

УДК 615.371

Избирательная протективность $\Delta nlpD$ -мутантов *Yersinia pestis*

С. В. Дентовская¹, С. А. Иванов¹, П. Х. Копылов¹, Р. З. Шайхутдинова¹, М. Е. Платонов¹,
Т. И. Комбарова¹, Т. В. Гапельченкова¹, С. В. Балахонов², А. П. Анисимов^{1*}

¹Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии
Роспотребнадзора, 142279, Московская обл., Серпуховской район, Оболенск

²Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока
Роспотребнадзора, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78

*E-mail: anisimov@obolensk.org, a-p-anisimov@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.06.2014

РЕФЕРАТ Мутация по гену *nlpD* приводит, как показано недавно, к полной аттенуации *Yersinia pestis*, а *nlpD*-мутант превосходит вакцинный штамм EV76 по способности защищать мышей от гибели при заражении бубонной или легочной формой чумы [PLoS One. 2009. V. 4. № 9. e7023]. В представленной работе аналогичные $\Delta nlpD$ -мутанты сконструированы на основе других родительских штаммов *Y. pestis*, включая непатогенные для морских свинок и человека штаммы подвида *microtus*. Проведение сравнительной оценки подтвердило, что при подкожной иммунизации мышей $\Delta nlpD$ -мутанты индуцировали иммунный ответ, в 10^5 раз превосходящий по напряженности ответ на введение вакцинного штамма EV. В то же время варианты $\Delta nlpD$ -бактерий практически не защищали морских свинок от подкожного заражения возбудителем чумы, уступая штамму EV по напряженности формируемого иммунитета в 10^6 раз. Обсуждаются возможные причины выявленного феномена.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Yersinia pestis*, $\Delta nlpD$ -мутант, избирательная протективность, чумная живая вакцина.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ИИ – индекс иммунитета; ИФА – иммуноферментный анализ; КОЕ – колониеобразующая единица; ЛПС – липополисахарид; DCL (LD_{100}) – абсолютная летальная доза (*dosis certa letalis*); ImD_{50} – иммунизирующая доза, предохраняющая от гибели 50% зараженных животных; LD_{50} – доза, летальная для 50% зараженных животных.

ВВЕДЕНИЕ

Живые вакцины стимулируют не только гуморальное, но и клеточное звено иммунитета, играющее ведущую роль в иммуногенезе чумы у некоторых видов животных [1–8]. Кроме того, живые вакцины, сконструированные на основе аттенуированных штаммов, содержат не только один-два иммунодоминантных антигена, а целый спектр сложных (комплексы белков с липополисахаридами (ЛПС) и т.п.), конформационно-лабильных и минорных антигенов, что обеспечивает индукцию «гетерогенного» иммунного ответа после однократной иммунизации. Этот иммунный ответ способен защитить животных различных видов от патогенных бактерий даже с частично измененной антигенной специфичностью как при подкожном, так и аэрозольном заражении [3, 7–11]. Однако коммерческая живая чумная вакцина, созданная на основе штамма EV *Yersinia pestis*, способна независимо от путей введения вызывать различные по тяжести местные и системные побочные реакции у 5–29% лиц с нормальным иммунным статусом [1, 2,

12, 13]. Поэтому исследования, направленные на создание живых чумных вакцин на основе прецизионно аттенуированных штаммов *Y. pestis*, превосходящих используемый в коммерческой вакцине штамм EV по иммуногенности и обладающих сниженной реактогенностью, сохраняют свою актуальность до настоящего времени [2, 8, 14–19].

Потенциальные гены-мишени для аттенуации вирулентных штаммов отбирают с помощью произвольного мутагенеза индивидуально меченными транспозонами [20], с использованием методик обратной (реверсивной) вакцинологии [21–23] или исследуют аналоги генов других бактериальных патогенов, мутации в которых ведут к снижению вирулентности [24]. Так, в последнее десятилетие установлена взаимосвязь экспрессии генов семейства *nlpD/lppB* (novel lipoprotein D / lipoprotein B) с выживанием некоторых грамотрицательных бактерий в стрессовых условиях и их патогенностью [18, 25, 26]. Показано [14], что липопротеин NlpD необходим и для вирулентности возбудителя чумы *Y. pestis* при под-

Таблица 1. Характеристика использованных в работе штаммов микроорганизмов

Штамм	Характеристика	Источник получения и/или ссылка*
<i>Y. pestis</i>		
EV линии НИИЭГ	pFra ⁺ pCad ⁺ pPst ⁺ Δpgm вакцинный штамм (subsp. <i>pestis</i> bv. <i>orientalis</i>)	ГКПМ-Оболениск
231	pFra ⁺ pCad ⁺ pPst ⁺ Pgm ⁺ дикого типа (subsp. <i>pestis</i> bv. <i>antiqua</i>)	ГКПМ-Оболениск
231ΔnlpD	ΔnlpD вариант 231	НИ
И-3455	pFra ⁺ pCad ⁺ pPst ⁺ Pgm ⁺ дикого типа (subsp. <i>microtus</i> , bv. <i>altaica</i>)**	МЖК ИркутскНИПЧИ Сибири и ДВ
И-3455ΔnlpD	ΔnlpD вариант И-3455	НИ
И-2359	pFra ⁺ pCad ⁺ pPst ⁺ Pgm ⁺ дикого типа (subsp. <i>microtus</i> , bv. <i>altaica</i>)	МЖК ИркутскНИПЧИ Сибири и ДВ
И-2359ΔnlpD	ΔnlpD вариант И-2359	НИ
<i>E. coli</i>		
ДН5α lpir	F ⁻ , λ ⁻ , recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺), supE44, recA1	[27]
S17-1 lpir	thi pro hsdR ⁻ hsdM ⁺ recA RP4 2-Tc::Mu-Km::Tn7(Tp ^R Sm ^R Pm ^S)	[28]

* ГКПМ-Оболениск – Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур на базе «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора; МЖК ИркутскНИПЧИ Сибири и ДВ – музей живых культур ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора.

**Использованы наименования подвидов и биоваров *Y. pestis*, предложенные в [29].

кожном и аэрогенном способе введения. Более того, при иммунизации мышей 10⁵ КОЕ ΔnlpD-мутанта штамма *Y. pestis* Kimberley53 с последующим введением 10⁵ LD₅₀ вирулентного штамма Kimberley53 (1 LD₅₀ = 1–3 КОЕ) выжило 100% мышей, а вакцинный штамм EV76 защитил от гибели только 10% животных.

Цель настоящей работы состояла в конструировании ΔnlpD-мутантов на основе других родительских штаммов *Y. pestis*, включая непатогенные для морских свинок и человека штаммы подвида *microtus*, и оценке их иммуногенности в отношении мышей и морских свинок.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные штаммы, использованные в работе, и их характеристика представлены в табл. 1. Штаммы *Y. pestis* и *Escherichia coli* культивировали на жидких или плотных питательных средах Хоттингера (различные серии лабораторного приготовления ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии) и LB (триптон – 1%, дрожжевой экстракт – 0.5%, натрий хлористый – 1%), pH 7.2. Селекцию клеток, содержащих рекомбинантные плазмиды, вели на средах с добавлением антибиотиков: ампициллин – 100 мкг/мл, хлорамфеникол – 10 мкг/мл, полимиксин В – 100 мкг/мл. Штаммы *Y. pestis* для иммунизации и заражения животных выращивали при температуре 28°C в течение 48 ч.

Мутагенез

Конструирование мутантных штаммов *Y. pestis* проводили путем гомологичной рекомбинации с помощью рекомбинантной плазмиды pCVD442-ΔnlpD::cat на основе суицидного вектора pCVD442 [30], в которой часть клонированной кодирующей последовательности гена nlpD (нуклеотиды 112–318) заменили геном cat из плазмиды pKD3 [31] (рисунком).

Плазмиду pCVD442-ΔnlpD::cat из донорного штамма *E. coli* S17-1 lpir переносили в штаммы-реципиенты *Y. pestis* (231, И-3455 и И-2359) методом конъюгации. Элиминацию суицидного вектора и селективный отбор клонов *Y. pestis* осуществляли в присутствии 5% сахарозы и хлорамфеникола [30]. Ген устойчивости к хлорамфениколу удаляли с помощью плазмиды pCP20 [31] (рисунком). Плазмиду pCP20 удаляли путем культивирования бактерий при температуре 40°C в среде, содержащей 2.5 мМ хлорида кальция, в течение ночи. Отбирали клоны, потерявшие устойчивость как к ампициллину (100 мкг/мл), так и к хлорамфениколу (20 мкг/мл). Правильность рекомбинации контролировали методом полимеразной цепной реакции.

Бактериоскопия и бактериологические исследования

Бактериоскопическое исследование, скорость роста и лизис культур чумным бактериофагом Л-413С, а также фибринолитическую и плазмокоагулазную

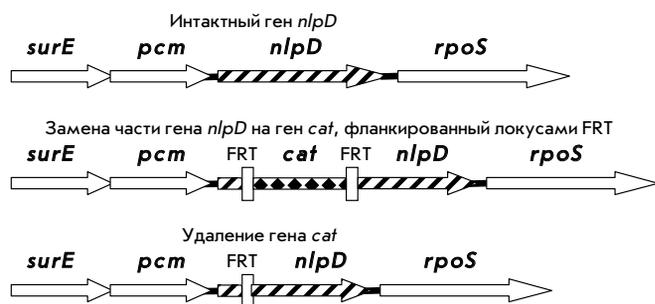


Схема конструирования $\Delta nlpD$ -мутантов *Y. pestis*. Детальное описание стратегии приведено в [30, 31]

активности, способность к пигментосорбции и плазмидный профиль определяли согласно [14, 32–34].

Иммунохимические исследования

Титры F1, продуцируемого испытываемыми штаммами *Y. pestis*, определяли в реакции непрямой гематглютинации согласно [35].

Титры антител к антигенам F1 и LcrV в сыворотках животных, иммунизированных для оценки напряженности иммунитета (см. ниже), определяли с помощью непрямого варианта ИФА на 21-е сут после подкожного введения испытываемых и контрольного штаммов. Титры антител определяли индивидуально у пяти животных, произвольно отобранных в каждой группе из 40, иммунизированных одним из опытных или контрольным штаммом, с последующим определением среднего титра в группе. За величину титра принимали наибольшее разведение специфической антисыворотки, которому соответствовала оптическая плотность растворов субстрата при длине волны 492 нм, превосходящая на 0.1 значение контроля в этом же разведении [36]. На практике вычисляли разность контрольных и опытных значений A_{492} и строили графики зависимости полученной величины от соответствующих разведений антисывороток, которые аппроксимировали с использованием полиномиальной функции.

Определение безвредности штаммов *Y. pestis*

Безвредность испытываемых штаммов *Y. pestis* для мышей линии BALB/c, а также морских свинок оценивали по методикам, приведенным в [35]. Культуры исследуемых штаммов чумного микроба вводили подкожно мышам массой 18–20 г в дозе 10^2 , 10^3 , 10^5 и 10^7 КОЕ (по 10 мышей на каждую дозу) и пяти морским свинкам массой 180–200 г по 1.5×10^{10} КОЕ.

Оценку иммуногенной активности кандидатных вакцинных препаратов проводили в соответствии

с Методическими указаниями [35]. Иммуногенность сконструированных штаммов оценивали по величине ImD_{50} . Морских свинок (10 животных на группу) иммунизировали подкожно в область верхней трети правого бедра двухсуточной агаровой культурой исследуемого штамма в дозах 4×10^2 , 2×10^3 , 1×10^3 и 5×10^3 КОЕ в объеме 0.5 мл. Мышей линии BALB/c (10 животных на группу) также иммунизировали подкожно дозами 2×10^2 , 1×10^3 , 5×10^3 и 2.5×10^4 КОЕ в объеме 0.2 мл. Животных заражали на 21-е сут после иммунизации подкожно в область верхней трети левого бедра в дозе, соответствующей 200 DCL (LD_{100}) вирулентного штамма чумного микроба (в наших опытах 1 DCL соответствовала 10 КОЕ для мышей и 100 КОЕ для морских свинок). Наблюдение за зараженными животными продолжали в течение 20 сут. Погибших животных вскрывали и исследовали бактериологическим методом.

Напряженность иммунитета, т.е. способность вакцинного препарата предохранять животное от гибели на 21-е сут после иммунизации при заражении массивными дозами вирулентной культуры, определяли по формуле:

$$ИИ = \frac{LD_{50имм}}{LD_{50инт}}, \quad (1)$$

где ИИ – индекс иммунитета; $LD_{50имм}$ – LD_{50} для животных, иммунизированных исследуемым препаратом, КОЕ; $LD_{50инт}$ – LD_{50} для интактных животных, КОЕ [35].

Для определения напряженности иммунитета животных иммунизировали подкожно двухсуточными агаровыми культурами испытываемых и контрольного штаммов (по 40 морских свинок и 40 мышей на один штамм): морских свинок в дозе 5×10^3 КОЕ в объеме 0.5 мл, мышей линии BALB/c – 10^4 КОЕ в объеме 0.2 мл. На 21-е сут после иммунизации животных заражали культурой вирулентного штамма *Y. pestis* 231 в четырех дозах: 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 КОЕ (морских свинок в объеме 0.5 мл, мышей – в объеме 0.2 мл). Одновременно заражали интактных (контрольных) животных в дозах 1, 5, 25 и 125 КОЕ в том же объеме, как и иммунизированных. Наблюдения за зараженными животными проводили в течение 20 сут. Погибших животных вскрывали и исследовали бактериологическим методом.

Статистические методы

Величины ImD_{50} мутантных по гену *nlpD* штаммов и LD_{50} вирулентного штамма, полученную на иммунизированных и интактных животных, а также доверительные интервалы (для вероятности 95%) определяли по методу Kärber [37].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Конструирование и характеристика NlpD⁻-вариантов вирулентных штаммов *Y. pestis*

Сайт-направленным мутагенезом гена *nlpD* в штаммах *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 и двух штаммах подвида *microtus* bv. *altaica* И-3455 и И-2359 с последующим удалением маркера устойчивости к хлорамфениколу получили мутанты 231Δ*nlpD*, И-2359Δ*nlpD* и И-3455Δ*nlpD* без генов антибиотикоустойчивости.

При бактериоскопическом исследовании окрашенных по Граму мазков, приготовленных из штаммов 231Δ*nlpD*, И-2359Δ*nlpD* и И-3455Δ*nlpD*, установили, что культивирование мутантных штаммов при температуре 28°C вело к формированию неразделенных цепей, включающих в среднем 8.2 ± 3.6 клетки/цепь, в то время как исходные культуры *Y. pestis* 231, И-2359 и И-3455 формировали агрегаты из отдельных клеток. Повышение температуры культивирования до 37°C снижало число клеток Δ*nlpD*-мутантов в цепи до 4 ± 2.5 . Морфология клеток и клеточных скоплений исходных штаммов не зависела от температуры культивирования. Скорость роста *Y. pestis* 231Δ*nlpD* была такой же, как у исходного штамма при 28 и 37°C.

Сконструированные Δ*nlpD*-мутанты лизировались чумным бактериофагом Л-413С. Содержание капсульного антигена F1 в клетках мутантов по данным реакции непрямой гемагглютинации в 4–16 раз превышало аналогичный показатель, полученный на культуре вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, выращенной в аналогичных условиях (1–4 мкг/10⁹ КОЕ и 0.25 мкг/10⁹ КОЕ соответственно). Эти Δ*nlpD*-мутанты не уступали штамму EV по фибринолитической и плазмокоагуляционной активностям.

Как и вакцинный штамм, они содержали три плазмиды pFra, pCad и pPst, но отличались от *Y. pestis* EV способностью к пигментосорбции.

Определение безвредности штаммов

Все дефектные по гену *nlpD* штаммы *Y. pestis*: 231Δ*nlpD*, И-3455Δ*nlpD* и И-2359Δ*nlpD*, так же как и вакцинный штамм *Y. pestis* EV, были авирулентны при подкожном введении мышам линии BALB/c (100% выживших при заражении дозой 10², 10³, 10⁵ и 10⁷ КОЕ) и морским свинкам (100% выживших при дозе 1.5×10^{10} КОЕ). Наблюдение проводили в течение 50 сут.

Антителный ответ к кандидатам в вакцинные штаммы

Образование антител к F1 и LcrV *Y. pestis* в крови мышей линии BALB/c определяли на 21-е сут после подкожной иммунизации исследуемыми штаммами *Y. pestis* в дозе 10⁴ КОЕ (табл. 2). Средние титры антител против F1 и LcrV в сыворотках мышей после вакцинации культурами *Y. pestis* 231Δ*nlpD* и И-3455Δ*nlpD* превышали показатели, полученные для *Y. pestis* И-2359Δ*nlpD* и вакцинного штамма EV ($p < 0.05$).

Титры анти-F1- и анти-LcrV-антител в крови вакцинированных и контрольных морских свинок определяли на 21-е сут после подкожной иммунизации исследуемыми штаммами *Y. pestis* в дозе 5×10^4 КОЕ (табл. 2). По нашим данным средние титры антител против F1 и LcrV в сыворотках морских свинок после введения вакцинного штамма *Y. pestis* EV на два-три порядка превышали показатели для штаммов 231Δ*nlpD*, И-3455Δ*nlpD* и И-2359Δ*nlpD* ($p < 0.05$). Антителный ответ к F1 и LcrV *Y. pestis* у морских свинок после введения вакцинного и сконструирован-

Таблица 2. Антителный ответ на введение штаммов *Y. pestis* по результатам ИФА

Средние титры IgG (обратные значения)				
Штамм	231Δ <i>nlpD</i>	И-3455Δ <i>nlpD</i>	И-2359Δ <i>nlpD</i>	EV НИИЭГ
Морские свинки				
Антиген				
F1	4435 ± 1625	2650 ± 1045	130 ± 80	127630 ± 52830
LcrV	1555 ± 840	710 ± 260	920 ± 630	94390 ± 49290
Мыши				
Антиген				
F1	942560 ± 16620	9140 ± 1590	550 ± 95	310 ± 140
LcrV	2465 ± 970	6715 ± 1620	1580 ± 850	235 ± 85

Таблица 3. Показатели иммуногенности и напряженности иммунитета у мышей линии BALB/c, вакцинированных $\Delta nlpD$ -вариантами штаммов *Y. pestis* 231, И-3455 и И-2359

Иммунизирующий штамм <i>Y. pestis</i>	ImD ₅₀ , КОЕ	Напряженность иммунитета	
		LD ₅₀ при заражении штаммом <i>Y. pestis</i> 231, КОЕ	ИИ
231 $\Delta nlpD$	1.3×10^2 ($5.3 \times 10 \div 3.4 \times 10^2$)	3.9×10^8 (слишком велик)	7.1×10^7
И-3455 $\Delta nlpD$	2.9×10^2 ($1.2 \times 10^2 \div 7.5 \times 10^2$)	2.5×10^7 ($1 \times 10^7 \div 3.9 \times 10^8$)	4.5×10^7
И-2359 $\Delta nlpD$	1.1×10^4 ($4.4 \times 10^3 \div 2.8 \times 10^4$)	2.5×10^3 ($6.3 \times 10^2 \div 3.9 \times 10^3$)	4.5×10^2
EV НИИЭГ	7.5×10^3 ($2.4 \times 10^3 \div 5.9 \times 10^4$)	1.0×10^3 ($2.5 \times 10^2 \div 3.9 \times 10^3$)	1.8×10^2

Таблица 4. Показатели иммуногенности и напряженности иммунитета для морских свинок, вакцинированных $\Delta nlpD$ -вариантами штаммов *Y. pestis* 231, И-3455 и И-2359

Иммунизирующий штамм <i>Y. pestis</i>	ImD ₅₀ , КОЕ	Напряженность иммунитета	
		LD ₅₀ при заражении штаммом <i>Y. pestis</i> 231, КОЕ	ИИ
231 $\Delta nlpD$	9.1×10^3 (слишком велик)	63 ($1.6 \times 10 \div 2.5 \times 10^2$)	3.7
И-3455 $\Delta nlpD$	4.3×10^3 (слишком велик)	158 ($4.0 \times 10 \div 6.3 \times 10^2$)	9.3
И-2359 $\Delta nlpD$	1.1×10^5 (слишком велик)	10 ($3 \div 4.0 \times 10$)	0.59
EV НИИЭГ	65 ($1.6 \times 10 \div 2.6 \times 10^2$)	1.6×10^8 (слишком велик)	9.4×10^6

ных нами штаммов варьировал, у мышей ответ был более однородным.

При этом уровень циркулирующих анти-F1 и анти-LcrV в крови мышей, иммунизированных кандидатами в вакцинные штаммы *Y. pestis* 231 $\Delta nlpD$ и И-3455 $\Delta nlpD$, значительно превышал показатели для морских свинок, иммунизированных теми же штаммами.

В контрольных группах после введения изотонического раствора хлорида натрия антител к F1 и LcrV *Y. pestis* не обнаружили.

Протективная эффективность кандидатов в вакцинные штаммы

Показатели иммуногенности и напряженности иммунитета у однократно иммунизированных мышей линии BALB/c представлены в табл. 3. У лабораторных животных данного вида ImD₅₀ штаммов *Y. pestis* 231 $\Delta nlpD$ и И-3455 $\Delta nlpD$ была в 58 и 26 раз ниже, чем у вакцинного штамма *Y. pestis* EV

соответственно, а у штамма И-2359 $\Delta nlpD$ – выше в 1.5 раза. Индекс иммунитета штаммов *Y. pestis* 231 $\Delta nlpD$ и И-3455 $\Delta nlpD$ был на пять порядков выше, чем у вакцинного штамма *Y. pestis* EV, а штамма И-2359 $\Delta nlpD$ – в 2.5 раза.

Обратную картину наблюдали при использовании морских свинок в качестве модели для оценки иммуногенности и напряженности иммунитета (табл. 4). ImD₅₀ вакцинного штамма EV ниже, чем у штаммов *Y. pestis* 231 $\Delta nlpD$, И-3455 $\Delta nlpD$ и И-2359 $\Delta nlpD$ в 140, 66 и 1692 раза соответственно. Индекс иммунитета вакцинного штамма EV был на шесть порядков выше, чем у штаммов 231 $\Delta nlpD$ и И-3455 $\Delta nlpD$, и на семь порядков выше, чем у штамма И-2359 $\Delta nlpD$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для проверки универсальности сочетания аттенуации и высокой иммуногенности у $\Delta nlpD$ -вариантов *Y. pestis* проводили сайт-направленный мутаге-

нез трех штаммов возбудителя чумы дикого типа: один – подвида *pestis* bv. *antiqua* 231, два штамма подвида *microtus* bv. *altaica* И-3455 и И-2359. Известно, что штаммы подвида *microtus*, к которому принадлежит биовар *altaica* [29], вирулентны для мышей, но авирулентны для морских свинок, кроликов и человека [38, 39]. Предполагают [40], что штаммы подвида *microtus*, обладающие всеми протективными антигенами и авирулентные для людей, могут служить основой для создания живых чумных вакцин. Кроме того, один из использованных нами штаммов bv. *altaica* И-3455 продуцирует LcrV с повышенной иммуногенной/протективной активностью (за счет замены триптофана в позиции 113 на глицин) [41].

В Российской Федерации все испытания аттенуированных штаммов *Y. pestis*, перспективных в качестве вакцинных, проводят, сравнивая их с эталонным вакцинным штаммом чумного микроба EV линии НИИЭГ. Согласно [35] «штамм, предлагаемый в качестве вакцинного, должен соответствовать или превосходить эталонный вакцинный по показателю иммуногенности, соответствовать контрольному штамму по показателям безвредности и реактогенности или быть более безопасным, а по некоторым несущественным характеристикам, которые характеризуют его как представителя вида или разновидности *Y. pestis*, могут отличаться от него». «Несущественные характеристики» подразумевают, что «исследуемый штамм – кандидат в вакцинные должен:

- лизироваться чумным бактериофагом Л-413С;
- быть типичным по культурально-морфологическим свойствам;
- титр F1 испытуемого штамма не должен быть меньше аналогичного показателя, полученного с культурой контрольного штамма *Y. pestis* EV, выращенного в аналогичных условиях;
- доля кальцийнезависимых мутантов в популяции культур чумного микроба, пропассированных через организм лабораторных животных и не подвергавшихся длительному хранению или каким-либо физическим воздействием, не должна превышать 0.3%;
- не должен уступать контрольному штамму по фибринолизин-плазмокоагулазной активности;
- испытуемый и контрольные штаммы не должны обладать способностью к пигментосорбции;
- испытуемые вакцинные штаммы подобно эталонному штамму EV на электрофореграмме должны иметь три полосы плазмидной ДНК, соответствующие pFra (60 MD), pCad (47 MD) и pPst (6 MD)». Первая из плазмид кодирует основной иммуноген *Y. pestis* – капсульный антиген F1. Вторая – систему,

позволяющую внеклеточно расположенным бактериям обезвреживать клетки, участвующие в иммунном ответе хозяина, – вирулон Yop и входящий в эту систему второй иммунодоминантный антиген LcrV, а третья – активатор плазминогена, ответственный за диссеминацию чумного микроба в тканях хозяина [13].

По большинству несущественных показателей сконструированные нами $\Delta nlpD$ -штаммы *Y. pestis* соответствовали требованиям к вакцинным штаммам чумного микроба [35]. Они лизировались бактериофагом Л-413С, продукция F1 в клетках мутантов была в 2–4 раза больше, чем в клетках штамма EV, фибринолитическая и плазмокоагулазная активности у всех штаммов были на одном уровне, все штаммы содержали полный набор из трех классических плазмид чумного микроба.

Культурально-морфологические свойства $\Delta nlpD$ -мутантов штаммов 231, И-3455 и И-2359, рост в виде цепочек, отличающий их от бактерий дикого типа и вакцинного штамма EV, совпали с аналогичными данными [14], свидетельствующими о том, что липопротеин NlpD возбудителя чумы играет важную роль в процессе клеточного деления. Возможно, именно особенности клеточного деления являются основной причиной аттенуации $\Delta nlpD$ -мутантов.

Способность к пигментосорбции сохранилась у сконструированных штаммов на уровне штаммов дикого типа, так как их аттенуация была вызвана не делецией локуса *pgm*, а удалением структурного гена *nlpD*.

Что же касается соответствия $\Delta nlpD$ -мутантов основным критериям отбора вакцинных штаммов *Y. pestis*, то по степени аттенуации (безвредности) для мышей и морских свинок штаммы NlpD⁻ не уступали вакцинному штамму EV. Со вторым критерием, иммуногенностью, все оказалось не столь однозначно. Этот показатель оценивали на двух видах животных в трех независимых тестах: определяли титры антител к F1 и LcrV, рассчитывали иммунизирующие дозы, предохранявшие от гибели 50% зараженных животных, и индексы иммунитета.

Хотя уровни продуцируемых антител лишь частично коррелируют с протективной эффективностью чумных вакцин, гуморальный иммунитет играет важную роль в защите против чумы [42]. Полученные данные свидетельствуют о развитии эффективного иммунного ответа у мышей после введения аттенуированных культур чумного микроба, причем $\Delta nlpD$ -штаммы статистически значимо превосходили по этому показателю вакцинный штамм EV. В опытах на морских свинках картина была обратной – вакцинный штамм превосходил $\Delta nlpD$ -мутанты по способности индуцировать антителогенез.

На мышинной модели штаммы *Y. pestis* 231 Δ *nlpD* и И-3455 Δ *nlpD* статистически значимо превосходили штамм EV по величинам ImD₅₀ и особенно ИИ. В опытах же на морских свинках экспериментальные штаммы уступали вакцинному, причем напряженность иммунитета у животных, иммунизированных Δ *nlpD*-мутантами, стремилась к 1, т.е. практически не отличалась от этого показателя у неиммунных животных.

Результаты наших экспериментов подтверждают данные других исследователей о том, что реакция различных видов животных на один и тот же антиген/вакцинный препарат неодинакова [12, 43–48]. Отличия в протективности NlpD⁻-вариантов штаммов *Y. pestis* в отношении морских свинок и мышей, вероятно, связаны с особенностями иммуногенеза у этих биологических моделей [2]. Отсутствие протективной эффективности Δ *nlpD*-мутантов в отношении морских свинок может иметь, как минимум, два возможных объяснения.

Во-первых, вероятно, аттенуация в результате мутации по гену *nlpD* приводит к чрезмерному снижению остаточной вирулентности [12, 49], вследствие чего подобные мутанты не способны размножаться в организме морских свинок в течение времени, достаточного для формирования иммунитета.

Во-вторых, нельзя исключить, что липопротейн NlpD возбудителя чумы – это именно тот водо-

нерастворимый «остаточный» антиген R (residue) или один из его составных компонентов, который обладает высокой протективной активностью в отношении морских свинок, индуцируя длительную защиту от чумы [50–52]. Следовательно, его отсутствие в препарате, использованном для иммунизации, может быть основной причиной слабой протективности мутантов Δ *nlpD*.

В настоящее время проводятся эксперименты по проверке этих двух гипотез.

ВЫВОДЫ

Завершая обсуждение полученных данных, следует констатировать, что Δ *nlpD*-мутанты без дополнительной модификации, повышающей их иммуногенность для морских свинок, не перспективны в качестве кандидатов в живые чумные вакцины из-за избирательности иммуногенности в отношении разных видов животных. ●

Работа выполнена в лаборатории микробиологии чумы Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии по государственным контрактам № 40-Д от 30.05.2012 г. и № 34-Д от 08.08.2013 г. в рамках ФЦП «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 гг.)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Наумов А.В., Ледванов М.Ю., Дроздов И.Г. Иммунология чумы. Саратов: Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», 1992. 172 с.
2. Dentovskaya S.V., Kopylov P.Kh., Ivanov S.A., Ageev S.A., Anisimov A.P. // *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2013. V. 28. P. 87–98.
3. Feodorova V.A., Corbel M.J. // *Expert Rev. Vaccines.* 2009. V. 8. P. 1721–1738.
4. Firstova V.V., Tyurin E.A., Kravchenko T.B., Zyrina E.V., Biketov S.F., Dyatlov I.A. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012. V. 954. P. 173–177.
5. Li B., Du C., Zhou L., Bi Y., Wang X., Wen L., Guo Z., Song Z., Yang R. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2012. V. 19. № 2. P. 228–234.
6. Smiley S.T. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007. V. 603. P. 376–386.
7. Smiley S.T. // *Immunol. Rev.* 2008. V. 225. P. 256–271.
8. Sun W., Roland K.L., Curtiss R. 3rd. // *J. Infect. Dev. Ctries.* 2011. V. 5. № 9. P. 614–627.
9. Анисимов А.П. Молекулярно-генетические механизмы образования и функциональная значимость капсулы *Yersinia pestis*. Саратов: Российский противочумный институт «Микроб»; Оболенск: Государственный научный центр прикладной микробиологии, 1999.
10. Коробкова Е.И. Живая противочумная вакцина. М.: Медгиз, 1956. 208 с.
11. Girard G. // *Biol. Med. (Paris)* 1963. V. 52. P. 631–731.
12. Meyer K.F., Smith G., Foster L., Marshall J.D., Jr., Cavanaugh D.C. // *J. Infect. Dis.* 1974. V. 129 (Suppl.). P. 85–120.
13. Perry R.D., Fetherston J.D. // *Clin. Microbiol. Rev.* 1997. V. 10. P. 35–66.
14. Tidhar A., Flashner Y., Cohen S., Levi Y., Zauberman A., Gur D., Aftallon M., Elhanany E., Zvi A., Shafferman A., Mamroud E. // *PLoS One.* 2009. V. 4. e7023.
15. Braciale V.L., Nash M., Sinha N., Zudina I.V., Motin V.L. // Correlates of immunity elicited by live *Yersinia pestis* vaccine. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. NIH. V. 1. *Frontiers Res. / Ed. Vassil St. Georgiev. Totowa, N.J.: Humana Press Inc.*, 2007. P. 473–480.
16. Derbise A., Cerdà Marín A., Ave P., Blisnick T., Huerre M., Carniel E., Demeure C.E. // *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012. V. 6. № 2. e1528.
17. Rosenzweig J.A., Chopra A.K. // *Expert Rev. Vaccines.* 2012. V. 11. № 6. P. 659–661.
18. Sha J., Agar S.L., Baze W.B., Olano J.P., Fadl A.A., Erova T.E., Wang S., Foltz S.M., Suarez G., Motin V.L., et al. // *Infect. Immun.* 2008. V. 76. № 4. P. 1390–1409.
19. Zhang X., Qi Z., Du Z., Bi Y., Zhang Q., Tan Y., Yang H., Xin Y., Yang R., Wang X. // *Vaccine.* 2013. V. 31. № 22. P. 2539–2542.
20. Flashner Y., Mamroud E., Tidhar A., Ber R., Aftalion M., Gur D., Lazar S., Zvi A., Bino T., Ariel N., et al. // *Infect. Immun.* 2004. V. 72. P. 908–915.
21. Garbom S., Forsberg A., Wolf-Watz H., Kihlberg B.M. // *Infect. Immun.* 2004. V. 72. P. 1333–1340.
22. Rappuoli R. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2000. V. 3. P. 445–450.
23. Sun W., Roland K.L., Branger C.G., Kuang X., Curtiss R. // *PLoS One.* 2009. V. 4. e6720.

24. Oyston P.C., Mellado-Sanchez G., Pasetti M.F., Nataro J.P., Titball R.W., Atkins H.S. // *Microb. Pathog.* 2010. V. 48. № 5. P. 191–195.
25. Padmalayam I., Kelly T., Baumstark B., Massung R. // *Infect. Immun.* 2000. V. 68. № 9. P. 4972–4979.
26. Sha J., Kirtley M.L., van Lier C.J., Wang S., Erova T.E., Kozlova E.V., Cao A., Cong Y., Fitts E.C., Rosenzweig J.A., Chopra A.K. // *Infect. Immun.* 2013. V. 81. № 3. P. 815–828.
27. Woodcock D., Crowther P., Doherty J., Jefferson S., DeCruz E., Noyer-Weidner M., Smith S., Michael M., Graham M. // *Nucl. Acids Res.* 1989. V. 17. P. 3469–3478.
28. Simon R., Priefer U., Pulher A. // *Biotechnology.* 1983. V. 1. P. 784–791.
29. Platonov M.E., Evseeva V.V., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. // *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2013. V. 28. P. 41–45.
30. Donnenberg M.S., Kaper J.B. // *Infect. Immun.* 1991. V. 59. P. 4310–4317.
31. Datsenko K., Wanner B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 6641–6645.
32. Filippov A.A., Solodovnikov N.S., Kookleva L.M., Protsenko O.A. // *FEMS Microbiol Lett.* 1990. V. 55. P. 5–48.
33. Filippov A.A., Sergueev K.V., He Y., Huang X.Z., Gnade B.T., Mueller A.J., Fernandez-Prada C.M., Nikolich M.P. // *PLoS One.* 2011. V. 6. e25486.
34. Bahmanyar M., Cavanaugh D.C. *Plague manual.* Geneva: WHO, 1976. 78 p.
35. Основные требования отбора новых вакцинных штаммов чумного микроба. Методические указания. МУ 3.3.1.1113-02 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 02.03.2002). 69 с.
36. Qiu Y., Liu Y., Qi Z., Wong W., Kou Z., Zhang Q., Liu G., Yang X., Xin Y., Li C., et al. // *Scand. J. Immunol.* 2010. V. 72. P. 425–433.
37. Finney D.J. *Statistical method in biological assay.* 3rd ed. London, England: Charles Griffin, 1978.
38. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis* // *Clin. Microbiol. Rev.* 2004. V. 17. P. 434–464.
39. Song Y., Tong Z., Wang J., Wang L., Guo Z., Han Y., Zhang J., Pei D., Zhou D., Qin H., et al. // *DNA Res.* 2004. V. 11. P. 179–197.
40. Zhou D., Tong Z., Song Y., Han Y., Pei D., Pang X., Zhai J., Li M., Cui B., Qi Z., et al. // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. P. 5147–5152.
41. Копылов П.Х., Бахтеева И.В., Анисимов А.П., Дентовская С.В., Иванов С.А., Киселева Н.В., Левчук В.П., Панферцев Е.А., Платонов М.Е., Светоч Т.Э. и др. Патент на изобретение RU 2439155 C1, РФ, МПК C12N15/10, C07H21/00, C12N15/70, C12N1/21, C12P21/00, C12R1/19, 2010.
42. Bashaw J., Norris S., Weeks S., Trevino S., Adamovicz J.J., Welkos S. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2007. V. 14. P. 605–616.
43. Бывалов А.А., Паутов В.Н., Чичерин Ю.П., Лебединский В.А., Евстигнеев В.И. // *Журн. микробиол.* 1984. № 4. С. 74–76.
44. Burrows T.W. // *Nature.* 1957. V. 179. P. 1246–1247.
45. Hallett A.F., Issacson M., Meyer K.F. // *Infect. Immun.* 1973. V. 8. P. 876–881.
46. Jones S.M., Griffin K.F., Hodgson I., Williamson E.D. // *Vaccine.* 2003. V. 21. P. 3912–3918.
47. von Metz E., Eisler D.M., Hottle G.A. // *Appl. Microbiol.* 1971. V. 22. P. 84–88.
48. Welkos S., Pitt M.L.M., Martinez M., Friedlander A., Vogel P., Tammariello R. // *Vaccine.* 2002. V. 20. P. 2206–2214.
49. Miranda K.L., Poester F.P., Minharro S., Dorneles E.M., Stynen A.P., Lage A.P. // *Vaccine.* 2013. V. 31. P. 3014–3018.
50. Brubaker R.R. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1972. V. 57. P. 111–158.
51. Meyer K.F. // *J. Immunol.* 1950. V. 64. P. 139–163.
52. Schütze H. // *Br. J. Exp. Pathol.* 1939. V. 19. P. 293–298.