viability of Tularemia Microbe Vaccine Strain. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2020; 3:50–55. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-50-55
Received 18.03.20. *Revised* 13.05.20. *Accepted* 08.09.20.

Volokh O.A., ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3044-971X
Borisova S.V., ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3793-6526
Kuznetsova E.M., ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0441-9269
Komissarov A.V., ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1609-0384

Вакцинация является самым надежным способом профилактики туляремии. В настоящее время в РФ для специфической профилактики применяют туляремийную живую сухую вакцину, которая в 2011 г. приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 31.01.2011 № 51н включена в Национальный календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям. Ежегодно в России вакцинируют и ревакцинируют около 1 млн человек [1, 2].

Основным компонентом вакцины являются клетки вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ [3]. Производство вакцины представляет собой сложный многоступенчатый процесс, включающий получение жизнеспособных иммуногенных бактерий вакцинного штамма и приготовление из них готовой лекарственной формы – лиофилизата. Для реализации оптимального выхода бактериальной биомассы необходим комплексный контроль ферментации и качества получаемой бактериальной культуры. Качество препарата на стадиях его производства контролируется в соответствии с нормативной документацией, используются стандартные микробиологические и биологические методы. Но длительное время получения результата анализа, а также невозможность контролировать состояние бактериальной клетки является существенным недостатком данных методов. Постоянно совершенствуются и создаются новые методы производства и контроля препаратов [4, 5]. Внедрение новых инструментальных методов контроля, позволяющих оценивать основные параметры и физиологическое состояние бактериальной клетки, является перспективным направлением исследований.

Одним из новейших методов оценивания параметров развития культуры является электрооптический (ЭО) мониторинг. Его применение обладает рядом преимуществ. Использование электрооптического мониторинга позволяет производить измерения в режиме реального времени без специальной пробоподготовки. Воздействие электрического поля на клетки во время процедуры минимально и не приводит к их гибели, а влияние поддерживающей среды на точность измерения незначительно.

Метод электрооптического анализа основан на регистрации изменения анизотропии поляризуемости (АП) – оптических свойств микробной суспензии под влиянием переменного электрического поля. Воздействие электрического поля на культуру вызывает появление на клетках индуцированного диполя, связанного с перераспределением объемных и поверхностных зарядов. Их распределение и величина определяются действующим механизмом поляризуемости, который характеризуется появлением зарядов на границе раздела сред [6, 7]. Для живой клетки такой границей является поверхность соприкосновения цитоплазматической мембраны с внешней средой. К преимуществам электрооптического метода исследования можно отнести высокую чувствительность электрооптических характеристик к изменениям свойств клеток, обусловленных их метаболизмом, адсорбцией, взаимодействием с биологически активными веществами и химическими агентами, а также возможность проводить исследования, не повреждая и не разрушая клетки [8].

ЭО-анализ можно использовать для исследования изменений электрофизических и морфометрических параметров клетки. Ранее нами была исследована возможность использования результатов электрооптических измерений для оперативного определения изменения жизнеспособности клеток до и после внешних экстремальных воздействий, таких как воздействие антибиотиков и дезинфицирующих средств [9].

Целью настоящего исследования является изучение возможности применения электрооптического анализа для оценки жизнеспособности клеток вакцинного штамма туляремийного микроба на этапах культивирования, подготовки биомассы, получения и хранения лиофилизата, а также исследование изменений, происходящих с клетками *F. tularensis* в процессе культивирования.

Материалы и методы

В работе использовали вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученный из «Государственной коллекции патогенных бактерий». Выращивание проводилось на пластинках с FT-агаром на основе сухого рыбно-солевого агара с добавлением сухой глюкозо-витаминной добавки и селективной добавки pH 7,2 (ФБУН «ГНЦ ПМБ», п. Оболенск) и в жидкой питательной среде на основе гидролизата фибрина pH 7,2 [10]. Посевным материалом служила двухсуточная агаровая культура в концентрации 4 млрд клеток в мл. Выращивание производилось методом глубинного культивирования в течение (24±1) ч при температуре 37 °С и pH 7,2 при непрерывном перемешивании и аэрации, в качестве подпитки использовался раствор 40 % глюкозы. Этапы концентрирования и отмывки от питательной среды 0,86 % раствором NaCl проводили методом тангенциальной микрофильтрации по ранее описанной методике [5]. В качестве сред высушивания применяли сре-

ду желатино-глутаминовую (СЖГТ) и экспериментальную среду с хитозаном (ЭСВХ). Лиофилизацию проводили на лиофилизационной установке Martin Christ Epsilon 2-6D (Германия) [11]. Полученные серии экспериментальной живой туляремийной вакцины (ЭЖТВ) контролировали по показателям «жизнеспособность» и «степень диссоциации» [12]. Общую концентрацию клеток измеряли денситометрически при 590 нм, оценку жизнеспособности проводили высевом на пластинки с FT-агаром. Посевы выдерживали при 37 °С в течение 5 сут. Коэффициент жизнеспособности рассчитывали в % живых микробных клеток (ж.м.к.) с учетом концентрации и степени разведения высеваемой культуры. Степень диссоциации культуры контролировали на 5-е сутки после высева и через 24 ч после инкубации при ±4 °С.

Электрооптический мониторинг физиологического состояния бактериальных клеток проводили на полностью автоматизированной аналитической установке EloTrace (EloSystems, Германия). Измерения проводили на всех стадиях получения экспериментальной живой туляремийной вакцины. Пробоподготовка осуществлялась автоматически по стандартному протоколу аналитической установки: клетки автоматически отделялись от культурального бульона фильтрованием через целлюлозный фильтр с размером пор 0,45 мкм, концентрат клеток разбавлялся водой MilliQ с проводимостью 5 МКС·см$^{-1}$ до конечной оптической плотности OD600 = (0,1±5) % перед электрооптическим измерением. В основе электрооптического метода лежит поляризация частиц, суспендированных в низкопроводящей жидкости под воздействием переменного электромагнитного поля. Регистрируемым параметром является изменение оптических свойств суспензии бактериальных клеток под воздействием переменного электромагнитного поля в широком диапазоне частот. Основным измеряемым параметром являлась анизотропия поляризуемости (АП), измеряемая в условных единицах. EloTrace позволяет регистрировать АП в диапазоне частот электрического поля от 10 кГц до 40 МГц. Для измерения АП клеток использованы частоты 900 и 2100 кГц. Данные частоты отражают состояние цитоплазмы и цитоплазматической мембраны соответственно [7, 13].

Для измерения тесноты связи между жизнеспособностью и АП использовался линейный коэффициент корреляции Пирсона. Корреляционная связь между показателями считается сильной, если коэффициент Пирсона ≥ 0,7 [14].

Результаты и обсуждение

Процесс изготовления экспериментальной живой туляремийной вакцины состоял из нескольких стадий: культивирование; концентрирование; сведение со средами высушивания; лиофилизация; хранение при ±4 °С [5].

В ходе проведенного нами эксперимента изучено изменение размера клеток, показатели анизотропии поляризуемости и «жизнеспособность» клеток *F. tularensis* в культуре в зависимости от технологической стадии подготовки клеточной массы и лиофилизации.

Электрооптический мониторинг показал, что размер клеток составляет в среднем (1,2±0,1) мкм, что согласуется с данными, полученными ранее. Отмечена высокая степень корреляции между показателями АП клетки при частотах 900 и 2100 кГц, отражающих состояние цитоплазмы и цитоплазматической мембраны соответственно. Коэффициент корреляции Пирсона составил 0,98. Использование агаровой или бульонной культуры, замена питательной среды в клеточной суспензии на 0,86 % раствор NaCl, добавление сред высушивания (в т.ч. экспериментальных) не оказывали значительного влияния на данный показатель.

При сравнении жизнеспособности клеток *F. tularensis* на этапе сведения со средами высушивания отмечено, что после сведения с СЖГТ и ЭСВХ неотмытых клеток АП культуры повышается в среднем на 5–10 %. Стандартными методами микробиологического анализа подтверждено отсутствие повреждающего действия новых технологических приемов и экспериментальной среды высушивания на качество ЭЖТВ по показателям «жизнеспособность» и «степень диссоциации». Показатель «степень диссоциации» на этапах обработки биомассы (концентрирование, отмывка и сведение со средами высушивания) составлял в среднем (97±2) % колоний в SR-форме.

На рис. 1 можно заметить, что показатель АП цитоплазмы более лабилен, чем АП цитоплазматической мембраны, хотя динамика изменений обоих показателей соответствует кривой роста культуры. Спустя 6 ч АП достигает своего пика, а спустя 8 ч жизнеспособность культуры снижается, после чего снова происходит скачок (18 ч), а затем окончательное угнетение жизнеспособности. На рис. 2, где отображена оптическая плотность среды, так же заметны изменения, но с опозданием в 2 ч. Так, плотность среды достигает своего максимума лишь к 8 ч культивирования, после чего происходит уменьшение

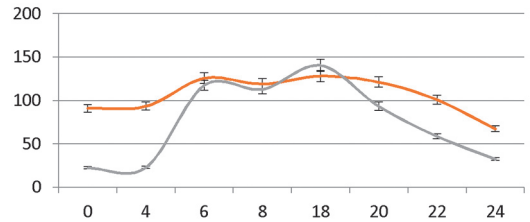

Рис. 1. Изменение анизотропии поляризуемости клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ в процессе глубинного культивирования на частоте 2100 кГц (красная линия) и 900 кГц (зеленая линия) с течением времени:

Ось ординат – показатель АП, ось абсцисс – время, ч

Fig. 1. Changes in polarizability anisotropy (PA) in *F. tularensis* 15 NIIEG cells during submerged cultivation at 2100 kHz (red line) and 900 kHz (green line) with time:

Y-axis – PA indicator, X-axis – time, h

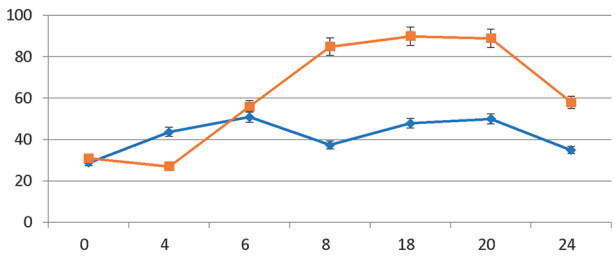

Рис. 2. Динамика показателей «концентрация» и «жизнеспособность» клеток вакцинного штамма в процессе глубинного культивирования:

Синяя линия – оптическая плотность при 650 нм ($\times 10^{-3}$), *красная* – жизнеспособность (К, %). Ось абсцисс – время, ч

Fig. 2. Dynamics of indicators "concentration" and "viability" of cells of the vaccine strain in the process of submerged cultivation:

Blue line – optical density at 650 nm ($\times 10^{-3}$), *red line* – viability (K, %). X-axis – time, h

плотности, а затем снова рост. Через 22 ч снова наступает снижение оптической плотности, достигая своего минимума к 24 ч. Таким образом, можно говорить о том, что ЭО-мониторинг «предсказывает» снижение клеточной массы, связанное, скорее всего, с недостатком питательных веществ.

В то же время можно отметить, что культуры туляремийного микроба с высокой жизнеспособностью (≥80 %) обладали большим показателем АП, при снижении жизнеспособности клеток значение их показателя АП уменьшалось, что согласуется с литературными данными [6, 7, 15].

На следующем этапе исследовали влияние условий концентрирования и лиофилизации на физиологическое состояние клеток туляремийного микроба. В таблице отображены анализируемые показатели культуры *F. tularensis* на основных этапах получения ЭЖТВ. Как известно, сведение со средой высушивания нужно для предотвращения разрушения клеток при замораживании, лиофилизации и длительном хранении за счет стабилизации конформационного состояния белковых молекул [16]. В то же время показатели АП в концентрированной и сведенной со средой высушивания биомассе уменьшались, несмотря на высокую жизнеспособность клеток. Это может быть связано со снижением поляризуемости бактериальной клетки при увеличении ионной силы раствора (соли в концентратах и в средах высушивания), что согласуется с литературными данными [17].

Влияние длительного хранения на лиофилизаты лабораторных серий ЭЖТВ изучали через 12 и 24 мес. хранения при +4 °С. Взято несколько лабораторных серий ЭЖТВ: 021 и 023 сделаны с использованием жидкой среды высушивания СЖГТ, а 022 и 024 – с использованием ЭСВХ. Сухую вакцину суспендировали в 5 мл 0,86 % раствора NaCl, после чего проводили измерение жизнеспособности культуры на электрооптическом анализаторе EloTrace при частоте 900 кГц.

На рис. 3 показано, что после 24 месяцев хранения показатель АП клеток *F. tularensis* снизился примерно на 30–35 %. Между сериями туляремийной вакцины наблюдаются незначительные колебания, которые не зависят от среды высушивания и от степени отмывки бактериальной массы.

На рис. 4 показана жизнеспособность культуры, которая измерялась бактериологическим ме-

Показатели физиологического состояния клеток вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ на этапах культивирования, концентрирования и сведения со средами высушивания

Indicators of physiological state of *F. tularensis* 15 NIIEG cells at the stages of cultivation, concentrating, and mixing with drying media

Проба Sample	Концентрация млрд м.к./мл Concentration, Bln mc/ml	Жизнеспособность К, % Viability K, %	Показатель АП PA indicator		Средний размер клеток, мкм Medium size of the cells, mkm
			900 кГц 900 kHz	2100 кГц 2100 kHz	
Инокулят (агаровая культура) Inoculate (agar culture)	4,8±0,5	30±1	22,4	90,83	1,1±0,01
Бульонная культура (лаг-фаза) Broth culture (Lag-phase)	6,2±0,5	27±1	23,07	93,39	1,3±0,03
Бульонная культура (лог-фаза) Broth culture (Log-phase)	26±1	85±1	112,95	119,17	1,9±0,04
Бульонная культура (поздняя лог-фаза) Broth culture (later log-phase)	29±1	90±1	140,4	127,98	1,1±0,01
Бульонная культура (стационарная фаза) Broth culture (Stationary phase)	30±1	89±1	93,31	121,16	1,2±0,01
Бульонная культура (фаза отмирания) Broth culture (die away phase)	20±1	58±1	32,41	67,25	1,3±0,03
Биомасса сконцентрированная «неотмытая» Concentrated "unwashed" biomass	100±1	99±1	48,19	28,84	1,1±0,02
Биомасса сконцентрированная «отмытая» Concentrated "washed" biomass	100±1	98±1	50,34	32,46	1,2±0,01
Биомасса + СЖГТ Biomass + gelatin-glutamine medium	25±1	99±1	78,05	33,41	1,5±0,1
Биомасса + ЭСВХ Biomass + experimental medium with chitosan	25±1	89±1	57,57	35,8	1,9±0,07

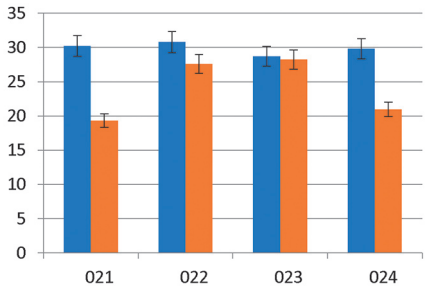

Рис. 3. Изменение анизотропии поляризуемости клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ после длительного хранения:

Столбцы: *синие* – 12 мес. хранения, *красные* – 24 мес. Ось абсцисс – образцы серий № 021, 022, 023, 024; ось ординат – показатель АП, измерение при 900 кГц

Fig. 3. Changes in polarizability anisotropy of *F. tularensis* 15 NIIEG cells after long-term storage:

Blue columns – 12 months of preservation, *red columns* – 24 months. X-axis – the samples of batches No 021, 022, 023, 024; Y-axis PA indicator, measured at 900 kHz

тодом. Установлено, что коэффициент жизнеспособности для всех анализируемых серий ЭЖТВ через 12–24 мес. хранения был более 40 %, что соответствует нормируемым показателям для живой туляремийной вакцины (не менее 40 %, согласно ФС.3.3.1.0019.15).

В процессе длительного хранения в течение срока, регламентированного для живой туляремийной вакцины, ЭЖТВ в высушенном состоянии жизненные показатели клеток *F. tularensis* практически не изменились, что говорит о том, что среды высушивания хорошо сохраняют специфическую активность препарата.

В ходе эксперимента показано, что метод электрооптического анализа гораздо быстрее реагирует на изменения жизненных показателей культуры клеток в процессе выращивания. Снижение жизнеспособности клеток *F. tularensis* происходило намного раньше, чем снижение оптической плотности среды. Кроме того, время, затраченное на проведение микробиологического анализа, составляет 5–6 сут, электрооптического мониторинга – 30–60 мин.

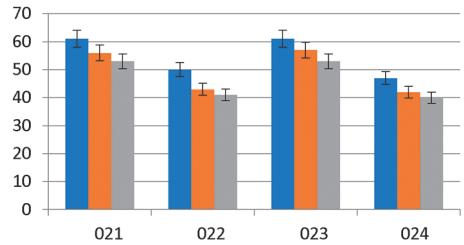

Рис. 4. Изменение показателя «жизнеспособность» экспериментальных серий ЭЖТВ в течение длительного хранения:

По оси ординат – К, %. Столбцы: синие – после сушки, красные – через 12 мес. хранения, зеленые – через 24 мес. хранения. Ось абсцисс – образцы серий № 021, 022, 023, 024

Fig. 4. Changes in viability indicator of experimental series of ELTV under long-term storage conditions:

Y-axis – K, %. *Blue columns* – after drying, *red columns* – after 12 months of storage, green ones – after 24 months of storage. X-axis – the samples of batches No 021, 022, 023, 024

Проведенные нами исследования показали перспективность применения метода электрооптического мониторинга для изучения особенностей физиологического состояния культуры клеток на разных стадиях роста бактериальной популяции в целом, для определения взаимодействия микроорганизмов с различными изменениями условий: отмывание, концентрирование, сведение со средами высушивания, длительное хранение. Разработка алгоритма проведения электрооптического мониторинга клеток штаммов-продуцентов вакцинных препаратов против опасных инфекционных заболеваний на модели туляремийного микроба является перспективной задачей дальнейшего исследования в данном направлении.

Таким образом, различные этапы получения туляремийной вакцины влияют на жизненные показатели клеток *F. tularensis*, а электрооптический анализ успешно регистрирует различные изменения жизненных показателей клеток микроорганизма в режиме реального времени. Разработка комплексного подхода к использованию новых инструментальных методов в сочетании со стандартными микробиологическими методами позволит упростить и ускорить этапы контроля состояния бактериальной культуры при внедрении новых технологических приемов культивирования, концентрирования и лиофилизации вакцинных штаммов.

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

Список литературы

1. Мещерякова И.С. Туляремия: современная эпидемиология и вакцинопрофилактика (к 80-летию создания первой туляремийной лаборатории в России). *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; 2(51):17–22.

2. Дятлов И.А., редактор. Туляремия: состояние проблемы и методы исследования. М.: Династия; 2019. 263 с.

3. Олсуфьев Н.Г., Дунаева Т.Н. Природная очаговость, эпидемиология и профилактика туляремии. М.; 1970. 272 с.

4. Касина И.В., Алексеева С.А., Бердникова З.Е., Немировская Т.И., Алехина А.С. Перспективы совершенствования экспертизы качества вакцины туляремийной живой. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017; 17(4):240–47.

5. Волох О.А., Комиссаров А.В., Антонычева М.В., Лобовикова О.А., Авдеева Н.Г., Вахрушина Н.И., Миронова Н.П., Бибиков Д.Н., Никифоров А.К. Совершенствование технологии получения живой туляремийной вакцины. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 3:81–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-81-84.

6. Bunin V.D., Ignatov O.V., Guliy O.I., Zaitseva I.S., O'Neil D., Ivnitski D. Electrooptical analysis of the Escherichia coli-phage interaction. *Anal. Biochem*. 2004; 328(2):181–6.

7. Junne S., Cruz-Bournazou M.N., Angersbach A., Gotz P. Electrooptical monitoring of cell polarizability and cell size in aerobic Escherichia coli batch cultivations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 2010; 37:935–42. DOI: 10.1007/s10295-010-0742-5.

8. Игнатов С.Г., Волошин А.Г., Бунин В.Д., Дятлов И.А. Электрооптический анализ в микробиологии. Серпухов: ФГУН ПМБ; 2007. 159 с.

9. Борисова С.В., Кузнецова Е.М., Ерохин П.С., Волох О.А. Применение нового инструментального метода для оценки функционального состояния клеток *Francisella tularensis* в стрессовых условиях. *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. 2019; 19(3):326–30.

10. Волох О.А., Антонычева М.В., Авдеева Н.Г., Вахрушина И.И., Никифоров А.К. Питательная среда для глубинного культивирования туляремийного микроба. Патент РФ № 2518282, опубл. 10.06.2014 г. Бюл. № 16.

11. Бибиков Д.Н., Комиссаров А.В., Волох О.А., Кузнецова Е.М., Никифоров А.К. Способ получения лиофилизата вакцины

туляремийной живой. Патент РФ № 2716505, опубл. 12.03.2020 г. Бюл. № 8

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

13. Волошин А.Г., Бунин В.Д., Веревкин В.В., Игнатов С.Г. Электрооптический анализ как средство контроля за внешними воздействиями на клетки. *Бактериология*. 2017; 2(4):46–9.

14. Унгуряну Т.Н., Гржибовский А.М. Корреляционный анализ с использованием пакета статистических программ STATA. *Экология человека*. 2014; 9:60–4.

15. Angersbach A., Bunin V., Ignatov O. Electrooptical analysis of bacterial cells. In: Molecular and Colloidal Electro-Optics. Stoylov and Stoimenova (eds.) Chapter 13. London, New York: Taylor&Francis, Boca Raton; 2006. P. 307–26. DOI: 10.1201/9781420009859.ch13.

16. Rey L., May J.C., editor. Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products. London: Informa Healthcare; 2010. 564 p.

17. Zhivkov A.M., Gyurova A.Y. High frequency electric polarizability of bacteria *E. coli*: dependence on the medium ionic strength. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 2008; 66(2):201–5. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2008.06.007.

References

1. Meshcheryakova I.S. [Tularemia: modern epidemiology and vaccinal prevention (on the 80th anniversary of establishing of the first tularemia laboratory in Russia)]. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika* [*Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2010; 2(51):17–22.

2. Dyatlov I.A., editor. Tularemia: the state of the problem and methods of study. Moscow: “Dinastiya”; 2019. 263 p.

3. Olsuf’ev N.G., Dunaeva T.N. Natural Focality, Epidemiology, and Prophylaxis of Tularemia. M.; 1970. 272 p.

4. Kasina I.V., Alekseeva S.A., Berdnikova Z.E., Nemirovskaya T.I., Alekhina A.S. [Prospects for improving evaluation of live tularemia vaccine quality]. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* [*BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]*. 2017; 17(4):240–47.

5. Volokh O.A., Komissarov A.V., Antonycheva M.V., Lobovikova O.A., Avdeeva N.G., Vakhrushina N.I., Mironova N.P., Bibikov D.N., Nikiforov A.K. [Enhancement of the technology for live tularemia vaccine production]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (3):81–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-81-84.

6. Bunin V.D., Ignatov O.V., Guliy O.I., Zaitseva I.S., O’Neil D., Ivnitski D. Electrooptical analysis of the Escherichia coli-phage interaction. *Anal. Biochem*. 2004; 328(2):181–6.

7. Junne S., Cruz-Bournazou M.N., Angersbach A., Gotz P. Electrooptical monitoring of cell polarizability and cell size in aerobic Escherichia coli batch cultivations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 2010; 37:935–42. DOI: 10.1007/s10295-010-0742-5.

8. Ignatov S.G., Voloshin A.G., Bunin V.D., Dyatlov I.A. [Electro-Optical Analysis in Microbiology]. Serpukhov; 2007. 159 p.

9. Borisova S.V., Kuznetsova E.M., Erokhin P.S., Volokh O.A. [Application of new instrumental method for the assessment of the functional state of *Francisella tularensis* cells under stressful conditions]. *Izvestiya Saratovskogo Universiteta. Novaya Seriya: Khimiya. Biologiya. Ekologiya [Bulletin of the Saratov University. New Series: Chemistry, Biology, and Ecology]*. 2019; 19(3):326–30.

10. Volokh O.A., Antonycheva M.V., Avdeeva N.G., Vakhrushina I.I., Nikiforov A.K. [Nutrient medium for submerged cultivation of tularemia microbe]. RF Patent No 2518282, Published on June 10, 2014. Bulletin No 16.

11. Bibikov D.N., Komissarov A.V., Volokh O.A., Kuznetsova E.M., Nikiforov A.K. [Method for the production of lyophilizate of live tularemia vaccine]. RF Patent No 2716505, published on March 12, 2020. Bulletin No 8.

12. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases: Practice Guidelines]. Moscow: “Shiko” CJSC; 2013. 560 p.

13. Voloshin A.G., Bunin V.D., Verevkin V.V., Ignatov S.G. [Electro-optical analysis as a means of control over external effects on cells]. *Bakteriologiya [Bacteriology]*. 2017; 2(4):46–9.

14. Unguryanu T.N., Grizhebovsky A.M. [Correlation analysis using STATA]. *Ekologiya Cheloveka [Human Ecology]*. 2014; 9:60–4.

15. Angersbach A., Bunin V., Ignatov O. Electrooptical analysis of bacterial cells. In: Molecular and Colloidal Electro-Optics. Stoylov and Stoimenova (eds.) Chapter 13. London, New York: Taylor&Francis, Boca Raton; 2006. P. 307–26. DOI: 10.1201/9781420009859.ch13.

16. Rey L., May J.C., editor. Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products. London: Informa Healthcare; 2010. 564 p.

17. Zhivkov A.M., Gyurova A.Y. High frequency electric polarizability of bacteria *E. coli*: dependence on the medium ionic strength. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 2008; 66(2):201–5. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2008.06.007.

Authors:

Volokh O.A., Borisova S.V., Bibikov D.N., Kuznetsova E.M., Samokhvalova Yu.I., Avdeeva N.G., Komissarov A.V., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Волох О.А., Борисова С.В., Бибиков Д.Н., Кузнецова Е.М., Самохвалова Ю.И., Авдеева Н.Г., Комиссаров А.В., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.