

Е.В.Сазанова, Т.А.Малюкова, Ю.А.Попов

УЧЕБНЫЕ ШТАММЫ *YERSINIA PESTIS*: КРИТЕРИИ ПОДБОРА, ПРИНЦИПЫ ПРИМЕНЕНИЯ

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

Целью работы была разработка критериев подбора штаммов *Yersinia pestis* в качестве учебных, принципов формирования и применения набора штаммов для проведения практических занятий по лабораторной и дифференциальной диагностике чумы. Изучены подзаконные акты Российской Федерации, нормативные и методические документы по лабораторной диагностике чумы и биобезопасности работ с микроорганизмами; программы обучения специалистов для работ с возбудителями особо опасных инфекций. Метод исследования: аналитический. В результате сформулированы определение понятия «учебный штамм», критерии подбора штаммов возбудителя чумы для практических занятий в рамках учебного модуля «Микробиология и лабораторный диагноз чумы» и алгоритм применения его с целью снижения биологических рисков в учебном процессе.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, учебные штаммы, подготовка специалистов, биологическая безопасность.

E.V.Sazanova, T.A.Malyukova, Yu.A.Popov

Dummy *Yersinia pestis* Strains: Selection Criteria, Usage Guidelines

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Objective of the work was to develop selection criteria for the dummy *Y. pestis* strains, as well as principles of the setting-up a panel and its application for practicing laboratory and differential diagnostics of plague. Studied were the RF regulations, statutory documents and methodological recommendations on the laboratory diagnostics of plague and safety of works with microorganisms; training courses for specialists to qualify for work with the agents of particularly dangerous infections. Research method: analytical. Consequently, established were the term for "dummy strain"; selection criteria for the *Y. pestis* strains used in the practical course within the frames of the training programme "Microbiology and Laboratory Diagnosis of Plague"; and algorithm of the course application in view of biological risk mitigation during the process of education.

Key words: *Yersinia pestis*, dummy strains, specialists training, biological safety.

Чума – особо опасная инфекционная болезнь, возбудитель которой относится к I группе патогенности. В ходе развития цивилизации известно три пандемии чумы, унесшие миллионы человеческих жизней. В отсутствие эпидемий штаммы *Yersinia pestis* постоянно циркулируют в природных очагах, в том числе на территории Российской Федерации (11 очагов с общей площадью ≈ 254 тыс. га) [4]. Одним из основных методов эпидемиологического надзора за очагами является лабораторная диагностика чумы у носителей и переносчиков возбудителя, больных людей, а также лиц, контактировавших с больными и инфицированными объектами окружающей среды [5]. Подготовку специализированных кадров осуществляют на базе противочумных учреждений Роспотребнадзора. Актуальность обучения по микробиологии, эпидемиологии и лабораторной диагностике чумы обусловлена также и тем, что возбудитель отнесен к категории А вероятных агентов биотерроризма [1].

Подготовку специалистов для работ с возбудителями особо опасных инфекций (ООИ) на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» осуществляют с 1924 г., основываясь как на проверенных временем традиционных методиках, так и на активно внедряемых современных обучающих технологиях. При совершенствовании обучения персонала для работы с патогенными биологическими агентами I–II групп (ПБА) нельзя не учи-

тывать государственные подходы к стандартизации и обеспечению безопасности любого вида деятельности, изложенные в ФЗ № 184 «О техническом регулировании» (с последними изменениями от 28.12.13) и «Основах государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2025 г. и дальнейшую перспективу» (утвержденные Президентом РФ 01.11.2013 г. № Пр-2573). В связи с этим актуальными являются разработка стандартизированных методических подходов, операционных процедур для подготовки специалистов и необходимость проведения научных исследований по снижению биологических рисков обучающих технологий путем максимального сокращения использования патогенных микроорганизмов в технологических процессах.

Обязательным разделом программ профессиональной переподготовки бактериологов, эпидемиологов, зоологов, лаборантов для работы с возбудителями ООИ является учебный модуль «Микробиология и лабораторная диагностика чумы», состоящий из теоретических и практических занятий. Отдельные разделы модуля используют при проведении практических занятий на курсах повышения квалификации по семи учебным программам. Необходимо отметить, что подбор штаммов для практических занятий на курсах определяет преподаватель, ответственный за их проведение. Отсутствуют критерии отбора штаммов воз-

будителя чумы в качестве учебных, а также соответствующие нормативные и методические документы. Не сформулировано само понятие «учебный штамм».

Целью работы была разработка критериев подбора штаммов *Y. pestis* в качестве учебных, а также принципов формирования и применения набора штаммов для обеспечения практических занятий по лабораторной и дифференциальной диагностике чумы.

Материалы и методы

Законодательные и подзаконные акты Российской Федерации, нормативные и методические документы по лабораторной диагностике чумы и биобезопасности работ с ПБА; учебные программы профессиональной переподготовки для работ с возбудителями ООИ и повышения квалификации. Метод исследования: аналитический.

Результаты и обсуждение

Для достижения поставленной цели нами были проанализированы учебные планы практических занятий в рамках учебного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика чумы» и нормативно-методические документы, регламентирующие диагностические исследования на чуму [3, 6]. Определено, что в Российской Федерации лабораторную диагностику чумы осуществляют учреждения Роспотребнадзора, функционирующие в рамках единой системы мониторинга, индикации и диагностики инфекционных болезней на трех уровнях: территориальном, региональном и федеральном. Для каждого уровня лабораторий нормативно закреплён перечень проводимых ими исследований [6].

Исходя из положений приказа руководителя Роспотребнадзора № 88 от 17.03.2008 г. «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней» и санитарных правил СП 1.3.1285-03 «Безопасность работ с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» специализированную переподготовку обязаны проходить работники учреждений регионального и федерального уровней. Сотрудники учреждений территориального уровня не проводят лабораторную диагностику чумы. Однако для решения определенных для них задач [6] должны освоить технику забора материала с соблюдением правил биобезопасности, хранения, транспортирования, учета, передачи патогенных биологических агентов. Специалисты учреждений регионального уровня должны владеть бактериологическими методами диагностики чумы, в том числе экспресс- и ускоренной диагностики (МФА, ПЦР, ИХ-тест, ИФА и другие), навыками обеспечения биобезопасности работ. Сотрудники учреждений федерального уровня, кроме владения вышеназванными методами и навыками, должны уметь идентифицировать выделенную бактериальную культуру по полной

схеме, включая молекулярно-генетические методы.

Таким образом, обучающий процесс, исходя из современных схем лабораторной диагностики чумы, включает следующие направления: изучение микробиологии возбудителя (морфология клетки, культуральные и физиолого-биохимические свойства), в том числе дифференциация от других патогенных иерсиний и возбудителей массовых эпизоотий грызунов; изучение патологоанатомической картины чумы у лабораторных животных. Финалом подготовки должно стать формирование специалиста, владеющего знаниями, умениями и навыками, позволяющими свободно решать профессиональные задачи. В результате анализа нормативно-методической базы в области лабораторной диагностики чумы и учебных программ нами впервые сформулирован перечень компетенций (знаний, умений, навыков), которые должен приобрести специалист в рамках учебного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика чумы» (таблица).

Выработку навыков и умений на практических занятиях в настоящее время осуществляют с использованием как вакцинного штамма возбудителя чумы *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, так и вирулентных штаммов. Использование последних связано с необходимостью освоения фенотипических и генотипических свойств, отличающихся от вакцинного штамма, а также отработки биологического метода, который является обязательным при лабораторной диагностике чумы. Вместе с тем слушатели курсов профессиональной переподготовки зачастую не владеют навыками выполнения микробиологических манипуляций в соответствии с правилами биобезопасности, что повышает риск неблагоприятного события – возникновения аварийной ситуации. Ранее нами был проведен ретроспективный анализ аварийных ситуаций при работе с ПБА слушателей курсов профессиональной переподготовки (1972–2009 гг.) [8]. Установлено, что 88,3 % аварий произошли в результате невнимательности, неаккуратности, недостаточной выработки навыков лабораторной работы у обучающихся. Следовательно, актуальным и приоритетным направлением совершенствования образовательных технологий является подбор штаммов возбудителя чумы, преимущественно вакцинных и со сниженной вирулентностью, для применения в качестве учебных. Вместе с тем информационный поиск выявил, что отсутствуют определение понятия «учебный штамм», соответствующие критерии подбора штаммов возбудителя чумы в качестве учебных, а также сведения о специализированных наборах штаммов для обучения лабораторной диагностике чумы.

Существует методика использования штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ для подготовки проб при проведении учений по обнаружению ПБА в объектах окружающей среды и материале от больных людей [7]. Однако планы практических занятий включают изучение всего многообразия биологических свойств различных подвидов возбудителя чумы, а также от-

Профессиональные компетенции специалиста

Компетенции	Индикаторы
Знать	Особенности морфологии, биохимии, физиологии, географического распространения и экологии патогенных иерсиний, возбудителя пастереллеза. Характеристику клеточных структур патогенных иерсиний. Антигенное строение чумного микроба, особенности иммунного ответа при чуме. Основы генетики патогенных иерсиний. Закономерности роста патогенных иерсиний в различных условиях культивирования. Методы изучения и применения бактериофагов, бактериоцинов чумного микроба. Схемы лабораторной диагностики чумы. Регламентированные методы исследования при индикации и идентификации возбудителя чумы, дифференциации от других патогенных для человека иерсиний.
Уметь	<p>Определить характер и объем материала, подлежащего исследованию, методы и сроки отбора проб. Организовать отбор и доставку материала в лабораторию. Определить условия, способ транспортировки и хранения материала для исследования. Окрашивать препараты простыми и сложными методами, проводить микроскопическую диагностику иерсиниозов. Выбрать необходимые тесты для индикации возбудителя чумы. Определить целесообразные методы и/или способы посева с целью выделения чистых культур возбудителя чумы. Определить оптимальный выбор питательных сред для посева нативного материала, а при необходимости для его обогащения. Определить качественные и количественные характеристики выросших бактериальных культур. Выделить чистые культуры микроорганизмов. Уметь поставить, учесть и оценить результаты МФА, ИФА, ИХ, ПЦР, реакции агглютинации, непрямои агглютинации и других. Выбрать необходимые тесты для идентификации возбудителя чумы до рода, вида, подвида. Идентифицировать выделенные культуры по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим, антигенным свойствам. Определить антибиотикограмму. Определить чувствительность к бактериофагам. Воспроизводить инфекционный процесс на экспериментальных животных. Уметь определять вирулентность культур чумного микроба на экспериментальных животных и <i>in vitro</i>. Определить титр антител и наличие антигена в сыворотке крови. Трактовать результаты лабораторных методов исследования и дать обоснованный ответ по завершении исследования материала. Оформить учетно-отчетную документацию. Обеспечить обеззараживание инфекционного материала.</p> <p>Выбрать необходимые тесты для дифференциации возбудителя чумы от других патогенных для человека иерсиний и возбудителей массовых эпизоотий грызунов. Оценивать результаты характеристики штаммов возбудителей чумы, циркулирующих на территории природного очага.</p>
Владеть	<p>Методами посева материала на различные питательные среды. Постановкой биохимических тестов. Методикой и техникой постановки иммунологических реакций. Навыками и методами морфологических исследований (приготовление биологического объекта к исследованию, фиксация, окраска, микроскопия с иммерсионной системой светового микроскопа, темнопольная, фазово-контрастная, люминесцентная). Постановкой тестов для индикации и идентификации возбудителя чумы.</p> <p>Методами экспериментальной работы с лабораторными животными (фиксация, заражение, вскрытие биопроб, приготовление мазков-отпечатков из органов, посев крови и органов, расчет LD₅₀).</p>

работку биологического метода лабораторной диагностики. С этой целью необходимо задействовать группу штаммов *Y. pestis*, различающихся по способности ферментировать отдельные субстраты (глицерин, мочевины, рамнозу, мелибиозу) [12], аминокислоты [3], по «избирательной» вирулентности для лабораторных животных [9], плазмидному составу [11, 13], чувствительности к специфическим бактериофагам [10] и антибактериальным препаратам [2]. Имитация экспериментальной чумы у лабораторных животных путем заражения вакцинным штаммом не позволяет получать характерную патологоанатомическую картину, а также стабильно выделять микроорганизмы при посеве паренхиматозных органов. Моделирование чумы у лабораторных животных на практических занятиях обеспечивается использованием вирулентного штамма.

В соответствии с необходимостью дифференциации возбудителя чумы от других патогенных иерсиний и бактерий, вызывающих массовые эпизоотии среди грызунов и спорадические заболевания людей, в учебный план включено изучение свойств возбудителей псевдотуберкулеза, кишечного иерсиниоза, пастереллеза.

Учитывая вышеперечисленные данные нами предложены критерии подбора штамма *Y. pestis*:

- авирулентность или сниженная вирулентность;
- наличие свойств, позволяющих изучить типичную морфологию клетки, культуральные и физиолого-биохимические свойства возбудителя чумы;
- наличие свойств, характеризующих биологические особенности различных подвидов или штаммов;
- наличие свойств, необходимых для проведения

индикации и идентификации возбудителя чумы регламентированными методами [6];

- наличие свойств, позволяющих дифференцировать возбудитель чумы от возбудителей псевдотуберкулеза, кишечного иерсиниоза, пастереллеза;

- способность моделировать экспериментальную чуму у лабораторных животных и стабильно выделяться из паренхиматозных органов биопробных животных;

- чувствительность к антибактериальным препаратам, применяемым для специфической профилактики чумы.

Исходя из выделенных критериев, может быть предложено следующее определение: «Учебный штамм» микроорганизма – это авирулентный или аттенуированный штамм, обладающий всем комплексом свойств для проведения в полном объеме индикации, идентификации и дифференциальной диагностики чумы, чувствительный к антибактериальным препаратам, используемым для специфической профилактики.

«Учебный штамм» – идеальный объект. Поэтому, корректнее говорить о наборе штаммов для обеспечения практических занятий в рамках учебного модуля. При формировании набора предпочтение необходимо отдавать штаммам авирулентным, вакцинным и со сниженной вирулентностью.

Следовательно, основной принцип формирования набора учебных штаммов – обеспечение освоения в полном объеме биологических свойств возбудителя чумы для проведения индикации, идентификации и дифференциальной диагностики чумы. На основании этого были определены следующие группы учебных штаммов:

- штаммы возбудителя чумы: вакцинный штамм

Y. pestis EV линии НИИЭГ, обладающий свойствами, позволяющими провести индикацию и идентификацию регламентированными методами; штаммы, преимущественно неосновных подвидов, позволяющие изучить биологические свойства, отличные от *Y. pestis* EV;

- штаммы, обеспечивающие моделирование экспериментальной чумы у лабораторных животных (характерная патанатомическая картина и стабильное выделение из паренхиматозных органов), вирулентные и со сниженной вирулентностью;

- штаммы *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *Pasteurella multocida*, предназначенные для освоения дифференциально-диагностических признаков.

Включение в набор штаммов авирулентных, со сниженной вирулентностью и вирулентных требует разработки алгоритма их применения. Нами предложен дифференцированный подход к использованию набора учебных штаммов: штаммы (вакцинный штамм, авирулентные, со сниженной вирулентностью), выдаваемые слушателям курсов для работы за лабораторным столом для изучения типичных свойств возбудителя чумы и стандартных методов лабораторной и дифференциальной диагностики; штаммы, используемые преподавателями при подготовке и проведении практических занятий с целью демонстрации свойств возбудителя чумы и лабораторных тестов, которые невозможно провести с помощью *Y. pestis* EV линии НИИЭГ (например, отсутствие ферментации глицерина, мочевины; ауксотрофность по отдельным аминокислотам, резистентность к бактериофагу Л413-С и т.д.); штаммы, используемые для моделирования экспериментальной чумы (вирулентные, которые используют преподаватели для демонстрации типичной клинической и патанатомической картины у лабораторных животных); штаммы возбудителя чумы (вакцинный или со сниженной вирулентностью) для работы слушателей курсов при освоении биологического метода диагностики.

Таким образом, в работе впервые сформулированы определение понятия «учебный штамм», критерии подбора штаммов возбудителя чумы в качестве учебных, принципы формирования специализированного набора учебных штаммов и их дифференцированного применения в образовательном процессе. Создание специализированного набора учебных штаммов, включающего преимущественно штаммы вакцинные, авирулентные и со сниженной вирулентностью, позволяет не только обеспечить в полном объеме выполнение учебных планов в рамках образовательного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика чумы», но и снизить биологические риски при проведении практических занятий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воробьев А.А., Боев Б.В., Бондаренко В.М., Гинцбург А.Л. Проблема биотерроризма в современных условиях. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2002; 3:3–12.
2. Кутырев В.В., Попов Н.В., Ерошенко Г.А., Меркулова Т.К. Чума на о. Мадагаскар. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 2(108):5–11.

3. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: «Шико»; 2013. 555 с.

4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: «Медицина»; 2004. 192 с.

5. Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации. МУ 3.1.3.2355-08. М.; 2009.

6. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики чумы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней. МУК 4.2.2940-11. М.; 2011.

7. Приготовление проб с имитаторами патогенных биологических агентов: методические указания. МУ 4.2.1103-02. М.; 2002.

8. Сазанова Е.В., Бойко А.В., Малокова Т.А., Лоцманова Е.Ю. Пути снижения вероятности возникновения аварийных ситуаций при подготовке специалистов для работы с возбудителями I–II групп патогенности. *Биозащита и биобезопасность.* 2012; 1(10):16–20.

9. Трухачев А.Л., Лебедева С.А., Иванова В.С. Современное представление о вирулентности и эпидемической опасности штаммов «полевоchей» (рамнозопозитивной) разновидности возбудителя чумы. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2007; 5:4–7.

10. Царева Н.С., Зайцев А.А., Брюханова Г.Д., Щедрин В.И., Шерстюк М.В. Штамм бактерий *Yersinia pestis*, используемый в качестве тест-штамма, резистентного к чумному бактериофагу Л-413 С. Патент РФ 2203316, опубл. 27.04.2003. Бюл. 12.

11. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific Diversity of *Yersinia pestis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17(2):434–64.

12. Devignat R. Varietes de le spece *Pasteurella pestis*. Nouvelle hypothese. *Bull. WHO.* 1951; 4(2):242–63.

13. Kutyrev V.V., Smirnova N.I. Genetic Diversity and Genomic Evolution of Particularly Dangerous Infectious Agents of Plague, Cholera and Anthrax: The Present Status and Future Perspective. In: *New Research on Biotechnology and Medicine.* 2006. P. 29–44.

References

1. Vorob'ev A.A., Boev B.V., Bondarenko V.M., Gintsburg A.L. [Bioterrorism issues under current conditions]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2002; 3:3–12.
2. Kutyrev V.V., Popov N.V., Eroshenko G.A., Merkulova T.K. [Plague in Madagascar]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 2(108):5–11.
3. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infections. Practice Guidelines]. М.: "Shiko"; 2013. 555 p.
4. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors [Natural Plague Foci in the Territory of Caucasus, Caspian Sea Region, Central Asia, and Siberia]. М.: "Meditsina"; 2004. 192 p.
5. [Organization and Carrying out of Epidemiological Surveillance in Natural Plague Foci in the Territory of the Russian Federation. Methodological Regulations]. MR 3.1.3.2355-08. М.; 2009.
6. [Management and carrying out of the laboratory diagnostics of plague in local, regional and national facilities. Methodological Guidelines]. MG 4.2.2940-11. М.; 2011.
7. [Sample preparation containing surrogates of pathological biological agents. Methodological Regulations]. MR 4.2.1103-02. М.; 2002.
8. Sazanova E.V., Boiko A.V., Malyukova T.A., Lotsmanova E.Yu. [Ways of decreasing the probability of emergency situations when training specialists for work with the agents of the I-IV groups of pathogenicity]. *Biозashchita i Biobezop.* 2012; 1(10):16–20.
9. Trukhachev A.L., Lebedeva S.A., Ivanova V.S. [Modern view on the virulence and level of epidemic hazard among the "Microtus" (rhamnose-positive) plague agent strains]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2007; 5:4–7.
10. Tsareva N.S., Zaitsev A.A., Bryukhanova G.D., Shchedrin V.I., Sherstyuk M.V. [*Yersinia pestis* strain used as a test-strain resistant to plague bacteriophage L-413 C]. RF Patent 2203316. 27.04.2003. Bull. 12.
11. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific Diversity of *Yersinia pestis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17(2):434–64.
12. Devignat R. Varietes de le spece *Pasteurella pestis*. Nouvelle hypothese. *Bull. WHO.* 1951; 4(2):242–63.
13. Kutyrev V.V., Smirnova N.I. Genetic Diversity and Genomic Evolution of Particularly Dangerous Infectious Agents of Plague, Cholera and Anthrax: The Present Status and Future Perspective. In: *New Research on Biotechnology and Medicine.* 2006. P. 29–44.

Authors:

Sazanova E.V., Malyukova T.A., Popov Yu.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Сазанова Е.В., Малокова Т.А., Попов Ю.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 10.06.14.