

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-50-56

УДК 616.98:579.842.23

Т.В. Гапельченкова, Р.З. Шайхутдинова, А.С. Трунякова, Т.Э. Светоч, Т.И. Комбарова,
М.Е. Платонов, А.И. Борзилов, П.Х. Копылов, С.В. Дентовская

Динамика антительного ответа морских свинок к белкам *Yersinia pestis* при чуме

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», р.п. Оболенск, Российская Федерация

Конструирование новых средств специфической профилактики чумы, тем более субъединичных вакцин, невозможно без исследования роли отдельных антигенов в проявлении патогенных и иммуногенных свойств *Yersinia pestis*. Цель настоящего исследования состояла в определении методом иммуноферментного анализа (ИФА) уровня антител к антигенам чумного микроба в сыворотках морских свинок, выживших после заражения сублетальными дозами вирулентных штаммов чумного микроба. **Материалы и методы.** Морских свинок заражали подкожно штаммом дикого типа *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 или бескапсульным (Caf1⁻) штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* 358/12 в дозе 30 КОЕ. Кровь от больных или переболевших чумой морских свинок отбирали на 15, 30, 60 и 90-е сутки после заражения. Антительный ответ определяли к 18 рекомбинантным белкам *Y. pestis* методом ИФА. **Результаты и обсуждение.** У морских свинок наблюдали неоднородный антительный ответ к большинству антигенов с вариацией титров IgG от животного к животному. После введения штаммов *Y. pestis* 231 и *Y. pestis* 358/12 иммунодоминантный характер имели 6 (AilC, Caf1, Pla, YapM, YapL, TalB) и 6 (AilC, pH6, SurA, YapM, MetQ, HtpG) из 18 использованных белков соответственно. Для большинства исследуемых антигенов наблюдали подъем титров антител в сыворотках морских свинок, зараженных штаммом дикого типа *Y. pestis* 231, к 90-м суткам наблюдения, в то время как при заражении бескапсульным (Caf1⁻) штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* 358/12 обнаружили тенденцию снижения титров специфических антител к 90-м суткам. Сохранение в организме морских свинок в течение длительного времени после перенесенного заболевания антител к белкам *Y. pestis* разной локализации, функциональной активности, степени представленности на поверхности бактериальной клетки свидетельствует о множественном характере формирования иммунного ответа при чуме. Полученные результаты важны для дизайна эффективных вакцин против чумы, а также для поиска новых мишеней для диагностики данной инфекции.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, бубонная чума, рекомбинантные антигены, антитела, иммунный ответ.

Корреспондирующий автор: Гапельченкова Татьяна Владимировна, e-mail: gapelchenkova@obolensk.org.

Для цитирования: Гапельченкова Т.В., Шайхутдинова Р.З., Трунякова А.С., Светоч Т.Э., Комбарова Т.И., Платонов М.Е., Борзилов А.И., Копылов П.Х., Дентовская С.В. Динамика антительного ответа морских свинок к белкам *Yersinia pestis* при чуме. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 4:50–56. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-50-56

Поступила 15.04.2022. Отправлена на доработку 05.05.2022. Принята к публ. 29.07.2022.

T.V. Gapel'chenkova, R.Z. Shaikhutdinova, A.S. Trunyakova, T.E. Svetoch, T.I. Kombarova,
M.E. Platonov, A.I. Borzilov, P.Kh. Kopylov, S.V. Dentovskaya

Dynamics of Antibody Response to *Yersinia pestis* Proteins in Plague Affected Guinea Pigs

State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Abstract. Designing of new means for the specific prevention of plague, especially protein subunit vaccines, is impossible without studying the role of individual antigens in the manifestation of the pathogenic and immunogenic properties of *Yersinia pestis*. **The aim** of the present study was to determine the antibody levels to *Y. pestis* antigens in guinea pigs that survived infection with sub-lethal doses of virulent plague agent strains using enzyme immunoassay (ELISA). **Materials and methods.** Guinea pigs were inoculated subcutaneously with 30 CFU of the wild type *Y. pestis* subsp. *pestis* strain 231 or non-capsular *Y. pestis* subsp. *pestis* Caf1-negative strain 358/12. Blood samples from sick or recovered guinea pigs were collected on day 15, 30, 60, and 90 after infection. The antibody response was assessed by 18 recombinant *Y. pestis* proteins in ELISA. **Results and discussion.** Heterogeneity of the antibody responses to the majority of the antigens with variation of IgG titers from animal to animal has been revealed. We observed increase in antibody titers by day 90 for the most analyzed antigens in the sera of the guinea pigs injected with wild type *Y. pestis* 231. On the contrary we found reduction in antibody titers by day 90 in case of inoculation with *Y. pestis* 358/12. The preservation of antibodies to *Y. pestis* proteins of different localization in the organism of the guinea pigs, as well functional activity, and the degree of representation on the surface of bacterial cell for a prolonged period of time indicates the multiplex nature of the plague immunity formation. Our findings are significant for the future design and development of effective vaccines against plague and the search for new targets for diagnostics of this disease.

Key words: *Yersinia pestis*, bubonic plague, recombinant antigens, antibodies, immune response.

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

Funding: The work was carried out within the frames of the sectoral research program of the Rospotrebnadzor for 2021–2025 “Problem-Oriented Scientific Research in the Field of Epidemiological Surveillance of Infectious and Parasitic Diseases”.

Corresponding author: Tat'yana V. Gapel'chenkova, e-mail: gapelchenkova@obolensk.org.

Citation: Gapel'chenkova T.V., Shaikhutdinova R.Z., Trunyakova A.S., Svetoch T.E., Kombarova T.I., Platonov M.E., Borzilov A.I., Kopylov P.Kh., Dentovskaya S.V. Dynamics of Antibody Response to *Yersinia pestis* Proteins in Plague Affected Guinea Pigs. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*, 2022; 4:50–56. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-50-56

Received 15.04.2022. Revised 05.05.2022. Accepted 29.07.2022.

Gapel'chenkova T.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2958-0144>
Shaikhutdinova R.Z., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6985-6822>
Trunyakova A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9223-2105>
Svetoch T.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3540-1176>
Kombarova T.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1959-1739>

Platonov M.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3946-1755>
Borzilov A.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6309-7645>
Kopylov P.Kh., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0250-3237>
Dentovskaya S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1996-8949>

Возбудитель чумы – *Yersinia pestis* – является одним из самых смертоносных инфекционных агентов, циркулирующих в природных биоценозах среди позвоночных хозяев и членистоногих переносчиков и представляющих серьезную угрозу здоровью населения РФ и всего мира. Так, эпидемические проявления чумы в 2011–2020 гг. зарегистрированы на территории 11 государств, общее число случаев заражения чумой в мире за это время составило 6347, из них летальных – 892 [1]. Быстрое развитие инфекционного процесса, несмотря на доступность лечения антибиотиками, может вызвать высокий уровень смертности [2], поэтому превентивная защита населения, проживающего в эндемичных районах, остается актуальной.

В настоящее время не существует ни одной чумной вакцины, получившей одобрение ВОЗ. Применявшиеся для людей, входящих в группы повышенного риска, вакцины представляют собой либо цельноклеточные варианты бактерий *Y. pestis*, инактивированные формальдегидом, либо варианты живого аттенуированного штамма *Y. pestis* EV76. Ограничение их применения, вызванное недостаточной эффективностью первого препарата и сохраняющейся остаточной вирулентностью второго, стимулирует исследования по разработке нетоксичных, высокоэффективных чумных вакцин. Одним из направлений совершенствования вакцинопрофилактики чумы является создание субъединичных вакцин, содержащих факторы патогенности чумного микроба, основными из которых являются иммунодоминантные белки: Caf1⁻ (F1) – капсульный антиген, подавляющий фагоцитоз [3], и LcrV (V) – ключевой регулятор системы секреции бактерий III типа, который отвечает за доставку цитотоксических белков в цитозоль клеток млекопитающих [4]. Было показано, что эти комбинированные вакцины обеспечивают эффективную защиту от бубонной и легочной формы чумы на животных моделях [5–7]. Однако существование бескапсульных, но сохранивших вирулентность штаммов *Y. pestis*, а также обнаружение мутаций в гене, кодирующем белок LcrV, обосновывают необходимость разработки многокомпонентных субъединичных вакцин, в состав которых включены другие белки, обладающие защитными свойствами.

Конструирование новых средств специфической профилактики чумы, тем более субъединичных вакцин, невозможно без исследования роли отдельных антигенов в проявлении патогенных и иммуногенных свойств *Y. pestis*. Условия существования чумного микроба: внешняя среда, организм перенос-

чика (блохи, организм млекопитающего) – оказывают влияние на функционирование генетического аппарата, обеспечивающего биосинтез структурных компонентов бактериальной клетки, позволяющих приспособляться и существовать в различных экологических нишах.

Для формирования протективного противочумного иммунитета необходима специфическая активация клеточного и гуморального звеньев иммунной системы, начинающаяся с распознавания наивными лимфоцитами антигенов, представленных на поверхности профессиональных «антигенпрезентирующих клеток» (АПК) в сочетании с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). Антительный ответ зависит от степени представленности антигенов и поэтому является чувствительным индикатором роли белков, важных для бактерии во время инфекционного процесса.

В настоящем исследовании методом иммуноферментного анализа (ИФА) определили уровни антител к рекомбинантным белкам чумного микроба в сыворотках морских свинок, выживших после заражения сублетальными дозами вирулентных штаммов *Y. pestis*, для выбора наиболее перспективных антигенов, способных вызывать защитный иммунный ответ.

Материалы и методы

Штаммы, плазмиды, среды. Штаммы бактерий и плазмиды, использованные в работе, приведены в табл. 1. Микроорганизмы (*Escherichia coli*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*) выращивали на жидких и плотных питательных средах: LB (Luria Bertani broth medium: триптон – 1 %, дрожжевой экстракт – 0,5 %, натрий хлористый – 1 %), Хоттингера (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) и ВНИ (BrainHeartInfusion, HiMedia, Индия). В случае необходимости в питательные среды добавляли антибиотики: 100 мкг/мл ампициллина или 40 мкг/мл канамицина.

Праймеры. Олигонуклеотидные последовательности праймеров, использованных в работе, приведены в табл. 2.

Клонирование и очистка рекомбинантных белков. Плазмидные конструкции, содержащие амплифицированные в ПЦР гены *ymt*, *pla*, *pst*, *ompA*, *surA*, *ailC*, *nlpD*, *yapF*, *yapM*, *yapL*, *metQ*, *glnA*, *hlpG*, *talB*, *fbaA* *Y. pestis*, включающие сайты для эндонуклеаз рестрикции NdeI и XhoI, создали с использованием вектора pET32b(+). Клонирование осуществляли согласно руководству Т. Maniatis *et al.* [11].

Таблица 1 / Table 1

Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в исследовании
Bacterial strains and plasmids used in this study

Штамм или плаزمид Strain or plasmid	Генотип или соответствующая характеристика Genotype or relevant characteristics	Источник/ссылка Source/Reference
<i>Y. pestis</i> 231	Fra ⁺ Tox ⁺ Lcr ⁺ Pst ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺ , вирулентный (subsp. <i>pestis</i> bv. <i>antiqua</i>) Fra ⁺ Tox ⁺ Lcr ⁺ Pst ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺ , virulent (subsp. <i>pestis</i> bv. <i>antiqua</i>)	ГКПМ-Оболенск SCPM-Obolensk
<i>Y. pestis</i> И-358/12	Fra ⁺ Tox ⁺ Lcr ⁺ Pst ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺ , вирулентный (subsp. <i>pestis</i> bv. <i>medievalis</i>) Fra ⁺ Tox ⁺ Lcr ⁺ Pst ⁺ Pla ⁺ Pgm ⁺ , virulent (subsp. <i>pestis</i> bv. <i>medievalis</i>)	ГКПМ-Оболенск SCPM-Obolensk
<i>E. coli</i> BL21	F ⁻ ompT hsd S _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3)	Novagene, Madison, WI, USA
<i>E. coli</i> DH5α	lacZ DM15 D(lacZYA-argF) recA1 endA1 hsdR17(rk 2mk+) phoA supE44 thi gyrA96 relA1	ГКПМ-Оболенск SCPM-Obolensk
<i>Y. pseudotuberculosis</i> EV11MpFSK3/9	O:3 серотип, несет плазмиду pFSK3/9; Km ^R O:3 serotype, carries the plasmid pFSK3/9; Km ^R	[8]
pET32b(+)	Экспрессионный вектор с T7-промотором для прокариот; Ap ^R Prokaryotic expression vector with T7 promoter; Ap ^R	Novagen, Madison, WI, USA
pFSK3/9	cafIR ⁺ , cafIM ⁺ , cafIA ⁺ , cafI ⁺ , pla ⁺ , pst ⁺ , imm; Km ^R	[8]
pIG824	Производное космиды pHC79, содержащее полный оперон <i>psaEFABC</i> ; Ap ^R Tc ^R A derivative of pHC79 cosmid containing the complete operon <i>psaEFABC</i> ; Ap ^R Tc ^R	[9]
pETV-I-3455	Производное pET32b(+), кодирующее синтез полипептида LcrV _(G113) <i>Y. pestis</i> A derivative of pET32b(+) encoding the synthesis of the polypeptide LcrV _(G113) <i>Y. pestis</i>	[10]

Примечание: ГКПМ-Оболенск – Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур.

Note: SCPM-Obolensk – The State Collection of Pathogenic Microbes and Cell Cultures.

Выделение белков проводили методом Ni²⁺-хелатной аффинной хроматографии с использованием носителя производства фирмы Tosoh, Япония, AF-Chelate TOYOPEARL 650M, упакованного в колонку объемом 25 мл; нагрузку и очистку колонки ионами никеля проводили самостоятельно по инструкции производителя. Контроль экспрессии после индукции и последующего выделения белков осуществляли электрофоретически в системе ПААГ с 0,1 % ДСН по методу U.K. Laemmli [12] и О. Остерману [13] и методом иммуноблота [14] с использованием меченых пероксидазой моноклональных антител против встроенного гексапептида (His)₆ (#A7058, Sigma, США).

F1-антиген выделяли из супернатанта культуры *Y. pseudotuberculosis* 11M/pFSK3/9 методом высаливания раствором (NH₄)₂SO₄ (30 %) и последовательной гель-фильтрацией согласно МР 4.2.0219-20 «Выделение и очистка F1-антигена чумного микроба». рН6-антиген (Psa) получали из супернатанта культуры *E. coli* DH5α/pIG824 методом осаждения в изоэлектрической точке, рН 4,01 [9]. LcrV-антиген выделяли и очищали с последовательным использованием гель-фильтрации, анионообменной хроматографии (DEAE TSK 650M) и гидрофобной хроматографии [10].

Животные. В экспериментах *in vivo* использовано 27 нелинейных морских свинок, самцы/самки (225±25) г. Протокол экспериментов с животными одобрен комитетом по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ (№ P05-28). Все работы с животными проводились в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». Для содержания животных в условиях

BSL-3 использовали микроизоляторы, снабженные HEPA-фильтрами (Lab Products Inc., США). Температура, влажность, вентиляция и освещение соответствовали стандартным нормам для содержания животных. Животные имели свободный доступ к воде и корму.

Моделирование чумной инфекции. Для моделирования заражения чумой в диких условиях одну группу морских свинок (N=15) заражали подкожно штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 дикого типа, другую (N=12) – бескапсульным (CafI⁻) штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* 358/12 в дозе 30 КОЕ. Кровь от больных или переболевших чумой морских свинок (n=3) получали на 15, 30, 60 и 90-е сутки после заражения. Для получения сывороток цельную кровь выдерживали в течение 18 ч при температуре +4 °С. Образовавшиеся сыворотки аккуратно отбирали и разводили 1:10 физиологическим раствором (PBS), содержащим мертиолят натрия (1:5000). После прогревания в течение 30 минут при температуре 56 °С их расфасовывали и замораживали. Сыворотки от неинфицированных животных (n=3), инактивированные аналогичным способом, служили отрицательным контролем.

Иммуноферментный анализ. ИФА проводили, как описано ранее [15]. Для сенсибилизации планшета использовали растворы рекомбинантных белков *Y. pestis* (6 мкг/мл) в 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере (рН 9,6). Титром антител считали величину наибольшего разведения иммунной сыворотки, которой соответствовала оптическая плотность (ОП), превосходящая контрольное значение на 0,1 единицы, при условии достижения значения ОП не меньше 0,2. Для статистического анализа использовали

Таблица 2 / Table 2

Последовательности праймеров, использованных в работе
Sequences of primers used in this study

Праймеры Primers	Последовательность (5'-3') Primer sequence (5'-3')
Ymt587F	GCGCCATATGCTTCAAATAGATAATGTC
YmtR	ATACTCGAGATTGGGCTTAATTTGGAAATG
Pla-NdeI	GGCATATGAAGAAAAGTTCTATTGTGG
Pla-HindIII	TAAAGCTTGAAGCGATATTGCAGA
PstF	CAATCATATGTCAGATACAATGGTAGTG
PstR	CTCCTCGAGTTTAAACAATCCACTATC
OmpANdeI	GGCATATGAAAAAGACAGCTATCGC
OmpAXhoI	GGCTCGAGAGCCTGTGGCTGAGTCACAAC
SurANdeI	TTGATGCATATGAAGAACTGGAGAACGCT
SurAXhoI	TTCTCGAGTTGTGGTTGTGCATTACTAC
AilC-NcoI	GGTCCATGGTGTATGCCGAAGGCGAAAGC
AilC-XhoI	AAACTCGAGGAACCGGTAACCCGCGCCAA
NlpD-NdeI	CCTCGCATATGAGCACAGGAAGCCCAATG
NlpD-XhoI	CCCTCGAGTCGCTGCGGAAGGTAACGCAG
YapFNdeI	GGCATATGGATCAGACCCTCCACTTCGC
YapFPasXhoI	GGCTCGAGCACTGGATCACGACGGTACTC
yapM-NdeI	CCTGTCATATGGTAGTATGCCACCAGAAGC
yapM-XhoI	CCCTCGAGAGTTGCTGCTGACTGATTAC
yapL-Nde	CCTGTCATAIGGATTCATGTAATTGATTATACTG
yapL-Xho	GGCTCGAGACCTTTATGTAATTAAATCC
MetQNdeI	CGCCCGCATATGCTTTAAAAATCAAATC
MetQXhoI	AAACTCGAGCCAGCCTTTTACTGCGCCAC
CF-glnA	ACCAACATATGACAAATCCGGGAGATATAAG
glnAXhoI	AAACTCGAGAACGCTGTAATACAGTTCGAAC
htpG-NdeI	GGTGGCATATGAAATATGAAAGGTCAAGAAACC
htpG-XhoI	ATACTCGAGAGCCGTGAGTAACTGATTCATTC
TalBNdeI	AACCGCATATGACCGATAAACTACTTTC
TalBXhoI	TTCTCGAGCAACAAGTCGGAGATCAT
fbaANdeI	GGCATATGCTAAAATTTTGATTCG
fbaAXhoI	GGCTCGAGCAGTACGTCGATGGCGTTTCAG

Примечание: сайты связывания эндонуклеаз рестрикции подчеркнуты.

Note: restriction endonuclease binding sites are underlined.

GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, США), выполняя однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Конструирование плазмид и выделение антигенов *Y. pestis*. Кодирующие последовательности генов *ymt*, *pla*, *pst*, *ompA*, *surA*, *ailC*, *nlpD*, *metQ*, *glnA*, *htpG*, *talB*, *fbaA*, а также passenger-домен генов *yapF*, *yapM* и *yapL* клонировали в экспрессирующем векторе pET32b(+) по сайтам эндонуклеаз NdeI и XhoI. Белки Ymt (595 а.о.), Pst (365 а.о.), SurA (442 а.о.),

MetQ (279 а.о.), GlnA (485 а.о.), HtpG (632 а.о.), TalB (325 а.о.) и Fba (367 а.о.) содержали полигистидиновую последовательность (His₆), выделены методом аффинной Ni⁺⁺-хелатной хроматографии в нативных условиях. Белки Pla (345 а.о.), OmpA (361 а.о.), AilC (168 а.о.), NlpD (341 а.о.), YapF (486 а.о.), YapL (473 а.о.) и YapM (428 а.о.) выделены тем же методом, но в присутствии 6 М мочевины в денатурирующих условиях в связи с нерастворимой природой (рис. 1). Рекомбинантные белки F1, pH6, LcrV выделяли, как описано ранее [9, 10] (рис. 1).

Антительный ответ к антигенам *Y. pestis* у морских свинок, переживших подкожное заражение вирулентными штаммами. Морские свинки традиционно используются в качестве лабораторных животных для моделирования бубонной чумы, так как обладают высокой чувствительностью к *Y. pestis*, диссеминация возбудителя при подкожном заражении происходит в большинство органов с возможным возникновением вторичной легочной инфекции [16]. В настоящем исследовании морских свинок заражали малой дозой штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 дикого типа (ЛД₅₀=24 КОЕ) или бескапсульным (CafI⁻) штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* 358/12 (ЛД₅₀=316 КОЕ), для снижения вирулентности не подвергавшихся предварительной анимализации. Развитие заболевания при использованной заражающей дозе было медленным, с потерей животными

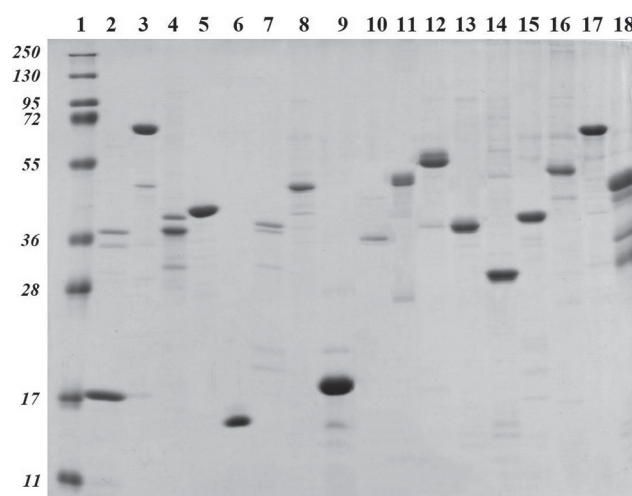


Рис. 1. Электрофорез препаратов очищенных антигенов *Y. pestis*, использованных для определения титров антител:

1 – маркеры молекулярных масс белков, Fermentas, # Sm1811 (сверху вниз: кДа – 250, 130, 95, 72, 55, 36, 28, 17, 11); 2 – смесь LcrV (37 кДа) и F1 (17 кДа); 3 – Ymt (68,6 кДа); 4 – Pla (38,3 кДа); 5 – Pst (41,1 кДа); 6 – pH6-антиген (15 кДа); 7 – OmpA (39 кДа); 8 – SurA (48,8 кДа); 9 – AilC (19,0 кДа); 10 – NlpD (35,9 кДа); 11 – YapF (49,7 кДа); 12 – смесь YapM (45,3 кДа), Fba (40,2 кДа) и MetQ (30,4 кДа); 13 – YapL (51,1 кДа); 14 – GlnA (52,5 кДа); 15 – HtpG (72,1 кДа); 16 – TalB (36,1 кДа)

Fig. 1. Electrophoresis of purified *Y. pestis* antigen preparations utilized to determine the antibody titers:

1 – markers of protein molecular weights, “Fermentas”, # Sm1811 (from top to bottom: кDa – 250, 130, 95, 72, 55, 36, 28, 17, 11); 2 – mix of LcrV (37 kDa), and F1 antigen (17 kDa); 3 – Ymt (62 kDa); 4 – Pla (38 kDa); 5 – Pst (41 kDa); 6 – pH6 antigen (15 kDa); 7 – OmpA (40.6 kDa); 8 – SurA (49.9 kDa); 9 – AilC (19.0 kDa); 10 – NlpD (35 kDa); 11 – YapF (49.7 kDa); 12 – mix YapM (45.3 kDa), Fba (40.2 kDa), and MetQ (30.4 kDa); 13 – YapL (51.1 kDa); 14 – GlnA (52.5 kDa); 15 – HtpG (72.1 kDa); 16 – TalB (36.1 kDa)

около 15 % веса к 7–16-м сут, что согласуется с опубликованными ранее данными [17]. В группе животных, инфицированных подкожно штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* 231, пало 3 из 15 взятых в эксперимент особей, в группе *Y. pestis* subsp. *pestis* 358/12 гибели не наблюдали.

Антительный ответ определяли к 18 рекомбинантным белкам *Y. pestis*, кодируемым генами плазмидной и хромосомной локализации, а именно капсульному антигену (Caf1, F1), мышиному токсину (Ymt), V-антигену (LcrV), активатору плазминогена (Pla), пестицину (Pst), рН6-антигену (Psa), белку внешней мембраны (OmpA), липопротеину D (NlpD), шаперону (SurA), белку локуса адгезии/инвазии (AilC); автотранспортерам Va-типа секреции: YapM, YapF, YapL, субстрат-связывающему белку ABC-транспортера метионина (MetQ), глутаминсинтазе (GlnA), белку теплового шока (HtpG), трансальдолазе B (TalB), фруктозо-бисфосфатаьдолазе (Fba).

У больных или переболевших бубонной чумой морских свинок наблюдали неоднородный антительный ответ к большинству использованных антигенов с вариацией титров IgG от животного к животному (рис. 2). Максимальные титры антител обнаружили к белку AilC при заражении штаммами *Y. pestis* 231 и 358/12; белкам, ассоциированным с патогенностью (Caf1 и Pla для животных, зараженных штаммом *Y. pestis* 231; рН6 и SurA – после введения штамма *Y. pestis* 358/12); белкам-автотранспортерам YapM, YapL и трансальдолазе B при заражении штаммом

Y. pestis 231 или белку-автотранспортеру YapM, субстрат-связывающему белку ABC-транспортера метионина MetQ и белку теплового шока HtpG при подкожном введении штамма *Y. pestis* 358/12.

Динамика роста титров антител в сыворотках морских свинок, зараженных штаммом дикого типа *Y. pestis* 231, не носила прямолинейного характера, однако для большинства исследуемых белков, за исключением F1, LcrV и Pst, наблюдали подъем к 90-м сут наблюдения (рис. 2, А). Причем значения специфических титров к 90-м сут превышали значения титров в первой точке забора крови примерно в 3–30 раз. Достоверные отличия в динамике титров антител установили для белков NlpD и HtpG ($p<0,05$), V-антигена ($p<0,001$), белков F1, AilC, SurA и GlnA ($p<0,005$), а также белка YapM ($p<0,0001$).

В сыворотках морских свинок, зараженных бескапсульным (Caf1⁻) штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* 358/12, обнаружили рост титров специфических антител для белков Pla, Pst, AilC, YapF, YapL и Fba к 15-м сут, для YapM и TalB – к 30-м сут и для LcrV, NlpD, рН6, OmpA, SurA и MetQ – к 60-м сут с общей тенденцией снижения к 90-м сут наблюдения (рис. 2, В). Причем для подавляющего большинства исследованных белков, за исключением пяти (V₃₄₅₅, рН6, YapM, Fba и MetQ), различия в титрах антител между точками забора крови носили достоверный характер ($p<0,05$).

Попытки оценить длительность иммунитета, сформированного после перенесенного заболева-

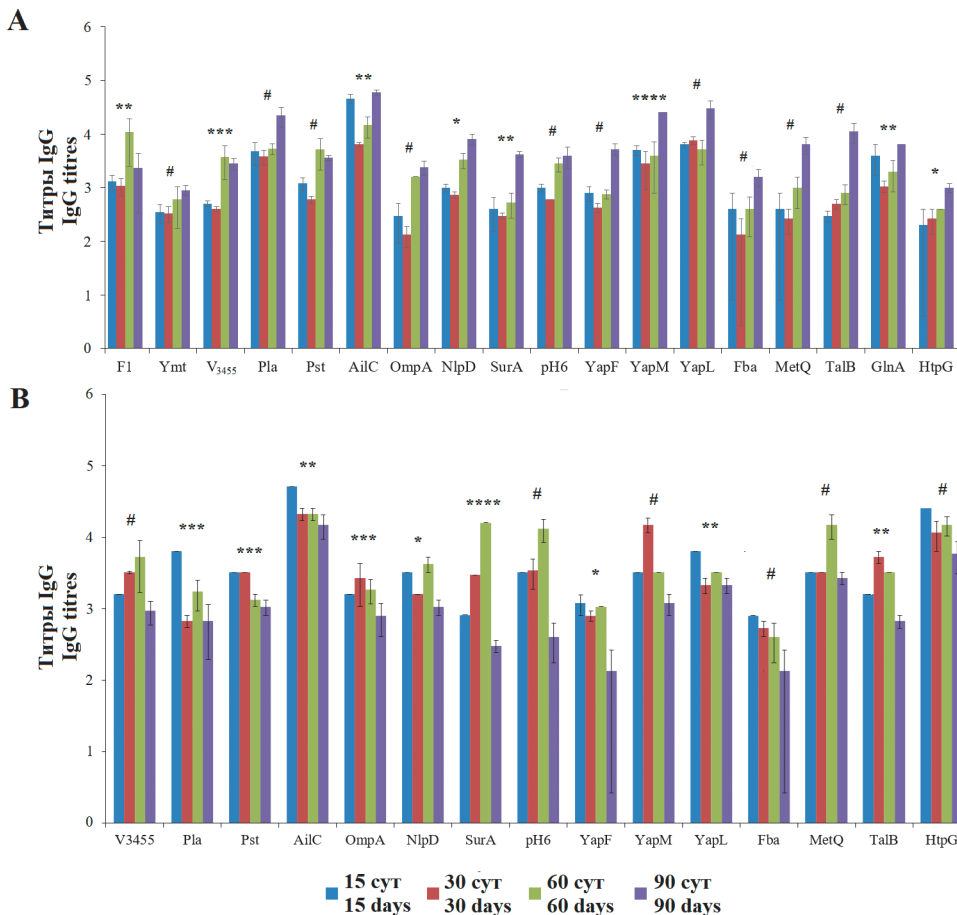


Рис. 2. Динамика титров специфических антител против белков чумного микроба в сыворотках морских свинок на различные сроки после заражения вирулентными штаммами *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 дикого типа (А) или бескапсульным (Caf1⁻) штаммом *Y. pestis* subsp. *pestis* 358/12 (В):
$p>0,05$; * $p<0,05$; ** $p<0,005$;
*** $p<0,001$; **** $p<0,0001$

Fig. 2. Dynamics of specific antibody titers against *Y. pestis* proteins in guinea pig sera at different periods after infection with virulent strains of *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 of the wild type (A) or non-capsular Caf1-negative strain of *Y. pestis* subsp. *pestis* 358/12 (B):
$p>0,05$; * $p<0,05$; ** $p<0,005$;
*** $p<0,001$; **** $p<0,0001$

ния или вакцинации, предпринимаются многими исследователями. В основном в качестве маркирующих антигенов используют один из иммунодоминантных – капсульный антиген F1 и LcrV *Y. pestis*. G. Benner *et al.* [18] методом ИФА обнаружили через 30 сут в крови у мышей, выживших после заражения *Y. pestis*, антитела к F1, LcrV, Pla, YopM, YopH. V. Andrianaiivoarimanana *et al.* [19] показали методом ИФА, что в крови переболевших чумой крыс можно обнаружить анти-F1 IgG в течение многих месяцев. Т.Е. Ерова *et al.* [20] в крови переболевших крыс на 64-е сут идентифицировали антитела к белкам F1, Pla, Ail и OmpA чумного микроба. В. Li *et al.* [21] с использованием панели белковых микрочипов (149 белков *Y. pestis*) выявили 50 белков, инициирующих антительный ответ у кроликов на 50-й день после иммунизации вакцинным штаммом EV76. Авторы обнаружили иммунодоминантный характер 13 белков, в том числе F1, LcrV, рН6, OmpA. В следующей работе В. Li *et al.* [22] показали методом ИФА наличие антител к F1 в сыворотке крови у 69,5 % пациентов, переболевших чумой более 10 лет назад. При этом на панели белковых микрочипов (218 белков *Y. pestis* различной локализации) авторы обнаружили антитела к 20 белкам, в том числе F1, LcrV, OmpA, рН6, в сыворотках пациентов, со времени заболевания которых прошло от 5 до 20 лет. В настоящем исследовании мы впервые проанализировали иммунный ответ у морских свинок, переживших подкожное заражение штаммами чумного микроба, для получения информации об экспрессии *in vivo* и иммуногенности использованных белков *Y. pestis* в процессе инфекции.

Несмотря на несомненное преобладание иммунного ответа на иммунодоминантные антигены, сохранение в организме в течение длительного времени после перенесенного заболевания антител к белкам *Y. pestis* разной локализации, функциональной активности, степени представленности на поверхности бактериальной клетки свидетельствует о множественном характере формирования иммунитета при чуме. Полученные результаты важны для дизайна эффективных вакцин против чумы, а также для поиска новых мишеней для диагностики данной инфекции.

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

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2021–2025 гг. «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями».

Список литературы

1. Попов Н.В., Ерошенко Г.А., Карнаухов И.Г., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Иванова А.В., Поршаков А.М., Ляпин М.Н., Корзун В.М., Вержуцкий Д.Б., Аязбаев Т.З., Лопатин А.А., Ашибиков У.М., Балахонов С.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В.

Эпидемиологическая и эпизоотическая обстановка по чуме в Российской Федерации и прогноз ее развития на 2020–2025 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 1:43–50. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-43-5.

2. Dillard R.L., Juergens A.L. Plague. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.

3. Du Y., Rosqvist R., Forsberg A. Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. *Infect. Immun.* 2002; 70(3):1453–60. DOI: 10.1128/IAI.70.3.1453-1460.2002.

4. Mueller C.A., Broz P., Müller S.A., Ringler P., Erne-Brand F., Sorg I., Kuhn M., Engel A., Cornelis G.R. The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science*. 2005; 310(5748):674–6. DOI: 10.1126/science.1118476.

5. Anderson G.W. Jr., Leary S.E., Williamson E.D., Titball R.W., Welkos S.L., Worsham P.L., Friedlander A.M. Recombinant V antigen protects mice against pneumonic and bubonic plague caused by F1-capsule-positive and -negative strains of *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 1996; 64(11):4580–5. DOI: 10.1128/iai.64.11.4580-4585.1996.

6. Titball R.W., Williamson E.D. Vaccination against bubonic and pneumonic plague. *Vaccine*. 2001; 19(20):4175–84. DOI: 10.1016/S0264-410X(01)00163-3.

7. Williamson E.D. Plague vaccine research and development. *J. Appl. Microbiol.* 2001; 91(4):606–8. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01497.x.

8. Dentovskaya S.V., Shaikhutdinova R.Z., Anisimov A.P. A recombinant prototrophic *Yersinia pestis* strain over-produces F1 antigen with enhanced serological activity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003; 529:419–21. DOI: 10.1007/0-306-48416-1_83.

9. Anisimov A.P., Bakhteeva I.V., Panfersev E.A., Svetoch T.E., Kravchenko T.B., Platonov M.E., Titareva G.M., Kombarova T.I., Ivanov S.A., Rakin A.V., Amoako K.K., Dentovskaya S.V. The subcutaneous inoculation of pH 6 antigen mutants of *Yersinia pestis* does not affect virulence and immune response in mice. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(Pt. 1):26–36. DOI: 10.1099/jmm.0.005678-0.

10. 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., Титарева Г.М. Нуклеотидная последовательность, кодирующая иммуногенный полипептид LcrV_(G113); вызывающий защитный иммунный ответ против *Yersinia pestis*; рекомбинантная плазмидная ДНК pETV-I-3455, кодирующая иммуногенный полипептид LcrV_(G113); рекомбинантный штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)/pETV-I-3455 – продуцент иммуногенного полипептида LcrV_(G113); полипептид LcrV_(G113) и способ его получения. Патент на изобретение РФ № 2439155, опубл. 10.01.2012. Бюл. № 1.

11. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory; 1982. 545 p.

12. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.

13. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука; 1981. 288 с.

14. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1979; 76(9):4350–4. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350.

15. Williamson E.D., Vesey P.M., Gillhespy K.J., Eley S.M., Green M., Titball R.W. An IgG1 titre to the F1 and V antigens correlates with protection to plague infection in the mouse model. *Clin. Exp. Immunol.* 1999; 116(1):107–14. DOI: 10.1046/j.1365-2249.1999.00859.x.

16. Jones S.M., Griffin K.F., Hodgson I., Williamson E.D. Protective efficacy of a fully recombinant plague vaccine in the guinea pig. *Vaccine*. 2003; 21(25-26):3912–8. DOI: 10.1016/S0264-410X(03)00379-7.

17. Quenee L.E., Ciletti N., Berube B., Krausz T., Elli D., Hermanas T., Schneewind O. Plague in Guinea pigs and its prevention by subunit vaccines. *Am. J. Pathol.* 2011; 178(4):1689–700. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.12.028.

18. Benner G.E., Andrews G.P., Byrne W.R., Strachan S.D., Sample A.K., Heath D.G., Friedlander A.M. Immune response to *Yersinia* outer proteins and other *Yersinia pestis* antigens after experimental plague infection in mice. *Infect. Immun.* 1999; 67(4):1922–8. DOI: 10.1128/IAI.67.4.1922-1928.1999.

19. Andrianaiivoarimanana V., Telfer S., Rajerison M., Ranjalaly M.A., Andriamiarimanana F., Rahaingosoaamamitiana C., Rahalison L., Jambou R. Immune responses to plague infection in wild *Rattus rattus*, in Madagascar: a role in foci persistence. *PLoS One*. 2012; 7(6):e38630. DOI: 10.1371/journal.pone.0038630.

20. Ерова Т.Е., Розензweig J.A., Ша J., Суарез Г., Сиера J.C., Киртли М.Л., ван Лер С.Д., Телепнев М.В., Мотин В.Л., Chopra A.K. Evaluation of protective potential of *Yersinia pestis* outer membrane protein antigens as possible candidates for a new-generation recombinant plague vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20(2):227–38. DOI: 10.1128/CI.00597-12.

21. Li B., Jiang L., Song Q., Yang J., Chen Z., Guo Z., Zhou D., Du Z., Song Y., Wang J., Wang H., Yu S., Wang J., Yang R. Protein microarray for profiling antibody responses to *Yersinia pestis* live vaccine. *Infect. Immun.* 2005; 73(6):3734–9. DOI: 10.1128/IAI.73.6.3734-3739.2005.

22. Li B., Du C., Zhou L., Bi Y., Wang X., Wen L., Guo Z., Song Z., Yang R. Humoral and cellular immune responses to *Yersinia pestis* infection in long-term recovered plague patients. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19(2):228–34. DOI: 10.1128/CAI.05559-11.

References

1. Popov N.V., Eroshenko G.A., Karnaukhov I.G., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Ivanova A.V., Porshakov A.M., Lyapin M.N., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Ayazbaev T.Z., Lopatin A.A., Ashibokov U.M., Balakhonov S.V., Kulichenko A.N., Kutryev V.V. [Epidemiological and epizootic situation on plague in the Russian Federation and forecast for its development for 2020–2025]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (1):43–50. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-43-5.

2. Dillard R.L., Juergens A.L. Plague. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.

3. Du Y., Rosqvist R., Forsberg A. Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. *Infect. Immun.* 2002; 70(3):1453–60. DOI: 10.1128/IAI.70.3.1453-1460.2002.

4. Mueller C.A., Broz P., Müller S.A., Ringler P., Erne-Brand F., Sorg I., Kuhn M., Engel A., Cornelis G.R. The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectosome needles. *Science*. 2005; 310(5748):674–6. DOI: 10.1126/science.1118476.

5. Anderson G.W. Jr., Leary S.E., Williamson E.D., Titball R.W., Welkos S.L., Worsham P.L., Friedlander A.M. Recombinant V antigen protects mice against pneumonic and bubonic plague caused by F1-capsule-positive and -negative strains of *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 1996; 64(11):4580–5. DOI: 10.1128/iai.64.11.4580-4585.1996.

6. Titball R.W., Williamson E.D. Vaccination against bubonic and pneumonic plague. *Vaccine*. 2001; 19(20):4175–84. DOI: 10.1016/S0264-410X(01)00163-3.

7. Williamson E.D. Plague vaccine research and development. *J. Appl. Microbiol.* 2001; 91(4):606–8. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01497.x.

8. Dentovskaya S.V., Shaikhutdinova R.Z., Anisimov A.P. A recombinant prototrophic *Yersinia pestis* strain over-produces F1 antigen with enhanced serological activity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003; 529:419–21. DOI: 10.1007/0-306-48416-1_83.

9. Anisimov A.P., Bakhteeva I.V., Panfertsev E.A., Svetoch T.E., Kravchenko T.B., Platonov M.E., Titareva G.M., Kombarova T.I., Ivanov S.A., Rakin A.V., Amoako K.K., Dentovskaya S.V. The subcutaneous inoculation of pH 6 antigen mutants of *Yersinia pestis* does not affect virulence and immune response in mice. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(Pt. 1):26–36. DOI: 10.1099/jmm.0.005678-0.

10. Kopylov P.Kh., Bakhteeva I.V., Anisimov A.P., Dentovskaya S.V., Ivanov S.A., Kiseleva N.V., Levchuk V.P., Panfertsev E.A., Platonov M.E., Svetoch T.E., Titareva G.M. [A nucleotide sequence encoding an immunogenic lcrV(G113) polypeptide that elicits a protective immune response against *Yersinia pestis*; recombinant plasmid DNA pETV-I-3455 encoding the immunogenic LcrV_(G113) polypeptide; recombinant *Escherichia coli* strain BL21(DE3)/pETV-I-3455, producer of the immunogenic polypeptide LcrV_(G113); polypeptide LcrV_(G113) and method for its production]. Patent for the invention in the Russian Federation No. 2439155, publ. 01/10/2012. Bull. No. 1.

11. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory; 1982. 545 p.

12. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.

13. Osterman L.A. [Methods for the Study of Proteins and Nucleic Acids. Electrophoresis and Ultracentrifugation]. Moscow: “Nauka”; 1981. 288 p.

14. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1979; 76(9):4350–4. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350.

15. Williamson E.D., Vesey P.M., Gillhespy K.J., Eley S.M., Green M., Titball R.W. An IgG1 titre to the F1 and V antigens correlates with protection against plague in the mouse model. *Clin. Exp. Immunol.* 1999; 116(1):107–14. DOI: 10.1046/j.1365-2249.1999.00859.x.

16. Jones S.M., Griffin K.F., Hodgson I., Williamson E.D. Protective efficacy of a fully recombinant plague vaccine in the guinea pig. *Vaccine*. 2003; 21(25–26):3912–8. DOI: 10.1016/S0264-410X(03)00379-7.

17. Quenee L.E., Ciletti N., Berube B., Krausz T., Elli D., Hermanas T., Schneewind O. Plague in Guinea pigs and its prevention by subunit vaccines. *Am. J. Pathol.* 2011; 178(4):1689–700. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.12.028.

18. Benner G.E., Andrews G.P., Byrne W.R., Strachan S.D., Sample A.K., Heath D.G., Friedlander A.M. Immune response to *Yersinia* outer proteins and other *Yersinia pestis* antigens after experimental plague infection in mice. *Infect. Immun.* 1999; 67(4):1922–8. DOI: 10.1128/IAI.67.4.1922-1928.1999.

19. Andrianaivoarimanana V., Telfer S., Rajerison M., Ranjalaly M.A., Andriamiarimanana F., Rahaingosoamamitiana C., Rahalison L., Jambou R. Immune responses to plague infection in wild *Rattus rattus*, in Madagascar: a role in foci persistence. *PLoS One*. 2012; 7(6):e38630. DOI: 10.1371/journal.pone.0038630.

20. Erova T.E., Rosenzweig J.A., Sha J., Suarez G., Sierra J.C., Kirtley M.L., van Lier C.J., Telepnev M.V., Motin V.L., Chopra A.K. Evaluation of protective potential of *Yersinia pestis* outer membrane protein antigens as possible candidates for a new-generation recombinant plague vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20(2):227–38. DOI: 10.1128/CAI.00597-12.

21. Li B., Jiang L., Song Q., Yang J., Chen Z., Guo Z., Zhou D., Du Z., Song Y., Wang J., Wang H., Yu S., Wang J., Yang R. Protein microarray for profiling antibody responses to *Yersinia pestis* live vaccine. *Infect. Immun.* 2005; 73(6):3734–9. DOI: 10.1128/IAI.73.6.3734-3739.2005.

22. Li B., Du C., Zhou L., Bi Y., Wang X., Wen L., Guo Z., Song Z., Yang R. Humoral and cellular immune responses to *Yersinia pestis* infection in long-term recovered plague patients. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19(2):228–34. DOI: 10.1128/CAI.05559-11.

Authors:

Gapel'chenkova T.V., Shaikhutdinova R.Z., Trunyakova A.S., Svetoch T.E., Kombarova T.I., Platonov M.E., Borzilov A.I., Kopylov P.Kh., Dentovskaya S.V. State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org.

Об авторах:

Гапелъченкова Т.В., Шайхутдинова Р.З., Трунякова А.С., Светоч Т.Э., Комбарова Т.И., Платонов М.Е., Борзилов А.И., Копылов П.Х., Дентовская С.В. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская область, р.п. Оболensk. E-mail: info@obolensk.org.