

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-139-145

УДК 616.98:579.842.23

Е.В. Сазанова, Т.А. Малиюкова, Ю.А. Попов, М.Н. Ляпин

РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ И КРИТЕРИЕВ ДЛЯ ОТНЕСЕНИЯ УЧЕБНЫХ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* К III ГРУППЕ ПАТОГЕННОСТИ (ОПАСНОСТИ)

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель исследования – выбор критериев и методических подходов для перевода авирулентных штаммов возбудителя чумы из I группы патогенности (опасности) в III группу. **Материалы и методы.** Проанализированы отечественные и зарубежные нормативные, методические документы, научные публикации в области лабораторной диагностики чумы и обеспечения биобезопасности работ с патогенными биологическими агентами. **Результаты и обсуждение.** Обоснован комплекс критериев для перевода штаммов *Y. pestis* из I группы в III группу патогенности, а также определены методы их оценки. Установлено наличие оснований для перевода в III группу патогенности ряда авирулентных штаммов *Y. pestis*, которые включены в учебный набор, сформированный для освоения модуля «Микробиология и лабораторная диагностика чумы». Продемонстрирована целесообразность комбинирования регламентированных методов оценки патогенных свойств чумного микроба с дополнительными, в частности, изучением цитотоксичности штаммов *Y. pestis* в отношении лейкоцитов цельной крови человека *in vitro*. Оценка вирулентности штамма *Y. pestis* должна опираться на комплексную характеристику основных факторов патогенности с помощью современных молекулярно-генетических методов исследования, данных о фенотипических проявлениях их функционирования, а также степени патогенности для чувствительных лабораторных животных. Актуальной задачей является пересмотр используемых количественных показателей для дифференциации штаммов чумного микроба по вирулентности с учетом показателя LD₅₀ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ.

Ключевые слова: возбудитель чумы, группы патогенности (опасности), биологическая безопасность, учебные штаммы.

Корреспондирующий автор: Сазанова Елена Владимировна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Сазанова Е.В., Малиюкова 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; 3:139–145. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-139-145

Поступила 21.11.19. Отправлена на доработку 09.01.20. Принята к публ. 16.01.20.

E.V. Sazanova, T.A. Malyukova, Yu.A. Popova, M.N. Lyapin

Development of Methodological Approaches and Criteria to Classify *Yersinia pestis* Training Strains as an Agent of Pathogenicity (Hazard) Group III

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Abstract. Objective of the study was to select the criteria and methodological approaches to reclassify avirulent strains of plague agent from pathogenicity (hazard) group I into pathogenicity group III. **Materials and methods.** We have reviewed domestic and foreign normative, methodological documents, scientific publications in the field of laboratory diagnostics of plague and biosafety provision while working with pathogenic biological agents. **Results and discussion.** A complex of criteria for reclassification of *Y. pestis* strains from hazard group I into hazard group III has been substantiated; the methods for their assessment identified. Validation has revealed the grounds for reassignment of a number of avirulent *Y. pestis* strains included into the training kit which is compiled for mastering the training module “Microbiology and laboratory diagnostics of plague” into pathogenicity group III. We have demonstrated the feasibility of combining the structured methods of assessment of pathogenic properties in plague microbe with additional informative ones; in particular, evaluation of cytotoxicity of *Y. pestis* strains in relation to leucocytes of whole human blood *in vitro*. Analysis of a strain virulence should be built on complex characterization of major pathogenicity factors using advanced molecular-genetic research methods, the data on phenotypic manifestations of their functioning, as well as the level of pathogenicity for sensitive laboratory animals. The review of the utilized quantitative indicators for differentiation of plague microbe strains by virulence taking into account LD₅₀ values for *Y. pestis* EV NIEG strain is a relevant task. It is practical to supplement the complex approach with informative research methods, notably, characterization of strain cytotoxicity which shows high correlation with virulence criterion LD₅₀.

Key words: plague agent, pathogenicity (hazard) groups, biological safety, strains used for training.

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

Corresponding author: Elena V. Sazanova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: 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; 3:139–145. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-139-145

Received 21.11.19. Revised 09.01.20. Accepted 16.01.20.

Sazanova E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9140-3910>

Malyukova T.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5629-4111>

Popova Yu.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7641-6334>

Одним из основных методов получения информации при эпидемиологическом мониторинге 11 природных очагов чумы на территории Российской Федерации, согласно действующим нормативно-методическим документам по санитарной охране территории МУ 3.1.3.2355-08 и профилактике чумы СП 3.1.7.3465-17, является лабораторное исследование носителей и переносчиков чумного микроба, больных людей, животных и объектов окружающей среды. В соответствии с национальной «Классификацией биологических агентов, вызывающих болезни человека, по группам патогенности», представленной в санитарно-эпидемиологических правилах по безопасности работ с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности) СП 1.3.3118-13, возбудитель чумы отнесен в I группу патогенности (опасности). Персонал лабораторий, выполняющий индикацию и идентификацию чумного микроба, должен иметь допуск к работе с микроорганизмами данной группы. Одним из основных условий допуска является прохождение профессиональной переподготовки с освоением методов безопасной работы. При обучении микробиологическим методам лабораторной диагностики чумы используют штаммы *Y. pestis* с различной вирулентностью, в том числе высоковирулентный *Y. pestis* 231(708), что повышает вероятность инфицирования обучающихся. Вместе с тем в Указе Президента Российской Федерации от 11 марта 2019 г. № 97 одним из приоритетных направлений государственной политики в области обеспечения биобезопасности на период до 2025 г. и дальнейшую перспективу является исключение или максимальное снижение использования в технологических процессах патогенных микроорганизмов. Задача актуальна и при обучении специалистов лабораторной диагностике особо опасных инфекций.

В настоящее время для освоения учебного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика чумы» применяют лишь один авирулентный штамм чумного микроба – *Y. pestis* EV НИИЭГ. Данный штамм используется для вакцинации людей; в соответствии с национальной классификацией отнесен к III группе патогенности, то есть характеризуется средней степенью опасности и в обычных условиях не представляет угрозы для работников лабораторий и населения. Другие штаммы *Y. pestis*, в том числе природные с установленными авирулентными свойствами и генно-инженерно-модифицированные, лишённые ведущих факторов патогенности, продолжают находиться в I группе патогенности [1, 2]. Необходимо заметить, что в Российской Федерации подход к дифференцировке штаммов микроорганизмов одного вида по группам патогенности регламентирован (СП 1.3.3118-13) только для вакцинных штаммов I–III групп патогенности (опасности) и отдельных штаммов *Vibrio cholerae* и *Escherichia coli*. При этом отсутствуют критерии и подходы, позволяющие отнести некоторые авирулентные (кроме вакцинных) штаммы *Y. pestis* к III группе патогенности.

Цель исследования – выбор критериев и методических подходов для перевода авирулентных штаммов возбудителя чумы из I группы патогенности (опасности) в III группу.

Материалы и методы

Проанализированы отечественные и зарубежные нормативные и методические документы, а также научные публикации в области лабораторной диагностики чумы и обеспечения биобезопасности работ с патогенными биологическими агентами.

Результаты и обсуждение

В процессе анализа действующих санитарно-эпидемиологических правил по безопасности работ с ПБА I–II групп СП 1.3.3118-13, ряда зарубежных руководств и научных публикаций по обеспечению биобезопасности работ с микроорганизмами в лабораториях обнаружены данные об отнесении штаммов микроорганизмов одного вида к разным группам патогенности (табл. 1) [3–5], а также алгоритм изменения группы патогенности, в частности по причине снижения вирулентности или утраты известных генов вирулентности [6].

В действующей на территории Российской Федерации классификации ПБА для аттенуированных штаммов микроорганизмов I–II групп патогенности предусмотрен отдельный подход. При паспортизации их включают в III группу патогенности. Реально это используют для вакцинных штаммов *Y. pestis* EV НИИЭГ, *Brucella abortus* 19 BA, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Bacillus anthracis* СТИ-1, но не распространяют на другие авирулентные штаммы данных видов.

Следует отметить, что в санитарно-эпидемиологических правилах СП 1.3.3118-13 приведены критерии, которые могут быть основанием для пересмотра классификации биологических агентов, а именно новые научные данные относительно патогенности, путей передачи, круга хозяев, методов, а также средств профилактики и лечения. Вместе с тем из установленных критериев преимущественно учитывают риск заражения человека, пути и вероятность передачи возбудителя инфекции от больного человека или объектов окружающей среды, тяжесть клинических проявлений, вероятность летального исхода, а также наличие эффективных мер и средств защиты, профилактики и лечения. При этом, в отличие от зарубежных документов [3, 6], не учитывают современные характеристики конкретных штаммов по основным факторам патогенности. Исключением являются некоторые штаммы *Vibrio cholerae* и *Escherichia coli*. В частности, критериями для отнесения штаммов *Vibrio cholerae* к более безопасной (III) группе патогенности является отсутствие продукции токсина ctx (СП 1.3.3118-13), штаммов *Escherichia coli* – отсутствие продукции веротоксина

Таблица 1 / Table 1

Отнесение штаммов микроорганизмов одного вида к группам патогенности (опасности)
Assignment of microorganism strains of the same species to pathogenicity (hazard) groups

Название вида Species	Группа патогенности (опасности) Pathogenicity (hazard) group		
	Российская Федерация [СП 1.3.3118-13] * Russian Federation [Sanitary Regulations (SR) 1.3.3118-13] *	НИИ [3] *	УК [6] *
<i>Yersinia pestis</i>	I группа – штаммы <i>Y. pestis</i> Group I – <i>Y. pestis</i> strains	3** группа – штаммы <i>Y. pestis</i> (кроме включенных во 2-ю группу) Group 3** – <i>Y. pestis</i> strains (excluding strains from Group II)	3** группа – штаммы <i>Y. pestis</i> Group 3** – <i>Y. pestis</i> strains
	III группа – штамм <i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ Group III – <i>Y. pestis</i> EV NIEG strain	2** группа – штаммы <i>Y. pestis</i> pgm- (лишенные области пигментации 102 kb) и штаммы lcr- (лишенные плазмиды LCR) Group 2** – <i>Y. pestis</i> strains pgm- (deprived of pigmentation region of 102kb) and lcr- strains (deprived of LCR plasmid)	
<i>Vibrio cholerae</i>	II группа – <i>V. cholerae</i> токсигенный, ctxB+ Group II – toxigenic <i>V. cholerae</i> , ctxB+	2** группа – штаммы <i>V. cholerae</i> Group 2** – <i>V. cholerae</i> strains	2** группа – штаммы <i>V. cholerae</i> токсигенные (включая El Tor) Group 2** – <i>V. cholerae</i> strains
	III группа – <i>V. cholerae</i> O1 не токсигенный; <i>V. cholerae</i> non O1(O139) не токсигенный Group III – non-toxigenic <i>V. cholerae</i> O1; non-toxigenic <i>V. cholerae</i> non O1(O139)		
<i>Brucella</i>	II группа – <i>B. melitensis, abortus, suis, ovis, neotomae, canis, ceti, pinnipedialis, microti</i> Group II – <i>B. melitensis, abortus, suis, ovis, neotomae, canis, ceti, pinnipedialis, microti</i>	3** группа – <i>Brucella</i> , включая <i>abortus, canis, suis</i> Group 3** – <i>Brucella</i> , including <i>abortus, canis, suis</i>	3** группа – штаммы <i>B. abortus, canis, suis, melitensis</i> Group 3 – <i>B. abortus, canis, suis, melitensis</i> strains
	III группа – <i>B. abortus</i> 19 BA Group III – <i>B. abortus</i> 19 BA		
<i>Francisella tularensis</i>	II группа – штаммы <i>F. tularensis</i> Group II – <i>F. tularensis</i> strains	3** группа – штаммы <i>F. tularensis</i> (кроме включенных во 2-ю группу) Group 3** – <i>F. tularensis</i> strains (except for strains included in Group 2)	3** группа – штаммы <i>F. tularensis</i> тип A Group 3** – <i>F. tularensis</i> type A strains
	III группа – штамм <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ Group III – <i>F. tularensis</i> 15 NIEG strain	2** группа – <i>F. tularensis</i> ssp. novicida штамм Utah 112; <i>F. tularensis</i> ssp. holarctica штамм LVS; <i>F. tularensis</i> bv. tularensis штамм B-38 Group 2** – <i>F. tularensis</i> ssp. novicida strain Utah 112; <i>F. tularensis</i> ssp. holarctica strain LVS; <i>F. tularensis</i> bv. tularensis strain B-38	2** группа – штаммы <i>F. tularensis</i> тип B Group 2** – <i>F. tularensis</i> type B strains
<i>Escherichia coli</i>	II группа – штаммы <i>E. coli</i> O157:H7, O104:H4 и другие серотипы – продуценты веротоксина Group II – <i>E. coli</i> strains O157:H7, O104:H4 and other serotypes – producers of verotoxin	2** группа – все энтеропатогенные, энтеротоксигенные, энтероинвазивные штаммы, включая <i>E. coli</i> O157:H7 и штаммы с K1 Group 2** – all enteropathogenic, enterotoxigenic, enteroinvasive strains, including <i>E. coli</i> O157:H7 and strains with K1	3** группа – штаммы <i>E. coli</i> O157:H7, O103 – продуценты веротоксина Group 3** – <i>E. coli</i> O157:H7, O103 strains – producers of verotoxin
	IV группа – штаммы <i>E. coli</i> Group IV – <i>E. coli</i> strains	1** группа – штамм <i>E. coli</i> K-12, если (1) не обладает полным ЛПС (т.е. не содержит О-антигена); (2) не содержит активных факторов вирулентности (например, токсинов) или факторов колонизации и генов, кодирующих эти факторы Group 1** – <i>E. coli</i> strains K-12, if (1) does not have complete LPS (i.e. does not contain O-antigen); (2) does not have active virulence factors (for instance, toxins) or colonization factors and genes encoding these factors	2** группа – <i>E. coli</i> , кроме непатогенных штаммов Group 2** – <i>E. coli</i> , except for non-pathogenic strains
<i>Bacillus anthracis</i>	II группа – штаммы <i>B. anthracis</i> Group II – <i>B. anthracis</i> strains	2** группа – штаммы <i>B. anthracis</i> Group 2** – <i>B. anthracis</i> strains	3** группа – штаммы <i>B. anthracis</i> Group 3** – <i>B. anthracis</i> strains
	III группа – штамм <i>B. anthracis</i> СТИ-1 Group III – <i>B. anthracis</i> STI-1 strain		

* – ссылки на источники литературы.

** – нумерация групп патогенности, принятая ВОЗ и рядом зарубежных стран.

* – references.

** – numbering of pathogenicity groups adopted by WHO and a some foreign states.

или факторов колонизации или генов, их кодирующих, а также полного ЛПС [СП 1.3.3118-13, 3, 6]. Однако в отечественных нормативно-методических документах и литературных источниках не обнаружено критериев для изменения группы патогенности

авирулентных штаммов возбудителя чумы. Вместе с тем за рубежом имеется опыт перевода в другую группу патогенности штаммов *Y. pestis*, лишенных области пигментации 102 т.п.н. (pgm⁻) и плазмиды pCad (*lcrV*) [3].

В настоящее время накоплены обширные научные данные, позволяющие на уровне генома оценить вирулентные свойства штаммов *Y. pestis*. Как известно, вирулентность – индивидуальный признак отдельного штамма, а мера ее проявляется в способности микроорганизма проникать в органы и ткани, размножаться в них, вырабатывать вещества, которые могут подавлять защитные силы макроорганизма [7]. Присутствие всего комплекса продуцируемых факторов и генов, их кодирующих, свидетельствует о потенциально высокой вирулентности штамма микроорганизма. Отсутствие одного или нескольких факторов приводит к снижению или авирулентности штаммов.

Ведущее значение в реализации вирулентных свойств *Y. pestis* имеют гены, локализованные на плазмиде pCad и хромосомной «области пигментации». Отсутствие в геноме хотя бы одной из основных детерминант патогенности (плазмиды pCad или области *pgm*) приводит к авирулентности штамма [8–12].

Для выявления факторов патогенности используют микробиологический, молекулярно-генетические и биологический методы, регламентированные в МУ 4.2.2940-11. Микробиологический метод обеспечивает возможность фенотипически выявить функционирование основных факторов патогенности. Культивирование штаммов *Y. pestis* на магниево-оксалатном агаре позволяет оценить наличие плазмиды кальцийзависимости (Cad-фенотип) в геноме возбудителя чумы, установить ее функционирование и, как следствие, дифференцировать потенциально вирулентные штаммы (Cad⁺) от авирулентных (Cad⁻). Потенциально вирулентные штаммы демонстрируют рост клеток чумного микроба только при 28 °С, авирулентные – при 37 °С. Выявление признака пигментсорбции (Pgm-фенотип) косвенно свидетельствует о наличии и функционировании генов *hms* оперона. Потенциально вирулентные штаммы *Y. pestis* проявляют способность формировать при культивировании на питательной среде с геминном (среда Джексона-Берроуза) мелкие пигментированные колонии (Pgm⁺), а авирулентные – более крупные, бесцветные (Pgm⁻).

Современные молекулярно-генетические методы позволяют получать информацию о генах, кодирующих биологические свойства [13]. В лабораторной диагностике чумы широко практикуют ПЦР, результаты которой дают возможность установить наличие или отсутствие генов, ассоциированных с вирулентностью и, как следствие, дифференцировать штаммы на потенциально вирулентные или авирулентные [14]. Такими ДНК-мишенями ПЦР-анализа являются гены *ybt*-региона, *irp2* – острова NPI; *lcrV* – плаزمиды pCad, которая кодирует и другие факторы патогенности, в том числе эффекторные белки Yops [15–16].

Однако подтвердить вирулентность штамма и дать ее количественную оценку возможно только применяя биологический метод исследования с использованием высокочувствительных лабораторных

животных [17]. Штаммы основного подвида *Y. pestis* subsp. *pestis* обладают высокой вирулентностью и эпидемическим потенциалом для людей и грызунов, к ним одинаково чувствительны морские свинки и белые мыши. Штаммы *Y. pestis* неосновных подвигов (*ulegeica*, *hissarica*, *altaica*, *caucasica*) проявляют избирательную вирулентность – вирулентны для мышей, авирулентны для морских свинок [18]. В настоящее время в Российской Федерации вирулентность характеризуют в соответствии с количественными критериями, полученными при подкожном заражении белых мышей: высоковирулентные штаммы – LD₅₀ от 5 до 10 м.к., слабовирулентные штаммы – LD₅₀ более 1·10⁵ м.к., авирулентные штаммы – LD₅₀ более 1·10⁶ м.к. [17].

Принимая во внимание молекулярно-генетические основы вирулентности штаммов *Y. pestis*, фенотипические проявления функционирования основных факторов патогенности, количественное определение вирулентных свойств штаммов с использованием высокочувствительных биопробных животных и требования санитарных правил СП 1.3.3118-13 и МУ 3.4.2552-09, нами был предложен комплекс критериев для отнесения штамма *Y. pestis* к III группе патогенности. А именно:

- авирулентность для белых мышей при подкожном заражении (LD₅₀ более или равна 10⁷ КОЕ). Вирулентность штамма не должна превышать LD₅₀ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, включенного в III группу патогенности, следовательно, в соответствии с действующими МУ 3.31.1113-02 должна быть более или равна 10⁷ КОЕ;

- отсутствие генов, ответственных за выработку основных факторов патогенности (pCad, область *pgm*), или одного из них;

- отсутствие фенотипических проявления *in vitro* продукции основных факторов патогенности (Pgm⁻, Cad⁻);

- наличие чувствительности к антибактериальным препаратам, регламентированным (МУ 3.4.2552-09) для экстренной профилактики и лечения чумы.

Таким образом, предлагаемый методический подход включает комплексное исследование штамма чумного микроба для выявления генов, кодирующих основные детерминанты патогенности, фенотипических проявлений функционирования данных генов, а также оценку показателя вирулентности (LD₅₀) для белых мышей при подкожном заражении.

Разработанный подход апробирован нами на наборе штаммов, сформированном сотрудниками отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» для освоения учебного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика чумы» [19]. В проведенных ранее исследованиях выбор штаммов *Y. pestis* осуществляли в соответствии с перечнем критериев, обусловленных учебными планами, необходимыми профессиональными компетенциями и правилами обеспечения биобезопасности. Одним из основных критериев,

актуальным для индивидуальной работы слушателей курсов на практических занятиях, обозначена авирулентность. Биологические свойства штаммов *Y. pestis* учебного набора охарактеризованы с помощью регламентированных методов и зарегистрированных медицинских изделий для *in vitro* диагностики (табл. 2). В качестве штаммов сравнения использовали вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ и высоковирулентный штамм *Y. pestis* 231 (708).

В учебный набор входят восемь авирулентных штаммов чумного микроба, у которых по генетическим и фенотипическим характеристикам отсутствуют плазмиды pCad и/или «остров высокой патогенности» в составе *pgm* области хромосомы, а LD₅₀ для белых мышей составляет более 10⁸ КОЕ, а также *Y. pestis* 652 «Гризель», включающий оба фактора патогенности и имеющий LD₅₀, равный 2,15·10⁶ КОЕ. Основанием для включения последнего штамма в данный набор явились действующие количественные показатели вирулентности для белых мышей, согласно которым штамм при значении LD₅₀ более

10⁶ КОЕ является авирулентным [18]. До настоящего времени окончательную оценку вирулентности штаммов *Y. pestis* проводят по показателю LD₅₀. Анализ научных публикаций и методических документов выявил отсутствие единых количественных критериев для дифференциации штаммов *Y. pestis* по вирулентности (табл. 3). В то же время результаты определения LD₅₀ зависят от многих факторов – метода заражения, вида животного, его возраста, веса, упитанности и других причин. В связи с этим следует отметить актуальность пересмотра формализованных критериев для дифференциации штаммов чумного микроба по вирулентности с использованием лабораторных животных [17, 18].

В результате оценки 9 авирулентных штаммов чумного микроба, включенных в учебный набор, с применением комплекса критериев для отнесения к III группе патогенности установлено, что:

- критерию «авирулентность для белых мышей» соответствуют 8 штаммов, исключение составил *Y. pestis* 652 «Гризель»;

Таблица 2 / Table 2

Результаты оценки патогенных свойств штаммов *Y. pestis* учебного набора [20]
Results of assessment of pathogenic properties in *Y. pestis* strains from the training kit [20]

Свойства штаммов Properties of strains	Штамм <i>Y. pestis</i> <i>Y. pestis</i> strain									
	231(708)	EV НИИЭГ EV NIEG	707 «Касуга» 707 "Kasuga"	521 (2101)	A-819	100P6 (36M5)	M-1813	KM 260 (12)	KM-130 (3)	707 «Гризель» 707 "Grizel"
Генетические особенности Genetic peculiarities	Наличие генов Presence of genes									
	<i>pla</i> <i>cafI</i> <i>lcrV</i> <i>hmsH</i> <i>irp2</i> область 3a (3a region)	<i>pla</i> <i>cafI</i> <i>lcrV</i> область 3a (3a region)	<i>pla</i> <i>cafI</i> <i>hmsH</i> <i>irp2</i> область 3a (3a region)	<i>pla</i> <i>cafI</i> <i>lcrV</i> область 3a (3a region)	<i>cafI</i> область 3a (3a region)	<i>pla</i> <i>cafI</i> <i>lcrV</i> область 3a (3a region)	<i>pla</i> <i>cafI</i> <i>lcrV</i> область 3a (3a region)	<i>hmsH</i> <i>irp2</i> область 3a (3a region)	<i>cafI</i> область 3a (3a region)	<i>cafI</i> <i>hmsH</i> <i>irp2</i> <i>lcrV</i> область 3a (3a region)
	Отсутствие генов Absence of genes									
	-	<i>hmsH</i> <i>irp2</i>	<i>lcrV</i>	<i>hmsH</i> <i>irp2</i>	<i>hmsH</i> <i>irp2</i> <i>lcrV</i> <i>pla</i>	<i>hmsH</i> <i>irp2</i>	<i>hmsH</i> <i>irp2</i>	<i>lcrV</i> <i>pla</i> <i>cafI</i>	<i>hmsH</i> <i>irp2</i> <i>lcrV</i> <i>pla</i>	<i>pla</i>
LD ₅₀ для белых мышей, КОЕ LD ₅₀ for white mice, CFU	12,5 КОЕ 12,5 CFU	>10 ⁹	1·10 ⁹	>10 ⁹	>10 ⁹	1,47·10 ⁸	1·10 ⁸	>10 ⁹	>10 ⁹	2,15·10 ⁶
Способность к пигментсорбции Pigment sorption capacity	Pgm ⁺	Pgm ⁻	Pgm ⁺	Pgm ⁻	Pgm ⁻	Pgm ⁻	Pgm ⁻	Pgm ⁺	Pgm ⁻	Pgm ⁺
Зависимость роста штаммов от ионов кальция Calcium-dependence	Cad ⁺	Cad ⁺	Cad ⁻	Cad ⁺	Cad ⁻	Cad ⁺	Cad ⁺	Cad ⁻	Cad ⁻	Cad ⁺
Цитотоксическое воздействие штаммов на лейкоциты цельной крови человека, % Cytotoxic effect of strains on leucocytes of whole human blood, %	91,33±4,56	24±0,19	44,33±7,35	2,66±0,33	49±2,94	30,33±1,73	41,66±5,07	18±2,35	10±3,27	76,66±7,65

Таблица 3 / Table 3

Дифференциация штаммов *Y. pestis* по вирулентности
Differentiation of *Y. pestis* strains by virulence

Вирулентность штамма Strain virulence	LD ₅₀ м.к. (microbe cells)		
	[20]*	[18]*	[17]*
Высоковирулентный Highly virulent	10	от 1 до 100	от 5 до 10
Вирулентные Virulent	-	от 101 до 1000	-
Средневирулентные Moderately virulent	-	от 1001 до 10000	-
Слабовирулентный Slightly virulent	> 10 ⁵	> 10 ⁵	> 10 ⁵
Авирулентным Avirulent	> 10 ⁶	-	> 10 ⁶

* – ссылки на источники литературы.

* – references.

- критерию «отсутствие генов, кодирующих основные факторы патогенности» – 8 штаммов (оба фактора – 2, pCad – 2, pgm – 4), исключение составил *Y. pestis* 652 «Гризель»;

- критерию «отсутствие фенотипических проявлений продукции обоих или одного из основных факторов патогенности» – 8 штаммов (6 штаммов – (Pgm–), 4 – (Cad–)), исключение составил *Y. pestis* 652 «Гризель»;

- критерию «наличие чувствительности к антибактериальным препаратам» – 9 штаммов.

Таким образом, в результате анализа показано, что штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ соответствует всем предложенным критериям. Для семи авирулентных штаммов *Y. pestis*, включенных в учебный набор, установлено наличие оснований для отнесения к III группе патогенности: *Y. pestis*: 707 «Касуга», 521 (2101), A-819, 100P6 (36M5), KM-130 (3), KM 260 (12), M-1813.

Для характеристики патогенных свойств наряду с данными регламентированных методов были использованы результаты оценки *in vitro* интенсивности цитотоксического воздействия штаммов чумного микроба на лейкоциты цельной крови человека, имеющие высокую корреляцию с биологическим методом ($r_s=0,9$ – для авирулентных штаммов; $r_s=0,7$ – для вирулентных штаммов) [21]. Отмечено, что вирулентные штаммы *Y. pestis* (pCad⁺, pgm⁺) обладали более выраженным повреждающим эффектом на лейкоциты цельной крови человека (гибель более 80 % клеток в исследуемом образце крови) в условиях *in vitro* (табл. 2). Штаммы, утратившие оба (pCad, область pgm) или один из основных факторов патогенности и по значению LD₅₀ характеризовавшиеся авирулентностью, не индуцировали массивную гибель лейкоцитов (гибель менее 50 % клеток). Исключение составил штамм *Y. pestis* 652 «Гризель» (LD₅₀ равно 2,15·10⁶ КОЕ), имевший высокий показатель цитотоксичности (76,77±7,65 %). Возможно, это объясняется наличием в геноме обязательных де-

терминант патогенности (pCad⁺, pgm⁺). Полученные молекулярно-генетические характеристики основных факторов патогенности и цитотоксичности данного штамма свидетельствуют о нецелесообразности отнесения его к группе авирулентных, несмотря на формальное соответствие критерию LD₅₀ более 10⁶ м.к.

Таким образом, оценка вирулентности штамма *Y. pestis* должна опираться на комплексную характеристику основных факторов патогенности с помощью современных молекулярно-генетических методов исследования, данных о фенотипических проявлениях их функционирования, а также степени патогенности для белых мышей. Данный подход в перспективе позволит избежать многократных пассажей культуры чумного микроба на лабораторных животных с целью доказательства отсутствия реверсии в вирулентную форму и получения сравнимых данных.

Актуальной задачей является пересмотр используемых количественных показателей для дифференциации штаммов чумного микроба по вирулентности с учетом показателя LD₅₀ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, который в соответствии с действующими МУ 3.31.1113-02 должен быть не менее 10⁷ КОЕ.

Целесообразно дополнять комплексный подход информативными методами исследования, в частности характеристикой цитотоксичности штамма, продемонстрировавшей высокую корреляцию с критерием вирулентности LD₅₀.

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

Список литературы

1. Дроздов С.Г., Гарин Н.С., Джинджоян Л.С., Тарасенко В.М. Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях. АМН СССР. М.: Медицина; 1987. 255 с.
2. Зверев В.В., Быков А.С., редакторы. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник. М.: Медицинское информационное агентство; 2016. С. 394–5.
3. NIH Guidelines for research involving recombinant or synthetic nucleic acid molecules. 2019. [Электронный ресурс]. URL: https://osp.od.nih.gov/wp-content/uploads/NIH_Guidelines.html (дата обращения 24.06.19).
4. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, fifth edition. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.cdc.gov/labs/pdf/CDC-BiosafetyMicrobiologicalBiomedicalLaboratories-2009-P.PDF> (дата обращения 25.06.19).
5. Tian D., Zheng T. Comparison and Analysis of Biological Agent Category Lists Based On Biosafety and Biodefense. *PLoS One*. 2014; 9(6):e101163. DOI: 10.1371/journal.pone.0101163.
6. The Approved List of biological agents. HSE Books; 2013. 35 p. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.hse.gov.uk/PuBns/misc208.pdf> (дата обращения 24.06.19).
7. Покровский В.И., Пак С.Г., Брико Н.И., Данилкин Б.К. Инфекционные болезни и эпидемиология: учебник. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2008. С. 192–3.
8. Анисимов А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение I. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2002; 3:3–23.
9. De Almeida, A.M. Guiole A., Guilvout I., Iteman I., Baranton G., Carniel E. Chromosomal irp 2 gene in *Yersinia*: distribution, expression, deletion and impact on virulence. *Microb. Pathog.* 1993; 14(1):9–21. DOI: 10.1006/mpat.1993.1002.
10. Iteman I., Guiole A., De Almeida A.M., Guilvout I., Baranton G., Carniel E. Relationship between loss of pigmentation and deletion of the chromosomal iron-regulated irp2 gene in *Yersinia*

pestis: evidence for separate but related events. *Infect. Immun.* 1993; 61(6):2717–22. PMID: 8500913. PMCID: PMC280907.

11. Nakajima R., Brubaker R.R. Association between virulence of *Yersinia pestis* and suppression of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* 1993; 61(1):23–31. PMID: 8418045. PMCID: PMC302683.

12. Ракин А. Остров «высокой патогенности»: продукция металлофора йерсиниобаكتина, интегративность, мобильность. *Бактериология*. 2017; 2(4):7–16. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-7-16.

13. Краснов Я.М., Гусева Н.П., Шарапова Н.А., Черкасов А.В. Современные методы секвенирования ДНК (обзор). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014; 2:73–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-2-73-79.

14. Попов Ю.А., Ерошенко Г.А., Булгакова Е.Г., Смирнова Н.И. Разработка комплексного алгоритма генотипирования и методов оценки генетического разнообразия природных штаммов возбудителей чумы и холеры. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2009; 4:5–10. DOI: 10.21055/0370-1069-2009-4(102)-5-10.

15. Куклев В.Е., Осина Н.А., Бугоркова Т.В., Кутырев В.В. Набор и способ для ускоренной идентификации чумного микроба с одновременной дифференциацией вирулентных и авирулентных штаммов *Y. pestis*, определением их плазмидного профиля. Патент РФ № 2473701, опубл. 27.01.2013. Бюл. № 3.

16. Leal N.C., Almeida A.M. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo.* 1999; 41(6):339–42. DOI: 10.1590/s0036-46651999000600002.

17. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.

18. Апарин Г.П., Голубинский Е.П. Микробиология чумы: руководство. Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та; 1989. 89 с.

19. Сазанова Е.В., Малукова Т.А., А.В. Бойко, Н.И. Вахрушина, Ю. А. Попов. Набор учебных штаммов для освоения лабораторной диагностики чумы. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2017; 5(22):22–7.

20. Burrows T.W. Virulence of *pasteurella pestis* and immunity to plague. *Ergeb. Mikrobiol. Immunitätsforsch. Exp. Ther.* 1963; 37:59–113. DOI: 10.1007/978-3-662-36742-1_2.

21. Сазанова Е.В., Шмелькова Т.П., Кравцов А.Л., Малукова Т.А., Попов Ю.А. Проточно-цитофлуориметрический анализ цитотоксичности штаммов *Yersinia pestis*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017; 6:3–9. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-6-3-9.

References

1. Drozdov S.G., Garin N.S., Dzhindoyan L.S., Tarasenko V.M. [Basic Principles of Occupational Safety in Microbiological and Virological Laboratories]. Academy of Medical Sciences of USSR. M.: “Meditsina”; 1987. 255 p.

2. Zverev V.V., Bykov A.S., editors [Medical Microbiology, Virology and Immunology: Study Guide]. M.: “Medical Information Agency”; 2016. P. 394–5.

3. NIH Guidelines for research involving recombinant or synthetic nucleic acid molecules. 2019. (Cited 24 June 2019). [Internet]. Available from: https://osp.od.nih.gov/wp-content/uploads/NIH_Guidelines.html.

4. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, fifth edition. (Cited: 25 June 2019). [Internet]. Available from: <https://www.cdc.gov/labs/pdf/CDC-BiosafetyMicrobiologicalBiomedicalLaboratories-2009-P.PDF>.

5. Tian D., Zheng T. Comparison and Analysis of Biological Agent Category Lists Based On Biosafety and Biodefense. *PLoS One*. 2014; 9(6):e101163. DOI: 10.1371/journal.pone.0101163.

6. The Approved List of biological agents. HSE Books; 2013. 35 p. (Cited 24 June 2019). [Internet]. Available from: <https://www.hse.gov.uk/PuBns/misc208.pdf>.

7. Pokrovsky V.I., Pak S.G., Briko N.I., Danilkin B.K. [Infectious Diseases and Epidemiology: Textbook, 2nd edition]. M.: “GEOTAR-Media”; 2008. P. 192–3.

8. Anisimov A.P. [*Yersinia pestis* factors, assuring circulation and maintenance of the plague pathogen in natural foci ecosystems. Report 1]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2002; 3:3–23.

9. De Almeida, A.M. Guiyole A., Guilvout I., Itean I., Baranton G., Carniel E. Chromosomal *irp 2* gene in *Yersinia*: distribution, expression, deletion and impact on virulence. *Microb. Pathog.* 1993; 14(1):9–21. DOI: 10.1006/mpat.1993.1002.

10. Itean I., Guiyole A., De Almeida A.M., Guilvout I., Baranton G., Carniel E. Relationship between loss of pigmentation and deletion of the chromosomal iron-regulated *irp2* gene in *Yersinia pestis*: evidence for separate but related events. *Infect. Immun.* 1993; 61(6):2717–22. PMID: 8500913. PMCID: PMC280907.

11. Nakajima R., Brubaker R.R. Association between virulence of *Yersinia pestis* and suppression of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* 1993; 61(1):23–31. PMID: 8418045. PMCID: PMC302683.

12. Rakin A. [“High pathogenicity” island: yersiniabactin metallophore production, integration, mobility]. *Bakteriologiya [Bacteriology]*. 2017; 2(4):7–16. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-7-16.

13. Krasnov Y.M., Guseva N.P., Sharapova N.A., Cherkasov A.V. [Modern Methods of DNA Sequencing (Scientific Review)]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2014; (2):73–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-2-73-79.

14. Popov Yu.A., Eroshenko G.A., Bulgakova E.G., Smirnova N.I. [Development of Complex Genotyping Algorithm and Methods of Evaluation of the Genetic Diversity of Plague and Cholera Agents Natural Strains]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2009; 4(102):5–10. (In Russ.) DOI: 10.21055/0370-1069-2014-2-73-79.

15. Kuklev V.E., Osina N.A., Bugorkova T.V., Kutyrev V.V. [The kit and method for express identification of plague microbe with simultaneous differentiation of virulent and avirulent *Y. pestis* strains, with determination of their plasmid profile]. RF Patent No 2473701, published on January 27, 2013. Bulletin No 3.

16. Leal N.C., Almeida A.M. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by multiplex-PCR. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo.* 1999; 41(6):339–42. DOI: 10.1590/s0036-46651999000600002.

17. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Infectious Diseases. Practice Guidelines]. M.: “Shiko” CJSC; 2013. 560 p.

18. Aparin G.P., Golubinsky E.P. [Microbiology of Plague: Guidelines]. Irkutsk: Irkutsk University Publishing House; 1989. 89 p.

19. Sazanova E.V., Malyukova T.A., Boyko A.V., Vakhrušina N.I., Popov Yu.A. [A kit of practice strains for mastering laboratory diagnostics of plague]. *Infektsionnye Bolezni: Novosti, Mneniya, Obuchenie [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]*. 2017; 5(22):22–7.

20. Burrows T.W. Virulence of *pasteurella pestis* and immunity to plague. *Ergeb. Mikrobiol. Immunitätsforsch. Exp. Ther.* 1963; 37:59–113. DOI: 10.1007/978-3-662-36742-1_2.

21. Sazanova E.V., Shmelkova T.P., Kravtsov A.L., Malyukova T.A., Popov Yu.A. [Flow-cytofluorimetric analysis of cytotoxicity of *Yersinia pestis* strains]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2017; 6:3–9. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-6-3-9.

Authors:

Sazanova E.V., Malyukova T.A., Popova Yu.A., Lyapin M.N. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Об авторах:

Сазанова Е.В., Малукова Т.А., Попова Ю.А., Ляпин М.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.