

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-20-26

УДК 616.98:579.842.23

С.В. Дентовская, А.С. Трунякова, А.С. Вагайская, М.Е. Платонов, Е.А. Тюрин, А.П. Анисимов

**К ВОПРОСУ О КРИТЕРИЯХ ПЕРЕВОДА АТТЕНУИРОВАННЫХ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* ИЗ I В III ГРУППУ ПАТОГЕННОСТИ (ОПАСНОСТИ)**

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

Живые вакцины индуцируют и клеточный, и гуморальный иммунитет, дешевы и просты в применении. Индукция иммунитета обеспечивается размножением вакцинного штамма в организме без развития заболевания, так как бактерия, к которой необходимо вызвать иммунитет, характеризуется ослабленной вирулентностью (аттенуацией). Первое поколение аттенуированных штаммов отбирали из множества спонтанных или индуцированных физическими, химическими и биологическими факторами мутантов после оценки вирулентности. Стремительное развитие молекулярной генетики позволяет значительно сократить время аттенуации патогенов путем получения нокаутных мутантов по определенным исследователям генам или введения в их геном «генов авирулентности». Но если методологические аспекты конструирования аттенуированных штаммов практически решены, то отсутствие в нормативных документах официально установленных критериев оценки их опасности затрудняет определение степени аттенуации. В публикации приводятся доводы в пользу необходимости изменений в порядке учета и хранения культур, а также регламентации процесса перевода аттенуированных штаммов возбудителя чумы из I в III группу опасности для последующего использования в работах по конструированию вакцинных препаратов. При этом требования к методологическим аспектам безопасного конструирования аттенуированных штаммов *Yersinia pestis* и критериям проверки утраты вирулентности не должны снижаться.

*Ключевые слова:* *Yersinia pestis*, группа патогенности (опасности), аттенуация.

*Корреспондирующий автор:* Анисимов Андрей Павлович, e-mail: anisimov@obolensk.org.

*Для цитирования:* Дентовская С.В., Трунякова А.С., Вагайская А.С., Платонов М.Е., Тюрин Е.А., Анисимов А.П. К вопросу о критериях перевода аттенуированных штаммов *Yersinia pestis* из I в III группу патогенности (опасности). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 2:20–26. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-20-26

Поступила 15.10.2021. Отправлена на доработку 25.10.2021. Принята к публ. 11.01.2022.

S.V. Dentovskaya, A.S. Trunyakova, A.S. Vagaiskaya, M.E. Platonov, E.A. Tyurin, A.P. Anisimov

**Concerning Criteria for Transfer of Attenuated *Yersinia pestis* Strains from Pathogenicity (Hazard) Group I into Pathogenicity Group III**

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

**Abstract.** Live vaccines induce both cellular and humoral immunity and are cheap and easy to use. The induction of immunity is provided through the reproduction of the vaccine strain in the host body without the development of the disease, since the bacterium to which it is necessary to induce the immunity is characterized by reduced virulence (attenuation). The first generation of attenuated strains was chosen from a variety of spontaneous or physically, chemically and biologically induced mutants after virulence assessment. The rapid development of molecular genetics makes it possible to significantly reduce the time of pathogen attenuation via obtaining knockout mutants with genes selected by a researcher or by inserting “avirulence genes” into the genome. But, given that the methodological aspects of the design of avirulent strains are basically clarified, the absence of officially established criteria for assessing the hazard in regulatory documents hinders the determination of the degree of attenuation. In this regard, there is a need for changes in the procedure for accounting and storage of bacterial cultures, as well as regulation of the process of transferring plague pathogen avirulent strains from the 1<sup>st</sup> into the 3<sup>rd</sup> pathogenicity group for subsequent use in the vaccine preparations development. Thereat, the requirements to methodological aspects of the safe generation of attenuated *Yersinia pestis* strains and the criteria for testing the virulence loss should be maintained at high levels.

*Key words:* *Yersinia pestis*, pathogenicity (hazard) group, attenuation.

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

*Funding:* The work was carried out with the support of a grant from the Russian Science Foundation No 19-1500072.

*Corresponding author:* Andrey P. Anisimov, e-mail: anisimov@obolensk.org.

*Citation:* Dentovskaya S.V., Trunyakova A.S., Vagaiskaya A.S., Platonov M.E., Tyurin E.A., Anisimov A.P. Concerning Criteria for Transfer of Attenuated *Yersinia pestis* Strains from Pathogenicity (Hazard) Group I into Pathogenicity Group III. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 2:20–26. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-20-26

Received 15.10.2021. Revised 25.10.2021. Accepted 11.01.2022.

Dentovskaya S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1996-8949>  
Trunyakova A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9223-2105>  
Vagaiskaya A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7280-3660>

Platonov M.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3946-1755>  
Tyurin E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-00015304-0469>  
Anisimov A.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5499-7999>

Живые бактериальные вакцины способны индуцировать как клеточный, так и гуморальный иммунитет; они относительно дешевы в производстве и

просты в применении. Индукция поствакцинального иммунитета достигается за счет способности вакцинного штамма колонизировать организм хозяина

и размножаться в нем, не вызывая заболевания. По этой причине живые вакцины требуют ослабления вирулентности (аттенуации) бактерии, к которой необходимо вызвать иммунитет [1]. «Аттенуация (лат. *attenuatio* – уменьшение, ослабление) – стойкое необратимое ослабление вирулентности патогенных микроорганизмов» [2]. Л. Пастер первым получил аттенуированные штаммы возбудителей куриной холеры, сибирской язвы и бешенства, а затем использовал их в качестве основы вакцинных препаратов [3]. В настоящее время продолжают применять и разрабатывать живые вакцины на основе аттенуированных штаммов вирусов и бактерий для профилактики таких особо опасных и социально значимых инфекций, как чума, туляремия, бруцеллез, сибирская язва, туберкулез, бешенство, грипп, желтая лихорадка, корь, полиомиелит и др. [4]. Первое поколение аттенуированных штаммов получали путем отбора спонтанных, а затем индуцированных физическими, химическими и/или биологическими факторами мутантов с помощью многократных пассажей на устойчивых к инфекции животных / культурах тканей и/или на искусственных питательных средах с последующим отбором клонов, обладающих сниженной вирулентностью. Так, вакцинный штамм чумного микроба EV76 получен в Институте Пастера в Антананариву (Мадагаскар) после 76 серийных пересевов на плотной питательной среде в течение 6 лет [5], а вакцинный штамм БЦЖ (BCG) – после 230 пассажей в течение 18 лет. Так как механизмы аттенуации оставались неизвестны, у исследователей сохранялись опасения возможной реверсии вирулентности отобранного штамма, что, соответственно, потребовало экспериментального обоснования безопасности введения «в одном шприце» в организм иммунизируемого одновременно аттенуированных и вирулентных бактерий, при содержании в смеси последних менее 1/1000 [6]. Основанная на феномене Гинсбурга теория безопасности введения иммунизируемому смеси аттенуированных бактерий с менее чем одним промилле высоковирулентных ревертантов победила в нашей стране, но ряд вопросов работы с аттенуированными штаммами бактерий до сих пор остаются без ответа. Поскольку вакцинные штаммы потенциально могут выйти из вакцинируемого организма в окружающую среду, необходимо учитывать не только вероятность обратной мутации, но и возможное восстановление вирулентности за счет горизонтального переноса чужеродных генов, комплементирующих мутацию, а также распространение нежелательных генов, таких как гены устойчивости к антибиотикам [1].

Стремительное развитие молекулярной генетики, геномной инженерии, а затем и редактирования геномов позволило значительно сократить время, необходимое для аттенуации патогенов, путем получения нокаутных мутантов по определенным исследователем генам [7] или введения в их геном «генов авирулентности (антивирулентности)» [8] (одна-две

недели), их комплементации (одна-две недели), а также оценки степени аттенуации и других характеристик (включая полногеномный сиквенс), необходимых для составления паспорта (один-два месяца). Однако если методологические аспекты конструирования аттенуированных штаммов бактериальных патогенов практически решены, то «отсутствие в нормативных документах официально установленных критериев оценки опасности биологических факторов затрудняет... определение степени аттенуации патогенных микроорганизмов», необходимое для обеспечения биобезопасности при исследованиях с использованием этих штаммов [9]. Эта проблема в части, касающейся аттенуированных штаммов *Yersinia pestis*, довольно подробно обсуждается в публикации Е.В. Сазановой с соавт. [10], но только с точки зрения их использования при обучении микробиологическим методам лабораторной диагностики чумы.

**Цель** настоящей публикации – обсуждение критериев и методических подходов для перевода аттенуированных штаммов возбудителя чумы из I в III группу патогенности (опасности) для их последующего использования в работах по конструированию диагностических и вакцинных препаратов.

В статье проанализированы научные публикации в области молекулярной микробиологии чумы, а также отечественные нормативные и методические документы по обеспечению биобезопасности работ с патогенными биологическими агентами.

**Конструирование аттенуированных штаммов чумного микроба.** В середине прошлого века Т.В. Burrows [11] описал набор детерминант вирулентности, присутствующий у всех изученных им вирулентных штаммов *Y. pestis*. Две из этих классических детерминант Т.В. Burrows: способность клеток сорбировать экзогенные красители и гемин (Pgm<sup>+</sup>), а также зависимость роста при 37 °С от наличия в среде ионов Ca<sup>2+</sup> (Ca<sup>-</sup>), сочетающаяся с синтезом V-антигена, – прошли проверку временем и получили статус обязательных факторов патогенности чумного микроба [12], утрата которых безусловно ведет к авирулентности.

Современная методология молекулярной микробиологии позволяет прицельно редактировать геномы, убирая, модифицируя или добавляя целые наборы определенных генов, что позволяет бактериям вакцинного штамма приживаться в тканях хозяина в течение времени, достаточного для развития напряженного иммунного ответа преимущественно на протективные иммунодоминантные антигены. Однако владение современными знаниями и современной методологией не должно создавать ложного впечатления всезнания и всемогущества. Природа постоянно готовит нам сюрпризы, и, как правило, неприятные. Так, 18 сентября 2009 г. в Чикаго скончался научный сотрудник университетской лаборатории, работавший с Pgm<sup>-</sup> штаммом *Y. pestis* KIM D27 [13], аттенуированным, как и вакцинный штамм EV, за

счет делеции *pgm*-локуса. До этого момента живой чумной вакциной на основе штамма EV были иммунизированы миллионы людей [14], а с аттенуированным Pgm<sup>-</sup> штаммом KIM D27 в США работали в условиях BSL-2-лаборатории [15], но не было зарегистрировано ни одного летального случая. Штамм KIM D27 используют в качестве одного из суррогатов тест-заражающих штаммов дикого типа на модели мышей, которым парентерально вводят препараты декстрана гидроксида железа [15]. У погибшего в Чикаго исследователя из предсмертных проб крови была выделена культура *Y. pestis*, идентифицированная как штамм KIM D27. Посмертный диагноз наследственного гемохроматоза поставлен на основании гистопатологических, лабораторных и генетических исследований. Наиболее вероятным объяснением фатального исхода у этого больного является вызванное гемохроматозом избыточное содержание железа в организме, достаточное для удовлетворения питательных потребностей Pgm<sup>-</sup> штамма *Y. pestis* и обеспечения в результате этого условий проявления его вирулентности на уровне таковой у штаммов дикого типа.

Нельзя исключать возможности повторения этой трагедии и на других парах: аттенуированный штамм чумного микроба (дефектный по синтезу и/или поглощению незаменимых питательных веществ) / исследователь или вакцинируемый (с пониженным иммунным статусом или метаболическими нарушениями). Отсюда вытекает требование к персоналу, работающему с аттенуированными штаммами чумного микроба, переведенными в III группу патогенности: к работам с аттенуированными штаммами *Y. pestis* в условиях BSL-2-лаборатории допускается только персонал без нарушений иммунного статуса и без метаболических нарушений. В случае учреждений, обслуживаемых медико-санитарными частями (МСЧ) ФМБА России, организовать подобное обследование не является проблемой, так как основное направление деятельности этих МСЧ – медико-санитарное обеспечение работников прикреплённых предприятий, условия работы которых связаны с воздействием опасных для здоровья биологических факторов, а именно с работой с микроорганизмами I–IV групп патогенности (опасности) (<https://msch164.ru/o-klinike>). Что же касается обследования сотрудников противочумных учреждений, то решение данной задачи выходит за рамки этой дискуссионной статьи, основная цель которой – привлечь к этой проблеме внимание людей, уполномоченных принимать решения в области санитарно-эпидемиологического нормирования.

Необходимо также учитывать принципиальную возможность передачи живых бактерий вакцинного штамма от вакцинированного неиммунизированному человеку, что может привести к довольно серьёзным последствиям, если реципиент страдает иммунодефицитом (например, вследствие ВИЧ-инфекции или при химиотерапии рака).

Еще одним важным вопросом процедуры перевода аттенуированных штаммов чумного микроба в III группу патогенности (опасности) является предотвращение возможности реверсии их вирулентности. Баланс между частичной аттенуацией и способностью вызывать заболевание, с одной стороны, и полной авирулентностью, сопровождаемой низкой иммуногенностью, является деликатным и не всегда технически достижим, что побуждает большинство исследователей конструировать аттенуированные штаммы со значительной остаточной вирулентностью. Такие условно-патогенные кандидаты в вакцинные штаммы теоретически могут вернуться к своей исходной патогенной форме, если они не несут множественных ослабляющих мутаций. Для решения этой проблемы ряд исследователей используют как минимум двойные или даже тройные нокаутные мутанты (содержащие две/три независимые делеции), обеспечивающие гораздо более низкую вероятность реверсии к вирулентности дикого типа по сравнению с одиночными мутантами [16].

Что же касается конкретных генов, делеция которых безусловно приводит к аттенуации, то их список постоянно расширяется (таблица).

Прежде чем разрешить применение живой вакцины на основе аттенуированного штамма, необходимо в каждом конкретном случае тщательно изучить вопросы безопасности. Оценка безопасности включает в себя владение информацией о точной функции и местоположении генов, подлежащих мутагенезу, их генетической стабильности, потенциальных механизмах реверсии, возможных событиях рекомбинации с неактивными генами, передаче генов другим организмам, а также приобретении генов от других организмов путем фаговой трансдукции, транспозиции или переноса плазмиды и цис- или транс-комплементации. В этом отношении аттенуированные штаммы, созданные с помощью современных методов генной инженерии/редактирования геномов, демонстрируют значительное преимущество перед штаммами, полученными при случайном мутагенезе. Предварительный отбор подходящих штаммов – кандидатов в вакцинные может проводиться в условиях *in vitro* с использованием базовых знаний о молекулярных механизмах патогенности соответствующих видов бактерий, а не путем тестирования *in vivo* большого числа случайных мутантов. Это приводит к научно обоснованному сокращению экспериментов на животных [1], особенно в ходе «юстировки» сконструированного аттенуированного мутанта, направленной на повышение его иммуногенности и снижение реактогенности.

Общепринятым методом определения как вирулентности, так и степени аттенуации является оценка величин ЛД<sub>50</sub> при подкожном заражении мышью [21]. Однако в единственном найденном нами нормативно-методическом документе [Основные требования к вакцинным штаммам чумного микроба: Методические указания. М.: Федеральный

**Некоторые из аттенуированных мутантов *Y. pestis* [17–20]**  
**Some of attenuated *Y. pestis* mutants [17–20]**

Штаммы <i>Y. pestis</i> <i>Y. pestis</i> strains	ЛД <sub>50</sub> мутанта для мышей, КОЕ Mutant's LD <sub>50</sub> for mice, CFU	ЛД <sub>50</sub> исходного штамма для мышей, КОЕ LD <sub>50</sub> of the parent strain for mice, CFU	Индекс аттенуации Attenuation index
Kimberley53Δpcm	>10 <sup>7</sup> (п/к) / (s.c.)	1–3 (п/к) / (s.c.)	>10 <sup>7</sup> (п/к) / (s.c.)
Kimberley53ΔnlpD	>10 <sup>7</sup> (п/к) / (s.c.) >10 <sup>7</sup> (и/н) / (i.n.)	1–3 (п/к) / (s.c.) 550 (и/н) / (i.n.)	>10 <sup>7</sup> (п/к) / (s.c.) >1,8·10 <sup>4</sup> (и/н) / (i.n.)
231ΔnlpD	>10 <sup>7</sup> (п/к) / (s.c.)	<10 (п/к) / (s.c.)	>10 <sup>6</sup>
GBΔadam	2,3·10 <sup>3</sup> (п/к) / (s.c.)	1 (п/к) / (s.c.)	2,3·10 <sup>3</sup>
CO92ΔyopH	>10 <sup>7</sup> (п/к) / (s.c.) >10 <sup>7</sup> (и/н) / (i.n.)	1,9 (п/к) / (s.c.) ~250 (и/н) / (i.n.)	5,3·10 <sup>6</sup> ~4·10 <sup>4</sup>
CO92ΔpgmΔsmpB-ssrA	>10 <sup>8</sup> (и/н) / (i.n.)	2·10 <sup>4</sup> (и/н) / (i.n.)	>5·10 <sup>3</sup>
GBΔguaBA	>7·10 <sup>4</sup> (п/к) / (s.c.)	1 (п/к) / (s.c.)	>7·10 <sup>4</sup>
CO92ΔyscN	>4,44·10 <sup>6</sup> (п/к) / (s.c.)	1,9 (п/к) / (s.c.)	>2,3·10 <sup>7</sup>
CO92Δlpp ΔmsbB	>30 (п/к) / (s.c.) ~10 <sup>3</sup> (и/н) / (i.n.)	1,9 (п/к) / (s.c.) ~250 (и/н) / (i.n.)	>15,8 ~4
CO92ΔailΔlppΔmsbB	1,3·10 <sup>4</sup>	1,9 (п/к) / (s.c.)	6,8·10 <sup>3</sup>

Примечания: КОЕ – колониеобразующие единицы; ЛД<sub>50</sub> – 50 % летальная доза; п/к – подкожное заражение; и/н – интраназальное заражение. Индекс аттенуации – это отношение величины ЛД<sub>50</sub> аттенуированного штамма к величине ЛД<sub>50</sub> исходного штамма.

Notes: CFU – colony forming units; LD<sub>50</sub> – 50 % lethal dose; s.c. – subcutaneous; i.n. – intranasal. The attenuation index is the ratio of the LD<sub>50</sub> of the attenuated strain to the LD<sub>50</sub> of the original strain.

центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2002. 63 с. URL: [https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT\\_ID=4717](https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=4717)] речь идет уже об использовании двух видов лабораторных животных в девяти тестах, направленных в основном на определение степени остаточной вирулентности (безвредности), распространяемости и приживаемости в органах, стойкости утраты вирулентности, реактогенности. Целесообразность таких развернутых исследований на стадии доклинических испытаний кандидатов в вакцинные штаммы очевидна.

Однако такая полномасштабная проверка безвредности сконструированных мутантов-полупродуктов в соответствии с методическими указаниями МУ 3.3.1.1113-02 «Основные требования к вакцинным штаммам чумного микроба» весьма дорогостояща (примерно 500 тыс. руб. только на покупку лабораторных животных для проверки одного испытуемого штамма вместе с контрольным), что на стадии первичной оценки препятствует отбору кандидатных штаммов в количестве, достаточном для дальнейших исследований. В подобных ситуациях целесообразно ограничиться использованием оценки величин ЛД<sub>50</sub> при подкожном заражении мышей, но надо учитывать, что разные филогенетические группы мышей обладают разной чувствительностью к заражению *Y. pestis*. С учетом этого на проверку одного препарата необходимо использовать 24 мыши (с двумя контролями – 72). Стоимость животных в этом случае составит не более 36 тыс. руб. Таким образом, полномасштабную проверку на соответствие требованиям к вакцинным штаммам целесообразно проводить только с прошедшими этап первичного отбора единичными кандидатами в вакцинные штаммы.

**Соблюдение требований санитарных правил.**

При работе с любыми живыми бактериальными культурами, даже ослабленными штаммами, исследователи должны неукоснительно придерживаться предписанных санитарными правилами практик биобезопасности, а локальные комиссии по контролю за соблюдением требований биологической безопасности должны внедрять и поддерживать эффективные системы эпиднадзора для выявления и мониторинга неожиданных острых заболеваний у сотрудников лабораторий. Несоблюдение этих правил может привести к трагедии. Так, в 1930 г. из Института Пастера в Париже в Любек передали маточную культуру вакцинного штамма BCG (*Bacillus Calmette – Guérin*), но при приготовлении вакцины в туберкулезной лаборатории Любека ее контаминировали вирулентным штаммом *Micobacterium tuberculosis*. Через 4–6 недель у большого числа вакцинированных младенцев развился туберкулез. Из 250 вакцинированных 73 погибли, а 135 были инфицированы, но выздоровели [22].

Санитарные правила постоянно совершенствуются, но в них еще недостаточно проработаны положения об официальном отнесении аттенуированных штаммов к III группе патогенности (опасности). В примечании 1 приложения 5.4 к СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности» записано, что «аттенуированные штаммы возбудителей I–II групп относят к микроорганизмам III группы патогенности», но нет ни слова о механизмах придания им статуса аттенуированных. В п. 3.2.11 тех же санитарных правил читаем: «В подразделениях научно-исследовательских институтов допускается хранение в лиофилизированном состоянии ПБА

III–IV групп (бактерии и риккетсии)... а также хранение авирулентных, комиссионно проверенных ПБА I–II групп, список которых утверждает руководитель организации». Так как раздел 3.2 посвящен «требованиям к учету и хранению ПБА», то не ясно, можно ли в этих подразделениях работать с указанными аттенуированными штаммами или только учитывать и хранить. Кроме того, в СП 1.2.036-95 не указан порядок комиссионной проверки авирулентности.

В новых санитарных правилах и нормах СП 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», утвержденных 28.01.2021 и введенных в действие с 01.09.2021, также написано, что «паспортизированные аттенуированные штаммы возбудителей I–II групп относятся к микроорганизмам III группы патогенности», но снова нет ни слова о механизмах придания им статуса аттенуированных (приложение 1).

Описание порядка проверки степени аттенуации штаммов чумного микроба, стабильно утративших патогенность для человека и животных, нам удалось найти только в методических указаниях МУ 3.3.1.1113–02 «Основные требования к вакцинным штаммам чумного микроба»: «Все исследования по испытанию кандидатов в вакцинные штаммы чумного микроба должны проводиться в изолированном помещении, в котором не должно быть микроорганизмов I–II групп патогенности», но вся «работа... до отнесения испытуемого штамма к III группе патогенности должна проводиться как с микроорганизмами I группы патогенности». Далее в п. 15.5 записано: «Испытуемый штамм чумного микроба, удовлетворяющий всем перечисленным требованиям, прошедший с положительным заключением государственные испытания, может быть признан как вакцинный, утвержден Министерством здравоохранения РФ», т.е. переведен в III группу опасности, но приказа директора учреждения, где он был получен, уже недостаточно. Перевод должен быть утвержден министром здравоохранения после проведения полномасштабных государственных испытаний.

Описанный в санитарных правилах алгоритм, вполне пригодный для работы со случайными мутантами, для которых возникшие мутации являются конечным этапом модификации генома, нерационален при конструировании современных кандидатов в вакцинные штаммы и/или продуцентов протективных антигенов, для которых аттенуация – это только первый этап редактирования генома. Вслед за аттенуацией исследователь может оптимизировать структуру и уровень продукции протективных антигенов [23], а также наличие или структуру обладающих адьювантной активностью молекул патоген-ассоциированных паттернов (липополисахарид, пептидогликан, флагеллин) [24], меняя степень узнаваемости этих агонистов рецепторами, распознающими патогены, и, соответственно, направленно регулировать напряженность и длительность иммун-

ного ответа. С учетом необходимости проведения большого объема молекулярно-генетических работ по конструированию и изучению сотен клонов наиболее целесообразно вначале сконструировать прецизионно аттенуированный штамм (полупродукт), всесторонне его охарактеризовать (включая полногеномное секвенирование и определение величин  $LD_{50}$ ), перевести его в III группу патогенности, а дальнейшие исследования по получению конечного продукта (кандидата в вакцинные штаммы) проводить уже в BSL-2-лаборатории.

Таким образом, на основании проведенного анализа считаем необходимым рекомендовать разработку методических указаний, касающихся алгоритма определения степени аттенуации и работы с аттенуированными (авирулентными) штаммами *Y. pestis*, или аналогичного по содержанию специального раздела включенных в план доработки методических документов Роспотребнадзора на 2022–2024 гг. МУ «Основные требования к оценке кандидатов в вакцинные штаммы, перспективные для создания на их основе средств специфической профилактики чумы». Особое внимание при разработке этих нормативных документов, на наш взгляд, должно быть уделено следующим вопросам:

1. Работы по редактированию геномов штаммов *Y. pestis* дикого типа могут проводиться в организациях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I–IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами согласно СП 1.2.1318-03 «Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I–IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами», а также в соответствии с положениями главы IV санитарных правил и норм «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» СП 3.3686-21.

2. К работам с аттенуированными штаммами *Y. pestis*, переведенными в III группу патогенности (опасности), в условиях BSL-2-лаборатории допускается только персонал, соответствующий требованиям действующих санитарно-эпидемиологических правил, а также без нарушений иммунного статуса и без метаболических нарушений.

3. Генно-инженерный протокол планируемых исследований должен быть рассмотрен и одобрен учрежденческими комиссиями по контролю за соблюдением требований биологической безопасности и комиссиями по проблемам генно-инженерной деятельности, а затем утвержден директором организации.

4. В состав комиссии по проверке аттенуации штаммов *Y. pestis* с отредактированными геномами

наряду с представителем авторского коллектива необходимо включать сотрудников других подразделений, допущенных к работам с *Y. pestis*, в том числе в обязательном порядке представителя лаборатории биологической безопасности.

5. Определение ЛД<sub>50</sub> аттенуированного штамма *Y. pestis* следует проводить при подкожном заражении мышей (четыре группы по шесть животных в каждой) в дозах 10 КОЕ, 10<sup>3</sup> КОЕ, 10<sup>5</sup> КОЕ и 10<sup>7</sup> КОЕ. В качестве контроля нужно использовать высоковирулентный штамм дикого типа (231 или аналогичный) и вакцинный штамм EV.

6. На основании анализа генно-инженерного протокола и результатов заражения мышей комиссия составляет акт, в котором дается заключение о степени аттенуации штамма *Y. pestis*, и, в случае ЛД<sub>50</sub> более 10<sup>7</sup> КОЕ, готовится проект приказа директора о переводе штамма в III группу патогенности.

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

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 19-15-00072.*

#### Список литературы

1. Frey J. Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines. *Vaccine*. 2007; 25(30):5598–605. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.11.058.
2. Петровский Б.В. Большая медицинская энциклопедия. 3-е изд. Т. 2. М.: Советская энциклопедия; 1975. С. 356.
3. Pasteur L., Chamberland C., Roux E. Nouvelle communication sur la rage. *C. R. Acad. Sci. Paris*. 1884; 98:457–63.
4. Feodorova V.A., Sayapina L.V., Corbel M.J., Motin V.L. Russian vaccines against especially dangerous bacterial pathogens. *Emerg. Microbes Infect.* 2014; 3(12):e86. DOI: 10.1038/emi.2014.82.
5. Cui Y., Yang X., Xiao X., Anisimov A.P., Li D., Yan Y., Zhou D., Rajerison M., Carniel E., Achtman M., Yang R., Song Y. Genetic variations of live attenuated plague vaccine strains (*Yersinia pestis* EV76 lineage) during laboratory passages in different countries. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 26:172–9. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.05.023.
6. Гинсбург Н.Н. Живые вакцины. История, элементы теории, практика. М.: Медицина; 1969. 336 с.
7. Dentovskaya S.V., Anisimov A.P., Kondakova A.N., Lindner B., Bystrova O.V., Svetoch T.E., Shaikhutdinova R.Z., Ivanov S.A., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Knirel A.Y. Functional characterization and biological significance of *Yersinia pestis* lipopolysaccharide biosynthesis genes. *Biochemistry (Moscow)*. 2011; 76(7):808–22. DOI: 10.1134/S0006297911070121.
8. Montminy S.W., Khan N., McGrath S., Walkowicz M.J., Sharp F., Conlon J.E., Fukase K., Kusumoto S., Sweet C., Miyake K., Akira S., Cotter R.J., Goguen J.D., Lien E. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *Nat. Immunol.* 2006; 7(10):1066–73. DOI: 10.1038/ni1386.
9. Онищенко Г.Г., Дроздов И.Г., Малокова Т.А., Ляпин М.Н., Пчелинцева М.В., Безсмертный В.Е., Кривуля С.Д., Федоров Ю.М., Нетесов С.В., Кутырев В.В. Нормирование как элемент системы обеспечения безопасности работ с биологическими агентами I–II групп патогенности. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2005; 2:5–11.
10. Сазанова Е.В., Малокова Т.А., Попов Ю.А., Ляпин М.Н. Разработка методических подходов и критериев для отнесения учебных штаммов *Yersinia pestis* к III группе патогенности (опасности). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 3:139–45. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-139-145.
11. Burrows T.W. Virulence of *Pasteurella pestis*. *Nature*. 1957; 179(4572):1246–7. DOI: 10.1038/1791246a0.
12. Анисимов А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 1. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2002; 3:3–23.
13. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Fatal laboratory-acquired infection with an attenuated *Yersinia pestis* strain – Chicago, Illinois, 2009. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2011; 60(7):201–5.

14. Дентовская С.В., Копылов П.Х., Иванов С.А., Агеев С.А., Анисимов А.П. Молекулярные основы вакцинопрофилактики чумы. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2013; 3:3–12.
15. Galván E.M., Nair M.K., Chen H., Del Piero F., Schifferli D.M. Biosafety level 2 model of pneumonic plague and protection studies with F1 and Psa. *Infect. Immun.* 2010; 78(8):3443–53. DOI: 10.1128/IAI.00382-10.
16. Ellis R.W. New technologies for making vaccines. *Vaccine*. 1999; 17(13–14):1596–604. DOI: 10.1016/S0264-410X(98)00416-2.
17. Sun W. Plague vaccines: status and future. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016; 918:313–60. DOI: 10.1007/978-94-024-0890-4\_12.
18. Dentovskaya S.V., Ivanov S.A., Kopylov P.Kh., Shaikhutdinova R.Z., Platonov M.E., Kombarova T.I., Gapel'chenkova T.V., Balakhonov S.V., Anisimov A.P. Selective protective potency of *Yersinia pestis* *ΔnlpD* mutants. *Acta Naturae*. 2015; 7(1):102–8.
19. Feodorova V.A., Pan'kina L.N., Savostina E.P., Sayapina L.V., Motin V.L., Dentovskaya S.V., Shaikhutdinova R.Z., Ivanov S.A., Lindner B., Kondakova A.N., Bystrova O.V., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Holst O., Pier G.B., Knirel Y.A., Anisimov A.P. A *Yersinia pestis* *lpxM*-mutant live vaccine induces enhanced immunity against bubonic plague in mice and guinea pigs. *Vaccine*. 2007; 25(44):7620–8. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.08.055.
20. Feodorova V.A., Devdariani Z.L. Immunogenicity and structural organisation of some pLRC-encoded proteins of *Yersinia pestis*. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50(1):13–22. DOI: 10.1099/0022-1317-50-1-13.
21. Finney D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Charles Griffin. London, UK; 1978.
22. Luca S., Mihaescu T. History of BCG vaccine. *Maedica (Bucur)*. 2013; 8(1):53–8.
23. Quenee L.E., Ciletti N.A., Elli D., Hermanas T.M., Schneewind O. Prevention of pneumonic plague in mice, rats, guinea pigs and non-human primates with clinical grade rV10, rV10-2 or FI-V vaccines. *Vaccine*. 2011; 29(38):6572–83. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.06.119.
24. Uematsu S., Akira S. Toll-Like receptors (TLRs) and their ligands. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2008; 183:1–20. DOI: 10.1007/978-3-540-72167-3\_1.

#### References

1. Frey J. Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines. *Vaccine*. 2007; 25(30):5598–605. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.11.058.
2. Petrovsky B.V. [Big Medical Encyclopedia]. 3rd ed. Vol. 2. Moscow: Soviet Encyclopedia; 1975. P. 356.
3. Pasteur L., Chamberland C., Roux E. Nouvelle communication sur la rage. *C. R. Acad. Sci. Paris*. 1884; 98:457–63.
4. Feodorova V.A., Sayapina L.V., Corbel M.J., Motin V.L. Russian vaccines against especially dangerous bacterial pathogens. *Emerg. Microbes Infect.* 2014; 3(12):e86. DOI: 10.1038/emi.2014.82.
5. Cui Y., Yang X., Xiao X., Anisimov A.P., Li D., Yan Y., Zhou D., Rajerison M., Carniel E., Achtman M., Yang R., Song Y. Genetic variations of live attenuated plague vaccine strains (*Yersinia pestis* EV76 lineage) during laboratory passages in different countries. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 26:172–9. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.05.023.
6. Ginsburg N.N. [Live Vaccines. History, Elements of Theory, Practice]. Moscow: "Medicine"; 1969. 336 p.
7. Dentovskaya S.V., Anisimov A.P., Kondakova A.N., Lindner B., Bystrova O.V., Svetoch T.E., Shaikhutdinova R.Z., Ivanov S.A., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Knirel A.Y. Functional characterization and biological significance of *Yersinia pestis* lipopolysaccharide biosynthesis genes. *Biochemistry (Moscow)*. 2011; 76(7):808–22. DOI: 10.1134/S0006297911070121.
8. Montminy S.W., Khan N., McGrath S., Walkowicz M.J., Sharp F., Conlon J.E., Fukase K., Kusumoto S., Sweet C., Miyake K., Akira S., Cotter R.J., Goguen J.D., Lien E. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *Nat. Immunol.* 2006; 7(10):1066–73. DOI: 10.1038/ni1386.
9. Onishchenko G.G., Dроздов I.G., Malyukova T.A., Lyapin M.N., Pchelintseva M.V., Bezsmertny V.E., Krivulya S.D., Fedorov Yu.M., Netesov S.V., Kutuyev V.V. [Rationing as an element of the system for ensuring the safety of work with biological agents of I–II pathogenicity groups]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2005; (2):5–11.
10. Sazanova E.V., Malyukova T.A., Popova Yu.A., Lyapin M.N. [Development of methodological approaches and criteria to classify *Yersinia pestis* training strains as an agent of pathogenicity (hazard) group III]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (3):139–45. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-139-145.
11. Burrows T.W. Virulence of *Pasteurella pestis*. *Nature*. 1957; 179(4572):1246–7. DOI: 10.1038/1791246a0.
12. Anisimov A.P. [Factors of *Yersinia pestis* that ensure the circulation and preservation of the plague pathogen in the ecosys-

tems of natural foci. Communication 1]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology, and Virology]*. 2002; (3):3–23.

13. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Fatal laboratory-acquired infection with an attenuated *Yersinia pestis* strain – Chicago, Illinois, 2009. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2011; 60(7):201–5.

14. Dentovskaya S.V., Kopylov P.Kh., Ivanov S.A., Ageev S.A., Anisimov A.P. [Molecular basis of preventive vaccination against plague]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology, and Virology]*. 2013; (3):3–12.

15. Galván E.M., Nair M.K., Chen H., Del Piero F., Schifferli D.M. Biosafety level 2 model of pneumonic plague and protection studies with F1 and Psa. *Infect. Immun.* 2010; 78(8):3443–53. DOI: 10.1128/IAI.00382-10.

16. Ellis R.W. New technologies for making vaccines. *Vaccine.* 1999; 17(13–14):1596–604. DOI: 10.1016/s0264-410x(98)00416-2.

17. Sun W. Plague vaccines: status and future. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016; 918:313–60. DOI: 10.1007/978-94-024-0890-4\_12.

18. Dentovskaya S.V., Ivanov S.A., Kopylov P.Kh., Shaikhutdinova R.Z., Platonov M.E., Kombarova T.I., Gapel'chenkova T.V., Balakhonov S.V., Anisimov A.P. Selective protective potency of *Yersinia pestis*  $\Delta nlpD$  mutants. *Acta Naturae.* 2015; 7(1):102–8.

19. Feodorova V.A., Pan'kina L.N., Savostina E.P., Sayapina L.V., Motin V.L., Dentovskaya S.V., Shaikhutdinova R.Z., Ivanov S.A., Lindner B., Kondakova A.N., Bystrova O.V., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Holst O., Pier G.B., Knirel Y.A., Anisimov A.P. A *Yersinia pestis* *lpxM*-mutant live vaccine induces enhanced immunity against bubonic plague in mice and guinea pigs. *Vaccine.* 2007; 25(44):7620–8. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.08.055.

20. Feodorova V.A., Devdariani Z.L. Immunogeneity and structural organisation of some pLCR-encoded proteins of *Yersinia pestis*. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50(1):13–22. DOI: 10.1099/0022-1317-50-1-13.

21. Finney D.J. *Statistical Methods in Biological Assay*. Charles Griffin. London, UK; 1978.

22. Luca S., Mihaescu T. History of BCG vaccine. *Maedica (Bucur).* 2013; 8(1):53–8.

23. Quenee L.E., Ciletti N.A., Elli D., Hermanas T.M., Schneewind O. Prevention of pneumonic plague in mice, rats, guinea pigs and non-human primates with clinical grade rV10, rV10-2 or F1-V vaccines. *Vaccine.* 2011; 29(38):6572–83. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.06.119.

24. Uematsu S., Akira S. Toll-Like receptors (TLRs) and their ligands. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2008; 183:1–20. DOI: 10.1007/978-3-540-72167-3\_1.

#### Authors:

Dentovskaya S.V., Trunyakova A.S., Vagaiskaya A.S., Platonov M.E., Tyurin E.A., Anisimov A.P. State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org.

#### Об авторах:

Дентовская С.В., Трунякова А.С., Вагайская А.С., Платонов М.Е., Тюрин Е.А., Анисимов А.П. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская область, р.п. Оболensk. E-mail: info@obolensk.org.