

## Экспериментальная адаптация вакцинного штамма чумного микроба к процессу лиофилизации

Н. В. Лопатина<sup>1</sup> (Natalija.Kozhanova2016@yandex.ru), Б. Н. Мишанькин<sup>2</sup>

DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-3-51-56

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Ростовский-на-Дону государственный медицинский университет»  
Минздрава России

<sup>2</sup> ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

### Резюме

Применение лиофилизации в качестве способа стабилизации свойств живой сухой чумной вакцины сопровождается уменьшением количества микробных клеток *Yersinia pestis* EV под влиянием испытанного ими стресса. Количество микробных клеток в лиофилизированных живых вакцинах, даже без нарушения режима хранения при низких температурах ( $4 \pm 2 - 6 \pm 2$  °C), постепенно снижается в результате отмирания живых клеток микроорганизмов, составляющих их основу. Целью настоящей работы стало повышение устойчивости вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ к лиофилизации с помощью разных методических подходов: использование самого процесса лиофилизации в качестве селекционирующего фактора; селекция устойчивых клонов из популяций одно-, дву- и трехкратно лиофилизированных культур; культивирование штамма при низких температурах ( $4 \pm 2 - 6 \pm 2$  °C). Показано, что после повторной и трехкратной лиофилизации, устойчивость штамма *Yersinia pestis* EV к этому процессу повысилась в 3–3,5 раза. Клональная селекция дважды лиофилизированного варианта способствовала выявлению устойчивых клонов и закреплению у них этого свойства. Экспериментальные серии вакцины, изготовленные на основе селекционированных клонов, обладали повышенной иммуногенностью, высокой термостабильностью и более длительными сроками хранения (в 2–2,3 раза). Получен психрофильный вариант штамма *Y. pestis* EV 37/28/20/5-expr., который приобрел более высокую устойчивость к лиофилизации, чем референтный. Количество выживших после лиофилизации клеток психрофильного варианта по отношению к коммерческому штамму *Y. pestis* EV было значительно выше (в 2 и более раз). Таким образом, экспериментально подтверждена возможность получения живой сухой вакцины EV более высокого качества с помощью изложенных в работе способов селекции. Эффективность этих способов создает предпосылки для дальнейшего изучения полученных вариантов *Y. pestis* EV и возможности их применения в производстве чумной вакцины.

**Ключевые слова:** селекция, штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, клон, иммуногенность, термостабильность, психрофильность

**Для цитирования:** Лопатина Н. В., Мишанькин Б. Н. Экспериментальная адаптация вакцинного штамма чумного микроба к процессу лиофилизации. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2018; 17 (3): 51–56. DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-3-51-56

### Experimental Adaptation of a strain of the plague microbe to lyophilization process

N. V. Lopatina<sup>1</sup> (Natalija.Kozhanova2016@yandex.ru), B. N. Mishankin<sup>2</sup>

DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-3-51-56

<sup>1</sup>Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

<sup>2</sup>Rostov-on-Don anti-plague Institute, Rostov-on-Don, Russia

### Abstract

The use of lyophilization as a means of preserving commercial properties of the dried live plague vaccine is closely linked to a number of resistant microbial cells surviving in the preparation after microbial population exposure to such stress action. Lyophilized live vaccine efficiency, even without violation of storage rules at low temperatures ( $4 \pm 2 - 6 \pm 2$  oC), decreases gradually due to death of live cells of microorganisms forming the base of a vaccine. Aim: The aim of this study was to enhance resistance of the reference vaccine strain *Yersinia pestis* EV of NIEEG lineage to freeze-drying in vacuum (lyophilization) by different techniques: the use of lyophilization process per se as a selection factor, resistant clone selection from populations of strains which underwent single, double and triple lyophilization, strain culturing at low temperatures ( $4 \pm 2 - 6 \pm 2$  °C). Summary and conclusion: It was demonstrated that after double and triple lyophilization the *Y. pestis* EV strain resistance to the process increased by 3–3.5 times. Clonal selection of twice and three times lyophilized variant facilitated detection of resistant clones and stabilization of this property. The clones selected were characterized by increased immunogenicity, high heat stability, as well as by increased duration of vaccine efficiency (by 2.3 times). A psychrophilic variant of *Y. pestis* EV strain was obtained in vitro acquiring higher resistance to lyophilization (in 2 times or more) in comparison with the reference strain. The number of psychrophilic variant cells surviving post-lyophilization was higher in comparison with the commercial strain. Thus the methods used in this study for selection of strains and clones with the highest resistance to lyophilization from *Y. pestis* EV reference strain population showed a significant potential for quality improvement of dried live plague vaccine. So, the possibility of receiving of a vaccine of more high quality by means of the ways of selection explained in our work is experimentally confirmed. Effectiveness of these ways creates prerequisites for their use in production of a live plague vaccine.

**Key words:** selection, strain, clone, immunogenicity, heat stability, psychrophility

**For citation:** Lopatina N. V., Mishankin B. N. Experimental Adaptation of a Strain of the Plague Microbe to Lyophilization Process. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2018; 17 (3): 51–56. DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-3-51-56 (in Russian)

### Введение

Микробные популяции в силу своей естественной изменчивости генетически и фенотипически неоднородны [1, 2]. Меняя условия культивирования или состав питательной среды, можно сдвинуть в ту или иную сторону температурные границы роста подавляющего числа микроорганизмов [3–5], стимулировать биосинтез ферментов [6], регулировать экспрессию генов, кодирующих белки холодового и теплового шока [7, 8].

Многими исследователями выявлена способность чумного микроба *Yersinia pestis* и *Yersinia pestis* EV репродуцироваться на питательных средах в широком диапазоне температур [9–11]. Доказано, что снижение температуры культивирования с 27 до 21 °С стимулирует рост вакцинного штамма чумного микроба EV в жидкой питательной среде и способствует увеличению биомассы микробных клеток перед лиофилизацией [12]. При лиофилизации микробная популяция теряет значительный процент клеток в результате разрушения клеточных структур под влиянием стрессовых факторов, в основном, в результате образования ледяных кристаллов внутри клеток на этапе низкотемпературного замораживания [13].

Поэтому поиск новых методических подходов к получению устойчивых к лиофилизации микробных клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, повышение их иммуногенности и термостабильности остается актуальной задачей.

**Цель исследования** – получение высокоустойчивых к лиофилизации вариантов *Yersinia pestis* EV с использованием различных методических приемов и изучение их протективных свойств.

### Материалы и методы

В эксперименте был использован вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, применяемый для производства коммерческих серий живой чумной вакцины. Штамм обладал типичными морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами. Иммуногенность и термостабильность соответствовали установленным нормативам. Экспериментальные серии вакцины готовили с использованием защитной среды СЖТ (сахароза, желатина, тиомочевина, pH 7,4). Определение иммуногенности проводили по стандартной методике.

Для определения термостабильности экспериментальных серий вакцины использовали экспресс-метод Вант-Гоффа: экспериментальные серии вакцинного препарата помещали в три температурных режима (температура 37 °С – экспозиция 14 суток; температура 47 °С – экспозиция 4 суток; температура 57 °С – экспозиция 2 суток) [14].

Штамм культивировали на плотной питательной среде «СО», состоящей из автолизата селезенки – 15–16 г/л, гидролизата белка пшеничных отрубей – 5–6 г/л, хлористого натрия – 0,1–0,5 г/л, сернокислого натрия – 0,001–0,1 г/л, агара

японского пластинчатого или Корсаковского – 1,5–2,0 г/л, воды дистиллированной – до 1 литра.

Лиофильное высушивание микробных суспензий культур штамма *Y. pestis* EV и его клонов осуществляли на камерной лиофильной установке LZ-9CP фирмы FRIGERA A. S. (Чешская Республика). Замораживание проводили путем погружения ампул с суспензией в охлажденный до  $-50 \pm 2$  °С этиловый спирт, после чего выдерживали в низкотемпературном столе HC 280/75 фирмы FRIGERA A. S. (Чешская Республика) при температуре  $-50 \pm 2$  °С. Высушивание материала осуществляли на установке LZ-9CP. Загрузку образцов проводили при температуре  $-50$  °С, выдерживая такую температуру для продукта и кассеты. Подогрев начинали через 2 часа при температуре продукта  $-20$  °С, режим подогрева минимальный, скорость подогрева  $-5$  °С/в минуту, длительность сушки 18 часов.

Селекция по признаку устойчивости клеток *Y. pestis* EV к лиофилизации была проведена с использованием различных методических приемов:

- путем предложенного авторами метода последовательной (2–3-кратной) лиофилизации культуры *Y. pestis* EV, при реализации которого сам процесс лиофилизации служил фактором отбора устойчивых вариантов;
- клонированием дважды и трижды лиофилизированной культуры *Y. pestis* EV и дальнейшего исследования клонов по степени их устойчивости к лиофилизации, иммуногенности и термостабильности;
- культивированием штамма *Y. pestis* EV в условиях низких температур (4–6 °С) с целью адаптации его к процессу лиофилизации.

На первом этапе исследований штамм подвергали одно-, дву-, трехкратной последовательной лиофилизации. Для этого после каждой лиофилизации двухсуточные культуры, полученные на агаре «СО» при 28 °С, в концентрации 70–80 млрд/мл, суспендировали в защитной сахарозо-желатиновой среде с тиомочевинной (СЖТ), pH 7,4. Суспензию (по 2 мл в ампуле) лиофилизировали. Лиофилизированные культуры регидратировали физиологическим раствором и определяли количество жизнеспособных микробных клеток в 1 мл суспензии (млрд/мл) и КОЕ.

На втором этапе изучали популяционный состав исходного, одно-, дву- и трехкратной лиофилизированных штаммов по степени устойчивости субкультур к лиофилизации. Каждую колонию (2-я генерация) высевали на агар «СО» с последующей лиофилизацией в защитной среде «СЖТ». Устойчивость каждой субкультуры оценивали числом жизнеспособных клеток, оставшихся в живых после лиофилизации. Устойчивыми считали субкультуры, с числом клеток в 2–5 раз превосходящие контрольный (однократно лиофилизированный) штамм. Наиболее устойчивые субкультуры повторно клонировали, каждый клон лиофилизировали

и отбирали наиболее устойчивый субклон. Эту процедуру повторяли до стабилизации устойчивости клонов. На основе дву- и трехкратно лиофилизированных культур, и селекционированных из их популяций клонов с повышенной устойчивостью к лиофилизации, готовили экспериментальные серии вакцинных препаратов, которые исследовали на жизнеспособность, иммуногенность и термостабильность. Исследовано 390 клонов.

В целях получения психрофильных вариантов штамма *Y. pestis* EV была проведена серия опытов, в которых штамм на протяжении 4-х лет культивировали на агаре Хоттингера, pH 7,4 в условиях низких температур (+4 – +6 °C). Через 15–30 суток роста культуру пересеивали на свежий агар Хоттингера и помещали в указанные температурные условия. Динамику роста и морфологию колоний наблюдали ежедневно. Лيوфилизации подвергали культуры 14–15 дневного возраста, находящиеся в стационарной фазе роста.

Статистическую обработку результатов проводили путем определения среднего квадратического отклонения ( $\delta$ ) от средней величины, полученной в 3-х опытах [15].

### Результаты исследования и их обсуждение

Влияние кратности лиофилизации на число жизнеспособных клеток штамма *Y. pestis* EV представлено в таблице 1.

Однократно лиофилизированная популяция штамма оказалась более устойчивой к повторному процессу лиофилизации. Количество живых микробных клеток в биомассе экспериментального препарата после повторной лиофилизации увеличилось более чем в 3 раза, а после трехкратной практически оставалось на уровне, полученном после двукратной лиофилизации. Количество колониеобразующих единиц штамма после повторной и трехкратной лиофилизации значительно возросло. Подвергшиеся однократно лиофилизации к стрессу клетки *Y. pestis* EV приобрели способность

более интенсивно репродуцироваться на питательной среде в условиях последующего культивирования. Причем, скорость их репродукции также увеличилась. Это приобретенное свойство, повидимому, связано с явлением гормезиса, активирующего адаптивные свойства клетки на стресс-реакции, в данном случае, у *Y. pestis* EV [16–18]. Многие авторы связывают эту способность микроорганизмов разных токсеномических групп с биосинтезом белков – протекторов, стабилизирующих макромолекулы микроорганизмов и усиливающих их гидрофобные свойства [19, 20].

Популяционный анализ однократно, дву- и трехкратно лиофилизированных культур *Y. pestis* EV с последующим отбором устойчивых к лиофилизации клонов показал, что по этому признаку популяции чрезвычайно неоднородны.

Число устойчивых к лиофилизации клонов в одно-, дву- и трехкратно лиофилизированных популяциях штамма *Y. pestis* EV было различным: в однократно лиофилизированных культурах процент устойчивых вариантов составлял – 7,5, двукратно – 17,5, трехкратно – 12,5. Количество устойчивых к лиофилизации клонов повышалось уже после двукратной лиофилизации штамма. Дальнейшее увеличение кратности лиофилизации исходной культуры (более 3-х раз) не приводило к существенному росту числа клеток до и после лиофилизации.

Из общего числа устойчивых клонов (двукратно лиофилизированной популяции) отобрано четыре варианта, проявивших наибольшую устойчивость к последующей лиофилизации. Результаты анализа иммуногенности препаратов, приготовленных на основе селекционированных штаммов и клонов, представлены в таблице 2.

Иммуногенный клон 37, выделенный из популяции двукратно лиофилизированного штамма, отобран для дальнейшей селекции с целью закрепления свойства устойчивости к лиофилизации. Из его популяции получен еще более устойчивый

Таблица 1.

**Количество микробных клеток в экспериментальном препарате, приготовленном на основе одно-, дву- и трехкратно лиофилизированных культур *Y. pestis* EV**  
*The number of microbial cells in the experimental preparation prepared on the basis of one-, two- and threefold lyophilized cultures of *Y. pestis* EV*

| Экспериментальные серии вакцины на основе разной частоты лиофилизации штамма<br>Experimental vaccine series based on a different frequency lyophilization of the strain | Количество живых микробных клеток (млрд/мл)<br>Number living microbial cells (bn/ml) | КОЕ – количество живых микробных клеток<br>CFU – the number of living microbial cells |  | %    |
|---|--|---|--|------|
|   |  | до лиофилизации<br>before lyophilization  | после лиофилизации<br>after lyophilization |      |
| Однократно (контроль)<br>One time (control)   | 8,9 ± 1,2  | 44,5 ± 3,1  | 21,3 ± 4,1                                 | 17,9 |
| Двукратно<br>Twice  | 25,7 ± 0,9   | 89 ± 3,2  | 57,2 ± 5,8                                 | 64,3 |
| Трехкратно<br>Threefold   | 24,8 ± 1,3   | 87,4 ± 2,5  | 59 ± 4,1                                   | 67,5 |

Таблица 2.

**Иммуногенные свойства экспериментальных препаратов, приготовленных на основе селекционированных вариантов *Y. pestis* EV**  
*Immunogenic properties of experimental drug prepared on the basis of the selected variants of *Y. pestis* EV*

| Вид препарата<br>Type of drug  | Иммуногенность, ЕД <sub>50</sub><br>Immunogenicity ED <sub>50</sub> |                                       |
|--|---|---------------------------------------|
|  | Для белых мышей<br>For white mice                                   | Для морских свинок<br>For guinea pigs |
| Однократно лиофилизированный штамм, контроль<br>Once lyophilized strain, control | 11170 (8102–18620)  | 5797 (1990–10000)                     |
| Двукратно лиофилизированный штамм<br>Twice lyophilized strain                    | 14500 (6481–32410)  | 4898 (1896–9989)                      |
| Трехкратно иммунизированный штамм<br>Threefold lyophilized strain                | 7254 (3244–16220)   | 7634 (3425–18032)                     |
| Селекционированный клон 14<br>A selective clone                                  | 1903 (851–4256)   | –                                     |
| Клон 37<br>Clone 37  | 637 (334–1674)  | –                                     |
| Клон 38<br>Clone 38  | 2130 (952–4762)   | –                                     |
| Клон 37/28/20/5 клон exp.<br>Clone 37/28/20/5 clone exp.                         | 279 (56–1396)   | –                                     |

Примечание: (–) – опыты не проводились.

субклон 37/28, из популяции этого субклона получен клон 37/28/20, а из последнего – 37/28/20/5-exp. Жизнеспособность клеток полученного клона *Y. pestis* EV exp. в экспериментальных сериях препарата после лиофилизации в два и более раз превышала соответствующий показатель однократно лиофилизированного штамма и составляла соответственно  $57,2 \pm 5,8$  против  $21,3 \pm 4,1$  КОЕ. При пятикратной проверке все экспериментальные серии препаратов, разработанные на основе селекционированных штаммов и клонов, сохраняли иммуногенные свойства, а в некоторых случаях превышали исходный уровень (клоны 37, 38, 14 и 38/28/20/5-exp). Препараты, приготовленные на основе двукратно лиофилизированных штаммов и селекционированных клонов, отличались от исходного варианта не только по степени жизнеспособности и иммуногенности, но и по термостойкости (табл. 3).

Отмечено повышение термостабильности экспериментальных серий препаратов, приготовленных на основе дву- и трехкратно лиофилизированных штаммов, и клона 37/28/20/5-exp. по сравнению с контрольными сериями. Наиболее устойчивым в процессе хранения оказался препарат, изготовленный на основе селекционированного клона *Y. pestis* EV, 37/28/20/5-exp. По-видимому, в процессе проведения культуры через 2–3 последовательных лиофилизации в популяции погибают клетки, не способные противостоять лиофилизационному стрессу, который является индуктором повышенного размножения оставшихся в живых клеток на плотной питательной среде. Выжившие после лиофилизации (гормесис)

клетки включают адаптационные к стрессовым условиям механизмы. Большое значение в адаптационных стратегиях клетки занимает экспрессия более половины генов, включая гены, кодирующих белки холодового и теплового шока, синтез «холодовых» изоферментов и запуск всего механизма модуляции текучести мембран, ассоциированных со спектром жирных кислот [21, 22].

Адаптация культур штамма *Y. pestis* EV к низким температурам культивирования (+4 – +6 °C) проводилась с целью повышения его устойчивости преимущественно к первому этапу лиофилизации – этапу замораживания микробной суспензии. Через 4 года низкотемпературного культивирования на агаре Хоттингера с пересевами через каждые через 15 – 30 суток роста штамм *Y. pestis* EV приобрел свойство психрофильности: он более интенсивно репродуцировался при температуре +4 – +6 °C, чем не адаптированный исходный вариант. У адаптированного штамма начальный рост колоний появлялся на 4–5-е сутки, в то время как исходный штамм начинал свой рост на 7–8, причем, величина колоний психрофильного варианта была в 5 раз больше. Стационарная фаза роста адаптированного штамма удерживалась на протяжении 14 дней и более. Из 1000 колоний в условиях низкотемпературного выращивания репродуцировалось 356 КОЕ психрофильного варианта и 139 – исходного. Выживаемость клеток в экспериментальном биопрепарате, приготовленном на основе психрофильного варианта вакцинного штамма, до лиофилизации составляла  $43,3 \pm 1,7$ , после лиофилизации  $30,0 \pm 1,4$ , в то время как

Таблица 3.

Показатели термостабильности экспериментальных препаратов, приготовленных на основе лиофилизированных культур штамма *Y. pestis* EV, и прогнозируемые сроки их хранения

Indicators of thermostability of experimental preparations prepared on the basis of lyophilized cultures of the *Y. pestis* EV strain, and the predicted shelf life

| Вид препарата<br>Type of drug   | Показатель термостабильности<br>(сутки) при 37 °С<br>The indicator of thermal stability<br>(day) at 37 °C | Прогноз сроков хранения<br>препарата (год)<br>Forecast of the shelf life of the drug<br>(year) |
|---|---|--|
| На основе однократно лиофилизированного штамма<br>Based on a once-lyophilized strain              | 4,08  | 3,6  |
| На основе двукратно лиофилизированного штамма<br>Based on a twice-lyophilized strain              | 9,0   | 4,3  |
| На основе трехкратно лиофилизированного штамма<br>Based on a triply lyophilized strain            | 13,2  | 7,3  |
| На основе селекционированного клона 37/28/20/5-exp.<br>Based on the selected clone 37/28/20/5-ex. | 14,4  | 8,3  |

Примечание: термостабильность – время в сутках, в течение которого в препарате содержится 50% клеток от исходного числа.

в препарате на основе исходного штамма, соответственно,  $57,0 \pm 2,8$  и  $25,1 \pm 3,1$ . Следовательно, показатель выживших после лиофилизации клеток психрофильного штамма по отношению к их исходному количеству составил – 69,2%, а мезофильного варианта всего – 44,0%. Адаптированный к низким температурам вариант *Y. pestis* EV проявил значительно более высокую устойчивость к замораживанию и высушиванию в условиях вакуума, чем неадаптированный штамм, что согласуется с данными ранее приведенных авторов [5, 9, 10, 11], получивших более высокую урожайность культуры *Y. pestis* EV при снижении температуры культивирования с 27 до 21 °С. Аналогичные приемы, связанные с понижением температуры культивирования вирусов гриппа, были предприняты Ю. З. Гендоном с соавт. [16] и Л. М. Цыбаловой с соавт. [23]. Полученные ими результаты свидетельствуют о значительном преимуществе холодо-адаптированных штаммов вируса гриппа в качестве доноров аттенуации и высокой продуктивности в производстве новых противогриппозных вакцин.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что существуют большие резервы повышения эффективности живой сухой чумной вакцины. Значительно (в 2–3 раза) повышается число устойчивых к лиофилизации микробных клеток в экспериментальном препарате после двукратной и трехкратной последовательной лиофилизации штамма. Селекция на клоновом уровне способствует закреплению этого свойства. Параллельно с повышением устойчивости к лиофилизации препараты, изготовленные на основе трех последовательно лиофилизированных штаммов *Y. pestis* EV сохранили иммуногенные свойства, а селекционированные клоны – 37/28/20/5-exp,

37 и 38 приобрели повышенную иммуногенность. У всех полученных вариантов штамма *Y. pestis* EV повысилась термостабильность, а прогнозируемые сроки их хранения увеличились более чем в 2 раза.

Таким образом, в условиях эксперимента подтверждена возможность получения экспериментальных серий живой сухой вакцины EV более высокого качества с помощью изложенных в работе методов селекции. Эффективность этих способов создает предпосылки для дальнейшего изучения полученных вариантов *Y. pestis* EV и определения возможности их использования в производстве живой сухой чумной вакцины.

### Выводы

1. Используемые в опыте экспериментальные подходы к адаптации штамма EV чумного микроба к лиофилизации (2–3-кратная последовательная лиофилизация штамма и последующее их клонирование) оказались достаточно эффективными. С их помощью удалось получить экспериментальные серии вакцины более высокого качества с повышенной иммуногенностью и более длительными сроками хранения.
2. Экспериментальная адаптация штамма *Y. pestis* EV к низким температурам культивирования (4–6 °С) позволила повысить его устойчивость к стрессовым воздействиям.
3. В результате комплексного подхода (селекция на штаммовом и клоновом уровнях) отобран клон 37/28/20/5-exp., обладающий повышенной, по сравнению с исходным штаммом, продуктивностью, термостабильностью и иммуногенностью. Приобретенные свойства полученного клона сохранялись после его пятикратных пересевов.

### Литература

1. Бухарин О. В., Гинцбург А. Л., Романова Ю. М., Эль-Регистан Г. И. Механизмы выживания бактерий. Москва: Медицина, 2005: 367.
2. Achtman M. Population structure of pathogenic bacteria revisited. Inf. J. Med. Microbiol. 2004; 294 (2): 67–73. DOI: 10.1186/1471-2180-9-50.

- Андрюков Б. Г., Сомова Л. М., Тимченко Н. Ф. Жирные кислоты как объект исследования температурных адаптационных стратегий микроорганизмов-психрофилов. *Здоровье. Экология. Мед. экология, Наука*. 2015; 61 (3): 43–49.
- Шеремет О. В., Корганов А. Н., Шатова И. Н. Иммуногенность чумного микроба, выращенного на некоторых питательных средах при 28 °С и 37 °С. *ЖМЭИ*. 1987; 4 (62): 63–68.
- Будыка Д. А., Абзаева Н. В., Гостищева С. Е., Ракитина Е. Л., Иванова Г. И., Фисун А. А. Биотехнология стабилизации живых микроорганизмов в биомассе и в препарате чумной вакцины. *Инфекция и иммунитет*. 2016; 1 (6): 87–92.
- Водопьянов С. О., Кадетов В. В., Олейников И. Л., Мишанькин Б. Н. Различные пути реализации ответа на тепловой и холодовой стресс у *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*. *Биотехнология*. 1997; 3: 14–17.
- Delihans N. Regulating the regulator: MicF RNA controls expression of the global regulator Lrp. *Molecular Microbiology* 2012; 84: 401–404. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08030.x. PMID: 22380658.
- Kamatsu Ya., Kaul SC, Iwahashi Yi, Obuchi K. Do heat shock proteins provide protection against freezing. *FEMS Microbiol. Let.* 1990; 72 (1–2): 159–162.
- Бренева Н. В., Марамович А. С., Климов В. Т. Экологические закономерности существования патогенных иерсиний в почвенных экосистемах. *ЖМЭИ*. 2005; 6: 82–88.
- Абзаева Н. В. Повышение жизнеспособности *Y. pestis* EV в биомассе вакцины. Дис. ... канд. биол. наук. Ставрополь; 2010: 122.
- Иванова Г. Ф., Будыка Д. А., Абзаева Н. В. Сравнительное изучение эффективности противочумных вакцин, полученных из биомасс, выращенных при температуре (21 ± 1 °С). Сб. науч. трудов. Ставрополь. 2007; 2: 186–188.
- Будыка Д. А., Абзаева Н. В., Гостищева С. Е., Ракитина Е. Л., Иванова Г. Ф., Фисун А. А. Биотехнология стабилизации живых микроорганизмов в биомассе и препарате чумной вакцины. *Инфекция и иммунитет*. 2016; 6 (1): 87–92.
- Tindall B. J. Vacuum drying and cryopreservation of prokaryotes. *Methods Mol. Biol.* 2007; 110: 36–40. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2-5.
- Методика определения термостабильности живых сухих чумных вакцин и прогнозирования их жизнеспособности в процессе хранения. Ставрополь; 1985: 11.
- Ефимова М. П., Петрова Е. В., Румянцев В. Н. Общая теория статистики: Учебник. Москва: ИНФА-М, 2013: 416.
- Воробьева Л. И., Ходжаев Е. Ю., Новикова Т. М., Мулюкин А. Л., Чудинова Е. М., Эль-Регистан Г. И. Стрессопротекторное и перекрестное действие внеклеточного реактивирующего фактора микроорганизмов, доменов бактерий, архей и эукариот. *Микробиол.* 2013; 82 (5): 588. DOI: 10.7868.5002635613050169.
- Kouda K, Iki M. Beneficial effects of mild stress (hormetic effects): dietary restriction and health. *J. Physiol. Anthropol.* 2010; 29: 127–132.
- Calabrese EJ, Mattson MP, Calabrese V. Resveratrol commonly displays hormesis: occurrence and biomedical significance. *Hum. Exp. Toxicol.* 2010; 29: 980–1015.
- Горячая И. П., Зинченко В. Д., Буряк И. А. Устойчивость мембран дрожжей *S. cerevisiae* к холодовым воздействиям в условиях окислительного стресса. *Науч. ведомости. Серия Естественные науки*. 2014; 3 (26): 72–78.
- Shapiro RS, Cowen LE. Thermal control of Microbial development and virulence: Molecular mechanisms of microbial temperature sensing. *МБИО*. 2013; 3 (5): 8–12. DOI: 10.1128/mBio00238-13.
- Андрюков Б. Г., Сомова Л. М., Тимченко Н. Ф. Жирные кислоты как объект исследования температурно-адаптационных стратегий микроорганизмов-психрофилов. *Здоровье, медицинская экология, наука*. 2015; 61 (3): 43–49.
- Павлова И. Б., Ленченко Е. М., Кононенко А. Б. Влияние температурного фактора на популяционную изменчивость *Yersini*. Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2004; 5: 41–44.
- Гендон Ю. З., Маркушин С. Г., Цфасман Т. М., Аكوпова И. И., Ахматова Н. К., Коптяева И. Б. Новые холодадаптированные штаммы-доноры аттенуации для живых вакцин против гриппа. *Вопросы вирусологии*. 2013; 1 (58): 11–17.
- Цибалова Л. М., Горев М. Е., Потапчук М. В., Репко И. А., Коротков А. В. и др. Характеристика холодадаптированных штаммов вируса гриппа А (Гонконг) 1/68/162/35 как потенциального донора аттенуации и высокой продуктивности. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57 (6): 13–17.

## References

- Bukharin O. V., Ginzburg A. L., Romanov Y. U., El-Registan G. I. Mechanisms of survival of bacteria. *Moscow: Medicine*; 2005: 367 (in Russian).
- Achtman M. Population structure of pathogenic bacteria revisited. *Inf. J. Med. Microbiol.* 2004; 294 (2): 67–73. DOI: 10.1186/1471-2180-9-50.
- Andryukov B. G., Somova L. M., Timtchenko N. F. Fatty acids as an object of study of the temperature-adaptation strategies psychrophiles microorganisms. *Zdorovje. Medicinskaya ekologiya. Nauka. [Health. Medical ecology. Science]*. 2015; 61 (3): 43–49 (in Russian).
- Sheremet O. V., Korганov A. N., Shatova I. N. The immunogenicity of the plague microbe, vyraschennogo some nutrient media at 28°C and 37 °C. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii. [Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology]*. 1987; 4 (62): 63–68 (in Russian).
- Budyka D. A., Abzaeva N. V., Gostischeva S. E., Rakitin E. L., Ivanova G. I., Fison A. A. Biotechnologiya stabilizatsii zhivykh mikroorganizmov v biomasе i v podgotovke vaktsiny. *Infektsiya i immunitet. [Russian Journal of Infection and Immunity]*. 2016; 1 (6): 87–92 (in Russian).
- Vodopianov S. O., Cadets V. V., Oleynikov I. L., Mishankin B. N. Different ways realizatsii response to heat and cold stress at and *Y. pseudotuberculosis Y.pestis*. *Biotechnologiya. [Biotechnology]*. 1997; 3: 14–17 (in Russian).
- Delihans N. Regulating the regulator: MicF RNA controls expression of the global regulator Lrp. *Molecular Microbiology* 2012; 84: 401–404. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08030.x. PMID: 22380658.
- Kamatsu Ya, Kaul SC, Iwahashi Yi, Obuchi K. Do heat shock proteins provide protection against freezing. *FEMS Microbiol. Let.* 1990; 72 (1–2): 159–162.
- Breneva N. B., Maramovich A. S., Klimov V. T. Environmental regularities of existence of pathogenic *Yersinia* in soil ecosystems. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii. [Journal of Microbiology Epidemiology and Immunobiology]*. 2005; 6: 82–88 (in Russian).
- Abzaeva N. V. Improving the viability of *Y. pestis* EV in biomass vaccine. *Doctorate of med. sci. diss. Stavropol*; 2010: 122 (in Russian).
- Ivanova G. F., Budyka D. A., Abzaeva N. V. Comparative study of the efficiency of pro-tivo-chumnyh.vaktsin derived from the biomass grown at a temperature (21 ± 1) °C. *Sbornik nauchnykh трудов. [Collection of scientific papers]*. Stavropol. 2007; 2: 186–188 (in Russian).
- Based on the selected clone 37/28/20/5-ex.
- Tindall B. J. Vacuum drying and cryopreservation of prokaryotes. *Methods Mol. Biol.* 2007; 110: 36–40. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2-5.
- The technique of determination of thermal stability of living dry plague vaccines and forecasting their viability during storage, Stavropol, 1985: 11 (in Russian).
- Efimova M. R., Petrova E. V., Rumyantsev V. N. General theory of statistics: textbook. *Moscow*. 2013: 416 (in Russian).
- Vorobyova L. I., Khodzhaev E. Y., Novikova T. M., Mulyukin A. L., Chudinov E. M., El Registan G. I. Stressoprotektoornoe and cross the action of extracellular reaktiviruyushchego factor microorganisms, bacteria domain archaea and ktery, archaea, and eukaryotes. *Mikrobiologia. [Microbiology]*. 2013; 82 (5): 588. DOI: 10.7868.5002635613050169 (in Russian).
- Kouda K, Iki M. Beneficial effects of mild stress (hormetic effects): dietary restriction and health. *J. Physiol. Anthropol.* 2010; 29: 127–132.
- Calabrese EJ, Mattson MP, Calabrese V. Resveratrol commonly displays hormesis: occurrence and biomedical significance. *Hum. Exp. Toxicol.* 2010; 29: 980–1015.
- Goryachaya I. P., Zinchenko V. D., Buryak I. A. Stability of yeast *S. cerevisiae* membranes to cold exposures in oxidative stress. *Nauchniye vedomosti. Seriya Yestestvenniye nauki. [Scientific bulletins. Series of Natural Sciences]*. 2014; 3 (26): 72–78 (in Russian).
- Shapiro RS, Cowen LE. Thermal control of Microbial development and virulence: Molecular mechanisms of microbial temperature sensing. *МБИО*. 2013; 3 (5): 8–12. DOI: 10.1128/mBio00238-13.
- Andryukov B. G., Somova L. M., Timtchenko N. F. Zhirnye acid as an object of temperature-adaptation strategies-psihrofilov. *Zdorove microorganisms meditsinskaya ecology, Nauka*. 2015; 61 (3): 43–49 (in Russian).
- Pavlova I. B., Lenchenko E. M., Kononenko A. B. Influence of the temperature factor on population variability *Yersini*. *Reports of the Russian Academy of agricultural sciences*. 2004; 5: 41–44 (in Russian).
- Hendon Yu. Z., Markushin S. G., Tsfasman T. M., Akopova I. I., Akhmatova N. K., Koptyaeva I. B. New cold-adapted donor attenuation for live influenza vaccines *Voprosi virusologii. [Problems of Virology]*. 2013; 1 (58): 11–17 (in Russian).
- Tsybalova L. M., Gorev M. E., Potapchuk M. V., Rепко I. A., Sergeeva M. V., Korotkov A. D. et al. Characteristics of cold-adapted strains of influenza A virus (Hong Kong) 1/68/162/35 as potential donor of attenuation and high productivity. *Voprosi virusologii. [Problems of Virology]*. 2012; 57 (6): 13–17 (in Russian).

## Об авторах

- Лопатина Наталья Викторовна – к. м. н., ассистент кафедры гигиены ФГБОУ ВО «Ростовский – на-Дону государственный медицинский университет». 344023 г. Ростов-на-Дону, пр. Ленина, 90 «Д», кв.10.
- Мишанькин Борис Николаевич – д. м. н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора. 344022 г. Ростов-на-Дону, пер. Крепостной, 77, кв.16.

## About the Authors

- Natalia V. Lopatina – Cand. Sci. (Med.), assistant of the Department of Hygiene, Rostov-on-Don State Medical University. Lenin Avenue, 90 «D», apt.10. Rostov-on-Don, Russia. 344023,
- Boris N. Mishankin – Dr. Sci. (Med.), professor, Honored Scientist of the Russian Federation, leading researcher of the laboratory of biochemistry of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institution. Crossway Krepostnaya, 77, apt.16. Rostov-on-Don, Russia. 344022,