

Е.В.Сазанова, А.Н.Малахаева, Т.А.Малюкова, А.В.Бойко, Е.Г.Булгакова, Ю.А.Попов

**МОДЕЛИРОВАНИЕ ЧУМНОЙ ИНФЕКЦИИ ПРИ ЗАРАЖЕНИИ АВИРУЛЕНТНЫМИ ШТАММАМИ *YERSINIA PESTIS***

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

Биологический метод исследования регламентирован при лабораторной диагностике чумы. Освоение данного метода специалистами в рамках дополнительного профессионального образования связано с использованием на практических занятиях вирулентных штаммов *Yersinia pestis* и вакцинного штамма *Y. pestis* линии EV, который, обеспечивая биобезопасность, не позволяет изучить типичную патоморфологическую картину на биомоделях, а также выделить микроорганизмы из внутренних органов. **Цель.** Подбор авирулентных штаммов *Y. pestis* и сравнительный анализ способов моделирования с их помощью чумы на биомоделях. **Материалы и методы.** В работе использованы штаммы *Y. pestis*. Вирулентность оценивали *in vitro* (полимеразная цепная реакция) и *in vivo* (показатель LD<sub>50</sub> на белых мышах). **Результаты и выводы.** Предложены авирулентные штаммы *Y. pestis*, перспективные в качестве учебных для освоения биологического метода лабораторной диагностики чумы, и способ их применения для моделирования чумы у биомоделей. Предложенный подход позволяет слушателям курсов дополнительного профессионального образования освоить в полном объеме биологический метод исследования чумы, повышая обеспечение биобезопасности практических занятий и сокращая сроки выделения и накопления чистой культуры бактерий.

**Ключевые слова:** биологическая безопасность, подготовка специалистов, биологический метод исследования, возбудитель чумы, учебные штаммы, лабораторная диагностика чумы.

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

E.V.Sazanova, A.N.Malakhayeva, T.A.Malyukova, A.V.Boiko, E.G.Bulgakova, Yu.A.Popov

**Plague Infection Simulating in Case of Inoculation with Avirulent *Yersinia pestis* Strains**

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

Biological method of investigation is specified for the laboratory diagnostics of plague. Mastering of this method by the trainees within the frames of further vocational education is associated with the use of avirulent *Yersinia pestis* strains and vaccine *Y. pestis* strain EV line, which while providing safety does not allow for typical pathomorphological pattern on biomodels, as well as for isolation of microorganisms from internal organs. **Objective** of the study is to select avirulent *Yersinia pestis* strains and to conduct comparative analysis of the simulation techniques for plague on biomodels. **Materials and methods.** Utilized were *Y. pestis* strains. Virulence was evaluated both, *in vitro* (polymerase chain reaction) and *in vivo* (LD<sub>50</sub> for white mice). **Results and conclusions.** Set forward have been avirulent *Y. pestis* strains, prospective in terms of mastering biological method of laboratory diagnostics of plague, and means of their application for simulating plague in biomodels. The designed approach allows for exercising biological methods of plague investigation to the fullest extent, enhancing biological safety of practical studies and reducing the time line for isolation and accumulation of pure bacterial culture.

**Key words:** biological safety, specialists training, biological method of investigation, plague agent, training strains, laboratory diagnostics of plague.

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

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

Citation: Sazanova E.V., Malakhayeva 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; 2:45–49. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-45-49

В схеме лабораторной диагностики чумы биологический метод является обязательным на этапах индикации, выделения и накопления бактериальной культуры [6, 8]. Традиционно освоение биологического метода исследования на практических занятиях по подготовке специалистов в рамках учебного модуля «Микробиология и лабораторный диагноз чумы» проводят с использованием вирулентных штаммов *Y. pestis* (I группа патогенности). Это позволяет наблюдать клинические проявления чумы у зараженных животных, типичные патоморфологические изменения в подкожной клетчатке и внутренних органах, выделять бактериальную культуру

путем посева на питательные среды проб паренхиматозных органов.

Однако слушатели курсов дополнительного профессионального образования зачастую не имеют должного опыта выполнения микробиологических манипуляций в соответствии с правилами биологической безопасности, что повышает риск аварий и/или лабораторных заражений. Это обуславливает необходимость исключения или максимально возможного сокращения использования в технологических процессах вирулентных штаммов микроорганизмов в том числе в процессе обучения, согласно концепции «Основы государственной политики в области

обеспечения химической и биологической безопасности РФ на период до 2025 года и дальнейшую перспективу». Снижения риска инфицирования добивались путем использования на практических занятиях авирулентных штаммов *Y. pestis*, LD<sub>50</sub> которых для белых мышей составляет более  $1 \cdot 10^6$  м.к. [6]. Вместе с тем, многолетний опыт применения вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ (III группа патогенности, LD<sub>50</sub> >  $10^9$  м.к.) свидетельствует об отсутствии типичной клинической и патоморфологической картины чумы у лабораторных животных, а также о нестабильности выделения чумного микроба из паренхиматозных органов [7]. Таким образом, применение вакцинного штамма целесообразно с позиции обеспечения биобезопасности практических занятий, но недостаточно эффективно для моделирования чумы у лабораторных животных и реализации учебного плана.

Цель работы – подобрать авирулентные штаммы *Y. pestis* и провести сравнительный анализ способов моделирования с их помощью чумы на лабораторных животных.

### Материалы и методы

В работе использованы 19 штаммов *Y. pestis*, отобранных по данным паспортов из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» как перспективные для учебных целей. Основными критериями [10] отбора для штаммов *Y. pestis*, планируемых к применению с целью освоения биологического метода лабораторной диагностики чумы, являлись ослабленная вирулентность или авирулентность, способность формировать типичные для чумы патоморфологические изменения в организме биопробного животного и стабильность выделения бактериальной культуры при посеве методом отпечатков проб внутренних органов на плотные питательные среды.

Вирулентность штаммов *in vitro* оценивали по наличию генетических детерминант патогенности с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием коммерческой тест-системы «Ген *Yersinia pestis* идентификация – РГФ», вирулентность *in vivo* – по показателю LD<sub>50</sub> для морских свинок и беспородных белых мышей [2, 6]. Белых мышей заражали подкожно в объеме 0,2 мл дозами от  $1 \cdot 10^9$  до 20 м.к. На каждую дозу брали по шесть белых мышей. Заданным требованиям отвечали четыре штамма *Y. pestis*, вирулентность которых не превышала  $1 \cdot 10^8$  м.к. В дальнейшем эти штаммы исследовали на морских свинках, заражая по 0,5 мл подкожно дозами от  $1 \cdot 10^9$  до  $1 \cdot 10^4$  м.к. На каждую дозу брали по две морские свинки. За животными наблюдали в течение 14 дней от момента заражения. Всех павших и умерщвленных лабораторных животных вскрывали, регистрировали патоморфологическую картину и проводили посев паренхиматозных органов (легких, печени, селезенки) на агар Хоттингера, pH 7,2, с це-

лью выделения, накопления чистой бактериальной культуры и подтверждения ее тождества с использованной для заражения.

Моделирование инфекционного процесса проводили путем заражения лабораторных животных авирулентными штаммами *Y. pestis* в сочетании с: 1 % раствором FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; дефибринированной кровью барана. Животных заражали внутрибрюшинно 1 % раствором препарата железа со взвесью испытуемого штамма *Y. pestis* в объемах 1:1, вводя 0,5 мл. Взвесь использовали в дозах  $1 \cdot 10^9$ ,  $1 \cdot 10^8$ ,  $1 \cdot 10^7$  и  $1 \cdot 10^6$  м.к., заражая по четыре белых мыши. Аналогично проводили заражение в сочетании с дефибринированной кровью барана. За животными наблюдали в течение 10 дней. Павших животных вскрывали, изучали патоморфологическую картину и проводили посев паренхиматозных органов на агар Хоттингера, pH 7,2. Посевы инкубировали в течение 5 дней при температуре (28±1) °С с ежедневным их просмотром. Выживших животных умерщвляли гуманным способом с помощью паров хлороформа, вскрывали и изучали, как описано выше. При работе с животными следовали Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123, г. Страсбург, 18.03.1986).

### Результаты и обсуждение

Проявлению вирулентных свойств возбудителя чумы способствуют наличие в геноме трех неконъюгативных плазмид (pCad, pFra и pPst) и хромосомного острова высокой патогенности, включающего область пигментации *pgm*. Гены, расположенные на плазмиде pCad и хромосомном острове высокой патогенности, являются основными генетическими факторами вирулентности возбудителя чумы.

ПЦР-анализ штаммов *Y. pestis* позволил дифференцировать их на 5 геновариантов (табл. 1) и сделать предположение о сниженной вирулентности для 6 штаммов (отсутствие либо pCad, либо Pgm), а также об авирулентности для 11 штаммов (отсутствие pCad и Pgm). В результате было отобрано 17 штаммов для оценки вирулентности *in vivo* по показателю LD<sub>50</sub> с применением следующих критериев: вирулентные штаммы имеют показатель LD<sub>50</sub> > 5–10 м.к., слабовирулентные – LD<sub>50</sub> >  $1 \cdot 10^5$  м.к., авирулентные – LD<sub>50</sub> >  $1 \cdot 10^6$  м.к. при подкожном заражении белых мышей [5]. В результате 4 штамма были охарактеризованы как вирулентные, 13 – как авирулентные (табл. 1).

Нами установлено, что при заражении штаммами *Y. pestis* М-1813, 100Р6(36М5), 780 (К-1) и 707 «Касуга» животные погибали только при дозах  $10^9$  и  $10^8$  м.к. При этом у павших животных отмечали типичные для чумы патоморфологические изменения. Из всех внутренних органов на питательных средах была выделена культура *Y. pestis*.

В итоге эти штаммы определены как перспек-

Показатель вирулентности штаммов *Y. pestis*

Наименование штамма	Геноварианты	Величина LD <sub>50</sub> , м.к.	
		белые мыши	морские свинки
<i>Y. pestis</i> 835 «РВС»	pPst <sup>+</sup> pFra <sup>+</sup> pCad <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup>	2,15·10 <sup>3</sup>	-
<i>Y. pestis</i> 400 (290)	pPst <sup>+</sup> pFra <sup>+</sup> pCad <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup>	1·10 <sup>4</sup>	-
<i>Y. pestis</i> 6483 АМО	pPst <sup>+</sup> pFra <sup>+</sup> pCad <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup>	4,64·10 <sup>5</sup>	-
<i>Y. pestis</i> 471 Овсептика	pPst <sup>+</sup> pFra <sup>+</sup> pCad <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup>	4,64·10 <sup>5</sup>	-
<i>Y. pestis</i> 652 «Гризель»	pPst <sup>+</sup> pFra <sup>+</sup> pCad <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup>	2,15·10 <sup>6</sup>	-
<i>Y. pestis</i> 7896	pPst <sup>+</sup> pFra <sup>+</sup> pCad <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup>	3,16·10 <sup>7</sup>	-
<i>Y. pestis</i> M-1815	pPst <sup>+</sup> pFra <sup>+</sup> pCad <sup>+</sup> Pgm <sup>-</sup>	6,81·10 <sup>7</sup>	-
<i>Y. pestis</i> M-1814	pPst <sup>+</sup> pFra <sup>+</sup> pCad <sup>+</sup> Pgm <sup>-</sup>	1,47·10 <sup>8</sup>	-
<i>Y. pestis</i> 100P6(36M5)	pPst <sup>+</sup> pFra <sup>+</sup> pCad <sup>+</sup> Pgm <sup>-</sup>	1,47·10 <sup>8</sup>	>10 <sup>9</sup>
<i>Y. pestis</i> 780 (К-1)	pPst <sup>+</sup> pFra <sup>+</sup> pCad <sup>+</sup> Pgm <sup>-</sup>	2,15·10 <sup>8</sup>	3·10 <sup>8</sup>
<i>Y. pestis</i> M-1813	pPst <sup>+</sup> pFra <sup>+</sup> pCad <sup>+</sup> Pgm <sup>-</sup>	1·10 <sup>8</sup>	>10 <sup>9</sup>
<i>Y. pestis</i> 22 (22)	pPst <sup>+</sup> pFra <sup>+</sup> pCad <sup>+</sup> Pgm <sup>-</sup>	>10 <sup>9</sup>	-
<i>Y. pestis</i> 14/44	pPst <sup>+</sup> pFra <sup>+</sup> pCad <sup>+</sup> Pgm <sup>-</sup>	>10 <sup>9</sup>	-
<i>Y. pestis</i> 707 Касуга	pPst <sup>+</sup> pFra <sup>+</sup> pCad <sup>+</sup> Pgm <sup>-</sup>	1·10 <sup>9</sup>	>10 <sup>9</sup>
<i>Y. pestis</i> 521 (2101)	pPst <sup>+</sup> pFra <sup>+</sup> pCad <sup>+</sup> Pgm <sup>-</sup>	>10 <sup>9</sup>	-
<i>Y. pestis</i> KM 260 (5)	pPst <sup>+</sup> pFra <sup>+</sup> pCad <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup>	>10 <sup>9</sup>	-
<i>Y. pestis</i> KM-130 (3)	pPst <sup>-</sup> pFra <sup>+</sup> pCad <sup>-</sup> Pgm <sup>-</sup>	>10 <sup>9</sup>	-

Примечание: «-» животных в эксперимент не брали.

тивные для моделирования инфекционного процесса у белых мышей. Учитывая вероятность избирательной чувствительности лабораторных животных к *Y. pestis* был определен показатель LD<sub>50</sub> для отобранных штаммов на высоковосприимчивых биомоделях – морских свинках. Установлено, что штаммы для них авирулентны.

Моделирование чумы с помощью авирулентных штаммов сопровождалось развитием клинических симптомов и гибелью животных не ранее 72 ч от момента заражения. Соответственно появление видимых невооруженным глазом колоний *Y. pestis* на плотных питательных средах при посеве паренхиматозных органов регистрировали не ранее 5 сут с момента заражения животных.

Вторым этапом исследования был подбор оптимального способа искусственного повышения чувствительности лабораторных животных (белых мышей) к авирулентным штаммам возбудителя чумы, позволяющего сократить сроки и повысить эффективность выделения *Y. pestis* из организма биопробных животных.

Анализ литературы показал, что известны методы заражения лабораторных животных штаммами *Y. pestis* в сочетании с веществами, понижающими резистентность макроорганизма к чуме (морбиторами): кортизоном, гистамином, новоэмбихином, желтком куриного яйца, холерным экзотоксином и др. [1, 4, 5]. Известны методики внутримозгового заражения белых мышей [9], пассажа *Y. pestis* EV и штаммов со сниженной вирулентностью в организме высоковосприимчивых монгольских пищух [3] с целью повышения чувствительности к возбудителю чумы. Однако

указанные методы имеют ограниченное практическое применение. Также известны исследования влияния солей железа на вирулентность штаммов возбудителя чумы [13]. Данный подход является наиболее органичным, связанным с естественным процессом жизнедеятельности возбудителя чумы [11, 12].

Для моделирования чумы нами использованы 4 отобранных авирулентных штамма и *Y. pestis* EV линии НИИЭГ. При заражении лабораторных животных смесью сульфата железа с микробной взвесью в дозах 1·10<sup>9</sup>–1·10<sup>6</sup> м.к. отмечали: а) 100 % гибель на третьи сутки после заражения штаммами *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, M-1813, 100P6(36M5); б) штамм 780 (К-1) вызвал гибель всех животных в течение 3 и 4 сут; в) заражение животных штаммом *Y. pestis* 707 «Касуга» дозами 1·10<sup>6</sup> и 1·10<sup>7</sup> м.к. сопровождалось медленным развитием инфекционного процесса и отсутствием гибели животных (табл. 2).

При заражении лабораторных животных смесью дефибринированной крови барана со взвешью клеток *Y. pestis* M-1813 во всех концентрациях отмечена гибель биопробных животных уже на вторые и третьи сутки. Заражение смесью дефибринированной крови со взвешью *Y. pestis* 780 (К-1), *Y. pestis* EV линии НИИЭГ и *Y. pestis* 100P6(36M5) вызывало гибель в течение 10 сут; со взвесью *Y. pestis* 707 «Касуга» – не вызвала гибели животных. Всех павших белых мышей вскрывали, регистрировали типичные для чумы патоморфологические изменения подкожной клетчатки и внутренних органов [6].

Установлено, что заражение штаммами *Y. pestis* 100P6(36M5), M-1813 и 780 (К-1) в дозах 1·10<sup>9</sup> и 1·10<sup>8</sup> м.к. в комбинации с сульфатом железа обу-

Оценка влияния морбиторов на чувствительность белых мышей к заражению штаммами *Y. pestis*

Срок гибели после заражения, сут	EV линии НИИЭГ				M-1813				100P6(36M5)				780 (K-1)				707 «Касуга»			
	заражающая доза, м.к.				концентрация взвеси, м.к./мл															
	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>
Результаты заражения в смеси с 1 % раствором FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O																				
1	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
2	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
3	4/4*	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/3	4/1	4/2	4/3	4/1	4/0	4/0
4	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	3/3	2/1	1/0	3/1	4/0	4/0
5–10	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	1/0	2/0	4/0	4/0
Результаты заражения в смеси с дефибринированной кровью барана																				
1	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
2	4/2	4/0	4/0	4/0	4/4	4/1	4/0	4/0	4/2	4/1	4/0	4/0	4/2	4/1	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
3	2/2	4/1	4/1	4/0	0/0	3/3	4/4	4/4	2/2	3/2	4/1	4/0	2/2	3/2	4/1	4/2	4/0	4/0	4/0	4/0
4	0/0	4/0	3/2	4/4	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	3/1	4/0	0/0	1/0	3/1	2/0	4/0	4/0	4/0	4/0
5	0/0	3/2	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/1	4/0	0/0	1/0	2/0	2/0	4/0	4/0	4/0	4/0
6	0/0	1/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	4/1	0/0	1/0	2/0	2/0	4/0	4/0	4/0	4/0
7	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	3/0	0/0	1/1	2/0	2/1	4/0	4/0	4/0	4/0
8	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	3/0	0/0	0/0	2/0	1/0	4/0	4/0	4/0	4/0
9	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	3/0	0/0	0/0	2/0	1/0	4/0	4/0	4/0	4/0
10	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	3/3	0/0	0/0	2/0	1/0	4/0	4/0	4/0	4/0
Результаты заражения взвесями исследуемых штаммов																				
1	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
2	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
3	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
4	4/0	4/0	4/0	4/0	4/2	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/1	4/1	4/0	4/0
5	4/0	4/0	4/0	4/0	2/0	4/0	4/0	4/0	1/3	4/1	4/0	4/0	4/2	4/0	4/0	4/0	3/0	3/0	4/0	4/0
6	4/0	4/0	4/0	4/0	2/2	4/2	4/0	4/0	1/0	3/1	4/0	4/0	2/1	4/0	4/0	4/0	3/0	3/0	4/0	4/0
7	4/0	4/0	4/0	4/0	0/0	2/1	4/0	4/0	1/1	2/0	4/0	4/0	1/0	4/0	4/0	4/0	3/0	3/0	4/0	4/0
8	4/0	4/0	4/0	4/0	0/0	1/0	4/0	4/0	0/0	2/0	4/0	4/0	1/1	4/0	4/0	4/0	3/0	3/0	4/0	4/0
9	4/0	4/0	4/0	4/0	0/0	1/0	4/0	4/0	0/0	2/0	4/0	4/0	0/0	4/1	4/0	4/0	3/1	3/0	4/0	4/0
10	4/0	4/0	4/0	4/0	0/0	1/0	4/0	4/0	0/0	2/0	4/0	4/0	0/0	3/0	4/0	4/0	2/0	3/0	4/0	4/0

Примечание. Числитель – количество животных в опыте; знаменатель – количество павших животных в указанный срок.

словливалось более яркую патоморфологическую картину в отличие от доз 1·10<sup>7</sup> и 1·10<sup>6</sup> м.к. У павших животных, зараженных *Y. pestis* EV линии НИИЭГ и 100P6(36M5), отмечались признаки носового кровотечения. На вскрытии у животных, зараженных взвесью *Y. pestis* EV линии НИИЭГ в дозе 1·10<sup>8</sup> м.к. в комбинации с дефибринированной кровью барана, отмечено образование очагов некроза в селезенке, а с взвесью *Y. pestis* 100P6(36M5) в дозе 1·10<sup>8</sup> м.к. – очагов некроза в легких.

При посеве паренхиматозных органов лабораторных животных, зараженных штаммами *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, M-1813, 100P6(36M5), 780 (K-1) в комбинации как с сульфатом железа, так и с дефибринированной кровью барана через 24 ч инкубации при температуре (28±1) °C отмечали обильный рост видимых невооруженным глазом типичных колоний возбудителя чумы. При посеве паренхиматозных

органов лабораторных животных, зараженных смесью дефибринированной крови барана со взвесью штаммов *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, 100P6(36M5) и 780 (K-1) в дозе 1·10<sup>6</sup> м.к., рост колоний из лимфатических узлов отсутствовал.

В результате заражения смесями взвесей *Y. pestis* 707 «Касуга» как с сульфатом железа, так и с дефибринированной кровью в организме лабораторных животных не формировались типичные для чумы патоморфологические изменения. Единичные колонии *Y. pestis* выделяли только при посеве проб печени, селезенки и крови при заражающей дозе 1·10<sup>9</sup> м.к.

Заражение лабораторных животных смесью 1 % раствора FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O с суспензиями клеток штаммов возбудителя чумы сокращало сроки развития инфекционного процесса в среднем в два раза, вызывал появление типичных, ярко выраженных патоморфологических изменений в органах павших живот-

ных, способствовало формированию в течение 24 ч (вместо 48 ч) инкубации при температуре (28±1) °С на плотной питательной среде видимых невооруженным глазом колоний при посеве органов павших биопробных животных, что ускорило выделение и накопление бактериальной культуры и проведение ее идентификации.

В результате проведенных исследований нами отобраны два штамма – *Y. pestis* М-1813 (770 Аст) и *Y. pestis* EV линии НИИГЭ – перспективные в качестве учебных при освоении биологического метода лабораторной диагностики чумы.

Несмотря на утрату штаммом *Y. pestis* М-1813 (770 Аст) области *pgm* (включая *hms* и *ybt* регионы), введение сульфата железа обеспечило развитие сепсиса, что ускорило течение инфекционного процесса и гибель животного. Вероятно, это связано с наличием у возбудителя чумы нескольких систем потребления железа. В случае утраты области *pgm* с генами иерсиниабактин-зависимой системы утилизации ионов трехвалентного железа происходит включение дублирующих систем связывания и транспорта железа в микробную клетку [14]. При введении дефибрированной крови барана, содержащей ионы железа в свободном и доступном виде вследствие механического повреждения эритроцитов, регистрировали более продолжительное течение инфекционного процесса до (10 сут) и гибель только части зараженных животных.

Таким образом, отобранные авирулентные штаммы *Y. pestis* М-1813 (770 Аст) и *Y. pestis* EV линии НИИЭГ позволяют в полном объеме овладеть биологическим методом лабораторной диагностики чумы, обеспечить биологическую безопасность учебного процесса, минимизируя вероятность лабораторного инфицирования обучающихся в процессе самостоятельной работы.

Оптимальным способом повышения чувствительности лабораторных животных к заражению авирулентными штаммами *Y. pestis* при моделировании типичной патоморфологической картины чумы и сокращения сроков выделения, накопления и идентификации выделенной бактериальной культуры является введение микробной взвеси в сочетании с сульфатом железа.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамов А.К., Брандзишевский Ю.В., Пономарев Н.Г., Тихомирова Л.А. Способ экспресс-диагностики авирулентных штаммов возбудителя чумы. Лабораторная диагностика, биохимия и специфическая профилактика чумы и холеры. Саратов, 1986. С. 14–8.
2. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. 180 с.
3. Дробышева Т.М. Повышение вирулентности у штамма чумного микроба EB-5n7/443 в организме крольчонка и изучение его свойств. *Пробл. особо опасных инф.* 1971; 1(17):71–4.

4. Зильфян В.Н., Норамирян А.В. Влияние некоторых препаратов на чувствительность лабораторных животных к чумному микробу. *Известия АН Армянской ССР. Мед. науки.* 1961; 4:129–303.

5. Овасапян О.В., Галоян В.О. Применение кортизона и новэмбихина при выделении возбудителя эризипелоида от белых мышей в эксперименте. *Тр. Армянской противочумной станции.* 1963; 2:295–301.

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

7. Основные требования к вакцинным штаммам чумного микроба. МУ 3.3.1.1113-02. М.; 2002.

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

9. Руднев М.М. К вопросу о внутримозговом методе заражения белых мышей для ускоренной диагностики чумы. *Тр. Армянской противочумной станции.* 1963; 2:209–16.

10. Сазанова Е.В., Малукова Т.А., Попов Ю.А. Учебные штаммы *Yersinia pestis*: критерии подбора, принципы применения. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 3:38–41.

11. Bullen J.J. The significance of iron in infection. *Rev. Infect. Dis.* 1981; 3:1127–38.

12. Bullen J.J., Rogers H.J., Griffiths E. Role of iron in bacterial infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1978; 80:1–35.

13. Jackson S., Burrows T.W. The virulence-enhancing effect of iron on non-pigmented mutants of virulent strains of *Pasteurella pestis*. *Br. J. Exp. Pathol.* 1956; 37(6):577–83.

14. Rakin A., Schneider L., Podladchikova O. Hunger for iron: the alternative siderophore iron scavenging systems in highly virulent *Yersinia*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2012; 2:151. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00151.

#### References

1. Adamov A.K., Brandzishvsky Yu.V., Ponomarev N.G., Tikhomirova L.A. [Methods of express-diagnostics of avirulent plague agent strains]. In: [Laboratory Diagnostics, Biochemistry and Specific Prophylaxis of Plague and Cholera]. Saratov; 1986. P. 14–8.
2. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.: "Medgiz"; 1962. 180 p.
3. Drobysheva T.M. [Enhancement of the virulence in plague agent strain, EB-5n7/443, in the organism of a baby rabbit and investigation of its properties]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1971; 1(17):71–4.
4. Zil'fyan V.N., Noramiryanyan A.V. [Effect of certain preparations on sensitivity of laboratory animals to plague microbe]. *Izvestiya Akademii Nauk Armyanskoy SSR. Med. nauki.* 1961; 4:129–303.
5. Ovasapyan O.V., Galoyan V.O. [Use of cortisone and novembichinum in isolation of erysipeloid agent from white mice *in vitro*]. *Trudy Armyanskoy Protivochumnoy Stantsii.* 1963; 2:295–301.
6. Onishchenko G.G., Kutuyev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases]. M.: CJSC "Shiko"; 2013. 560 p.
7. [Basic requirements to vaccine strains of plague microbe]. MR 3.3.1.1113-02. M.; 2002.
8. [Organization and management of laboratory diagnostics of plague in territorial, regional and federal facilities]. MR 4.2.2940-11. M.; 2011.
9. Rudnev M.M. [On intracerebral inoculation of white mice for express diagnostics of plague]. *Trudy Armyanskoy Protivochumnoy Stantsii.* 1963; 2:209–16.
10. Sazanova E.V., Malyukova T.A., Popov Yu.A. [Dummy *Yersinia pestis* strains: selection criteria, usage guidelines]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 3:38–41.
11. Bullen J.J. The significance of iron in infection. *Rev. Infect. Dis.* 1981; 3:1127–38.
12. Bullen J.J., Rogers H.J., Griffiths E. Role of iron in bacterial infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1978; 80:1–35.
13. Jackson S., Burrows T.W. The virulence-enhancing effect of iron on non-pigmented mutants of virulent strains of *Pasteurella pestis*. *Br. J. Exp. Pathol.* 1956; 37(6):577–83.
14. Rakin A., Schneider L., Podladchikova O. Hunger for iron: the alternative siderophore iron scavenging systems in highly virulent *Yersinia*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2012; 2:151. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00151.

#### Authors:

Sazanova E.V., Malakhaeva A.N., Malyukova T.A., Boiko A.V., Bulgakova E.G., 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., Малахаева А.Н., Малукова Т.А., Бойко А.В., Булгакова Е.Г., Попов Ю.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 01.02.17.