DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-46-53

УДК 616.98:579.842.23

А.С. Вагайская, А.С. Трунякова, Т.И. Комбарова, С.В. Дентовская

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧУМЫ В УСЛОВИЯХ ЛАБОРАТОРИИ УРОВНЯ БИОБЕЗОПАСНОСТИ 2

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

Возбудитель чумы, *Yersinia pestis*, относится к I группе патогенности (опасности), что подразумевает работу с его штаммами «дикого типа» в УББ 3 (уровень биобезопасности) лаборатории. *Y. pestis* EV НИИЭГ является Δ pgm штаммом, что позволяет проводить эксперименты в УББ 2 лаборатории. Однако возникновение и развитие заболевания, вызванное этим штаммом, не может полностью повторять наблюдаемое при использовании вирулентных аналогов. Остаточную вирулентность штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для мышей можно повысить при введении препаратов железа *in vivo*. **Цель** исследования состояла в оптимизации методических приемов моделирования экспериментальной чумы у лабораторных животных после введения аттенуированных Δ pgm штаммов *Y. pestis* с использованием декстрана железа. **Материалы и методы.** Моделирование чумной инфекции у беспородных мышей проводили путем подкожного введения штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ с добавлением декстрана железа. У животных ежедневно проводили оценку здоровья. В ходе эксперимента оценивали патологоанатомическую картину и обсемененность органов у мышей. **Результаты и обсуждение.** При подкожном введении штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в присутствии декстрана железа у мышей наблюдали бубонную форму чумы, приводящую к летальному исходу с патологическими изменениями внутренних органов, характерными для чумной инфекции. При ежедневном введении железа LD₅₀ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для мышей достоверно превышала таковую при однократном введении препарата. Различия в выживаемости животных в группах с однократным и многократным введением железа по сравнению с контрольными группами были достоверны. Таким образом, аттенуированные Δ pgm штаммы *Y. pestis* в присутствии декстрана железа могут быть использованы в условиях лаборатории УББ 2 для воспроизведения экспериментальной чумы у мышей с выраженными патологоанатомическими изменениями и летальностью.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, модель экспериментальной чумы, EV НИИЭГ, декстран железа.

Корреспондирующий автор: Вагайская Анастасия Сергеевна, e-mail: Vagaiskaia@obolensk.org.

Для цитирования: Вагайская А.С., Трунякова А.С., Комбарова Т.И., Дентовская С.В. Моделирование экспериментальной чумы в условиях лаборатории уровня биобезопасности 2. Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 4:46–53. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-46-53
Поступила 16.06.2021. Отправлена на доработку 30.06.2021. Принята к публ. 19.10.2021.

A.S. Vagaiskaya, A.S. Trunyakova, T.I. Kombarova, S.V. Dentovskaya

Simulation of Bubonic Plague in BSL-2 Laboratory

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

Abstract. The causative agent of plague, *Yersinia pestis*, is classified as pathogenicity (hazard) group I agent, which means that the work with “wild type” strains should be carried out in BSL-3 facilities. *Y. pestis* EV NIEG is a Δ pgm strain, allowing experimental studies to be carried out in BSL-2 laboratories. However, the disease and its progression elicited by such strain do not entirely mirror the infection observed with fully virulent strains. Residual virulence of *Y. pestis* EV NIEG strain for mice can be increased under *in vivo* iron supplementation. **The aim** of the study was to optimize methodological approaches to modeling experimental plague in laboratory animals following administration of attenuated Δ pgm *Y. pestis* strains with iron dextran. **Materials and methods.** Simulation of plague infection in outbred mice was carried out through subcutaneous inoculation of *Y. pestis* EV NIEG strain with iron dextran supplementation. The animal condition was assessed on a daily basis. In the course of the experiment, the pathological presentation and bacterial content in organs of mice were evaluated. **Results and discussion.** Mice inoculated subcutaneously with *Y. pestis* EV NIEG strain in the presence of iron dextran developed a bubonic plague that resulted in lethal outcome with pathological changes of internal organs, characteristic of plague infection. In case of daily administration of iron, LD₅₀ of *Y. pestis* EV NIEG strain for the mice significantly exceeded the same one with a single injection. Differences in the survival rate among animals in the groups with a single and multiple administration of iron compared to the control group were statistically valid. Thus, attenuated Δ pgm *Y. pestis* strains in the presence of iron dextran can be used to model experimental plague in mice with marked pathological changes and lethality in BSL-2 laboratories.

Key words: *Yersinia pestis*, experimental plague model, EV NIEG, iron dextran.

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

Corresponding author: Anastasiya S. Vagaiskaya, e-mail: Vagaiskaia@obolensk.org.

Citation: Vagaiskaya A.S., Trunyakova A.S., Kombarova T.I., Dentovskaya S.V. Simulation of Bubonic Plague in BSL-2 Laboratory. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2021; 4:46–53. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-46-53

Received 16.06.2021. Revised 30.06.2021. Accepted 19.10.2021.

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

Kombarova T.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1959-1739>
Dentovskaya S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1996-8949>

Чума – острая инфекционная болезнь, характеризующаяся явлениями тяжелой общей интоксикации, воспалительными процессами в лимфатических узлах, легких и других органах, – признана в настоящее время «возвращающейся» инфекцией, а ее возбудитель, *Yersinia pestis*, может быть использован в качестве агента биотерроризма [1]. Поиски «идеальной» вакцины против чумы продолжаются. *Y. pestis* относят к I группе патогенности (биологической опасности), что подразумевает при проведении работ соблюдение санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий, направленных на обеспечение личной и общественной безопасности и защиту окружающей среды. Одним из основных препятствий при изучении биологии *Y. pestis* и патогенеза чумы является то, что многие лаборатории не имеют доступа к необходимым для работы с такими патогенами помещениям 3-го уровня биобезопасности (УББ 3) и поэтому должны работать с аттенуированными штаммами чумного микроба.

Важным этапом в процессе создания вакцинных препаратов является демонстрация защитной эффективности, обычно включающая заражение вакцинированных и контрольных интактных животных вирулентными штаммами, воспроизводящими заболевание. На ранних стадиях разработки, когда перспективные вакцины-кандидаты должны быть первоначально охарактеризованы и доработаны, риск и сложность, связанные с использованием вирулентных тест-заражающих штаммов при оценке протективности на модели животных, могут быть снижены за счет воспроизведения чумной инфекции в условиях УББ 2, а не УББ 3 лаборатории с использованием стандартных аттенуированных штаммов.

Аттенуированные (авирулентные) штаммы чумного микроба, относящиеся к III группе патогенности согласно СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности», обычно не обладающие либо хромосомным локусом пигментации (*pgm*), основным компонентом которого является иерсиниабактин-зависимая система транспорта железа (*ybt*), необходимая для проявления вирулентности штаммов чумного микроба при интрадермальном введении, либо плазмидой кальцийзависимости (*pCad*, *pYV*, *pCD1*), более безопасны при манипуляциях, что позволяет проводить экспериментальные исследования в лабораториях уровня УББ 2 [2].

Морбиторы – это вещества (дефибринированная кровь барана, сульфат железа, декстран железа и др.), повышающие содержание ионов железа в крови и способствующие эффективному развитию сепсиса и гибели лабораторных животных при введении

аттенуированных *Δpgm* штаммов чумного микроба. Показано, что введение мышам сульфата железа может нивелировать потребность в продуктах локуса иерсиниабактина, полностью восстанавливая вирулентность *Δpgm* мутанта *Y. pestis*, введенного парентерально [3, 4]. При этом использование подобного подхода для воспроизведения легочной чумы после интраназального введения штамма KIMD27 не было успешным [5]. М.А. Parent *et al.* [6] показали токсичность хлорида железа, ограничив дозу введения до 0,5 мг/мышь, что согласуется с ранее полученными данными о токсичности неорганического железа в концентрациях 30–60 мг/кг.

Токсичность неорганического железа и потребность в его парентеральном введении при лечении различных заболеваний привели к появлению более безопасных коллоидных растворов гидроксида железа, стабилизированных различными полисахаридами [7]. Подкожное введение мышам штамма *Y. pestis*, дефектного по области пигментсорбции *pgm*, с добавлением коллоидного раствора хондроитин сульфата железа приводило к смерти животных с гистологическими изменениями в печени и селезенке, напоминающими те, что возникают в результате инфицирования вирулентным штаммом [8]. В дальнейшем миллиграммовые дозы коллоидного декстрана железа начали использовать при воспроизведении моделей других бактериальных инфекций [9–11]. Е.М. Galván *et al.* [12] описали УББ 2 модель легочной чумы у мышей, основанную на внутрибрюшинном введении коллоидного декстрана железа, применение которого позволяет избежать возникновения проблем токсичности и использовать благоприятные преимущества фармакокинетики, такие как более низкий клиренс и более длительный период полувыведения, чем у других коллоидных или неорганических препаратов железа [7]. В доступной литературе отсутствуют данные об использовании железа (III) гидроксид декстрана для воспроизведения бубонной чумы у мышей, обусловленной введением *Δpgm* штаммов *Y. pestis*. Кроме того, не описано течение инфекции у животных при разных режимах введения данного препарата железа.

В настоящей работе мы оптимизировали методический прием моделирования бубонной чумы у лабораторных животных после подкожного введения аттенуированного *Δpgm* штамма *Y. pestis* с использованием декстрана железа с целью оценки протективности кандидатных вакцин на ранних стадиях разработки. Предлагаемая к использованию модель является безопасным инструментом идентификации наиболее многообещающих кандидатных препаратов, защитный потенциал которых впоследствии

может быть оценен с использованием вирулентных штаммов чумного микроба.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и условия культивирования. Штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk» выращивали на питательной среде на основе сердечно-мозговой вытяжки – ВНИ (Brain Heart Infusion производства HiMedia, Индия) pH (7,2±0,1) с добавлением 1 % гемолизированной крови в течение 48 ч при температуре (28±1) °С. Бактериальную суспензию готовили в 0,9 % растворе натрия хлорида по ОСО мутности 10 МЕ, концентрацию контролировали путем посева. Все работы осуществляли в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Определение вирулентности проводили на 6–8-недельных самцах беспородных мышей 18–20 г в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». Протокол экспериментов с животными одобрен комитетом по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ (ВП – 2019/4 от 05.12.2019). Мышам подкожно вводили суспензию двухсуточной агаровой культуры *Y. pestis* EV НИИЭГ в изотоническом растворе NaCl в разведениях с 10 по 10⁵ КОЕ в объеме 0,2 мл на животное. Погибших животных вскрывали, внутренние органы (селезенку, регионарные лимфоузлы) подвергали бактериологическому исследованию. В ходе эксперимента по моделированию чумной инфекции все животные были разделены на четыре группы. Первая группа состояла из мышей, которым однократно внутрибрюшинно вводили 4 мг декстрана железа (раствор для внутримышечного введения «Феррум Лек» 50 мг/мл, Словения) за 1 ч до инокуляции штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ. Во второй группе были мыши, которым вводили препарат железа в той же дозе ежедневно. Мышам третьей группы вводили только штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ, а животным четвертой группы – только декстран железа.

Оценку здоровья проводили ежедневно. Активность, внешний вид, признаки обезвоживания и потерю веса животных оценивали по шкале от 1 до 4 баллов. Все работы с животными велись в соответствии с этическими нормами.

Статистический анализ. Вычисление величин LD₅₀ проводили по методу Kärber в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [13]. Данные представляли как среднее значение ± стандартное отклонение. Для статистического анализа использовали Graph Pad Prism 6 (Graph Pad Software, La Jolla, CA), выполняя однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Различия считали достоверными при p≤0,05.

Результаты и обсуждение

Влияние железа на остаточную вирулентность Δpgm штаммов *Y. pestis*. Ранее проведенные исследования показали, что аттенуированные Δpgm штаммы *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, не обладающие способностью получать железо из биологических жидкостей, восстанавливают вирулентность для мышей и морских свинок при парентеральном введении гема или неорганического железа перед заражением [3, 14]. Для создания воспроизводимой модели бубонной чумы исследовали изменение остаточной вирулентности Δpgm штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для мышей при совместном введении с декстраном железа. Развитие заболевания и выживаемость животных при подкожном введении штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в концентрациях от 10 до 10⁵ КОЕ изучили при однократной и ежедневных инъекциях декстрана Fe(OH)₃ в дозе 4 мг, так как более высокие концентрации могут проявлять токсический эффект [15]. Мыши контрольных групп получили или только штамм чумного микроба, или только препарат железа.

После подкожного введения штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в дозах 10–10⁴ КОЕ наряду с однократной внутрибрюшинной инъекцией раствора «Феррум Лек» мыши оставались живы на протяжении всего эксперимента (рис. 1), при дозе 10⁵ КОЕ четыре из пяти животных пали к восьмым суткам наблюдения. При ежедневном введении декстрана Fe(OH)₃ гибель животных наблюдали при всех использованных дозах штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ со 100 % смертностью в дозах 10³–10⁵ КОЕ. Животные контрольных групп, получившие только препарат железа или только штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ, оставались здоровыми.

LD₅₀ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ при ежедневном введении беспородным мышам декстрана Fe(OH)₃ достоверно превышала аналогичный показатель при однократном введении препарата (p=0,0086). Различия в выживаемости животных в группах как с однократным (p=0,003), так и с ежедневным (p=0,0001) введением железа по сравнению с контролем были достоверны (рис. 1, таблица).

В последующем оценку физического здоровья, патологоанатомических изменений и обсемененности внутренних органов мышей проводили для дозы 10⁵ КОЕ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ.

Характеристика заболевания. Для установления особенностей заболевания ежедневно в течение всего эксперимента контролировали состояние здоровья и массу тела беспородных мышей из всех экспериментальных групп. Признаки заболевания: снижение активности, обезвоживание и взъерошенность шерсти – стали появляться на третьи сутки у мышей при ежедневном введении декстрана железа, при однократном – только на четвертые. Животные контрольных групп не проявляли признаков заболевания. Снижение веса наблюдали в первых двух

Рис. 1. Выживаемость беспородных мышей после подкожного введения штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ при добавлении железа:

А – кривые выживания при дозе 10⁵ КОЕ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ; Б – кривые выживания при введении разных доз штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ. ** p≤0,01; *** p≤0,001

Fig. 1. Mice survival rate after subcutaneous administration of *Y. pestis* EV NIEG strain supplemented with iron:

А – survival curves at an infecting dose of 10⁵ CFU of the *Y. pestis* EV NIEG; Б – survival curves at different doses of the *Y. pestis* EV NIEG. ** p≤0,01; *** p≤0,001

группах, при этом во второй группе снижение было более прогрессирующим. В двух оставшихся группах вес мышей не снижался (рис. 2). У животных первых двух групп, получивших штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ с добавлением декстрана железа, заболевание прогрессировало, пока мыши не пали, в то время как контрольные мыши оставались здоровыми.

Для оценки патологоанатомических изменений павших мышей из первой и второй групп подвергали вскрытию. Мышей из контрольных групп вскрывали ежедневно (рис. 3). У павших мышей из первой группы наблюдали формирование бубона в месте введения, геморрагию в подкожной клетчатке в виде характерных для чумы разлитых кровоизлияний, занимающих весь бок животного, а также увеличение селезенки с характерными очагами некроза. Патологоанатомические изменения у мышей из вто-

рой группы включали образование бубонов в паховых лимфатических узлах (регионарном и контралатеральном), увеличение и кровенаполнение печени, незначительное увеличение в размерах, «дряблость» селезенки. Подкожная клетчатка животных окрашена в оранжевый цвет как следствие ежедневного введения железа. У мышей из третьей группы отмечали увеличение селезенки, не отражающееся на общем состоянии здоровья. У мышей, получавших только препарат железа, наблюдали изменение цвета подкожной клетчатки, изменения тканей и внутренних органов отсутствовали.

Распространение по органам. Диссеминацию чумного микроба изучили при ежедневном и однократном введении препарата железа (рис. 4). В первые дни после введения штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ наряду с однократной инъекцией железа большая

Влияние декстрана железа на остаточную вирулентность штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для беспородных мышей

The effect of iron dextran on the residual virulence of *Y. pestis* EV NIEG strain for outbred mice

Штамм Strain	Декстран железа, 4 мг Iron dextran, 4 mg	LD ₅₀ , КОЕ* LD ₅₀ , CFU*	Доза, КОЕ Dose, CFU	Средние сроки жизни, сутки Average survival time, days
<i>Y. pestis</i> EV NIEG	однократно once	50119 (19953÷794328)	10–10 ⁴	>21
			10 ⁵	5,4±1,3
	ежедневно daily	79 (20÷316)	10	18
			10 ²	5,5±0,7
			10 ³	7±3,5
			10 ⁴	4,8±1,6
<i>Y. pestis</i> 231	–	3 (1÷12)	10–10 ⁴	5,4±0,5

Примечание: * – 95 % доверительный интервал представлен в круглых скобках.

Notes: * – 95 % confidence interval is shown in parentheses.

Рис. 2. Оценка физического здоровья мышей после введения штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в присутствии железа:

А – показатель здоровья; В – вес

Fig. 2. Physical health assessment of mice after injection with *Y. pestis* EV NIEG strain plus iron:

A – an indicator of health; B – weight

Рис. 3. Патологоанатомические изменения у беспородных мышей при введении декстрана $\text{Fe}(\text{OH})_3$ совместно с *Y. pestis* EV НИИЭГ:

А – однократное введение; В – ежедневное введение; С – контроль после введения только штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ; Д – контроль после введения только препарата железа. Стрелками обозначены сформировавшиеся бубоны в лимфатических узлах

Fig. 3. Pathological changes in outbred mice infected with *Y. pestis* EV NIEG strain supplemented with iron dextran $\text{Fe}(\text{OH})_3$:

А – single administration; В – daily administration; С – only *Y. pestis* EV NIEG strain; Д – control group that received only iron. Arrows highlight buboes in the lymph nodes

Рис. 4. Бактериальная колонизация внутренних органов беспородных мышей после введения штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в присутствии железа

Fig. 4. Bacterial colonization of the internal organs of outbred mice infected with *Y. pestis* EV NIEG strain in the presence of iron

часть микроорганизмов находилась в регионарных лимфоузлах с последующим распространением в селезенку, в которой со временем количество бактерий уменьшалось. При ежедневном введении декстрана $\text{Fe}(\text{OH})_3$ наблюдали сохранение высокого уровня бактериальной колонизации регионарных лимфоузлов и селезенки мышей. Селезенки и лимфатические узлы, полученные от мышей из групп контроля, были стерильны (данные не показаны).

Как биологическую модель мышей широко используют для изучения патогенеза инфекции, вызываемой *Y. pestis*, а также для оценки иммуногенности и защитной эффективности кандидатных вакцин против чумы [16–19]. Мыши являются естественными хозяевами чумного микроба, заболевание которых протекает подобно возникающему у инфицированного человека [18]. Эксперименты *in vivo* с использованием высоковирулентных штаммов чумного микроба проводят в соответствии с санитарными правилами СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» уровня УББ 3. Таким образом, лабораторные работы с использованием подобных штаммов сложны, дорогостоящи и сопряжены с риском инфицирования лабораторного персонала.

Аттенуация вакцинного штамма *Y. pestis* EV произошла из-за спонтанной делеции 102-т.п.о. локуса *pgm*, отвечающего за поглощение железа бактерией [20]. Данный штамм относится к III группе патогенности, не подпадает под нормативные требования в отношении вирулентных аналогов и может безопасно использоваться в работе в соответствии с требованиями лаборатории УББ 2.

Согласно МУ 3.3.1.1113-02 «Основные требования отбора новых вакцинных штаммов чумного микроба» подкожное введение штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ не должно вызывать гибель беспородных мышей при введении доз до 10^7 КОЕ. При использовании бактериальной культуры в большей концентрации гибель животных может наступить в первые трое суток после введения вследствие токсического эффекта, обусловленного наличием мышинового токсина Ymt (*Yersinia* mouse toxin, фосфолипаза Д) [21, 22]. Кроме того, установлено, что патологогистологические изменения у мышей после введения штамма *Y. pestis* EV отличаются от наблюдаемого при использовании вирулентных аналогов [2].

Остаточную вирулентность Δpgm штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ можно повысить при одновременном внутрибрюшинном введении животным препаратов железа (так называемая условная вирулентность) без роста риска для исследователей. О влиянии железа на рост и вирулентность Δpgm штаммов *Y. pestis* впервые сообщили Jackson и Burrows в середине 1950-х гг. при изучении механизмов патогенеза чумы [3]. Введение мышам штамма *Y. pestis* KIM, дефектного по локусу *pgm*, с добавлением железа было описано в двух исследованиях [7, 14]. Н. Lee-Lewis *et al.* [5] сообщали о летальной инфекции у мышей

BALB/c после введения штамма KIM D27 в присутствии большого количества неорганического железа (до 500 мкг), введенного внутрибрюшинно. При этом исследователи наблюдали размножение бактерий и повреждение нескольких органов, но не обнаружили признаков пневмонии или поражений, характерных для легочной чумы. Проблема, возникающая при использовании больших доз неорганического железа *in vivo*, – это токсичность. Самая высокая доза FeCl_2 , которую смогли без токсических последствий вводить мышам интраназально, – 40 мкг; большие количества вызывали побочные эффекты, включая сухость глаз, взъерошенность шерсти и сутулость, на устранение которых требовалось 1–3 дня. Эти неспецифические побочные эффекты не только вызывали чрезмерный стресс у животных, но также затрудняли оценку «истинного» заболевания [15]. Использование декстрана железа снижает токсичность из-за более медленного высвобождения из углеводных комплексов, несмотря на необходимость даже больших количеств и многократного введения. Например, в исследовании, описанном E.M. Galván *et al.* [12], для моделирования легочной чумы мышам ежедневно вводили коллоидный раствор железа за 2–3 ч до и в течение 10 суток после заражения.

В настоящей работе использование декстрана железа однократно или ежедневно при моделировании бубонной чумы позволило повысить остаточную вирулентность аттенуированного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для беспородных мышей. При ежедневном введении препарата железа LD_{50} штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для животных приблизилась к аналогичному показателю штамма «дикого» типа *Y. pestis* 231. Несмотря на достоверность отличий в величинах LD_{50} вакцинного штамма при однократном и ежедневном введении декстрана $\text{Fe}(\text{OH})_3$, средние сроки гибели животных при введении дозы 10^5 КОЕ практически не отличались.

Таким образом, в присутствии внутрибрюшинно вводимого декстрана железа штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ можно использовать для воспроизведения бубонной чумы с выраженными патологоанатомическими изменениями и гибелью мышей в условиях УББ 2. Модель, описанная в настоящем исследовании, не предназначена для замены, а является дополнительным инструментом предварительного тестирования протективности и определения приоритетных потенциальных кандидатов для дальнейшей оценки с использованием вирулентных штаммов чумного микроба. Использование предложенной модели бубонной чумы позволит быстро и безопасно оценить кандидатные препараты и выделить наиболее перспективные для дальнейшего тестирования в условиях УББ 3.

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

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора

на 2021–2025 гг. «Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации. Создание новых технологий, средств и методов контроля и профилактики инфекционных и паразитарных болезней».

Список литературы

1. Gage K.L., Kosoy M.Y. Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. *Annu. Rev. Entomol.* 2005; 50:505–28. DOI: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130337.
2. Perry R.D., Fetherston J.D. Iron and heme uptake systems. In: Carniel E., Hinnebusch B.J., editors. *Yersinia: Molecular and Cellular Biology*. UK: Horizon Bioscience; 2004. P. 257–83.
3. Burrows T.W., Jackson S. The virulence-enhancing effect of iron on nonpigmented mutants of virulent strains of *Pasteurella pestis*. *Br. J. Exp. Pathol.* 1956; 37(6):577–83.
4. Сазанова Е.В., Малахаева А.Н., Малукова Т.А., Бойко А.В., Булгакова Е.Г., Попов Ю.А. Моделирование чумной инфекции при заражении авирулентными штаммами *Yersinia pestis*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 2:45–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-45-49.
5. Lee-Lewis H., Anderson D.M. Absence of inflammation and pneumonia during infection with nonpigmented *Yersinia pestis* reveals a new role for the pgm locus in pathogenesis. *Infect. Immun.* 2010; 78(1):220–30. DOI: 10.1128/IAI.00559-09.
6. Parent M.A., Wilhelm L.B., Kummer L.W., Szaba F.M., Mullarky I.K., Smiley S.T. Gamma interferon, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide synthase 2, key elements of cellular immunity, perform critical protective functions during humoral defense against lethal pulmonary *Yersinia pestis* infection. *Infect. Immun.* 2006; 74(6):3381–6. DOI: 10.1128/IAI.00185-06.
7. Denoël P., Godfroid F., Guiso N., Hallander H., Poolman J. Comparison of acellular pertussis vaccines-induced immunity against infection due to *Bordetella pertussis* variant isolates in a mouse model. *Vaccine*. 2005. 23(46-47):5333–41. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.06.021.
8. Wake A., Morita H., Yamamoto M. The effect of an iron drug on host response to experimental plague infection. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 1972. 25(2):75–84. DOI: 10.7883/yoken1952.25.75.
9. Holbein B.E., Jericho K.W., Likes G.C. Neisseria meningitidis infection in mice: influence of iron, variations in virulence among strains, and pathology. *Infect. Immun.* 1979; 24(2):545–51. DOI: 10.1128/iai.24.2.545-551.1979.
10. Starks A.M., Schoeb T.R., Tamplin M.L., Parveen S., Doyle T.J., Bomeisl P.E., Escudero G.M., Gulig P.A. Pathogenesis of infection by clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. *Infect. Immun.* 2000; 68(10):5785–93. DOI: 10.1128/iai.68.10.5785-5793.2000.
11. Yi K., Stephens D.S., Stojiljkovic I. Development and evaluation of an improved mouse model of meningococcal colonization. *Infect. Immun.* 2003; 71:1849–55. DOI: 10.1128/iai.71.4.1849-1855.2003.
12. Galván E.M., Nair M.K., Chen H., Del P.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.
13. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Ленинград: Медгиз [Ленингр. отд-ние]; 1962. 180 с.
14. Ivanov M.I., Noel B.L., Rampersaud R., Mena P., Benach J.L., Bliska J.B. Vaccination of mice with a Yop translocon complex elicits antibodies that are protective against infection with F1-*Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 2008; 76(11):5181–90. DOI: 10.1128/IAI.00189-08.
15. Mellado-Sanchez G., Ramirez K., Drachenberg C.B., Diaz-McNair J., Rodriguez A.L., Galen J.E., Nataro J.P., Pasetti M.F. Characterization of systemic and pneumonic murine models of plague infection using a conditionally virulent strain. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2013; 36(2):113–28. DOI: 10.1016/j.cimid.2012.10.005.
16. Rosenzweig J.A., Jejelowo O., Sha J., Erova T.E., Brackman S.M., Kirtley M.L., van Lier C.J., Chopra A.K. Progress on plague vaccine development. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011; 91(2):265–86. DOI: 10.1007/s00253-011-3380-6.
17. Bubeck S.S., Cantwell A.M., Dube P.H. Delayed inflammatory response to primary pneumonic plague occurs in both outbred and inbred mice. *Infect. Immun.* 2007; 75(2):697–705. DOI: 10.1128/IAI.00403-06.
18. Latham W.W., Crosby S.D., Miller V.L., Goldman W.E. Progression of primary pneumonic plague: a mouse model of infection, pathology, and bacterial transcriptional activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005; 102(49):17786–91. DOI: 10.1073/pnas.0506840102.
19. Agar S.L., Sha J., Foltz S.M., Erova T.E., Walberg K.G., Parham T.E., Baze W.B., Suarez G., Peterson J.W., Chopra A.K. Characterization of a mouse model of plague after aerosolization of *Yersinia pestis* CO92. *Microbiology (Reading)*. 2008; 154(Pt 7):1939–48. DOI: 10.1099/mic.0.2008/017335-0.
20. Fetherston J.D., Kirillina O., Bobrov A.G., Paulley J.T., Perry R.D. The yersiniabactin transport system is critical for the pathogenesis of bubonic and pneumonic plague. *Infect. Immun.* 2010; 78(5):2045–52. DOI: 10.1128/IAI.01236-09.
21. Hinnebusch J., Cherepanov P., Du Y., Rudolph A., Dixon J.D., Schwan T., Forsberg A. Murine toxin of *Yersinia pestis* shows phospholipase D activity but is not required for virulence in mice. *Int. J. Med. Microbiol.* 2000; 290(4-5):483–7. DOI: 10.1016/S1438-4221(00)80070-3.
22. Fan Y., Zhou Y., Feng N., Wang Q., Tian G., Wu X., Liu Z., Bi Y., Yang R., Wang X. Recombinant murine toxin from *Yersinia pestis* shows high toxicity and β -adrenergic blocking activity in mice. *Microbes Infect.* 2016; 18(5):329–35. DOI: 10.1016/j.micinf.2016.01.001.

References

1. Gage K.L., Kosoy M.Y. Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. *Annu. Rev. Entomol.* 2005; 50:505–28. DOI: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130337.
2. Perry R.D., Fetherston J.D. Iron and heme uptake systems. In: Carniel E., Hinnebusch B.J., editors. *Yersinia: Molecular and Cellular Biology*. UK: Horizon Bioscience; 2004. P. 257–83.
3. Burrows T.W., Jackson S. The virulence-enhancing effect of iron on nonpigmented mutants of virulent strains of *Pasteurella pestis*. *Br. J. Exp. Pathol.* 1956; 37(6):577–83.
4. Sazanova E.V., Malakhaeva A.N., Malyukova T.A., Boiko A.V., Bulgakova E.G., Popov Yu.A. Plague infection simulating in case of inoculation with avirulent *Yersinia pestis* strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (2):45–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-45-49.
5. Lee-Lewis H., Anderson D.M. Absence of inflammation and pneumonia during infection with nonpigmented *Yersinia pestis* reveals a new role for the pgm locus in pathogenesis. *Infect. Immun.* 2010; 78(1):220–30. DOI: 10.1128/IAI.00559-09.
6. Parent M.A., Wilhelm L.B., Kummer L.W., Szaba F.M., Mullarky I.K., Smiley S.T. Gamma interferon, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide synthase 2, key elements of cellular immunity, perform critical protective functions during humoral defense against lethal pulmonary *Yersinia pestis* infection. *Infect. Immun.* 2006; 74(6):3381–6. DOI: 10.1128/IAI.00185-06.
7. Denoël P., Godfroid F., Guiso N., Hallander H., Poolman J. Comparison of acellular pertussis vaccines-induced immunity against infection due to *Bordetella pertussis* variant isolates in a mouse model. *Vaccine*. 2005. 23(46-47):5333–41. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.06.021.
8. Wake A., Morita H., Yamamoto M. The effect of an iron drug on host response to experimental plague infection. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 1972. 25(2):75–84. DOI: 10.7883/yoken1952.25.75.
9. Holbein B.E., Jericho K.W., Likes G.C. Neisseria meningitidis infection in mice: influence of iron, variations in virulence among strains, and pathology. *Infect. Immun.* 1979; 24(2):545–51. DOI: 10.1128/iai.24.2.545-551.1979.
10. Starks A.M., Schoeb T.R., Tamplin M.L., Parveen S., Doyle T.J., Bomeisl P.E., Escudero G.M., Gulig P.A. Pathogenesis of infection by clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. *Infect. Immun.* 2000; 68(10):5785–93. DOI: 10.1128/iai.68.10.5785-5793.2000.
11. Yi K., Stephens D.S., Stojiljkovic I. Development and evaluation of an improved mouse model of meningococcal colonization. *Infect. Immun.* 2003; 71:1849–55. DOI: 10.1128/iai.71.4.1849-1855.2003.
12. Galván E.M., Nair M.K., Chen H., Del P.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.
13. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Research]. Leningrad: "Medgiz" [Leningrad office]; 1962. 180 p.
14. Ivanov M.I., Noel B.L., Rampersaud R., Mena P., Benach J.L., Bliska J.B. Vaccination of mice with a Yop translocon complex elicits antibodies that are protective against infection with F1-*Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 2008; 76(11):5181–90. DOI: 10.1128/IAI.00189-08.
15. Mellado-Sanchez G., Ramirez K., Drachenberg C.B., Diaz-McNair J., Rodriguez A.L., Galen J.E., Nataro J.P., Pasetti M.F. Characterization of systemic and pneumonic murine models of plague infection using a conditionally virulent strain. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2013; 36(2):113–28. DOI: 10.1016/j.cimid.2012.10.005.
16. Rosenzweig J.A., Jejelowo O., Sha J., Erova T.E., Brackman S.M., Kirtley M.L., van Lier C.J., Chopra A.K. Progress on plague vaccine development. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011; 91(2):265–86. DOI: 10.1007/s00253-011-3380-6.

17. Bubeck S.S., Cantwell A.M., Dube P.H. Delayed inflammatory response to primary pneumonic plague occurs in both outbred and inbred mice. *Infect. Immun.* 2007; 75(2):697–705. DOI: 10.1128/IAI.00403-06.

18. Lathem W.W., Crosby S.D., Miller V.L., Goldman W.E. Progression of primary pneumonic plague: a mouse model of infection, pathology, and bacterial transcriptional activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2005; 102(49):17786–91. DOI: 10.1073/pnas.0506840102.

19. Agar S.L., Sha J., Foltz S.M., Erova T.E., Walberg K.G., Parham T.E., Baze W.B., Suarez G., Peterson J.W., Chopra A.K. Characterization of a mouse model of plague after aerosolization of *Yersinia pestis* CO92. *Microbiology (Reading)*. 2008; 154(Pt 7):1939–48. DOI: 10.1099/mic.0.2008/017335-0.

20. Fetherston J.D., Kirillina O., Bobrov A.G., Paulley J.T., Perry R.D. The yersiniabactin transport system is critical for the pathogenesis of bubonic and pneumonic plague. *Infect. Immun.* 2010; 78(5):2045–52. DOI: 10.1128/IAI.01236-09.

21. Hinnebusch J., Cherepanov P., Du Y., Rudolph A., Dixon J.D., Schwan T., Forsberg A. Murine toxin of *Yersinia pestis* shows phospholipase D activity but is not required for virulence in mice.

Int. J. Med. Microbiol. 2000; 290(4-5):483–7. DOI: 10.1016/S1438-4221(00)80070-3.

22. Fan Y., Zhou Y., Feng N., Wang Q., Tian G., Wu X., Liu Z., Bi Y., Yang R., Wang X. Recombinant murine toxin from *Yersinia pestis* shows high toxicity and β -adrenergic blocking activity in mice. *Microbes Infect.* 2016; 18(5):329–35. DOI: 10.1016/j.micinf.2016.01.001.

Authors:

Vagaiskaya A.S., Trunyakova A.S., Kombarova T.I., Dentovskaya S.V. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org.

Об авторах:

Вагайская А.С., Трунякова А.С., Комбарова Т.И., Дентовская С.В. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., р.п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org.