

На правах рукописи

САЗАНОВА ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ СВОЙСТВ
YERSINIA PESTIS С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АВИРУЛЕНТНЫХ ШТАММОВ

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Саратов – 2019

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора)

Научный руководитель: **Малюкова Татьяна Анатольевна**, кандидат медицинских наук

Официальные оппоненты: **Щербаков Анатолий Анисимович**, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, профессор кафедры микробиологии, биотехнологии и химии

Швиденко Инна Григорьевна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры микробиологии с вирусологией и иммунологией

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится «**15**» **марта 2019 г.** в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.078.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте <http://www.microbe.ru/disser/dissert> Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Автореферат разослан « ____ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Микшис Наталья Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования и степень разработанности. Чума - острая, особо опасная зоонозная природно-очаговая бактериальная инфекционная болезнь с преимущественно трансмиссивным механизмом передачи возбудителя [Черкасский, 1996; Покровский и др., 2008]. Заболевание имеет индивидуальную и общественную опасность для человека, тяжелое течение и высокую летальность при отсутствии лечения. В ходе развития цивилизации известно три пандемии чумы, унесшие миллионы человеческих жизней [Домарадский, 1998; Кутырев, 2013]. Штаммы *Y. pestis* постоянно циркулируют в природных очагах, находящихся в 37 странах Африки, 28 странах Евразии, 11 странах Американского континента [Топорков и др., 2008; Попова и др., 2017; О мерах по предупреждению завоза ..., приказ № 1035/198 от 26 декабря 2008; Gage, Kosoy, 2005; Stenseth et al., 2008]. В начале XXI века зарегистрированы спорадические случаи заболеваний людей и рост эпизоотической активности на территории природных очагов чумы России и стран ближнего зарубежья, что требует систематического эпидемиологического надзора [Кутырев, Попова, 2016; Попов и др., 2017; Об организации деятельности системы ..., приказ Роспотребнадзора № 274 от 01.04.2015]. Одним из основных методов получения информации при эпидемиологическом мониторинге является лабораторное исследование носителей и переносчиков чумного микроба; больных людей, животных; объектов окружающей среды [МУ 3.1.3.2355-08; СП 3.1.7.3465-17]. В связи с этим актуальна подготовка специалистов противочумных учреждений Роспотребнадзора по вопросам индикации, идентификации *Yersinia pestis* и межвидовой дифференциации. Необходимость обучения приемам работы с возбудителем особо опасной инфекционной болезни обусловлена и его отнесением к категории А вероятных агентов биотерроризма [Inglesby et al., 2000; Воробьев, 2002].

В настоящее время в ходе профессиональной подготовки специалистов используют штаммы чумного микроба с различной вирулентностью. Одним из традиционно применяемых является высоковирулентный штамм *Y. pestis* 231 (708), относящийся к I группе патогенности. Преимущества его использования обуславливаются: стабильным сохранением типичных видовых биологических свойств (морфологических, культуральных и биохимических), наличием видоспецифических антигенов и генов; способностью вызывать выраженные патологоанатомические изменения у чувствительных лабораторных животных. Однако работа с высоковирулентным штаммом (LD_{50} равно 12,5 м.к.) повышает вероятность инфицирования обучающихся.

Одним из основных направлений государственной политики в области обеспечения биобезопасности Российской Федерации является исключение или максимальное снижение использования в технологических процессах патогенных микроорга-

низмов [Основы государственной политики ..., приказ № 2194 от 04.12.2003; Основы государственной политики ..., приказ № 2573 от 01.11.2013; Постановление Правительства РФ о Федеральной Целевой Программе ..., № 791 от 27 октября 2008]. Данный подход необходимо использовать при совершенствовании образовательных технологий подготовки специалистов к работам с возбудителями особо опасных инфекций (ООИ), так как слушатели курсов не имеют допуска к работе с ПБА I-II групп и только начинают приобретать навыки безопасного выполнения манипуляций, что сопряжено с вероятностью лабораторного инфицирования [СП 1.3.3118-13].

В настоящее время при подготовке специалистов для обеспечения биологической безопасности освоения лабораторных технологий используют единственный отнесенный к III группе патогенности авирулентный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ, поскольку является вакцинным. Однако его применение позволяет изучать фено-и генотипические особенности только *Y. pestis* основного подвида биовара *orientalis*.

Использование штаммов *Y. pestis* 231 (708) и EV НИИЭГ обеспечивает демонстрацию признаков основного подвида *pestis* биоваров *antique* и *orientalis* соответственно. Вместе с тем, в природных очагах Российской Федерации распространены штаммы основного подвида биовара *medievalis*, способного вызывать чуму у человека, а также неосновных подвидов (*ulegeica*, *hissarica*, *altaica*, *caucasica*) [Кутырев и др., 2016]. Выяснение подвидовой принадлежности штаммов чумного микроба – очень важная практическая задача. Следовательно, необходимо подобрать авирулентные штаммы для освоения алгоритма внутривидовой дифференциации этого патогена. Межвидовая дифференциация возбудителя чумы со штаммами *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *Pasteurella multocida*, сохраняющимися в природном резервуаре – грызунах, в том числе на территории природных очагов чумы, также подлежит освоению бактериологами. Представителей этих видов, имеющих набор общих биологических свойств, также необходимо использовать на практических занятиях при обучении специалистов приемам безопасной работы с патогенными биологическими агентами.

Вместе с тем штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ не вызывает полноценный инфекционный процесс с массивным обсеменением внутренних органов, лимфатических узлов и формированием в них выраженных патологоанатомических изменений, гибелью зараженных чувствительных лабораторных животных, а также не обеспечивает стабильное выделение чумного микроба при посеве паренхиматозных органов на питательные среды [МУ 3.3.1.1113-02].

Для воспроизведения патологоанатомической картины чумы на модели лабораторных животных необходим поиск безопасного штамма и разработка условий его применения.

Все вышеизложенное свидетельствует об актуальности разработки стандартизированного научно-обоснованного подхода к совершенствованию методической базы подготовки специалистов по программам дополнительного профессионального образования и снижению вероятности инфицирования обучающихся путем формирования набора охарактеризованных по основным биологическим свойствам штаммов чумного микроба и близкородственных видов, обеспечивающих биологическую безопасность.

На момент начала исследования отсутствовало понятие «учебный штамм *Y. pestis*», не было четких критериев и конкретных рекомендаций для отбора и применения штаммов чумного микроба на практических занятиях при обучении специалистов для работы с ПБА I-II групп патогенности. Освоение методов лабораторной диагностики чумы проводили на штаммах, в том числе, высоковирулентных, потенциально опасных при возникновении аварийных ситуаций.

Предложены штаммы *Y. pestis* для изучения отдельных генетических особенностей [А.с. 1825375; Пат. 2002802; 2031938; 2034023; 2034024; 2038376; 2118362; 2317325]. Выделен ряд природных штаммов чумного микроба, характеризующихся резистентностью к чумному бактериофагу Л-413С [Савостина и др., 2004; Пат. № 2203316]. Известен тест-штамм *Y. pestis* С-781, обладающий типичными свойствами штаммов из Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы [Пат. № 2317325]. Вместе с тем, все перечисленные штаммы являются вирулентными. Известна коллекция изогенных штаммов на основе вирулентного штамма *Y. pestis* 231 (708), включающая десять авирулентных дериватов [Самойлова, 1991]. Однако использование в учебном процессе любого из перечисленных штаммов *Y. pestis* в отдельности не позволяет продемонстрировать весь спектр типичных и атипичных биологических свойств возбудителя чумы, а также освоить комплекс базовых методов индикации и идентификации.

Таким образом, целенаправленных исследований по разработке репрезентативной выборки штаммов, характеризующих весь комплекс диагностических свойств чумного микроба, не проводилось.

Цель исследования: характеристика основных биологических свойств штаммов *Y. pestis* для формирования учебного набора, позволяющего моделировать диагностические признаки и снизить вероятность инфицирования специалистов при освоении методов лабораторной диагностики чумы.

Основные задачи исследования:

1. Обосновать необходимость формирования учебного набора штаммов возбудителя чумы. Разработать критерии отбора штаммов *Y. pestis* в качестве кандидатов в учебные для освоения вопросов микробиологии и лабораторной диагностики чумы.

2. Осуществить комплексную оценку в опытах *in vitro* и *in vivo* биологических свойств авирулентных штаммов *Y. pestis*, отобранных с учетом установленных критериев из фонда «Государственной коллекции патогенных бактерий» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

3. Оптимизировать методические приемы моделирования чумы у лабораторных животных с применением авирулентных штаммов *Y. pestis* для воспроизведения патологоанатомических изменений во внутренних органах биомоделей.

4. Подтвердить аутентичность выбранных коллекционных штаммов *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *Pasteurella multocida*, используемых для дифференциации с возбудителем чумы.

5. Разработать дифференцированный подход к применению штаммов учебного набора при подготовке специалистов в рамках модуля «Микробиология и лабораторный диагноз чумы» и снижению вероятности инфицирования слушателей курсов.

Научная новизна исследования. Сформулировано понятие «учебный штамм *Y. pestis*» и предложены критерии отбора штаммов *Y. pestis* для использования на курсах дополнительного профессионального образования при освоении лабораторной диагностики чумы.

Получены характеристики штаммов *Y. pestis*, перспективных в качестве учебных, по следующим свойствам: кальцийзависимость, пигментсорбция, чувствительность или резистентность к диагностическим чумным и псевдотуберкулезному бактериофагам, продукция пестицина и чувствительность к нему, чувствительность к доксициклину, гентамицину, ципрофлоксацину, показатель LD₅₀; определены их молекулярно-генетические особенности.

Показано, что для моделирования чумы у лабораторных животных оптимально использование при внутрибрюшинном заражении авирулентных штаммов определенных биоваров - *Y. pestis* EV НИИГЭ (*bv. orientalis*); *Y. pestis* M-1813 (*bv. medievalis*); *Y. pestis* 100P6 (36M) (*bv. antique*) в дозе $1 \cdot 10^8$ КОЕ в сочетании (в равных объемах) с железосодержащим морбитором (1% раствор FeSO₄·7H₂O). Данный прием позволяет выделять через 24 ч (вместо 48 ч) при температуре 28 °С типичные зрелые колонии *Y. pestis* при посеве лимфоузлов и паренхиматозных органов лабораторных животных на плотной питательной среде, и, следовательно, ускорить накопление выделенной бактериальной культуры и идентификацию. Установлено путем подкожного заражения белых мышей отсутствие фенотипических изменений и повышения вирулентности у *Y. pestis* M-1813 после его применения в комбинации с сульфатом железа.

Впервые в тесте цитотоксичности определено, что пороговым значением для оценки штамма чумы как вирулентного является гибель более 80 % лейкоцитов в ис-

следуемом образце цельной крови человека через 48 ч при температуре 37 °С, тогда как для авирулентного – менее 50 %. Установлена для каждого штамма высокая степень корреляции показателей цитотоксичности и значений LD₅₀ для белых мышей (для авирулентных штаммов – r_s=0,9; для вирулентные штаммы – r_s=0,7).

По материалам исследований получен патент на изобретение № 2642322 «Набор штаммов бактерий, используемый для обучения вопросам микробиологии и методам лабораторной диагностики чумы». Приоритет установлен 15.11.2016. Опубликовано 24.01.2018 г. Бюл. 3.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработан научно обоснованный подход к использованию авирулентных штаммов *Y. pestis* при подготовке специалистов по вопросам микробиологии и лабораторной диагностики чумы. Получены новые данные о фено- и генотипических особенностях 21 штамма *Y. pestis* – кандидата в учебные.

На основании результатов проведенного комплексного анализа биологических свойств предложен учебный набор, включающий 10 штаммов *Y. pestis*: EV НИИЭГ, 652 «Гризель», 100Р6 (36М5), 707 «Касуга», М-1813, 521 (2101), А-819, КМ 260 (12), КМ 130 (3), 400 (290); 3 штамма *Y. pseudotuberculosis* 85 (837 II), 861 (II), 67 (I); 1 штамм *Y. enterocolitica* Р-74Е-5В; 1 штамм *P. multocida* 556. Разработан дифференцированный подход к применению штаммов учебного набора в соответствии с их фено- и генотипическими особенностями. Использование предложенного набора обеспечивает снижение вероятности лабораторного инфицирования и моделирование диагностически значимых признаков в полном объеме при освоении микробиологии и лабораторной диагностики чумы.

Приоритетное значение имеют результаты определения цитотоксичности штаммов *Y. pestis* по отношению к лейкоцитам цельной крови человека в экспериментальной системе *in vitro* для отнесения их к вирулентным и авирулентным. Показана целесообразность дополнения комплексной характеристики патогенности штаммов чумного микроба количественным показателем динамики гибели лейкоцитов цельной крови человека в течение 48 ч при температуре (37±1) °С.

Депонированы в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» 8 штаммов *Y. pestis*, 3 штамма *Y. pseudotuberculosis*, 1 штамм *Y. enterocolitica* и 1 штамм *P. multocida*, включенные в учебный набор (справки о депонировании от 16.05.2016 г.). Полученные данные о фенотипических, молекулярно-генетических свойствах и LD₅₀ исследованных коллекционных штаммов внесены в паспорта.

Разработаны 6 учебно-методических документов, одобренных на заседаниях Ученого Совета и утвержденных директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»: учебно-

методическое пособие «Микробиология и лабораторная диагностика чумы» (протокол № 7 от 16.12.2010); учебно-методический комплекс «Микробиология, эпидемиология и лабораторная диагностика чумы» (протокол № 7 от 22.12.2011); методические рекомендации «Подготовка культур микроорганизмов для практических занятий учебного модуля «Микробиология и лабораторный диагноз чумы» (протокол № 3 от 28.04.2015 г.); «Приготовление проб-имитаторов патогенных биологических агентов для практических занятий учебного модуля «Микробиология и лабораторный диагноз чумы» (протокол № 6 от 08.12.2015 г.); «Алгоритм применения набора учебных штаммов для практических занятий учебного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика чумы» (протокол № 2 от 30.05.2017 г.).

Результаты научных исследований включены в электронное учебно-методическое пособие «Микробиология, эпидемиология и лабораторный диагноз чумы», разработанное в рамках Распоряжения Правительства Российской Федерации № 1965-р от 07.10.2014 «О материально-технической и методической поддержке внедрения и реализации положений Международных медико-санитарных правил» и размещенное на сайте ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (school.microbe.ru).

Предлагаемый учебный набор штаммов был апробирован в 2017 и 2018 гг. при обучении специалистов по трем программам профессиональной переподготовки на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Материалы диссертации используют при чтении лекций по микробиологии и генетики возбудителя чумы на курсах повышения квалификации (проводимых на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» и выездных курсах) специалистов учреждений Роспотребнадзора, Минздрава, других министерств и ведомств Российской Федерации, стран СНГ.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Созданный учебный набор штаммов *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *P. multocida* и разработанный дифференцированный подход к их использованию для освоения лабораторной диагностики чумы на курсах дополнительного профессионального образования обеспечивают моделирование диагностических признаков и снижение вероятности лабораторного инфицирования при подготовке специалистов.

2. Применение авирулентных штаммов *Y. pestis* EV НИИГЭ, *Y. pestis* М-1813, *Y. pestis* 100Р6 (36М5) в дозе 10^8 КОЕ в сочетании с 1% раствором $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ позволяет воспроизводить патологоанатомическую картину чумы у лабораторных животных.

3. Степень цитотоксического воздействия клеток *Y. pestis* на лейкоциты цельной крови человека является информативным критерием комплексной характеристики *in vitro* патогенных свойств штаммов возбудителя чумы.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность результатов диссертационного исследования обеспечивается значительным объемом экспериментальных данных с применением регламентированных методов исследования и наличием метрологической поверки оборудования. Все данные получены в повторяющихся экспериментах. В работе освещен каждый этап исследования, фактические данные наглядно представлены в таблицах и рисунках, что позволяет воспроизвести и проверить изложенные результаты. Основные материалы диссертации представлены и обсуждены на III Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2011); VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014» (Москва, 2014 г.); II Всероссийском семинаре памяти профессора Ю.П. Волкова «Современные проблемы биофизики, генетики, электроники и приборостроения» (Саратов, 2015 г.); XIII межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ «Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005 г.) до 2016 года» (Саратов, 2016 г.); на научно-практических конференциях «Итоги и перспективы фундаментальных и прикладных исследований в институте «Микроб» (Саратов, 2011, 2013-2017 г.).

Связь работы с научными программами и личный вклад автора в исследование. Результаты диссертационного исследования получены в рамках плановых НИР: «Совершенствование подготовки персонала в целях обеспечения биобезопасности функционирования учреждений медико-биологического профиля» (2008-2012 гг., № госрегистрации 0120.0804516) и «Снижение рисков обучающих технологий на курсах дополнительного профессионального образования при подготовке специалистов для работы с ПБА I-II групп» (2015-2017 гг., № госрегистрации 155013010019). Основные разделы диссертационной работы выполнены лично соискателем на базе отдела образовательных программ и подготовки специалистов. Автором самостоятельно проведен анализ литературы, патентной документации, паспортов штаммов, законодательных, нормативно-методических документов, учебных программ; планирование экспериментов и их проведение, обобщение и интерпретация полученных результатов, статистический анализ полученных данных. Идея и основные положения диссертации, цель, новизна и практическая значимость сформулированы совместно с научным руководителем. Автор принимал участие в подготовке методических документов, патентной документации, публикаций и докладов на научных конференциях разного уровня.

Отдельные экспериментальные исследования выполнены совместно с заведующим лабораторией диагностических технологий, канд. мед. наук В.Е. Куклевым и

старшим науч. сотр. лаборатории молекулярной микробиологии, канд. биол. наук Л. М. Куклевой (пп. 3.4.1 главы 3 диссертационной работы), старшим науч. сотр. Государственной коллекции патогенных бактерий, канд. мед. наук А. Н. Малахаевой (пп. 3.4.2 главы 3 диссертационной работы), а также ведущим науч. сотр. отдела иммунологии, докт. биол. наук А. Л. Кравцовым (пп.3.4.3 главы 3 диссертационной работы).

Публикации. По теме диссертационного исследования опубликованы 9 научных работ в периодических изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов», рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 171 странице, содержит введение, обзор литературы, главу с описанием используемых материалов и методов исследования, 4 главы собственных исследований, заключение, выводы и список литературы, включающий 201 отечественный и 76 зарубежных источников. Текст иллюстрирован 22 таблицами и 7 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методология и методы исследования. Методологию работы определяли соответственно поставленной цели и задачам исследования.

В работе использовано 40 штаммов микроорганизмов, включая 27 штаммов *Y. pestis*, 3 штамма *Y. pseudotuberculosis*; 1 штамм *Y. enterocolitica*; 1 штамм *P. multocida*, а также штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus epidermidis*, *Bacillus anthracis* СТИ-1, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli communis*, *E. coli* O 151 из фонда «Государственной коллекции патогенных бактерий» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Для культивирования микроорганизмов применяли общепринятые питательные среды и методы [Лабинская, 2004; Дятлов, 2012]. Исследование бактериальных культур осуществляли в соответствии с действующими нормативно-методическими документами по лабораторной диагностике чумы, иерсиниозов, пастереллеза с применением зарегистрированных медицинских изделий для *in vitro* диагностики в соответствии с инструкцией по применению [МУ 3.1.3.2355-08; СП 1.3.3118-13; МУ 3.1.1029-01; МУ 3.1.3.2355-08; МУ 3.1.1.2438-09; МУК 4.2.2495-09; МУК 4.2.2940-11; МУК 4.2.3019-12; Лабораторная диагностика ..., 2013].

Проведение ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени осуществляли с помощью набора реагентов «Ген *Yersinia pestis* идентификация – РГФ» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб») в соответствии с инструкцией изготовителя.

Определение вирулентности штаммов чумного микроба проводили, заражая аутбредных белых мышей подкожно в объеме 0,2 мл взвесями *Y. pestis* кавказского

подвида в дозах от $1 \cdot 10^9$ до 20 КОЕ, штаммами основного подвида - в дозах $1 \cdot 10^9$ - $1 \cdot 10^4$ КОЕ. Штаммами, отобранными для учебного набора, заражали морских свинок подкожно, вводя дозы $1 \cdot 10^9$ - $1 \cdot 10^4$ КОЕ в объеме 0,5 мл.

Инфекционный процесс моделировали на аутбредных белых мышах, вводя авирулентные штаммы *Y. pestis* в сочетании с морбиторами - 1 % раствором $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ или дефибринированной кровью барана [Практическое пособие для подготовки врачей-бактериологов ..., 2004].

Цитотоксичность штаммов чумного микроба по отношению к лейкоцитам цельной крови человека определяли в экспериментальной системе *in vitro* [Кравцов, 2011; Watson et al., 1996; А.с. 522923]. Долю гиподиплоидных (апоптотических) клеток, несущих менее 2С ДНК на клетку и обладающих пониженной интенсивностью ДНК-флуоресценции, подсчитывали общепринятым способом, исходя из показаний ДНК-гистограмм, полученных с помощью проточного цитофлуориметра ICP-22 фирмы RNYWE (Германия) [Монцевичуте-Эрингене, 1964].

Плазмидный скрининг штаммов *Y. pestis* осуществляли по методике С. Kado и S.Liu (1981).

Для оценки вероятности аварий использован показатель «апостериорная вероятность» - условная вероятность событий, рассчитанная на основе свершившихся случаев и характеризующаяся как количество аварий на одного работника в течение года [Лакин, 1990].

Статистическую обработку данных осуществляли с вычислением средней арифметической абсолютных и относительных величин (М), средней ошибки средней арифметической (m), коэффициента достоверности различия (р), рангового коэффициента линейной корреляции Спирмена (r_s) [Ашмарин, Воробьев, 1962; Лакин, 1990; Монцевичуте-Эрингене, 1964].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Формирование учебного набора штаммов для освоения методов лабораторной диагностики чумы. Приоритетным направлением совершенствования методической базы подготовки специалистов по ООИ является снижение вероятности реализации профессионального риска – лабораторного инфицирования обучающихся. Информационный поиск показал, что имеются единичные попытки обобщить данные об авариях при работе с ПБА I-II групп в Российской Федерации и сообщения об отдельных случаях [Храмов, 1994; Семина, Ковалева, 2005; Мохель, 2005; Безсмертный и др., 2006; Ковалева, Семина, 2006; Ставский, 2008; Малюкова и др., 2016]. Отсутствуют сведения об авариях с ПБА и инфицировании при обучении специалистов.

Нами проведен ретроспективный анализ аварий по архивным документам отдела образовательных программ и подготовки специалистов. Установлено, что с 1972 года по 2009 год при освоении лабораторной диагностики чумы, холеры, туляремии, бруцеллеза, сибирской язвы зарегистрированы 94 аварии, из них 77 % обусловлены «человеческим фактором». Апостериорная вероятность возникновения аварий у слушателей курсов составила $p=0,094$; в среднем 2-3 случая в год. Наиболее часто аварии происходили при работе с возбудителями чумы и холеры. Аварии с разбрызгиванием ПБА, наиболее опасные в эпидемиологическом плане, составили 71,3 % случаев. Выявлена тенденция к снижению аварийности с 90,4 % (1972-1989 гг.) до 9,6 % (1990-2009 гг.), что связано с совершенствованием обеспечения биобезопасности подготовки специалистов, а именно: подробным изучением правил безопасной работы с ПБА и сдачей зачета; постоянным контролем преподавателей за работой группы из 4-5 учащихся в микробиологической комнате и закреплением куратора за каждым слушателем при манипуляциях с животными.

Вместе с тем анализ полученных результатов показал, что нельзя полностью исключить риск антропогенных аварий и лабораторного инфицирования. Одной из основных нерешенных задач остается обеспечение образовательного процесса авирулентными учебными штаммами.

Нами было предложено понятие «учебный штамм *Y. pestis*» и его определение. Учебный штамм *Y. pestis* – авирулентный штамм, обеспечивающий изучение типичных морфологических, тинкториальных, биохимических, антигенных свойств, молекулярно-генетических характеристик *Y. pestis*; особенности свойств подвидов, биофармацевтических свойств; развитие характерной патологоанатомической картины чумы у лабораторных животных; чувствительный к антибактериальным препаратам, используемым для специфической профилактики. Вместе с тем, один штамм не может обладать всеми перечисленными свойствами. Следовательно, корректнее говорить об учебном наборе штаммов для: 1) освоения в полном объеме типичных биологических свойств возбудителя чумы и их особенностей; 2) проведения индикации, идентификации; 3) внутривидовой и межвидовой дифференциации; 4) снижения вероятности инфицирования обучающихся.

Были разработаны критерии выбора штаммов *Y. pestis* для включения в набор: 1) авирулентность (LD_{50} более 10^6 КОЕ); 2) отсутствие в геноме основных детерминант вирулентности в составе плазмиды pCad и/или области *pgm*; 3) типичные видовые культурально-морфологические свойства; 4) отсутствие или наличие: ферментации рамнозы, арабинозы, мелибиозы, глицерина; денитрифицирующей активности; продукции пестицина и чувствительности к нему; способности к пигментсорбции; кальцийзависимости; фибринолитической и плазмокоагуляционной

активности; 5) чувствительность или резистентность к чумным бактериофагам Л-413С, Покровской и псевдотуберкулезному; 6) различные варианты сочетания плазмид pFra, pCad, pPst или генов *pla*, *caf1*, *lcrV*, *hmsH* и *irp2*; 7) способность воспроизводить патологоанатомические изменения во внутренних органах лабораторных животных; 8) чувствительность к антибактериальным препаратам, регламентированным для экстренной профилактики чумы.

На основании разработанных критериев и данных, содержащихся в стандартных паспортах (DCL, наличие или отсутствие области *pgm* и плазмиды pCad, культурально-морфологические свойства), в качестве кандидатов в учебные был отобран 21 коллекционный штамм чумного микроба и проведен анализ их морфологических, культуральных, биохимических, антигенных свойств, являющихся основой регламентированных методов индикации и идентификации. Для углубленной характеристики получены дополнительные данные об LD₅₀ для белых мышей (100 % штаммов); о кальцийзависимости (71 %); способности к пигментсорбции (62 %); чувствительности к диагностическим чумным и псевдотуберкулезному бактериофагам (52 %); продукции пестицина и чувствительности к нему (71 %); молекулярно-генетических характеристиках (62 %); чувствительности к антибактериальным препаратам (86 %).

Показано, что типичными видовыми признаками обладали 20 штаммов *Y. pestis*, нетипичными - 1 штамм (*Y. pestis* A-143). С помощью ПЦР на основании регистрации видоспецифичного фрагмента *3a* принадлежность к виду *Y. pestis* была подтверждена у 20 штаммов. Шесть штаммов были отнесены к неосновному кавказскому подвиду и четырнадцать штаммов - к основному подвиду. Последние на основе фенотипических свойств разделили на биовары: *orientalis* - 1 штамм, *medievalis* - 8 штаммов, *antique* - 5 штаммов.

Установлено, что все исследуемые штаммы чувствительны к антибактериальным препаратам (доксциклину, гентамицину, ципрофлоксацину), применяемым для экстренной профилактики чумы [МУ 3.4.1030-01].

Нами был проведен комплексный анализ патогенных свойств штаммов *Y. pestis* *in vitro* и *in vivo*. Учитывая обнаружение с помощью ПЦР генов хромосомной (*hmsH*, *irp2*) и плазмидной (*pla*, *lcrV*, *caf1*) локализации сделано предположение о вирулентности 6 штаммов и авирулентности 14 штаммов (отсутствие pCad или/и области *pgm*). В итоге в качестве перспективных для учебных целей отобраны 14 штаммов с генотипами: *pgm*⁻pFra⁺pCad⁺pPst⁺ (7 штаммов); *pgm*⁺pFra⁺pCad⁻pPst⁺ (2 штамма); *pgm*⁻pFra⁺pCad⁺pPst⁻ (2 штамма); *pgm*⁺Fra⁺pCad⁻pPst⁻ (2 штамма); *pgm*⁺pFra⁻pCad⁻pPst⁻ (1 штамм).

В результате определения факторов патогенности *in vitro* было зафиксировано наличие: признака пигментсорбции (Pgm⁺) у 12 штаммов, признака кальцийзависимости (Cad⁺) у 16 штаммов, продукции пестицина (Pst⁺) у 9 штаммов.

Оценка вирулентности *in vivo* с использованием аутбредных белых мышей и морских свинок позволила охарактеризовать 2 исследуемых штамма чумного микроба как вирулентные (LD₅₀ равно 2,15·10³ и 10⁴ КОЕ), 2 штамма – как слабовирулентные (LD₅₀ равно 4,64·10⁵ КОЕ), 16 штаммов – как авирулентные (LD₅₀ от 2,15·10⁶ до 10⁹ КОЕ и более). Полученная информация подтверждает обоснованность комплексного анализа патогенных свойств штаммов.

В качестве дополнительного теста для оценки патогенных свойств штаммов в системе *in vitro* было использовано определение цитотоксического воздействия *Y. pestis* на лейкоциты цельной крови человека. Полученные ДНК-гистограммы 9 авирулентных штаммов *Y. pestis*, отобранных в качестве учебных, и 6 вирулентных штаммов характеризовались затяжным (постепенным) развитием цитотоксического эффекта с проявлением максимальных различий к 48 ч инкубации при температуре (37±1) °С. Среднее значение показателя повреждения лейкоцитов для вирулентных штаммов составило 88,05±1,12 %; для авирулентных – 32,96±7,57 % (Таблица 1). Установлена достоверность различий (p<0,05) показателей для исследуемых штаммов с контрольными образцами. Отмечено, что все штаммы *Y. pestis* (pCad⁺, pgm⁺) обладали более выраженным повреждающим эффектом на лейкоциты цельной крови человека в условиях *in vitro*. Штаммы, утратившие «остров высокой патогенности» или плазмиду pCad, характеризовавшиеся по значению LD₅₀ авирулентностью, не индуцировали массивную гибель лейкоцитов.

Таблица 1 - Цитотоксическое воздействие штаммов *Y. pestis* на лейкоциты цельной крови человека при 37 °С через 48 часов инкубации

Штаммы <i>Y. pestis</i>	Геновариант	LD ₅₀ для белых мышей, КОЕ	Кол-во погибших лейко- цитов, несущих менее 2С ДНК, (M±m), %
1	2	3	4
Вирулентные			
231 (708)	<i>pgm⁺pFra⁺pCad⁺pPst⁺</i>	25	91,33±4,56
748	<i>pgm⁺pFra⁺pCad⁺pPst⁺</i>	25	89±6,4
С-533	<i>pgm⁺pFra⁺pCad⁺pPst⁻</i>	31	87±2,56
М-586	<i>pgm⁺pFra⁺pCad⁺pPst⁺</i>	32	88,33±6,12
И-3340	<i>pgm⁺pFra⁺pCad⁺pPst⁺</i>	112	89,33±5,55
400 (290)	<i>pgm⁺pFra⁺pCad⁺pPst⁺</i>	1·10 ⁴	83,33±3,91
Авирулентные			
652 «Гризель»	<i>pgm⁺pFra⁺pCad⁺pPst⁻</i>	2,15·10 ⁶	76,66±7,65

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
100P6 (36M5)	<i>pgm⁻pFra⁺pCad⁺pPst⁺</i>	$1,47 \cdot 10^8$	30,33±1,73
M-1813	<i>pgm⁻pFra⁺pCad⁺pPst⁺</i>	$1 \cdot 10^8$	41,66±5,07
707 «Касуга»	<i>pgm⁺pFra⁺pCad⁻pPst⁺</i>	$1 \cdot 10^9$	44,33±7,35
A-819	<i>pgm⁻pFra⁺pCad⁻pPst⁻</i>	$>10^9$	49±2,94
521 (210)	<i>pgm⁻pFra⁺pCad⁺pPst⁺</i>	$>10^9$	2,66±0,33
260 (12)	<i>pgm⁺pFra⁻pCad⁻pPst⁻</i>	$>10^9$	18±2,35
KM-130 (3)	<i>pgm⁻pFra⁺pCad⁻pPst⁻</i>	$>10^9$	10±3,27
EV НИИЭГ	<i>pgm⁻pFra⁺pCad⁺pPst⁺</i>	$>10^9$	24±0,19
Контроль 1: кровь донора + 0,9 % физиологический раствор (спонтанный апоптоз)			5±1,17
Контроль 2: кровь донора + <i>S. aureus</i>			68±3,27
n (число опытов)=3			

Сравнительный анализ показателей цитотоксичности исследованных штаммов *Y. pestis* и их LD₅₀ свидетельствовал о высокой степени корреляции (авирулентные штаммы – $r_s=0,9$; вирулентные – $r_s=0,7$).

На основании полученных данных сделано предположение, что ориентировочным пороговым значением для отнесения штамма возбудителя чумы к вирулентным является гибель более 80 % клеток в исследуемом образце крови в условиях инкубации (48 ч при 37 °C), к авирулентным – менее 50 %.

Одним из этапов лабораторной диагностики чумы является межвидовая дифференциация штаммов от *Y. pseudotuberculosis*. Критериями выбора штаммов *Y. pseudotuberculosis* явились: наличие подвижности, типичные видовые морфологические, биохимические свойства (ферментация сахаров, глицерина, мочевины, образование сероводорода); различные формы роста на питательных средах; чувствительность или резистентность к чумным и псевдотуберкулезному бактериофагам. Обоснована актуальность дифференциации от патогенных для человека *Y. enterocolitica* и *P. multocida*. Критериями выбора штаммов *P. multocida* и *Y. enterocolitica* определены типичные видовые морфологические, культуральные, биохимические свойства (ферментация сахаров, глицерина, мочевины, образование сероводорода). В итоге на основе разработанных нами критериев, паспортных данных и результатов исследований были выбраны 5 коллекционных штаммов – кандидатов в учебные: *Y. pseudotuberculosis* 85 (837 II), *Y. pseudotuberculosis* 861(II), *Y. pseudotuberculosis* 67 (I); *Y. enterocolitica* P-74E-5B и *P. multocida* 556. Исследование фенотипических свойств подтвердило, что штаммы *Y. enterocolitica* P-74E-5B, *Y. pseudotuberculosis*

861 (II) и *P. multocida* 556 обладают типичными видовыми свойствами, базовыми для дифференциации с чумным микробом. Штаммы *Y. pseudotuberculosis* 85 (837 II), *Y. pseudotuberculosis* 67 (I) позволяют моделировать варианты морфологии роста на питательных средах, отдельных биохимических свойств, чувствительности к диагностическим чумным и псевдотуберкулезному бактериофагам.

2. Оптимизация способа моделирования чумы при заражении лабораторных животных авирулентными штаммами *Y. pestis*. По результатам исследования фено- и генотипических особенностей, показателю LD₅₀ были отобраны авирулентные штаммы *Y. pestis* (*pgm*⁻, *pCad*⁺; LD₅₀ более или равно 10⁸ КОЕ), перспективные для воспроизведения патологоанатомической картины чумы у лабораторных животных - *Y. pestis* EV НИИЭГ, М-1813; 100Р6 (36М5), 780 (К-1).

Для моделирования чумы нами был выбран метод, основанный на способности *Y. pestis* усваивать в организме хозяина связанное железо. Белых мышей в количестве 720 заражали внутрибрюшинно штаммами *Y. pestis* М-1813; 100Р6 (36М5), 780 (К-1), EV НИИЭГ с морбиторами – 1 % раствором FeSO₄·7H₂O или дефибринированной кровью барана – в соотношении (1:1) [Практическое руководство ..., 2004]. В связи с отсутствием рекомендаций о заражающих дозах нами были определены оптимальные варианты при введении *Y. pestis* в дозах 10⁹ - 10⁶ КОЕ.

Отмечено, что эффект от применения сульфата железа превосходит таковой от дефибринированной крови барана. Наиболее результативным для моделирования патологоанатомической картины явилось использование штаммов *Y. pestis* EV НИИЭГ, М-1813 и 100Р6 (36М5) в дозах 10⁹ - 10⁷ КОЕ в сочетании с 1 % раствором FeSO₄·7H₂O. Заражение дозами 10⁹ КОЕ и 10⁸ КОЕ вызывало более выраженную патологоанатомическую картину, сходную с действием *Y. pestis* 231 (708) – множественные кровоизлияния в подкожно-жировой клетчатке и внутренних органах, увеличение лимфатических узлов, селезенки; печень дряблой консистенции с фибринозным налетом [Каркищенко, Брайцева, 2005]. Особое внимание заслуживает штамм *Y. pestis* EV НИИГЭ, который при введении без морбиторов не вызывал гибели животных, а с морбиторами приводил к гибели 87,5 %. Однако применение штаммов в дозе 10⁹ КОЕ сопровождалось развитием кровоизлияний и кровотечений, очевидно, в значительной степени обусловленных повреждающим действием на тромбоциты и кровеносные сосуды «мышинного токсина», что обусловило отказ от нее при моделировании.

Итак, в результате проведенных исследований нами были выбраны авирулентные штаммы трех биоваров – *Y. pestis* EV НИИЭГ (*bv. orientalis*), *Y. pestis* М-1813 (*bv. medievalis*), *Y. pestis* 100Р6 (36М5) (*bv. antique*) в дозе 1·10⁸ КОЕ и морбитор 1 % раствор FeSO₄·7H₂O, сочетанное применение которых оптимально с целью моделирования патологоанатомической картины. Установлено, что комбинирование

Y. pestis M-1813 с сульфатом железа не сопровождалось повышением вирулентности штамма в последующем для белых мышей. Аналогичные результаты для штамма 100P6 (36M5) были получены ранее [Пономарев, 1968]. Невозможность спонтанной реверсии вирулентных свойств штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ подтверждена на молекулярно-генетическом уровне [Сухоносков, 2008; Одинокоев, 2013].

Обнаружена стабильность и сокращение в два раза (до 24 ч) срока формирования при температуре (28±1) °С типичных зрелых колоний *Y. pestis* на плотной питательной среде при посеве паренхиматозных органов лабораторных животных, что позволило ускорить накопление выделенной бактериальной культуры и идентификацию.

Таким образом, отработанные методические приемы моделирования чумы с помощью авирулентных штаммов, сопровождающиеся стабильным выделением чумного микроба на питательных средах, позволяют исключить применение высоковирулентного штамма *Y. pestis* 231 (708), в полном объеме овладеть биологическим методом исследования и минимизировать вероятность лабораторного инфицирования обучающихся.

Для демонстрации обучающимся особенностей патологоанатомической картины чумы у лабораторных животных при подкожном способе заражения без морбиторов (увеличение подмышечных и паховых лимфоузлов с последующим формированием бубонов) в учебный набор включен вирулентный штамм *Y. pestis* 400 (290).

Итак, в процессе решения задач диссертационного исследования нами сформирован учебный набор бактерий, в состав которого вошли 9 авирулентных и 1 вирулентный штамм *Y. pestis*; 3 штамма *Y. pseudotuberculosis*; 1 штамм *Y. enterocolitica*; 1 штамм *P. multocida*. Следующим этапом исследования была разработка дифференцированного подхода к его применению с целью исключения использования высоковирулентного штамма *Y. pestis* 231 (708).

3. Разработка дифференцированного подхода к использованию учебного набора штаммов для освоения микробиологии и лабораторной диагностики чумы. На основании установленных биологических свойств микроорганизмов был разработан дифференцированный подход к применению каждого штамма учебного набора при моделировании типичных свойств чумного микроба для изучения регламентированными методами индикации и идентификации, а также освоения ряда фенотипических и генетических особенностей (Таблица 2). Основным принципом являлась применение авирулентных штаммов для замены штамма *Y. pestis* 231 (708) с учетом отдельных характерных для него биологических свойств.

Таблица 2 - Применение штаммов учебного набора для освоения модуля «Микробиология и лабораторная диагностика чумы»

Учебная тема	Назначение штаммов
1	2
Морфологические особенности клетки, колоний на питательных средах в зависимости от фаз роста, культуральных свойств	<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ – изучение типичной морфологии клетки, стадий развития колонии, рост в R-форме на питательных средах
	<i>Y. pestis</i> 521 (2101) – изучение стадии «битое стекло»
	<i>Y. pestis</i> KM 130 (3) – изучение стадии «кружевные платочки»
	<i>Y. pestis</i> 707 «Касуга» – зрелые колонии, при бактериоскопии сходные с колониями возбудителя сибирской язвы
Изучение чувствительности к чумным и псевдотуберкулезному бактериофагам	<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ – чувствителен к чумному бактериофагу Л-413С, Покровской; диагностическому псевдотуберкулезному бактериофагу
	<i>Y. pestis</i> А-819 – резистентен к цельному фагу Л-413С
Изучение способности к пигментсорбции	<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ – 100 % бесцветных колоний (Pgm ⁻)
	<i>Y. pestis</i> 707 «Касуга» - 40 % пигментированных, 60 % бесцветных колоний (Pgm ⁺)
Изучение зависимости роста штаммов от ионов кальция	<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ – кальцийзависимый, при изменении температуры инкубации на 28 °С увеличивает число типичных колоний в шесть раз
	<i>Y. pestis</i> 707 «Касуга» – кальцийнезависимый
	<i>Y. pestis</i> 100Р6 (36М5) – кальцийзависимый, при изменении температуры инкубации на 28 °С увеличивает число типичных колоний в десятки раз
Изучение фибринолитической и плазмокоагуляционной активностей	<i>Y. pestis</i> 100Р6 (36М5) – образует плотный сгусток фибрина (4+)
	<i>Y. pestis</i> KM-130 (3) – не формирует сгусток фибрина
Лабораторная диагностика чумы иммунологическими методами (МФА, ИФА, реакция слайд-агглютинации, ИХ-тест)	<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ – pFra ⁺ pCad ⁺ pPst ⁺
	<i>Y. pestis</i> KM-130 (3) – pFra ⁺ pCad ⁻ pPst ⁻
	<i>Y. pestis</i> KM 260 (12) – pFra ⁻ pCad ⁻ pPst ⁻
Лабораторная диагностика чумы методом ПЦР	<i>Y. pestis</i> EV линии НИИЭГ – гены <i>pla</i> , <i>cafI</i> , <i>lcrV</i> , область 3a; отсутствие генов <i>hmsH</i> , <i>irp2</i>
	<i>Y. pestis</i> 652 «Гризель» – гены <i>cafI</i> , <i>hmsH</i> , <i>irp2</i> , <i>lcrV</i> , область 3a; отсутствие гена <i>pla</i>
	<i>Y. pestis</i> 707 «Касуга» – гены <i>pla</i> , <i>cafI</i> , <i>hmsH</i> , <i>irp2</i> , область 3a; отсутствие гена <i>lcrV</i>
	<i>Y. pestis</i> KM-130 (3) – гены <i>cafI</i> , область 3a; отсутствие генов <i>pla</i> , <i>lcrV</i> , <i>hmsH</i> и <i>irp2</i>
	<i>Y. pestis</i> KM 260 (12) – гены <i>hmsH</i> , <i>irp2</i> , область 3a; отсутствие гена <i>pla</i> , <i>cafI</i> , <i>lcrV</i>
Освоение биологического метода лабораторной диагностики чумы	<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ – <i>ssp. pestis</i> <i>bv. orientalis</i>
	<i>Y. pestis</i> М-1813 (770 Act) – <i>ssp. pestis</i> <i>bv. medievalis</i>
	100Р6 (36М5) – <i>ssp. pestis</i> <i>bv. antique</i>
	<i>Y. pestis</i> 400 (290) – <i>ssp. caucasica</i>

Продолжение таблицы 2

1	2
Внутривидовая дифференциация (основана на фенотипических признаках)	<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ – <i>ssp. pestis bv orientalis</i>
	<i>Y. pestis</i> М-1813 – <i>ssp. pestis bv medievalis</i>
	<i>Y. pestis</i> 707 «Касуга» – <i>ssp. pestis bv. antique</i>
	<i>Y. pestis</i> 652 «Гризель» – <i>ssp. caucasica</i>
Межвидовая дифференциация (основана на фенотипических признаках)	<i>Y. pestis</i> EV линии НИИЭГ
	<i>Y. enterocolitica</i> Р-74Е-5В
	<i>Y. pseudotuberculosis</i> 85 (837 II)
	<i>Y. pseudotuberculosis</i> 861 (II)
	<i>Y. pseudotuberculosis</i> 67 (I)
	<i>P. multocida</i> 556

Нами были сформулированы требования к стандартным учебным образцам и подготовлены 5 проб клинического материала, 1 проба из объектов внешней среды, 5 проб носителей и переносчиков чумного микроба для решения ситуационных бактериологических задач.

На основании данных о вирулентности *in vivo* разработан дифференцированный подход к использованию штаммов учебного набора для снижения вероятности инфицирования слушателей курсов (Таблица 3). Наиболее безопасный штамм *Y. pestis* КМ 2011 (EV НИИЭГ) используют на всех этапах лабораторного исследования (Таблицы 2, 3).

Таблица 3 - Применение штаммов *Y. pestis* в зависимости от вирулентности

Вирулентность штаммов, LD ₅₀	Номер штамма	Контингент	Назначение
10 ⁸ -10 ⁹ КОЕ	КМ2011 КМ 2008 КМ 2012 КМ 2010 КМ 2014 КМ 2024 КМ 260 (12) КМ 130 (3)	слушатели курсов	- изучение на примере <i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ типичных свойств, регламентированных методов лабораторной и дифференциальной диагностики; - изучение свойств возбудителя чумы и лабораторных тестов, нетипичных для <i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ; - решение ситуационных задач; - освоение биологического метода лабораторной диагностики
		преподаватели	- подготовка стандартных учебных образцов для ситуационных бактериологических задач; - моделирование чумы у лабораторных животных
2,15·10 ⁶ КОЕ	КМ 2013	преподаватели	- демонстрация варианта результата при освоении метода ПЦР; - демонстрация тестов для дифференциации основного подвида возбудителя чумы от кавказского подвида
10 ⁴ КОЕ	КМ 2009	преподаватели	- демонстрация патологоанатомической картины чумы у лабораторных животных при подкожном заражении

Таким образом, итогом нашей работы стало формирование первого учебного набора штаммов бактерий, позволяющего моделировать диагностические признаки, максимально ограничив применение вирулентных штаммов и исключив высоковирулентный *Y. pestis* 231 (708), в полном объеме освоить регламентированные методы лабораторной диагностики чумы, приобрести навыки выполнения микробиологических методов исследования с *Y. pestis* в соответствии с правилами биобезопасности и снизить вероятность лабораторного инфицирования обучающихся за счет применения авирулентных штаммов чумного микроба.

ВЫВОДЫ

1. Сформулировано понятие «учебный штамм *Y. pestis*» и разработаны критерии отбора штаммов *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *P. multocida*, что в совокупности с результатами проведенного анализа вероятности и причин аварийных ситуаций при профессиональной переподготовке специалистов для работ с патогенными биологическими агентами позволило обосновать необходимость создания учебного набора бактерий, моделирующего диагностически значимые свойства для освоения в полном объеме тинкториальных, биохимических, антигенных признаков, молекулярно-генетических особенностей чумного микроба, проведения внутривидовой и межвидовой дифференциации, воспроизведения патологоанатомической картины чумы у лабораторных животных.

2. На основании комплексного изучения вирулентности, фено- и генотипических особенностей штаммов патогенных видов иерсиний для максимального ограничения применения вирулентных штаммов возбудителя чумы и совершенствования методической базы подготовки специалистов создан учебный набор, включающий 9 авирулентных штаммов *Y. pestis*, в том числе подвида *pestis* биовара *orientalis* (1), биовара *antique* (4), биовара *medievalis* (3), подвида *caucasica* (1), а также 1 вирулентный штамм подвида *caucasica*; 3 штамма *Y. pseudotuberculosis*, 1 штамм *Y. enterocolitica* и 1 штамм *P. multocida*.

3. Применение для заражения белых мышей авирулентных штаммов *Y. pestis* EV НИИГЭ, *Y. pestis* М-1813, *Y. pestis* 100Р6 (36М5), входящих в учебный набор, в дозе 10^8 КОЕ в сочетании с 1% раствором сернокислого железа позволяет моделировать патологоанатомическую картину чумы у лабораторных животных с массивным обсеменением всех паренхиматозных органов, а также сократить в 2 раза срок выделения возбудителя, последующего накопления и идентификации бактериальной культуры.

4. На основании степени гибели лейкоцитов цельной крови человека при совместной инкубации (48 ч при температуре (37 ± 1) °С) с клетками *Y. pestis*

определены пороговые значения для отнесения штаммов к вирулентным (апоптоз более 80 % лейкоцитов) или авирулентным (апоптоз менее 50 % лейкоцитов). Коэффициент корреляции показателей цитотоксичности вирулентных и авирулентных штаммов со значениями LD₅₀ для белых мышей составил r_s=0,7 и r_s=0,9 соответственно.

5. Разработан дифференцированный подход к применению учебных штаммов *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *P. multocida* для освоения слушателями курсов регламентированных методов индикации и идентификации в рамках десяти учебных тем модуля «Микробиология и лабораторная диагностика чумы» и снижения вероятности лабораторного инфицирования в ходе приобретения навыков выполнения микробиологических методов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанные подходы к отбору и применению учебных штаммов патогенного микроорганизма рекомендуются для внедрения в процессе профессиональной подготовки бактериологов в организациях Роспотребнадзора с целью стандартизации процесса обучения лабораторной диагностике ООИ и снижения риска лабораторного инфицирования.

2. Определение *in vitro* цитотоксического действия штаммов *Y. pestis* на лейкоциты цельной крови человека целесообразно включить в комплекс регламентированных способов оценки патогенных свойств чумного микроба.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Установленные на модели возбудителя чумы принципы и критерии подбора учебных штаммов, оценки их биологических свойств и дифференцированный подход к применению при подготовке специалистов для работ с возбудителями ООИ планируется использовать при аналогичных разработках в отношении возбудителей сибирской язвы, холеры, туляремии и бруцеллеза.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сазанова Е.В. Пути снижения вероятности возникновения аварийных ситуаций при подготовке специалистов для работы с возбудителями I-II групп патогенности / Е.В. Сазанова, А.В. Бойко, Т.А. Малюкова, Е.Ю. Лоцманова // Биозащита и биобезопасность. – 2012. – Т. IV, №1 (10). – С. 16-20 (из Перечня ВАК).

2. Юсупова З.С. Совершенствование биобезопасности на курсах дополнительного профессионального образования по особо опасным инфекциям / З.С. Юсупова,

Е. В. Сазанова, Л.А. Тихомирова, Т.А. Малюкова, А.В. Бойко, Ю.А. Попов // Биозащита и биобезопасность. – 2013. – Т.V, № 4(17).– С. 33-35 (из Перечня ВАК).

3. **Сазанова Е.В.** Учебные штаммы *Yersinia pestis*: критерии подбора, принципы применения / Е.В. Сазанова, Т.А. Малюкова, Ю.А. Попов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2014. – №3. – С. 38-41 (из Перечня ВАК).

4. **Сазанова Е.В.** Характеристика молекулярно-генетических свойств штаммов возбудителя чумы, перспективных для использования в учебном процессе / Е.В. Сазанова, В.Е. Куклев, Т.А. Малюкова, Л.М. Куклева, А.Н. Малахаева, Н.И. Вахрушина // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 2. – С. 83-86 (из Перечня ВАК).

5. Шмелькова Т.П. Определение вирулентных свойств патогенных микроорганизмов *in vitro*: состояние вопроса / Т.П. Шмелькова, **Е.В. Сазанова**, А.Л. Кравцов, Т.А. Малюкова, Ю.А. Попов, А.В. Бойко, З.Л. Девдариани, Т.Н. Щуковская // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2016. – № 6. – С. 100-108 (из Перечня ВАК).

6. **Сазанова Е.В.** Проточно-цитофлуориметрический анализ цитотоксичности штаммов *Yersinia pestis* / Е.В. Сазанова, Т.П. Шмелькова, А.Л. Кравцов, Т.А. Малюкова, Ю.А. Попов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. – № 6. – С. 3-9 (из Перечня ВАК).

7. Растунцева Е.В. Пути снижения рисков инфицирования при обучении работе с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) / Е.В. Растунцева, Л. А. Тихомирова, **Е.В. Сазанова** // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 3. – С. 80-84 (из Перечня ВАК).

8. **Сазанова Е.В.** Моделирования чумной инфекции при заражении авирулентными штаммами *Yersinia pestis* / Е.В. Сазанова, А.Н. Малахаева, Т.А. Малюкова, А.В. Бойко, Е.Г. Булгакова, Ю.А. Попов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 2. – С. 45-49 (из Перечня ВАК).

9. **Сазанова Е.В.** Набор учебных штаммов для освоения лабораторной диагностики чумы / Е.В. Сазанова, Т.А. Малюкова, А.В. Бойко, Н.И. Вахрушина, Ю. А. Попов // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2017. – № 5 (22). – С. 22-27 (из Перечня ВАК).

10. Пат. № 2642322 Российская Федерация, МПК С12N-1/20, С12Q -1/04, С12R-1/01. Набор штаммов бактерий, используемый для обучения вопросам микробиологии и методам лабораторной диагностики чумы / Е.В. Сазанова, Т.А. Малюкова, Ю.А. Попов, В.Е. Куклев, А.Н. Малахаева, В.В. Кутырев, заявитель и патентообладатель Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по

надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека – № 2016144910; заявл. 15.11. 2016; опубл. 24.01.2018, Бюл. 3.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

КОЕ	– колониеобразующие единицы
ММСП	– Международные медико-санитарные правила
МУ	– методические указания
ООИ	– особо опасные инфекции
ПБА	– патогенный биологический агент
СП	– санитарные правила
DCL	– абсолютная смертельная доза, летальная для 100 % животных
LD ₅₀	– доза, летальная для 50% животных
pCad	– плаزمида кальцийзависимости
pFra	– плазмида, детерминирующая синтез капсульного антигена (F 1)
<i>pgm</i> -область	– хромосомная область пигментации
pPst	– плазмида пестициногенности