

40(9):3198–203.

5. Leelayuwat C., Romphruk A., Lulitanond A., Trakulsomboon S., Thamlikitkul V. Genotype analysis of *Burkholderia pseudomallei* using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD): indicative of genetic differences amongst environmental and clinical isolates. *Acta Trop.* 2000; 77(2):229–37.

6. Oyston P., Ulrich R., Jeddelon J. Пат. No. 60/396 WO2004006857. Glanders/Melioidosis Vaccines. CIIIA.

7. Reckseidler S.L., DeShazer D., Sokol P.A., Woods D.E. Detection of Bacterial Virulence Genes by Subtractive Hybridization: Identification of Capsular Polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* as a Major 'Virulence' Determinant. *Infect. Immun.* 2001; 69(1):34–4.

8. Thibault F.M., Valade E., Vidal D.R. Identification and discrimination of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, and *B. thailandensis* by real-time PCR targeting type III secretion system genes. *J. Clin. Microbiol.* 2004 Dec;42(12):5871–4.

9. Tyler S.D., Strathdee C.A., Rozee K.R., Johnson W.M. Oligonucleotide primers designed to differentiate pathogenic pseudomonads on the basis of the sequencing of genes coding for 16S-23S rRNA internal transcribed spacers. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1995; 2(4):448–53.

D.A.Chuhlantsev, I.V.Marakulin,
I.V.Darmov

Application of PCR for Identification and Interspecific Differentiation of Glanders and Melioidosis Etiological Agents

*The 48th Central Scientific Research Institute of the RF Ministry of Defense,
Kirov*

Assessed were possibilities of identification and differentiation of glanders and melioidosis etiological agents by means of PCR method using different nucleotide sequences of the pathogenic *Burkholderia*.

Primers perspective for inclusion in the test-system assigned for detection of glanders and melioidosis etiological agents DNA in environmental samples and biological materials were selected.

Key words: glanders, melioidosis, detection, differentiation, PCR.

Поступила 26.02.08.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 616.981.452

Л.В.Самойлова

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РАЗВИТИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ФОРМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧУМЫ ПРИ АЭРОГЕННОМ И ПОДКОЖНОМ ЗАРАЖЕНИИ ВИРУЛЕНТНЫМИ ШТАММАМИ *Y. PESTIS* И ИХ ИЗОГЕННЫМИ ВАРИАНТАМИ С РАЗЛИЧНЫМ ПЛАЗМИДНЫМ ПРОФИЛЕМ

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Представлены обобщенные результаты сравнительных исследований по развитию экспериментальной чумы у лабораторных животных после аэрогенного и подкожного заражения вирулентными штаммами *Y. pestis* (pFra⁺, pCad⁺, pPst⁺, pgm⁺) и их изогенными вариантами с утратой pFra и/или pPst. В зависимости от пути передачи инфекции и дозы возбудителя один и тот же штамм и его изогенные варианты вызывает как легочную, так и бубонно-септическую форму чумы у лабораторных животных. Показано, что у лабораторных животных, зараженных аэрогенно и подкожно изогенными вариантами *Y. pestis*, лишенными плазмид pPst или pPst/pFra, выращенными при 28 °C на агаре Хоттингера, развивается затяжной инфекционный процесс.

Ключевые слова: чумной микроб, штамм, изогенный вариант, аэрогенное заражение, легочная чума.

В связи с успехами в области молекулярной биологии, расшифровкой генома возбудителя чумы, характеристикой вирулентности в зависимости от генотипа возбудителя стал возникать вопрос, особенно в последние два десятилетия, о роли генотипа возбудителя чумы в развитии той или иной клинической формы болезни. Однако к настоящему времени влияние детерминант вирулентности *Y. pestis* на развитие легочной формы чумы не установлено.

В связи с этим проведено обобщение результатов исследований по определению роли генотипа чумного микроба в развитии легочной формы чумы. Для этого были получены изогенные варианты вирулентных штаммов возбудителя с различными наборами двух собственных плазмид чумного микроба (pFra и pPst) при сохранении всеми вариантами плазмиды pCad.

Штаммы. Использовали три вирулентных штамма *Y. pestis* 231, 358, 629М и изогенные варианты штаммов 358 и 629М, утратившие собственные

плазмиды pFra и/или pPst. Изогенные варианты получали путем направленного конструирования в отделе генетики РосНИПЧИ «Микроб». Штаммы выращивали при 28 °C на агаре Хоттингера, pH 7,2±0,2.

Аэрогенно заражали морских свинок весом 300–350 г и беспородных белых мышей весом от 20 до 25 г в аэродинамической камере и рассчитывали аспирационную дозу по методике Л.В. Самойловой и Н.И.Николаева [1, 3]. Подкожное заражение проводили общепринятым методом. После заражения вели наблюдение в течение 14 дней и подсчитывали LD₅₀ и СТ₅₀ (50 % летальная доза для аэрогенного заражения) штаммов по формуле Кербера. Бактериологическое, морфологическое и гистологическое исследования проводили общепринятыми методами. Все исследования проводили в соответствии с Инструкцией по режиму работы с аэрозолями возбудителей особо опасных инфекций (1976) и СП 1.3.12.85-03 «Безопасность работы с микроорганизмами».

низмами I–II групп патогенности (опасности)».

Многочисленными опытами, проведенными нами, установлено, что для аэрогенного заражения морских свинок и белых мышей требуется доза, намного превышающая дозу подкожного заражения. LD₅₀ для подкожного заражения вирулентными штаммами чумного микроба как морских свинок, так и белых мышей находилась в пределах 5–25 КОЕ.

Для аэрогенного заражения вирулентными штаммами СТ₅₀ для морских свинок составляет 500 КОЕ, а для белых мышей – 2000–2230 (1580–3140) КОЕ. Различия в величине показателей можно объяснить более извилистыми верхними дыхательными путями у белых мышей, чем у морских свинок и некоторыми особенностями защитных механизмов верхнего дыхательного тракта этих животных [3].

В экспериментах по заражению морских свинок изогенными вариантами *Y. pestis* 358 (контроль – полноценный штамм) показано, что все изогенные варианты *Y. pestis* вызывали при аэрогенном заражении летальный инфекционный процесс, характеризующийся как первичная легочная чума морских свинок. Значительных, статистически достоверных различий по величине СТ₅₀ и срокам жизни морских свинок, у штаммов чумного микроба, лишенных pFra и pPst, не было, наблюдалось лишь некоторое увеличение СТ₅₀. Проведенное подкожное заражение этими же штаммами позволяет отметить статистически достоверную тенденцию к увеличению сроков жизни у морских свинок, зараженных вариантами штаммов, у которых отсутствуют в геноме две плазмиды pFra и pPst.

Штаммы чумного микроба, полноценные по плазмидному профилю (*Y. pestis* 231, 358, 629M), а также лишенные pFra (*Y. pestis* 358/12), были вирулентными для белых мышей при аэрогенном и подкожном заражении. У всех павших от чумы белых мышей бактериологически и морфологически наблюдалась первичная легочная чума.

Штамм *Y. pestis* 629M (pPst[–]) вызывал затяжной инфекционный процесс. Для этого изогенного варианта СТ₅₀ составляла >4·10⁴ КОЕ, т.е. на порядок выше цифр СТ₅₀ исходного штамма. У другого изогенного варианта *Y. pestis* 358/12 (pFra[–], pPst[–]) отмечено еще более медленное развитие инфекции и уменьшение обсемененности органов и тканей мышей бактериями чумы. Эти опыты подтвердили результаты, полученные в экспериментах на морских свинках, где также были отмечены затяжные формы и медленное течение инфекции при заражении штаммами, лишенными плазмид pFra, pPst или pPst.

Проведенное морфологическое и бактериологическое исследование органов и тканей аэрогенно зараженных белых мышей показало, что первичная аэрогенная пневмония («первичный аффект») при заражении исходными (полноценными) штаммами и штаммами, лишенными плазмид, характеризовалась обширными, множественными, быстро прогрессирующими воспалительными очагами с некрозами,

накоплением микробов, гибелью фагоцитов и отсутствием признаков пролиферации.

Для всех «дефектных» штаммов характерны более мелкие и медленно развивающиеся, не склонные к слиянию пневмонические очаги. В большинстве случаев эти штаммы вызывали изменения, которые включали гранулемы и инкапсулированные абсцессы, т.е. имели признаки перехода к подострому процессу и локализованной форме чумы.*

Таким образом показано, что все изогенные варианты от *Y. pestis* 358 и 629M вызывают у морских свинок и белых мышей при аэрогенном заражении первичную легочную чуму. Однако изогенные варианты штаммов, лишенные pFra, pPst или pPst, вызывали более затяжной инфекционный процесс (удлинение жизни). Кроме того, величины СТ₅₀ и LD₅₀ превышали таковые для полноценного штамма.

Таким образом, проведенные исследования в данных условиях опытов показали, что для развития легочной чумы в эксперименте играет роль только вирулентность штамма, путь передачи и восприимчивость к инфекции, что подтверждает мнение Д.И.Заболотского и Wu Lien The, высказанное во время эпидемии чумы в начале XX века [2, 4]. Варианты изогенных штаммов *Y. pestis* вызывают легочную чуму при аэрогенном заражении и бубонно-септическую при подкожном заражении. Отмечена более затяжная форма чумной инфекции у лабораторных животных при аэрогенном и подкожном заражении их штаммами *Y. pestis*, лишенными плазмид pPst pFra или только pPst, выращенных при 28 °C на агаре Хоттингера.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов П.И., Наумов А.В., Белобородов Р.А. и др. Общие сведения о чуме. Рук-во по профилактике чумы. Наумов А.В., Самойлова Л.В., редакторы. Саратов; 1992. 276 с.
2. Заболотный Д.К. Легочная чума в Манчжурии в 1910–1911 гг. Отчет русской научной экспедиции. Пг.; 1915. Т. 1, 2.
3. Храмов В.Н. Некоторые особенности клинко-лабораторного обследования на чуму [автореф. ... канд. мед. наук]. Саратов, 1994.
4. Wu Lien The, Chun, Pollitzer, Wu. Plague. A. Manuel for Medical and Public Health Workers, 1936.

L.V.Samoilova

A Comparative Study of the Development of Clinical Forms of Experimental Plague after Aerogenic or Subcutaneous Challenge with Virulent *Y. pestis* Strains and their Isogenic Variants Containing Different Plasmid Combinations

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Reviewed in the work are the results of comparative studies of experimental plague infection development in test animals after their aerogenic or subcutaneous challenge with virulent *Y. pestis* strains (pFra⁺, pCad⁺, pPst⁺, pgm⁺) and their isogenic variants, lacking pFra and/or pPst. Any virulent strain and its isogenic variants were shown to produce both pulmonary and bubonic-septicemic forms of plague depending on the infection transmission route and the dose of the pathogen. The test animals infected via aerogenic and subcutaneous routes with isogenic *Y. pestis* deprived of their pPst or pPst/pFra plasmids and grown in Hottinger agar at 28 °C developed a lingering infection.

Key words: the plague pathogen, strain, isogenic variant, aerogenic infection, pulmonary plague.

Поступила 13.06.08.

*Морфологические исследования проведены Р.А.Белобородовым.