

<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-6-12-19>

## Повышение иммуногенной и протективной активности вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ в условиях культивирования с азоксимером бромидом (полиоксидонием)

Т. Н. Щуковская\*, А. Ю. Гончарова, С. А. Бугоркова, О. М. Кудрявцева,  
Н. Е. Щербаклова, А. С. Абдрашитова

ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»  
Роспотребнадзора, г. Саратов

### Резюме

**Актуальность.** Для профилактики чумы в России используют вакцину чумную живую на основе вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, вызывающую развитие иммунитета длительностью до 1 года, что обуславливает необходимость проведения ежегодной ревакцинации прививаемого контингента. Разработка новых способов усиления иммуногенности вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ является актуальной задачей. **Цель** – изучение влияния иммуноадьюванта азоксимера бромидом (полиоксидония, ПО) на иммунобиологические свойства *Y. pestis* EV НИИЭГ в условиях культивирования. **Материалы и методы.** *Y. pestis* EV НИИЭГ выращивали при 28 °С в течение 48 ч на LB agar pH 7,2 (Sigma-Aldrich, USA) как с ПО, так и без. Снятие масс-спектров экстрактов клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ проводили на масс-спектрометре Microflex™ LT (Bruker Daltonics, Германия). Протективные свойства оценивали в условиях моделирования чумной инфекции по интегральному показателю  $ImD_{50}$  на морских свинках и мышах BALB/c при заражении вирулентными штаммами основного подвида *Y. pestis* 231, *Y. pestis* P-13268 Вьетнам. Иммуногенность – по уровню антител к F1 чумного микроба методом ТИФА. **Результаты и обсуждение.** Внесение ПО в среду культивирования вызывает достоверное повышение иммуногенности вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, сопровождающееся ростом продукции антител к капсульному антигену F1 чумного микроба и выраженным усилением защитного действия вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ при моделировании бубонной формы чумы на двух видах экспериментальных животных – мышах линии BALB/c и морских свинках. Зарегистрировано значимое ( $p < 0,05$ ) уменьшение величины  $ImD_{50}$  для культур вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, выращенных на среде с добавлением ПО, по сравнению с  $ImD_{50}$  для *Y. pestis* EV НИИЭГ в стандартных условиях культивирования. **Выводы.** Выявлены изменения количественных и качественных характеристик на масс-спектрах *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного на среде с ПО, сопровождавшиеся повышением его иммуногенной и протективной активности. Морфологические исследования подтверждают отсутствие влияния ПО на безвредность вакцинного штамма.

**Ключевые слова:** азоксимера бромид (полиоксидоний), *Y. pestis* EV НИИЭГ, иммуногенность, протективность  
Конфликт интересов не заявлен.

**Для цитирования:** Щуковская Т. Н., Гончарова А. Ю., Бугоркова С. А. и др. Повышение иммуногенной и протективной активности вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ в условиях культивирования с азоксимером бромидом (полиоксидонием). Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2021;20(6): 12–19. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-6-12-19>.

### Enhancement of the *Yersinia pestis* EV NIEG Vaccine Strain Immunogenic and Protective Activity under Cultivation with Azoximer Bromide (Polyoxidonium)

TN Shchukovskaya\*\*, AY Goncharova, SA Bugorkova, OM Kudryavtseva, NE Shcherbakova, AS Abdrashitova  
Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" Rospotrebnadzor, Saratov, Russia

#### Abstract

**Background.** The live-attenuated vaccine based on the *Yersinia pestis* strain EV line NIEG is still used in Russia, providing protective efficacy against plague. Nevertheless, there is an urgent need for developing new ways to increase the immunogenicity of the *Y. pestis* EV NIEG vaccine strain. In this study, the ability of direct action of immunoadjuvant azoximer bromide (polyoxidonium, PO) on the immunobiological properties of vaccine strain *Y. pestis* EV NIEG during cultivation on a dense nutrient medium was

\*Для переписки: Щуковская Татьяна Николаевна, д. м. н., профессор, главный научный сотрудник отдела иммунологии, ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, 410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46. +7 (845-2) 26-21-31, Факс: +7 (845-2) 51-52-12. [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru). [tatyanaschuk@mail.ru](mailto:tatyanaschuk@mail.ru). ©Щуковская Т. Н. и др.

\*\*For correspondence: Shchukovskaya Tatiana N., Dr. Sci. (Med.), Professor, Head Researcher, Department of Immunology, Federal Government Health Institution "Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russia. +7 (845-2) 26-21-31, fax: +7 (845-2) 51-52-12. [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru). [tatyanaschuk@mail.ru](mailto:tatyanaschuk@mail.ru). ©Shchukovskaya TN et al.

evaluated. **Materials & Methods.** *Y. pestis* EV NIIEG, cultivated at 28 °C for 48 h on LB agar, Miller pH 7.2 ± 0.1 (Sigma-Aldrich, USA) with the addition of PO and without. MALDI-TOF mass-spectrometry was deployed for the obtaining of mass-spectra of ribosomal proteins from *Y. pestis* EV NIIEG cells on the Microflex™ LT mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany). Protective efficacy was evaluated under subcutaneously challenge guinea pigs and mice BALB's with 400 LD<sub>50</sub> doses of the *Y. pestis* 231, *Y. pestis* P-13268 Vietnam (MLD=5 CFU). Antibody titers to F1 in serum were determined using an ELISA. **Results.** The addition of the therapeutic concentration of PO in the cultivation medium induced a significant increase in the immunogenicity of *Y. pestis* EV NIIEG that resulted in enhancement of serum antibody levels against *Y. pestis* F1 antigen and several times the growth of protective efficacy in the bubonic plague model on two types of experimental animals. ImD<sub>50</sub> of the vaccine strain *Y. pestis* EV NIIEG, cultivated with PO, was significantly ( $p < 0,05$ ) lower in comparison to ImD<sub>50</sub> for *Y. pestis* EV NIIEG in standard cultivation conditions. One year of storage at a temperature of 4 °C did not alter the protective properties of the vaccine strain *Y. pestis* EV NIIEG, cultivated with PO. **Conclusions.** Morphological studies confirmed the absence of influence PO introduction into the cultivation environment on the safety of the vaccine strain. MALDI-TOF MS profile of the *Y. pestis* EV NIIEG, cultivated with PO, had peaks characteristic features. The mass peak at  $m/z$  3,061 was significantly down-regulated and new mass peaks at  $m/z$  2,759,  $m/z$  3,533 were determined. These changes are accompanied by the increase of *Y. pestis* EV NIIEG immunogenicity.

**Keywords:** azoximer bromide (polyoxidonium), cultivation *Y. pestis* EV NIIEG, immunogenic and protective properties  
No conflict of interest to declare.

**For citation:** Shchukovskaya TN, Goncharova AY, Bugorkova SA, et al. Enhancement of the *Yersinia pestis* EV NIIEG vaccine strain immunogenic and protective activity under cultivation with azoximer bromide (polyoxidonium). *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2021;20(6): 12–19 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-6-12-19>.

## Введение

Чума – особо опасная инфекционная болезнь с природной очаговостью, возбудитель которой *Yersinia pestis* относится к микроорганизмам I группы патогенности. На территории Российской Федерации действуют 11 природных очагов чумы, в 7 из которых циркулируют высоковирулентные и эпидемически значимые штаммы. Ситуация также осложняется ежегодным выявлением новых случаев чумы среди населения сопредельных с Россией государств (Казахстан, Монголия, Китай) [1–3]. Для профилактики чумы предусмотрено проведение комплекса многоплановых профилактических мероприятий, включая вакцинацию, которая внесена в Календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям [4]. За рубежом отсутствуют лицензированные вакцины для специфической профилактики чумы [5,6]. В России для этого используют вакцину чумную живую (ВЧЖ), которая формирует напряженный иммунитет продолжительностью 6–12 месяцев, что обуславливает необходимость проведения ежегодной ревакцинации прививаемого контингента [4]. Обострение эпидемической ситуации в 2015–2016 гг. в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы, вызванное единичными случаями бубонной формы чумы среди людей, в том числе и у вакцинированных [7], заставляет интенсифицировать поиск возможных путей повышения иммуногенных и протективных свойств ВЧЖ.

Действие вакцины основано на приживлении и размножении в макроорганизме клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, сопровождающемся формированием иммунного ответа на целый ряд антигенов чумного микроба и развитием специфической резистентности к чуме. В этой связи разработка новых способов усиления иммуногенности вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ,

включая прямое воздействие иммуoadъювантов на его биологические свойства, является актуальной задачей.

В России синтезирован и внедрен в практику не имеющий аналогов за рубежом адъювант-иммуоактиватор азоксимера бромид (полиоксидоний) с молекулярной массой 80 kD. Данный препарат представляет собой водорастворимое N-оксидированное производное полиэтиленпиперазина с наличием на поверхности молекулы большого количества различных активных групп, которые могут взаимодействовать с белками поверхностных структур бактериальных клеток [8]. Известно, что полиоксидоний (ПО) обладает выраженным иммуномодулирующим и антигенусиливающим эффектом [9]. Введение ПО в схему вакцинации против чумы усиливало защитное действие вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в условиях моделирования бубонной и легочной форм чумы штаммами *Y. pestis* основного и неосновного подвидов из различных природных очагов [10]. В настоящее время отсутствуют сведения о прямом действии адъювантов с иммуноактивирующим действием на биологические свойства возбудителей особо опасных заболеваний бактериальной этиологии и на вакцинные штаммы.

**Цель работы** – изучение влияния азоксимера бромида (полиоксидония) на иммуногенные и протективные свойства вакцинного штамма чумного микроба *Y. pestis* EV НИИЭГ в условиях культивирования на плотной питательной среде.

## Материалы и методы

Работа проводилась в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» [11]. Вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ (Pgm–,

## Original Articles

pYT<sup>+</sup>, pYV<sup>+</sup>, pYP<sup>+</sup>) и вирулентные штаммы основного подвида *Y. pestis* 231 (Pgm<sup>+</sup>, pYT<sup>+</sup>, pYV<sup>+</sup>, pYP<sup>+</sup>), LD<sub>50</sub> при подкожном введении для белых мышей 5 м. кл., LD<sub>50</sub> для морских свинок 10 м. кл.; *Y. pestis* P-13268 (Pgm<sup>+</sup>, pYT<sup>+</sup>, pYV<sup>+</sup>, pYP<sup>+</sup>) Вьетнам, LD<sub>50</sub> для белых мышей 5 м. кл, получены из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб». В экспериментах использовали мышей линии BALB/c массой (18 ± 2) г и морских свинок массой (300 ± 50) г, полученных из отдела экспериментальных животных с виварием РосНИПЧИ «Микроб» (г. Саратов). Манипуляции с животными, а также выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей [12]. Протокол исследований одобрен Комиссией по биоэтике при ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

*Y. pestis* EV НИИЭГ выращивали при 28 °С в течение 48 ч на питательной среде LB agar, Miller pH 7,2 ± 0,1 (Sigma-Aldrich, USA) как с добавлением ПО в конечной концентрации 60 мкг/мл, что соответствует его терапевтической концентрации при разовом введении человеку, так и без внесения в среду ПО.

Иммуногенность *Y. pestis* EV НИИЭГ в условиях культивирования с ПО и без оценивали по уровню антител (АТ) к капсульному антигену F1 чумного микроба в сыворотке крови на 21-е сутки после иммунизации подкожно мышью BALB/c дозой 2,5x10<sup>4</sup> колониеобразующих единиц (КОЕ), морских свинок дозами 10<sup>3</sup> и 5x10<sup>3</sup> КОЕ. Определение АТ проводили методом ТИФА с применением тест-системы «ИФА-АТ-Ф1 YERSINIA PESTIS» рег. уд. № ФСР 2012/13946 – 101012 (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»). Учет оптической плотности осуществляли на микропланшетном фотометре Stat Fax-3200 (USA) при длине волны 405 нм.

Защитное действие вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ при культивировании с ПО и без определяли в условиях моделирования чумной инфекции по интегральному показателю ImD<sub>50</sub> на морских свинках и мышах линии BALB/c при заражении вирулентными штаммами основного

подвида *Y. pestis* 231, *Y. pestis* P-13268 Вьетнам. *Y. pestis* EV НИИЭГ вводили подкожно соответствующим группам мышей BALB/c в дозах 2x10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 5x10<sup>3</sup> и 2,5x10<sup>4</sup> КОЕ, морским свинкам – 4x10<sup>1</sup>, 2x10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 5x10<sup>3</sup> КОЕ. Заражение осуществляли подкожно дозой 400 LD<sub>50</sub> на 21-е сутки после вакцинации [13]. За инфицированными животными наблюдали в течение 20 суток. Величину ImD<sub>50</sub> – количество живых микробных клеток, выраженное в колониеобразующих единицах и способных защитить через 21 сутки 50% взятых в опыт животных от заражения вирулентными штаммами *Y. pestis* дозой 400 LD<sub>50</sub>, рассчитывали по методу Кербера в модификации И. П. Ашмарина [14].

Для гистологического исследования морфологический материал фиксировали в 10% водном нейтральном растворе формалина («НеваРеагент», Россия) с дальнейшей обработкой по стандартной схеме [15]. Препараты, окрашенные гематоксилином и эозином (Merck, Германия), анализировали на микроскопе OLYMPUS CX 41 (Olympus, Япония) при увеличении X 100-400 и цифровой камере VZ-C31S (VideoZavr, Россия) в программе VideoZavr (версия 1.5).

Снятие масс-спектров экстрактов клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных на среде с ПО и без, проводили в автоматическом режиме на масс-спектрометре MicroflexTM LT (Bruker Daltonics, Германия). Экстракцию белков осуществляли в соответствии с MP 4.2.0089-14 [16]. В качестве матрицы применяли насыщенный раствор α-циано-4-гидроксикоричной кислоты. Анализируемый диапазон масса/заряд (m/z) составлял 2000–20000 Да. Для получения одиночного масс-спектра использовали 40 импульсов азотного лазера (частота 60 Гц). Сравнение пиков белковых масс-спектров проводили в программе общего доступа mMass [http://www.mmass.org/]. Идентификацию пептидов по значению m/z осуществляли с использованием международной базы белков UniProt [http://www.uniprot.org/].

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартного пакета программ

**Таблица 1. Титры антител к капсульному антигену F1 чумного микроба в сыворотке крови мышей BALB/c, вакцинированных штаммом *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, культивированном с добавлением азоксимера бромида и без него**

**Table 1. Antibody titers to F1 *Y. pestis* capsule antigen in serum BALB/c mice vaccinated with *Y. pestis* EV NIEG cultured with and without addition of azoximer bromide**

Иммунизирующий штамм, доза (КОЕ) Immunized strain, dose (CFU)	Количество животных Number of animals	Реципрокные значения среднегеометрического титра Geometric mean reciprocal titers
		M ± m
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ (LB agar) 2,5 x 10 <sup>4</sup>	10	76 ± 35,43
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ (LB agar+ ПО) 2,5 x 10 <sup>4</sup>	10	136 ± 36,6 *
0,9% раствор натрия хлорида PBS	10	< 40

Примечание: \*p < 0,05 по отношению к группе сравнения, иммунизированной *Y. pestis* EV НИИЭГ.  
Note: \*p < 0.05 in comparison with vaccinated mice *Y. pestis* EV NIEG without PO

**Таблица 2. Влияние азоксимера бромида в условиях культивирования на защитное действие вакцинного штамма чумного микроба *Y. pestis* EV НИИЭГ**

**Table 2. The influence of azoximer bromide under cultivation on the protective efficacy of vaccine strain *Y. pestis* EV line НИИЭГ**

Заражающий штамм. Доза Challenge strain. Dose	Иммунизирующий штамм Immunizing strain					
	<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ (LB agar, Miller pH 7,2)			<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ (LB agar, Miller pH 7,2 + PO)		
	Иммуни- зирующая доза (КОЕ) Immunizing dose (CFU)	Число животных (выжившие/ общее кол-во) Number of animals (survived/ inoculated)	ImD <sub>50</sub> КОЕ <sup>50</sup> (CFU)	Иммуни- зирующая доза (КОЕ) Immunizing dose (CFU)	Число ж-х (выжив-шие/ общее кол-во) Number of animals (survived/ inoculated)	ImD <sub>50</sub> КОЕ <sup>50</sup> (CFU)
<i>Y. pestis</i> 231 400 LD <sub>50</sub>	2x10 <sup>2</sup> 1x10 <sup>3</sup> 5x10 <sup>3</sup> 2,5x10 <sup>4</sup>	0/10 0/10 1/10 3/10	2,9 x 10 <sup>4</sup> (29000 КОЕ)	2x10 <sup>2</sup> 1x10 <sup>3</sup> 5x10 <sup>3</sup> 2,5x10 <sup>4</sup>	4/10 4/10 2/10 10/10	0,22 x10 <sup>4</sup> (2231 КОЕ)
<i>Y. pestis</i> 13268 (Вьетнам) 400 LD <sub>50</sub>	2x10 <sup>2</sup> 1x10 <sup>3</sup> 5x10 <sup>3</sup> 2,5x10 <sup>4</sup>	0/10 0/10 2/10 4/10	2,1 x 10 <sup>4</sup> (21000 КОЕ)	2x10 <sup>2</sup> 1x10 <sup>3</sup> 5x10 <sup>3</sup> 2,5x10 <sup>4</sup>	6/10 8/10 4/10 10/10	0,06 x10 <sup>4</sup> (616 КОЕ)

Примечание: \*p < 0,05 при сравнении с вакцинированными *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенным на LB agar, Miller pH 7,2 ± 0,1 без ПО;  
Note: \*p < 0.05 in comparison with vaccinated mice *Y. pestis* EV НИИЭГ without PO

**Таблица 3. Протективные свойства вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного с добавлением азоксимера бромида, после 1 года хранения при 4 °С**

**Table 3. The protective properties of the vaccine strain *Y. pestis* EV line НИИЭГ, grown with the addition of azoximer bromide after 1 year of storage (4 °C)**

Иммунизирующий штамм, доза (КОЕ) Immunizing strain, dose (CFU)	Заражающий штамм <i>Y. pestis</i> 231, доза Challenge strain <i>Y. pestis</i> 231, dose	Без хранения No storage		1 год при 4 °С After 1 year of storage (4 °C)	
		Число животных (павшие/ общее кол-во) Number of animals (Dead/ inoculated)	% выживших Survival (%)	Число животных (павшие/ общее кол-во) Number of animals (Dead/ inoculated)	% выживших Survival (%)
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ (LB agar + PO) 1x10 <sup>5</sup> КОЕ (CFU)	400 LD <sub>50</sub>	0/8	100 %	0/8	100 %
0,9% раствор натрия хлорида PBS	400 LD <sub>50</sub>	10/10	0	–	–
0,9% раствор натрия хлорида PBS	10 LD <sub>50</sub>	10/10	0	–	–

Microsoft Office Excel 2016. Взаимосвязь между переменными определяли с помощью рангового корреляционного анализа по Спирмену. Данные представляли в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее значение,  $m$  – средняя квадратическая ошибка средней арифметической. Значимость различий между группами оценивали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия между группами наблюдения считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

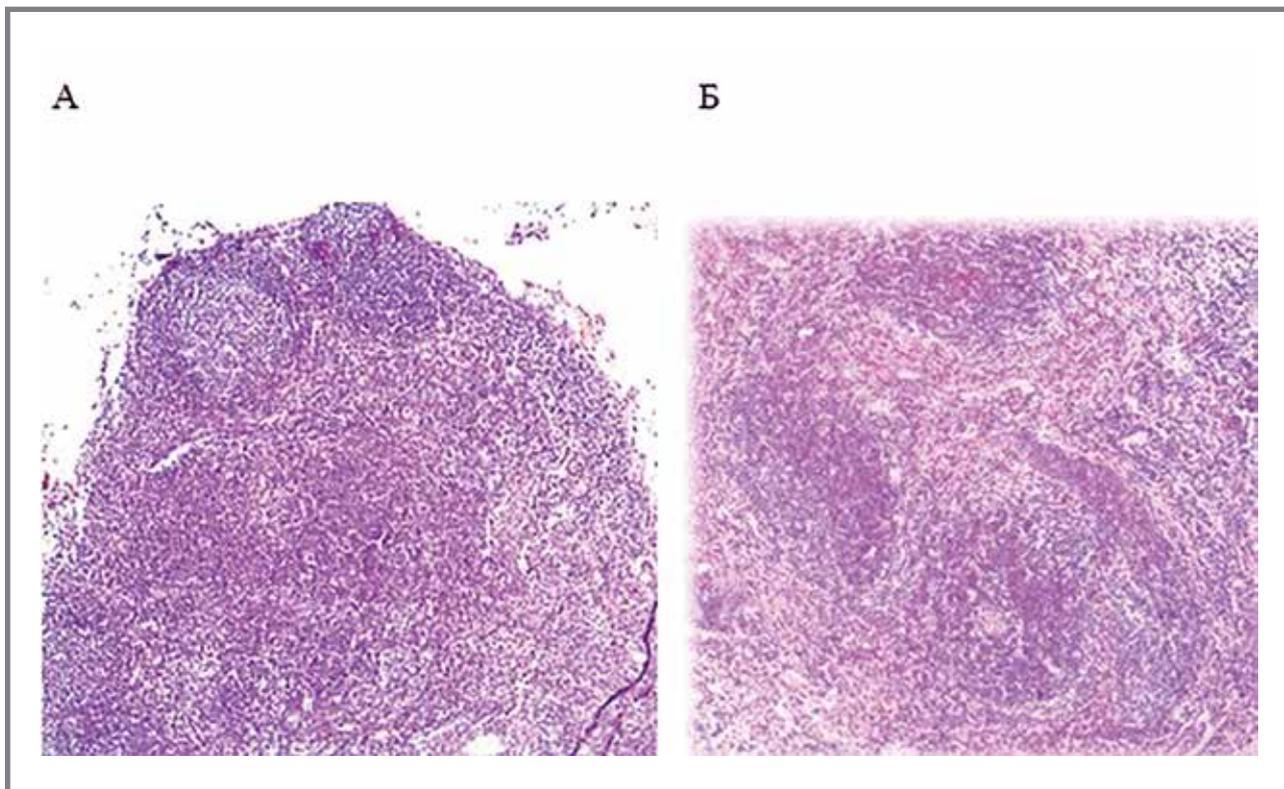
Как известно, ПО характеризуется быстрым всасыванием и высокой скоростью распределения

по всем органам и тканям организма, проникает через гематоэнцефалический и гематоофтальмический барьеры. Биодоступность препарата составляет более 90% при парентеральном введении, а максимальная концентрация в крови достигается через 40 минут. Период полувыведения ПО для разного возраста – от 36 до 65 часов [17]. Также ПО способен блокировать растворимые токсические вещества и микрочастицы, выводить из организма токсины, соли тяжелых металлов, ингибировать перекисное окисление липидов как за счет перехвата свободных радикалов, так и посредством элиминации каталитически активных ионов Fe<sup>2+</sup> [18].

## Original Articles

**Рисунок 1. Мыши BALB/c на 7 сутки после вакцинации штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенным с добавлением азоксимера бромида, в дозе  $2,5 \times 10^4$  КОЕ. А – лимфатический узел, активация паракортикальной зоны; В – селезенка, гиперплазия Т-зон. Окр. Гематоксилин-Эозин. Ув.  $\times 100$**

**Figure 1. Mice BALB/c on 7 day after vaccination with  $2,5 \times 10^4$  CFU of *Y. pestis* EV НИИЭГ, cultivated on LB agar with the addition of azoximer bromide (PO). A – lymph node, activation of the paracortic zone. B – spleen, T-zone hyperplasia. Stained with hematoxylin and eosin. Original magnification,  $\times 100$  (main images). Data are representative of three experiments**



Одновременное внутривенное введение ВЧЖ и ПО кроликам и морским свинкам индуцировало выявление антител к капсульному антигену чумного микроба F1 в более ранние сроки и повышало протективную активность данной вакцины [19]. Эффективность сочетанного применения ПО и ВЧЖ может быть обусловлена не только его иммуностимулирующим действием, но и непосредственным воздействием на размножающиеся в вакцинированном организме клетки вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ.

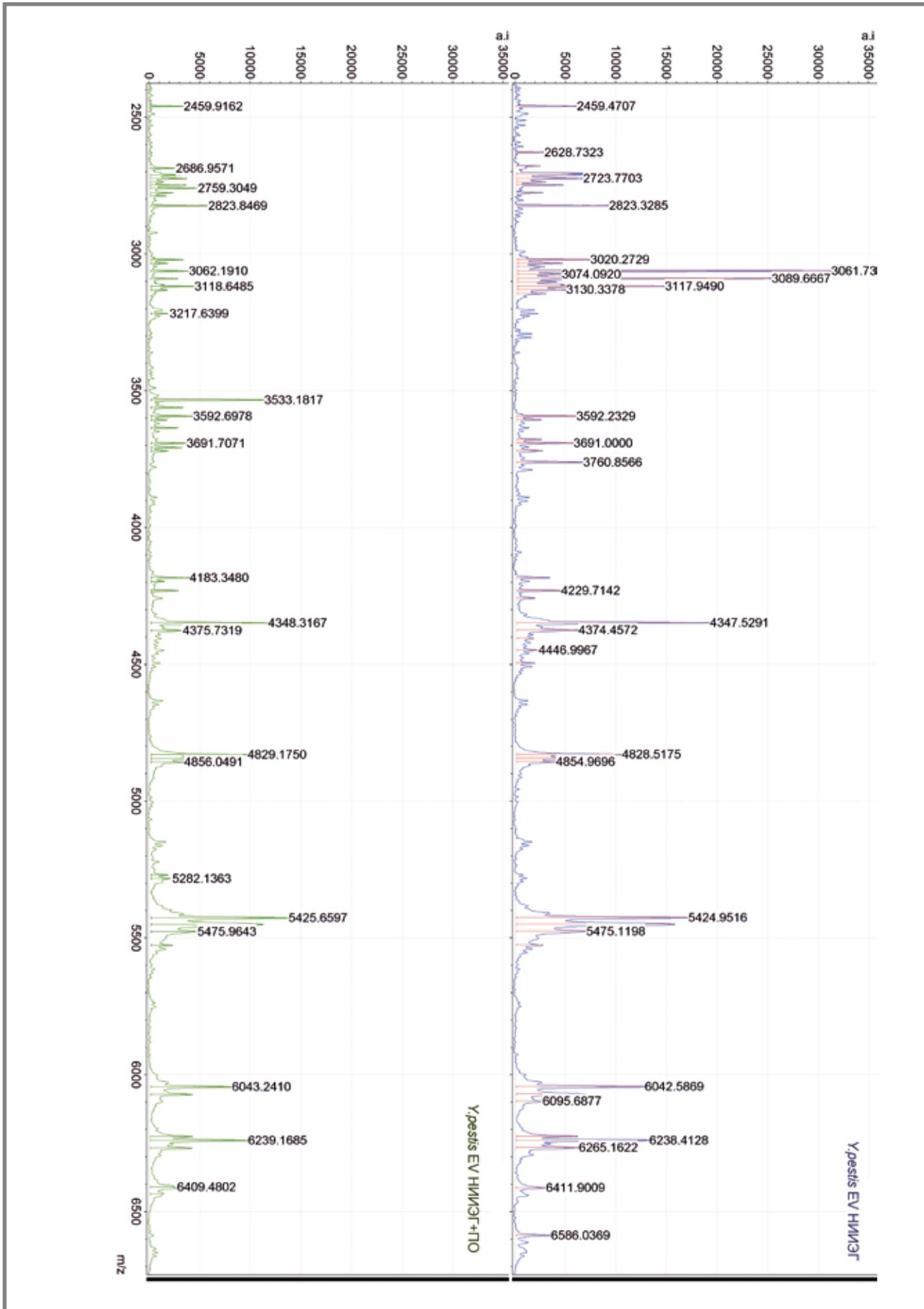
В настоящем исследовании проведено изучение возможности прямого действия ПО на биологические свойства *Y. pestis* EV НИИЭГ в условиях культивирования на плотной питательной среде. Выбор питательной среды LB agar, Miller pH  $7,2 \pm 0,1$  обусловлен сравнительно близким по данным транскриптомного анализа характером роста чумного микроба в плазме крови человека [20], что позволяет более адекватно экстраполировать результаты исследований на процессы иммунопатогенеза в организме людей при чуме.

Характеристики антигенной активности культур *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных на LB агаре с ПО и без, при вакцинации мышей BALB/c представлены в таблице 1. Установлено, что уровень антител к капсульному антигену чумного микроба F1 в 1,7 раза выше в группе животных, иммунизированных

вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенным на питательной среде с ПО. Аналогичные по вектору достоверные изменения титров антител к F1 чумного микроба наблюдались у другого вида биомодельных животных – морских свинок. Зарегистрировано 4-кратное повышение титров антител к F1 чумного микроба в группе животных, иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенным на среде с ПО, по сравнению с уровнем антител, детектируемым у морских свинок, иммунизированных вакцинным штаммом *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенным в стандартных условиях. Реципрокные значения среднегеометрического титров антител к F1 чумного микроба в сыворотке крови морских свинок, вакцинированных  $1000$  КОЕ и  $5000$  КОЕ *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенным на LB agar с добавлением ПО и без составили  $266,6 \pm 75,4$ ;  $640 \pm 0,1$  и  $66,7 \pm 18,8$ ;  $133,3 \pm 37,1$  соответственно при  $p < 0,05$ . Выявлена высокая степень прямой связи между наличием ПО в среде культивирования и уровнем АТ к капсульному антигену чумного микроба F1 ( $r = 1,0$ ,  $p < 0,05$ ).

Нами проведена оценка влияния азоксимера бромида на протективные свойства вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ по интегральному показателю  $ImD_{50}$  при моделировании бубонной формы чумы на двух видах экспериментальных животных – мышах линии BALB/c и морских свинках.

**Рисунок 2. MALDI-TOF MS профили белковых экстрактов *Y. pestis* EV НИИЭГ, полученных с добавлением азоксимера бромида**  
**Figure 2. MALDI-TOF MS profiles of protein extracts *Y. pestis* EV NIEG obtained with the addition of azoximer bromide**



## Original Articles

Установлено, что введение ПО в состав среды культивирования приводило к достоверному повышению защитного действия вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ у мышей BALB/c (табл. 2). Регистрировалось значимое ( $p < 0,05$ ) уменьшение величины  $ImD_{50}$  для культур вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных на среде с добавлением ПО, по сравнению с  $ImD_{50}$  для *Y. pestis* EV НИИЭГ в стандартных условиях культивирования. Отмечалось снижение  $ImD_{50}$  в 13 раз при заражении высоковирулентным штаммом *Y. pestis* 231, применяющимся в качестве заражающего тест-штамма при контроле вакцины чумной живой, и в 30 раз при инфицировании штаммом основного подвида *Y. pestis* P-13268 (Вьетнам). Введение ПО в состав среды культивирования приводило также к достоверному повышению защитного действия *Y. pestis* EV НИИЭГ при моделировании бубонной формы чумы у морских свинок. Наблюдалось значимое ( $p < 0,05$ ) уменьшение величины  $ImD_{50}$  для вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного на среде с добавлением ПО, по сравнению с  $ImD_{50}$  для *Y. pestis* EV НИИЭГ в стандартных условиях культивирования (151 КОЕ и 448 КОЕ соответственно). Длительное хранение (1 год) при температуре 4 °C не влияло на протективные свойства вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного на среде с добавлением ПО (табл. 3).

Морфологические исследования органов мышей BALB/c, иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенным на среде с добавлением ПО и без, в дозах  $5 \times 10^3$  и  $2,5 \times 10^4$  КОЕ, не выявили грубых изменений. При гистологическом исследовании на фоне отсутствия признаков повреждения тканей регистрировали гиперпластические процессы в лимфоидных органах, причем у животных, иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенном на среде с ПО, выраженная активация лимфатических структур началась уже с 7-х суток. Отмечалась более выраженная активация паракортикальных зон в лимфатических узлах и раннее формирование активных Т-зон в селезенке (рис. 1).

Сравнительный анализ масс-спектрометрических профилей *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных на среде с ПО и без, показал, что основное количество зафиксированных пиков локализовано в интервале значений масс 2400–12000 Да (рис. 2). На всех масс-спектрах встречались гомологичные

сигналы, отличающиеся по абсолютной интенсивности ( $m/z \pm 5$  Да): 2459, 2823, 3592, 3691, 4347, 4829, 5424, 5475, 6042, 6238, 6411. Введение ПО в среду культивирования приводило к резкому снижению интенсивности пика ( $m/z$  3061), характерного для штаммов *Y. pestis* основного подвида, имеющих плазмиду *rYP* (*pPst*) [21,22], исчезновению отдельных сигналов ( $m/z$  3760, 6585) и появлению новых ( $m/z$  2759, 3533). Пик со значением  $m/z$  2759 соответствует пептиду, состоящему из 23 аминокислотных остатков, который идентифицируется в базе данных UniProtKB как фрагмент гипотетической цинк-связывающей дегидрогеназы, сигнал  $m/z$  3533 – как не охарактеризованный белок, состоящий из 34 аминокислотных остатков, показанный для *Y. pestis* *biovar Orientalis str. PEXU2*. Изменения количественных и качественных характеристик на масс-спектрах *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного на среде с ПО, сопровождались повышением его иммуногенной и протективной активности.

Таким образом, в данной работе экспериментально обоснована возможность использования азоксимера бромида для повышения иммуногенной и протективной активности вакцинного штамма чумного микроба. Показано, что внесение ПО в среду культивирования вызывает значимое повышение иммуногенности вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, характеризующееся ростом продукции антител к капсульному антигену F1 чумного микроба и выраженным усилением защитного действия вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ при моделировании бубонной формы чумы на двух видах экспериментальных животных – мышах линии BALB/c и морских свинок при отсутствии негативного влияния на безвредность вакцинного штамма. Разработанный подход позволяет получить культуру вакцинного штамма чумного микроба, обладающего высокой иммуногенностью, без использования живого организма (анимализации), клеточных культур. Вопрос о молекулярных механизмах этого воздействия является предметом дальнейших исследований.

*Исследование выполнено при поддержке бюджетного финансирования в рамках темы НИР № АААА-А16-118011590103-А.*

*The research was carried out with the support of budgetary funding within the framework of research project No. АААА-А16-118011590103-А.*

## Литература

1. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2020. 299 с.
2. Shi L., Yang G., Zhang Z., et al. Reemergence of human plague in Yunnan, China in 2016 // *PLoS ONE*. 2018. Vol. 13, N 6:e0198067. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198067>
3. Kehrman J., Popp W., Delgermaa B., et al. Two fatal cases of plague after consumption of raw marmot organs. *Emerg Microbes Infect.* 2020. Vol. 9, N 1. P. 1878–1880. [DOI 10.1080/22221751.2020.1807412](https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1807412)
4. Профилактика чумы. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.7.3465-17. Бюллетень нормативных и методических документов Госсанэпиднадзора. 2017. № 4. С. 3–21.
5. WHO Workshop Meeting Report «Efficacy trials of Plague Vaccines: endpoints, trial design, site selection». 2018, INSERM, Paris, 12 p. [https://www.who.int/blueprint/what/norms-standards/PlagueVxeval\\_FinalMeetingReport.pdf?ua=1](https://www.who.int/blueprint/what/norms-standards/PlagueVxeval_FinalMeetingReport.pdf?ua=1).
6. Demeure C.E., Dussurget O., Fiol G.M., et al. *Yersinia pestis* and plague: an updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination, and diagnostics // *Genes and Immunity*. 2019. Vol. 20. P. 357–370. <https://doi.org/10.1038/s41435-019-0065-0>
7. Балахонов С. В., Попова А. Ю., Мищенко А. И. и др. Случай заболевания человека чумой в Кош-Агачском районе Республике Алтай в 2015 г. Сообщение 1. Клинико-эпидемиологические и эпизоотологические аспекты. Проблемы особо опасных инфекций. 2016. № 1. С. 55–60. [DOI 10.21055/0370-1069-2016-1-55-60](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-1-55-60)
8. Петров Р. В., Хаитов Р. М., Некрасов А. В. и др. Полиоксидоний: Механизм действия и клиническое применение. *Медицинская иммунология*. 2000. Т. 2, № 3. С. 271–278.

9. Омельченко Н. Д., Иванова И. А., Беспалова И. А., Филиппенко А. В. Иммуномодуляторы и специфическая профилактика инфекционных болезней. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017. № 3. С. 21–26. DOI:10.21055/0370-1069-2017-3-21-2.
10. Щуковская Т. Н., Курьелина А. Ф., Шавина Н. Ю., Бугоркова С. А. Влияние полиоксидония, Poly(I:C), даларгина на защитное действие вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭ при экспериментальной чуме. *Российский иммунологический журнал*. 2020. Т. 23, № 1. С. 41–50. <https://doi.org/10.46235/1028-7221-005-IOP>.
11. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности): Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118-13. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. 2014. <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70563038/>
12. World Health Organization. Vaccine Supply and Quality Unit. *Manual of laboratory methods for testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunization*. World Health Organization. [1997. 221 p. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/63576>
13. МУ 3.3.1.113-02. Основные требования к вакцинным штаммам чумного микроба: Методические указания. М.: Минздрав России. 2002. DOI: 10.13140/RG.2.1.1468.6246
14. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. <https://search.rsl.ru/ru/record/01005954123>.
15. Коржевский Д. Э., Гиляров А. В. Основы гистологической техники. СПб: СпецЛит; 2010.
16. Использование метода времяпротечной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I–II групп патогенности: Методические рекомендации. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. 2015. [https://www.rosotrebndzord.ru/documents/details.php?ELEMENT\\_ID=4693](https://www.rosotrebndzord.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=4693)
17. Некрасов А. В., Пучкова Н. Г. Полиоксидоний: основы синтеза и свойства // *Иммунология*. 2002. Т. 23, № 6. С. 329–333.
18. Пинегин Б. В., Некрасов А. В., Хаитов Р. М. Иммуномодулятор полиоксидоний: механизмы действия и аспекты клинического применения // *Цитокины и воспаление*. 2004. Т. 3, № 3. С. 41–47.
19. Пономарева Т. С., Дербябин П. Н., Каралынк Б. В. и др. Влияние полиоксидония на иммунную и протективную активность живой чумной вакцины // *Иммунология*. 2014. Т. 35, № 5. С. 286–290.
20. Chauvaux S., Dillies M.A., Marceau M., et al. In silico comparison of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* transcriptomes reveals a higher expression level of crucial virulence determinants in the plague bacillus. *International Journal of Medical Microbiology*. 2011. Vol. 301, N. 2. P. 105–116. doi:10.1016/j.ijmm.2010.08.013.
21. Спицын А. Н., Уткин Д. В., Щербак Н. Е. и др. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ штаммов возбудителя чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016. № 2. С. 91–94. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-2-91-94>
22. Котенева Е. А., Котенев Е. С., Калинин А. В. и др. Протеомное профилирование штаммов *Yersinia pestis*, циркулирующих на территории природных очагов Северного Кавказа и Закавказья. *Журн. микробиол.* 2019. № 4. С. 18–25. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-4-18-25>

## References

1. On the state of sanitary and epidemiological wellbeing of the population in the Russian Federation in 2019: State report. М.: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing. 2020:299.
2. Shi L, Yang G, Zhang Z, et al. Reemergence of human plague in Yunnan, China in 2016. *PLoS ONE*. 2018;13(6):e0198067. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198067>
3. Kehrmann J, Popp W, Delgermaa B, et al. Two fatal cases of plague after consumption of raw marmot organs. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):1878–1880. [DOI: 10.1080/22221751.2020.1807412](https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1807412)
4. Prevention of plague. Sanitary - epidemiological Regulations SP 3.1.7.3465-17. Bulletin of regulatory and methodical documents of Gossanepidnadzor, 2017;(4):3–2. <https://megainorm.ru/Data2/1/4293744/4293744127.pdf>
5. Efficacy trials of Plague Vaccines: endpoints, trial design, site selection: WHO Workshop Meeting Report, April 23, 2018:INSERM, Paris. Available at: [https://www.who.int/blueprint/what/norms-standards/PlagueVexEval\\_FinalMeetingReport.pdf?ua=1](https://www.who.int/blueprint/what/norms-standards/PlagueVexEval_FinalMeetingReport.pdf?ua=1). Accessed: 18 June 2021.
6. Demeure CE, Dussurget O, Fiol GM, et al. *Yersinia pestis* and plague: an updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination, and diagnostics. *Genes and Immunity*. 2019;20:357–370. <https://doi.org/10.1038/s41435-019-0065-0>
7. Balakhonov SV, Popova AYU, Mishchenko AI, et al. Case of Human Infection with Plague in the Kosh-Agach Region of the Republic of Altai in 2015. *Communication 1. Clinical-Epidemiological and Epizootiological Aspects. Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;(1):55–60 (In Russ). DOI:10.21055/0370-1069-2016-1-55-60
8. Petrov RV, Khaïtov RM, Nekrasov AV, et al. Polyoxidonium - mechanisms of action and clinical relevance. *Medical Immunology*. 2000;2(3):271–278 (In Russ).
9. Omel'chenko ND, Ivanova IA, Bespalova IA, Filippenko AV. Immunomodulators and specific prophylaxis of infectious diseases. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 201; (3):21–26 (In Russ). DOI:10.21055/0370-1069-2017-3-21-2.
10. Shchukovskaya TN, Kurylina AF, Shavina NYU, Bugorkova SA. Influence of polyoxidonium, Poly(I:C), dalargin on the protective efficacy of *Yersinia pestis* vaccine strain EV line NIIEG in experimental plague. *Russian Journal of Immunology*. 2020;23(1):41–50 (In Russ). <https://doi.org/10.46235/1028-7221-005-IOP>
11. Safety of work with microorganisms in pathogenic groups I–II (hazard): sanitary-epidemiological rules SP 1.3.3118-13. Moscow: Federal Center of hygiene and epidemiology, 2014. <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70563038/>
12. World Health Organization. Vaccine Supply and Quality Unit. *Manual of laboratory methods for testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunization*. World Health Organization, 1997. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/63576>
13. МУ 3.3.1.113-02. Main requirements for vaccine strains of the plague pathogen: Methodological Guidelines. Moscow: Federal Centre of State Epidemic Surveillance of Ministry of Health of Russian Federation, 2002. DOI: 10.13140/RG.2.1.1468.6246
14. Ashmarin IP, Vorobjov AA. Statistical methods in microbiological research. Leningrad: Medgiz, 1962 (In Russ). <https://search.rsl.ru/ru/record/01005954123>
15. Korzhevskiy DE, Gilarov AV. Basics of histological technology. St. Petersburg: SpecialLIT, 2010 (In Russ).
16. Use of the method of time-long mass spectrometry with matrix-activated laser desorption/ionization (MALDI-ToF MS) to indicate and identify pathogenic pathogens I-II: Methodical recommendations. М.: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rosпотребнадзора, 2015. [https://www.rosotrebndzord.ru/documents/details.php?ELEMENT\\_ID=4693](https://www.rosotrebndzord.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=4693)
17. Nekrasov AV, Puchkova NG. Polyoxidonium: the basics of synthesis and properties. *Immunology*. 2002;23(6):329–333 (In Russ).
18. Pinegin BV, Nekrasov AV, Khaïtov RM. Immunomodulator polyoxidonium: mechanism of action and aspects of clinical application. *Cytokines and Inflammation*. 2004;3(3):41–47.
19. Ponomareva TS, Deryabina PN, Karal'nik BV, et al. The impact of polyoxidonium on immunogenic and protective activity of plague vaccine. *Immunology*. 2014;35(5):286–290.
20. Chauvaux S, Dillies MA, Marceau M, et al. In silico comparison of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* transcriptomes reveals a higher expression level of crucial virulence determinants in the plague bacillus. *International Journal of Medical Microbiology*. 2011;301(2):105–116. doi:10.1016/j.ijmm.2010.08.013
21. Spitsyn AN, Utkin DV, Shcherbakova NE, et al. MALDI-TOF Mass-Spectrometry Analysis of Plague Agent Strains. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;(2):91–94 (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-2-91-94>
22. Koteneva EA, Kotenev ES, Kalinin AV, et al. Proteomic profiling of *Yersinia pestis* strains circulating in the area of natural plague foci of North Caucasus and Transcaucasia. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2019;(4):18–25. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-4-18-25>

## Об авторах

- **Татьяна Николаевна Щуковская** – д. м. н., профессор, главный научный сотрудник отдела иммунологии, ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. +7 (909) 330-25-83, [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru), [tatyanaschuk@mail.ru](mailto:tatyanaschuk@mail.ru). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8995-0894>.
- **Анастасия Юрьевна Гончарова** – к. м. н., научный сотрудник отдела иммунологии, ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. +7 (927) 110-83-55, [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>.
- **Светлана Александровна Бугоркова** – д. м. н., и.о. зав. отделом иммунологии, ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>.
- **Ольга Михайловна Кудрявцева** – к. б. н., старший научный сотрудник отдела иммунологии, ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. +7 (905) 369-71-99, [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9894-3394>.
- **Наталья Евгеньевна Щербак** – научный сотрудник отдела диагностики инфекционных болезней, ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. +7 (8452) 51-52-11, [hainl@yandex.ru](mailto:hainl@yandex.ru). ORCID: 0000-0003-3261-6128.
- **Адиля Сабержановна Абдрашитова** – к. б. н., ведущий научный сотрудник отдела диагностики инфекционных болезней, ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. +7 (8452) 51-52-11, [Abdrashitova\\_AS@microbe.ru](mailto:Abdrashitova_AS@microbe.ru). ORCID: 0000-0003-1803-4156.

Поступила: 02.07.2021. Принята к печати: 20.11.2021.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

## About the Authors

- **Tatiana N. Shchukovskaya** – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head Researcher, Department of Immunology, Federal Government Health Institution «Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia. +7 (909) 330-25-83, [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru), [tatyanaschuk@mail.ru](mailto:tatyanaschuk@mail.ru). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8995-0894>.
- **Anastasia Yu. Goncharova** – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Department of Immunology, Federal Government Health Institution «Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia. +7 (927) 110-83-55, [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9994-7936>.
- **Svetlana A. Bugorkova** – Dr. Sci. (Med.), Head, Department of Immunology, Federal Government Health Institution «Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia. [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7548-4845>.
- **Olga M. Kudryavtseva** – Cand. Sci. (Bio.), Senior Researcher, Department of Immunology, Federal Government Health Institution «Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia. +7 (905) 369-71-99, [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9894-3394>.
- **Natalya E. Shcherbakova** – researcher at the Department of Diagnostics of Infectious Diseases, Federal Government Health Institution «Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia. +7 (845-2) 51-52-11, [hainl@yandex.ru](mailto:hainl@yandex.ru). ORCID: 0000-0003-3261-6128.
- **Adilya S. Abdrashitova** – Cand. Sci. (Bio.), leader researcher at the Department of Diagnostics of Infectious Diseases, Federal Government Health Institution «Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia. (845-2) 51-52-11, [Abdrashitova\\_AS@microbe.ru](mailto:Abdrashitova_AS@microbe.ru). ORCID: 0000-0003-1803-4156.

Received: 02.07.2021. Accepted: 20.11.2021.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.