



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 1/20 (2006.01); *C12Q 1/04* (2006.01); *C12R 1/01* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016144910, 15.11.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.11.2016

Дата регистрации:
24.01.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 15.11.2016

(45) Опубликовано: 24.01.2018 Бюл. № 3

Адрес для переписки:

410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
РосНИПЧИ "Микроб"

(72) Автор(ы):

Сазанова Елена Владимировна (RU),
 Малюкова Татьяна Анатольевна (RU),
 Попов Юрий Алексеевич (RU),
 Куклев Василий Евгеньевич (RU),
 Малахаева Алина Николаевна (RU),
 Кутырев Владимир Викторович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное казенное учреждение
 здравоохранения "Российский
 научно-исследовательский противочумный
 институт "Микроб" Федеральной службы по
 надзору в сфере защиты прав потребителей
 и благополучия человека ("РосНИПЧИ
 "Микроб") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: МУК 4.2.2940-11. Методические
 указания. Методы контроля. Биологические
 и микробиологические факторы. Порядок
 организации и проведения лабораторной
 диагностики чумы для лабораторий
 территориального, регионального и
 федерального уровней, с. 16-29. МУ
 3.1.3.2355-08. Методические указания.
 Профилактика инфекционных болезней.
 Кровяные инфекции. (см. прод.)

(54) НАБОР ШТАММОВ БАКТЕРИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ОБУЧЕНИЯ ВОПРОСАМ
 МИКРОБИОЛОГИИ И МЕТОДАМ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЧУМЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицинской
 микробиологии и представляет собой набор,
 содержащий авирулентные штаммы *Yersinia pestis*
 подвида *pestis* биовара *orientalis* КМ 2011, подвида
pestis биовара *antiqua* КМ 2008, КМ 2012, КМ 260
 (12), КМ 130(3), подвида *pestis* биовара *medievalis*
 КМ 2010, КМ 2014, КМ 2024, подвида *caucasica*
 КМ 2013, штаммы *Yersinia pseudotuberculosis* КМ

2004, КМ 2005, КМ 2006, *Yersinia enterocolitica* КМ
 2007 и штамм *Pasteurella multocida* КМ 2003,
 депонированные в Государственной коллекции
 патогенных бактерий «Микроб». Набор штаммов
 может быть использован для обучения вопросам
 микробиологии и методам лабораторной
 диагностики чумы. Изобретение позволяет
 снизить риск инфицирования обучающихся. 9 пр.

(56) (продолжение):

Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных чумных очагах чумы на территории РФ, с. 39-64. МУ 3.3.1.1113-02. Методические указания. Основные требования к вакцинным штаммам чумного микроба, с. 6-36. RU 2118362 C1, 27.08.1998. RU 2031938 C1, 27.03.1995. RU 2038376 C1, 27.06.1995.

R U
2 6 4 2 3 2 2
2 6 4 2 3 2 2
C 1

R U
2 6 4 2 3 2 2
C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 1/20 (2006.01); C12Q 1/04 (2006.01); C12R 1/01 (2006.01)(21)(22) Application: **2016144910, 15.11.2016**(24) Effective date for property rights:
15.11.2016Registration date:
24.01.2018

Priority:

(22) Date of filing: **15.11.2016**(45) Date of publication: **24.01.2018** Bull. № 3

Mail address:

**410005, g. Saratov, ul. Universitetskaya, 46,
RosNIPCHI "Mikrob"**

(72) Inventor(s):

**Sazanova Elena Vladimirovna (RU),
Malyukova Tatyana Anatolevna (RU),
Popov Yuriy Alekseevich (RU),
Kuklev Vasilij Evgenevich (RU),
Malakhaeva Alina Nikolaevna (RU),
Kutyrev Vladimir Viktorovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe kazennoe uchrezhdenie
zdravookhraneniya "Rossijskij
nauchno-issledovatel'skij protivochumnyj institut
"Mikrob" Federalnoj sluzhby po nadzoru v sfere
zashchity prav potrebitelej i blagopoluchiya
cheloveka ("RosNIPCHI "Mikrob") (RU)**(54) **BACTERIAL STRAINS KIT USED FOR TRAINING ON MICROBIOLOGY AND PLAGUE LABORATORY DIAGNOSTICS METHODS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention is a kit containing avirulent *Yersinia pestis* strains of *pestis* subspecies, *orientalis* biovar (KM 2011), *pestis* subspecies, *antiqua* biovar (KM 2008, KM 2012, KM 260 (12), km 130 (3)), *pestis* subspecies, *medievalis* biovar (KM 2010, 2014, 2024), *caucasica* subspecies (KM 2013), *Yersinia pseudotuberculosis* strains (KM 2004, 2005, 2006),*Yersinia enterocolitica* (KM 2007) and *Pasteurella multocida* strain (KM 2003), deposited in the State Collection of Pathogenic Bacteria "Microbe". A kit of strains can be used to train on microbiology and methods for laboratory diagnosis of plague.

EFFECT: invention reduces the risk of students' infection.

9 ex

C 1
2 6 4 2 3 2 2
R UR U
2 6 4 2 3 2 2
C 1

Изобретение относится к медицинской микробиологии и может быть использовано для подготовки специалистов в области лабораторной диагностики чумы и повышения уровня биологической безопасности во время проведения практических занятий за счет минимизации риска лабораторного инфицирования обучающихся.

5 Чума - зоонозная природно-очаговая бактериальная инфекционная болезнь с преимущественно трансмиссивным механизмом передачи возбудителя, которая может вызвать чрезвычайную ситуацию как в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации, так и имеющую международное значение. Заболевание человека чумой характеризуется как имеющее индивидуальную
10 и общественную опасность, тяжелое течение и высокую летальность.

С начала 90-х годов прошлого века в мире отмечается активизация природных очагов чумы. На территории Российской Федерации существует 11 природных очагов чумы общей площадью ~254 тыс. га [16]. В 2014-15 гг. на территории Горно-Алтайского природного очага было зарегистрировано два случая заболевания человека бубонной
15 формой чумы.

Важным мероприятием по предупреждению и предотвращению чумы является систематический эпидемиологический надзор за природными очагами [12]. При этом один из основных методов получения информации - лабораторная диагностика чумы у носителей и переносчиков возбудителя, больных, а также лиц, контактировавших с
20 больными и инфицированными объектами окружающей среды. Специальную подготовку медицинских, ветеринарных и других работников по лабораторной диагностике чумы осуществляют противочумные учреждения Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Актуальность подготовки специалистов обусловлена также и тем, что возбудитель чумы отнесен к категории А
25 вероятных агентов биотерроризма [4].

Основу лабораторной диагностики чумы составляют классические схемы микробиологического анализа, предусматривающие выделение возбудителя *Yersinia pestis* в чистой культуре и последующую идентификацию по морфологическим, культуральным, биохимическим и другим свойствам [6, 15].

30 Проведение практических занятий при подготовке специалистов связано с использованием штаммов возбудителя чумы для решения следующих задач:

- изучение морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств возбудителя чумы, а также отличий биологических особенностей биоваров штаммов основного подвида чумного микроба, отличий штаммов основного подвида от штаммов
35 неосновных подвигов [1, 11, 21];

- освоение бактериологического, иммунологических и молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики чумы, применяемых для индикации и идентификации;

40 - освоение биологического метода лабораторной диагностики чумы;
- дифференциации *Y. pestis* от других патогенных для человека иерсиний, а также пастерелл, вызывающих массовые эпизоотии среди грызунов и спорадические заболевания людей.

Проведенный заявителем анализ уровня техники, включающий поиск по патентам и научно-техническим источникам информации, не обнаружил сведений о штаммах,
45 регламентированных для использования в целях обучения лабораторной диагностике чумы.

В настоящее время в учебном процессе используют как вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, так и вирулентные штаммы возбудителя чумы.

Использование штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ для подготовки проб при проведении учений по обнаружению ПБА в объектах окружающей среды и материале от больных людей обеспечивает биологическую безопасность при проведении практических занятий, однако позволяет изучить только часть биологических свойств возбудителя чумы, характерных для одного из трех биоваров основного подвида - *Y. pestis* spp. *pestis* bv. *orientalis*; биохимические, антигенные, генетические особенности и чувствительность к чумным бактериофагам, характерные для вакцинного штамма [13].
5 Вместе с тем, вызывать чуму у человека могут также штаммы, относящиеся к двум другим биоварам основного подвида - *Y. pestis* spp. *pestis* bv. *medievalis* и bv. *antiqua*, а также штаммы неосновных подвигов, в частности кавказского подвида (*spp. caucasica*).
10 Изучение их фенотипических и генотипических особенностей необходимо с целью своевременной, точной диагностики возбудителя чумы и оперативного проведения противозидемических мероприятий.

Кроме того, при освоении на практических занятиях биологического метода лабораторной диагностики чумы заражение лабораторных животных (белых мышей и морских свинок) штаммом *Y. pestis* EV линии НИИЭГ в дозах $1 \cdot 10^2$ - $1,5 \cdot 10^{10}$ м.к. не вызывает их гибели и не обеспечивает типичной клинической и патоморфологической картины чумы, а также не удается стабильно выделять *Y. pestis* EV линии НИИЭГ из внутренних органов биопробных животных при посеве их на питательные среды.
15

Таким образом, в настоящее время с целью реализации учебного плана в полном объеме для освоения фенотипических и генотипических свойств штаммов *Y. pestis*, отличающихся от вакцинного, а также биологического метода диагностики чумы используют вирулентные штаммы. Однако слушатели курсов зачастую не владеют навыками выполнения микробиологических манипуляций в соответствии с правилами биологической безопасности, что обуславливает повышенный риск аварий и/или лабораторных заражений. Кроме того, согласно концепции «Основы государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности РФ на период до 2025 года и дальнейшую перспективу» необходимо исключить или минимизировать использование в технологических процессах патогенных микроорганизмов [14]. Данный государственный подход необходимо учитывать при обучении персонала правилам работы с возбудителями особо опасных инфекций и снижать биологические риски обучающих технологий, заменяя вирулентные штаммы микроорганизмов на учебные штаммы. Снижения риска инфицирования можно добиться путем использования в процессе обучения авирулентных штаммов *Y. pestis*, LD₅₀ которых для белых мышей при подкожном заражении превышает $1 \cdot 10^6$ м.к. [6].
20
25
30
35

Известна коллекция изогенных штаммов *Y. pestis*, включающая семнадцать геновариантов, созданных на базе вирулентного штамма *Y. pestis* 231 [18]. Одиннадцать штаммов коллекции характеризуются сниженной вирулентностью и могут быть рекомендованы к использованию при проведении учебных занятий. Вместе с тем, коллекция изогенных штаммов не позволяет продемонстрировать все разнообразие биологических свойств, являющихся базовыми при индикации и идентификации возбудителя чумы, бактериологическим и иммунологическими методами исследования. Отсутствуют данные о возможности использования данных геновариантов для результативного освоения биологического метода лабораторной диагностики чумы.
40
45

Известны штаммы *Y. pestis*, применяемые для изучения отдельных генетических особенностей возбудителя чумы [2, 3, 7-10, 19]. Известен тест-штамм *Y. pestis* [20] и ряд природных штаммов, резистентных к чумному бактериофагу Л-413 «С» [17]. Известен

тест-штамм *Y. pestis*, обладающий типичными свойствами штаммов, выделенных в Центрально-Кавказском высокогорном природном очаге чумы [5]. Вместе с тем, использование каждого из указанных штаммов в учебном процессе в отдельности имеет ограниченное назначение и не позволяет ознакомиться со всем спектром типичных и атипичных биологических свойств возбудителя чумы, а также освоить комплекс методов лабораторной диагностики чумы.

Кроме того, процесс изучения микробиологии и лабораторной диагностики чумы непосредственно сопряжен с необходимостью дифференциации возбудителя чумы от других патогенных для человека иерсиний (*Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica*) и возбудителя пастереллеза (*Pasteurella multocida*), распространенного повсеместно, включая территории природных очагов чумы, и вызывающего массовые эпизоотии среди грызунов. Следовательно, для осуществления полного учебного цикла необходимы также штаммы *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *P. multocida*.

Таким образом, в данной области существует очевидная потребность в разработке набора штаммов патогенных для человека иерсиний и возбудителей массовых эпизоотий грызунов, позволяющего освоить в полном объеме вопросы микробиологии и лабораторной диагностики чумы и снизить риск лабораторного инфицирования, для применения в качестве учебных.

Для обеспечения учебного процесса необходимы авирулентные ($LD_{50} > 1 \cdot 10^6$ м.к.) штаммы *Y. pestis*, штаммы *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *P. multocida*, позволяющие продемонстрировать отдельные базовые свойства, регламентированные при лабораторной диагностики чумы:

- штаммы *Y. pestis*, обладающие типичными видовыми культурально-морфологическими свойствами; отличающиеся по способности ферментировать рамнозу, арабинозу, глицерин, по нитрифицирующей и денитрифицирующей активности для изучения алгоритма дифференциации *Y. pestis* основного подвида от неосновных подвидов и биоваров основного подвида; в геноме которых отсутствуют одна или обе основные детерминанты вирулентности (плазмида *pCad*, хромосомная область *pgm*); отличающиеся по способности к пигментсорбции; отличающиеся по зависимости роста колоний при 37°C на питательной среде в условиях дефицита ионов кальция; отличающиеся по фибринолитической и плазмокоагулазной активности; отличающиеся по чувствительности к чумным бактериофагам Л-413С, Покровской и псевдотуберкулезному бактериофагу; имеющие следующие сочетания двух плазмид:

- $pFra^+pPst^+$, $pFra^-pPst^+$, $pFra^+pPst^-$, $pFra^-pPsf^-$ для демонстрации вариантов индикации с помощью регламентированных иммунологических методов - метода флуоресцирующих антител (МФА), иммуноферментного анализа (ИФА), реакции агглютинации на стекле (РА); имеющие различные сочетания генов - детерминант вирулентности, детекция которых осуществляется с помощью сертифицированных тест-систем для индикации возбудителя чумы: гены *pla*, *3a*, *caf1*, *lcrV*, *hmsH* и *igr2*; при заражении лабораторных животных, формирующие типичные патоморфологические изменения во внутренних органах; накапливающиеся и обеспечивающие стабильное выделение бактериальной культуры при посеве на питательные среды проб внутренних органов животных.

- штаммы *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*, обладающие типичными видовыми биологическими свойствами и позволяющие провести дифференциацию с *Y. pestis*, а также имеющие отдельные биологические особенности, актуальные при проведении дифференциации с возбудителем чумы.

- штаммы *P. multocida*, обладающие типичными видовыми биологическими

свойствами, актуальными при дифференциации с возбудителем чумы.

Задача изобретения - набор авирулентных штаммов *Y. pestis*, позволяющих продемонстрировать биологические свойства рода, вида и биоваров основного подвида (фенотипические, биохимические, антигенные свойства, генетические особенности) - базовые для лабораторной диагностики чумы регламентированными методами индикации и идентификации, дифференциации от штаммов неосновных подвигов, а также штаммов *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *P. multocida*, стабильно сохраняющих фенотипические, биохимические, антигенные свойства, для дифференциации возбудителя чумы от других патогенных для человека иерсиний и возбудителей массовых эпизоотий грызунов, применяемый для изучения микробиологии и лабораторной диагностики чумы.

Технический результат, полученный от использования изобретения, выражается в повышении биологической безопасности и увеличении эффективности обучения специалистов, а именно изучения многообразия биологических свойств возбудителя чумы, методов индикации, идентификации и дифференциации *Y. pestis*.

Для достижения указанного технического результата предложен набор штаммов, обеспечивающий полный комплекс базовых свойств, включающий 9 авирулентных штаммов *Y. pestis*, 3 штамма *Y. pseudotuberculosis*, 1 штамм *Y. enterocolitica*, 1 штамм *P. multocida*, предназначенный для учебных целей при подготовке специалистов по вопросам микробиологии и лабораторной диагностики чумы.

Набор содержит следующие штаммы:

1. Штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ - вакцинный, получен в институте НИИЭГ, относится к подвиду *pestis* биовару *orientalis*. Депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» под номером КМ 2011.

Обладает типичными для вида *Y. pestis* культурально-морфологическими и физиолого-биохимическими признаками [6]. Обладает типичными для подвида *pestis* биовара *orientalis* физиолого-биохимическими признаками [1].

Особые свойства штамма: реакция агглютинации на стекле с иммуноглобулинами чумными диагностическими адсорбированными сухими: 4+. При исследовании МФА специфическое свечение: 3+. Не обладает способностью к нитрификации.

Плазмокоагулазная активность: 3+. Фибринолитическая активность: 4+. Продуцирует пестицин. Не чувствителен к пестицину PI. Колонии не сорбируют пигмент (на среде Джексона-Берроуза). На среде Хигучи-Смита формирует кальцийзависимые колонии. Вирулентность для лабораторных животных: LD₅₀ для белых мышей и морских свинок - более 10⁹ м.к. Генетические характеристики: pFra⁺ pPst⁺ pCad⁺ Pgm⁻.

2. Штамм *Y. pestis* 100P6 (36M5) - из авторской коллекции проф. Н.Г. Пономарева (ВНИПЧИ «Микроб»), полученный методом отбора непигментированных колоний, относится к подвиду *pestis* биовару *antiqua*. Депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» под номером КМ2008.

Обладает типичными для вида *Y. pestis* культурально-морфологическими и физиолого-биохимическими признаками [6]. Обладает типичными для подвида *pestis* биовара *antiqua* физиолого-биохимическими признаками [1].

Особые свойства штамма: отсутствует способность к пигментсорбции. На среде Хигучи-Смита формирует кальцийзависимые колонии (при смене температуры инкубации с 37°C на 28°C количества колоний возбудителя чумы увеличивается в пятьдесят раз). Вирулентность для лабораторных животных: LD₅₀ для белых мышей - 1,5·10⁸ м.к., для морских свинок - более 10⁹ м.к. Генетическая характеристика: pFra⁺

pPst⁺ pCad⁺ Pgm⁻.

3. Штамм *Y. pestis* 707 «Касуга» выделен на северо-востоке Китая в 1939 г., относится к подвиду *pestis* биовару *antiqua*. Депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» под номером КМ 2012.

5 Обладает типичными для вида *Y. pestis* культурально-морфологическими и физиолого-биохимическими признаками [6]. Обладает типичными для подвида *pestis* биовара *antiqua* физиолого-биохимическими признаками [1].

10 Особые свойства штамма: при изучении с помощью светового микроскопа морфологии колоний, выращенных на плотных питательных средах, отмечается выраженное сходство с колониями возбудителя сибирской язвы. На среде Хигучи-Смита формирует кальцийнезависимые колонии. Наличие способности к пигментсорбции (60% пигментированных колоний, 40% непигментированных колоний). Вирулентность для лабораторных животных: LD₅₀ для белых мышей - 10⁹ м.к., для морских свинок - более

15 10⁹ м.к. Генетические характеристики: pFra⁺ pPst⁺ pCad⁻ Pgm⁺.

4. Штамм *Y. pestis* КМ 260 (12) получен методом селекции штамма *Y. pestis* 231 в 1990 г. авторским коллективом: Самойлова С.В., Ежов И.Н., Дроздов И.Г., Еремин С.А. (РосНИПЧИ «Микроб»), относится к подвиду *pestis* биовару *antiqua*. Депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб».

20 Обладает типичными для вида *Y. pestis* культурально-морфологическими и физиолого-биохимическими признаками [6]. Обладает типичными для srrp. подвида биовара *antiqua* физиолого-биохимическими признаками [1].

25 Особые свойства штамма: чувствителен к пестицину; не продуцирует пестицин; фибринолитическая и плазмокоагулазная активность отсутствует. На среде Хигучи-Смита формирует кальцийнезависимые колонии. Обладает способностью к пигментсорбции (на среде Джексона-Берроуза). Отсутствует продукция антигена F1. Вирулентность для лабораторных животных: LD₅₀ для белых мышей - более 10⁹ м.к.

Генетические характеристики: pFra⁻ pPst⁻ pCad⁻ Pgm⁺.

30 5. Штамм *Y. pestis* КМ130 (3) - изогенный вариант штамма *Y. pestis* 231, полученный поэтапной селекцией спонтанных мутантов в 1989 г. авторским коллективом: Кутырев В.В., Видяева Н.А., Шавина Н.Ю., Проценко О.А. (РосНИПЧИ «Микроб»), относится к подвиду *pestis* биовару *antiqua*. Депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб».

35 Обладает типичными для вида *Y. pestis* культурально-морфологическими и физиолого-биохимическими признаками [6]. Обладает типичными для подвида *pestis* биовара *antiqua* физиолого-биохимическими признаками [1].

40 Особые свойства штамма: при изучении с помощью светового микроскопа отмечаются особенности морфологии колоний в стационарной фазе - формирование непигментированного центра. Ферментирует глицерин. Отсутствуют плазмокоагулазная и фибринолитическая активности. На среде Хигучи-Смита формирует кальцийнезависимые колонии. Отсутствует способность к пигментсорбции (на среде Джексона-Берроуза непигментированные колонии). Вирулентность для лабораторных животных: LD₅₀ для белых мышей - более 10⁹ м.к. Генетические характеристики: pFra⁺

45 pPst⁻ pCad⁻ Pgm⁻.

6. Штамм *Y. pestis* М-1813 (770 Аст.) - выделен в Лиманском районе (Астраханская область) от полуденных песчанок (*Nosopsyllus Laeviceps*) в 2006 г., относится к подвиду

pestis биовару *medievalis*. Депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» под номером КМ 2010.

Обладает типичными для вида *Y. pestis* культурально-морфологическими и физиолого-биохимическими признаками [6]. Обладает типичными для подвида *pestis* биовара *medievalis* физиолого-биохимическими признаками [1].

Особые свойства штамма: не обладает способностью к денитрификации. Продуцирует пестицин; не обладает чувствительностью к пестицину. Обладает фибринолитической и коагулазной активностями. На среде Хигучи-Смита формирует кальцийзависимые колонии. Отсутствует способность к пигментсорбции (на среде Джексона-Берроуза). Вызывает формирование у лабораторных животных типичных для чумы патоморфологических изменений подкожной клетчатки и внутренних органов; стабильное выделение возбудителя чумы из паренхиматозных органов при посеве на питательные среды. Вирулентность для лабораторных животных: LD₅₀ для белых мышей - 10⁸ м.к., для морских свинок. более 10⁹ м.к. Генетические характеристики: pFra⁺ pPst⁺ pCad⁺ Pgm⁻.

7. Штамм *Y. pestis* 521 (2101) - выделен на территории Гурьевской области от полуденной песчанки (*Pallasiomys meridianus*) в 1944 г., относится к подвиду *pestis* биовару *medievalis*. Депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» под номером КМ 2014.

Обладает типичными для вида *Y. pestis* культурально-морфологическими и физиолого-биохимическими признаками [6]. Обладает типичными для подвида *pestis* биовара *medievalis* физиолого-биохимическими признаками [1].

Особые свойства штамма: наличие замедленной смены стадий формирования зрелых колоний на плотных питательных средах (при изучении с помощью светового микроскопа морфологии колоний, выращенных в течение 20 часов при температуре 28°C, регистрируют стадию развития колоний «битое стекло»), наличие ярко выраженной биполярной окраски микробных клеток в мазках, окрашенных по методу Грама. На среде Хигучи-Смита формирует кальцийзависимые колонии. Отсутствует способность к пигментсорбции (на среде Джексона-Берроуза). Вирулентность для лабораторных животных: LD₅₀ для белых мышей - более 10⁹ м.к. Генетические характеристики: pFra⁺ pPst⁺ pCad⁺ Pgm⁻.

8. Штамм *Y. pestis* A-819 - выделен на территории Волго-Уральского песчаного очага чумы от блохи (*Xenopsylla conformis*) в 1963 г., относится к подвиду *pestis* биовару *medievalis*. Депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» под номером КМ 2024.

Обладает типичными для вида *Y. pestis* культурально-морфологическими и физиолого-биохимическими признаками [6]. Обладает типичными для подвида *pestis* биовара *medievalis* физиолого-биохимическими признаками [1].

Особые свойства штамма: резистентен к чумному бактериофагу Л-413 «С», чувствителен к чумному бактериофагу Покровской (цельный, 1:10, 1:100, 1:1000) и псевдотуберкулезному диагностическому бактериофагу (цельный, 1:10, 1:100, 1:1000) при постановке пробы на агаровых пластинах методом диагностических рабочих разведений. На среде Хигучи-Смита формирует кальцийзависимые колонии. Отсутствует способность к пигментсорбции (на среде Джексона-Берроуза). Генетические характеристики: pFra⁺ pPst⁻ pCad⁻ Pgm⁻

9. Штамм *Y. pestis* 652 «Гризель» - выделен в с. Зуйчахбюр (Гукасянский район,

Армянская ССР) от блохи (*Stenophthalmus teres*), относится к подвиду *caucasica*. Депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» под номером КМ 2013.

5 Обладает типичными для вида *Y. pestis* культурально-морфологическими и физиолого-биохимическими признаками [6]. Обладает типичными для подвида *caucasica* физиолого-биохимическими признаками [1].

Особые свойства штамма: ферментирует рамнозу; обладает способностью к денитрификации. Отсутствует продукция пестицина; обладает чувствительностью к пестицину. Отсутствуют фибринолитическая и плазмокоагулазная активности. На среде 10 Хигучи-Смита формирует кальцийзависимые колонии. Обладает способностью к пигментсорбции (40% пигментированных колоний, 60% непигментированных колоний на среде Джексона-Берроуза). Вызывает формирование у лабораторных животных типичных для чумы патоморфологических изменений подкожной клетчатки и внутренних органов; выделение *Y. pestis* при посеве всех паренхиматозных органов на 15 питательные среды. Вирулентность для лабораторных животных: LD₅₀ для белых мышей - $2 \cdot 10^6$ м.к. Генетические характеристики: pFra⁺ pPst⁻ pCad⁺ Pgm⁺.

10. Штамм *Y. enterocolitica* P-74 E-5B - получен из ЦНИИ эпидемиологии МЗ СССР в 1978 г. Депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» 20 под номером КМ 2007.

Обладает типичными для вида *Y. enterocolitica* культурально-морфологическими признаками: полиморфные, грамотрицательные, биполярно окрашенные палочки. Капсулообразование при 37°C отсутствует. Спор не образует. Рост на питательных средах в S-форме. На плотной среде Хоттингера рН 7,2 при 22°C в течение 24 часов 25 формируются мелкие, прозрачные колонии; на вторые сутки инкубации - колонии d= 2-2,5 мм, круглые, с ровным краем, прозрачные, в проходящем свете голубоватые. В жидкой питательной среде - рост в виде равномерного помутнения.

Обладает типичными для вида *Y. enterocolitica* физиолого-биохимическими признаками. Оптимальная температура роста - 22°C. Оптимум рН среды - 7,2-7,4. 30 Подвижность отмечается при температуре до 30°C, не отмечается при более высокой температуре. Ферментирует глюкозу, маннит, мальтозу, сахарозу, глицерин, мочевины. Не ферментирует лактозу, рамнозу, не образует индол, сероводород; оксидазная активность отрицательная, каталазная - положительная. Восстанавливает нитраты.

35 Не лизируется чумными бактериофагами Л413«С» и Покровской, псевдотуберкулезным бактериофагом Покровской.

11. *Y. pseudotuberculosis* 861 (II) - получен из коллекции А. Молляре (институт Пастера, Франция, Париж) в 1966 г. Депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» под номером КМ 2005.

40 Обладает типичными для вида *Y. pseudotuberculosis* морфологическими, физиолого-биохимическими признаками [6].

Особые свойства штамма: рост на питательных средах в S-форме. Рост на плотной среде Хоттингера рН 7,2 характеризуется формированием в течение 24 часов 45 прозрачных, выпуклых, круглых, с ровным краем, с голубоватым оттенком в проходящем свете колоний. В жидкой питательной среде (бульон Хоттингера рН 7,2) рост в виде равномерного помутнения с пристеночным кольцом и небольшим осадком на дне пробирки. Не ферментирует мальтозу. Лизируется бактериофагами диагностическим псевдотуберкулезным (цельным и в разведениях 1:10, 1:100, 1:1000) и чумным бактериофагом Покровской (цельным и в разведении 1:10), не лизируется чумным бактериофагом Л413«С». Реакция агглютинации на стекле: агглютинируется

иммуноглобулинами диагностическими псевдотуберкулезными II серотипа.

12. Штамм *Y. pseudotuberculosis* 85 (837 II) - получен из коллекции А. Молляре (институт Пастера, Франция, Париж) в 1966 г. Депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» под номером КМ 2004.

5 Обладает типичными для возбудителя *Y. pseudotuberculosis* морфологическими, физиолого-биохимическими признаками [6].

Особые свойства штамма: рост на питательных средах в R- форме. На плотных питательных средах формируются колонии серо-белого цвета, с выпуклым зернистым центром, с буроватым оттенком; с неровным краем, d=2-2,5 мм; в жидких питательных средах - на дне рыхлый осадок, бульон остается прозрачным. Резистентен к чумным бактериофагам (Л-413«С», Покровской) и псевдотуберкулезному диагностическому бактериофагу.

13. Штамм *Y. pseudotuberculosis* 67 - выделен от больного, проходившего лечение во 2^{ой} Городской больницы, г. Саратов.

15 Обладает типичными для возбудителя *Y. pseudotuberculosis* морфологическими, физиолого-биохимическими признаками [6]. Депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» под номером КМ 2006.

Особые свойства штамма: наличие роста на плотных питательных средах в R- и S- формах. В жидкой питательной среде рост в виде равномерного помутнения среды с рыхлым осадком. Чувствителен к псевдотуберкулезному диагностическому бактериофагу (цельному и в разведениях 1:10, 1:100, 1:1000); резистентен к чумным бактериофагам Л-413«С» (цельному) и Покровской (цельному и в разведениях 1:10, 1:100, 1:1000).

14. Штамм *P. multocida* 556 - выделен в п. Фурмановка (Джамбульская область) от зайца-песчаника в 1964 г. Депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» под номером КМ 2003.

Обладает типичными для вида *P. multocida* культурально-морфологическими признаками: короткие, овоидные, полиморфные грамтрицательные палочки. Спор не образует. На питательных средах рост в S-форме. При культивировании на плотной среде Хоттингера рН 7,2 в течение 24 часов формирует нежные, круглые, выпуклые, с гладкой, влажной поверхностью, ровными краями, полупрозрачные колонии диаметром 1-2 мм. В жидкой питательной среде - равномерное помутнение бульона и образование слизистого осадка на дне пробирки.

35 Обладает типичными для вида *P. multocida* физиолого-биохимическими признаками. Оптимальная температура роста - 37°С. Оптимум рН - 7,2-7,4. Факультативный анаэроб. Неподвижный, образует слизистую капсулу, спор не образуют. Ферментирует до кислоты глюкозу, сахарозу, маннит, мальтозу, маннозу, орнитин, фруктозу, сорбит, галактозу; не ферментирует лактозу, дульцит, амигдалин, раффинозу, рамнозу, адонит, декстрин, инулин, глицерин, мочевины, желатину; образует индол и сероводород; проба на каталазу положительная; нитраты восстанавливает до нитритов.

40 Не лизируется чумными бактериофагами Л413«С» и Покровской, псевдотуберкулезным диагностическим бактериофагом.

Вирулентность для лабораторных животных: DCL для белых мышей - 10 м.к.; для кроликов - 10² м.к.; для морских свинок - 10⁹ м.к.

45 Заявляемый набор штаммов позволяет продемонстрировать в учебном процессе базовые для лабораторной диагностики чумы биологические особенности вида, подвидов, биоваров *Y. pestis* и их отличия от других патогенных для человека иерсиний, пастерелл и снизить риск инфицирования обучающихся.

Использование заявляемого набора иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Использование штаммов набора при изучении морфологии клеток *Y. pestis*

На первом этапе лабораторной диагностики чумы исследование проводят методами индикации, одним из которых является анализ морфологии микробных клеток. Метод включает приготовление мазков из исследуемого материала и окраску их стандартными методами (по Граму и по Лефлеру).

Для изучения морфологии клеток возбудителя чумы на практических занятиях используют вакцинный штамм *Y. pestis* КМ 2011. Использование штамма позволяет обучающимся ознакомиться с морфологическими характеристиками клетки, типичными для вида *Y. pestis*. В мазках, окрашенных по Граму, *Y. pestis* имеет вид прямых или овоидных, полиморфных грамтрицательных палочек. В мазках, окрашенных по Лефлеру, *Y. pestis* имеет вид прямой или овоидной палочки с интенсивной биполярной окраской (прокрашенными полюсами), напоминающей «застегнутую булавку».

Пример 2. Использование штаммов набора при изучении морфологии роста *Y. pestis* на питательных средах

Характерными признаками роста возбудителя чумы в жидкой питательной среде являются прозрачный бульон и находящийся на дне пробирки нежный, рыхлый, порошковидный или хлопьевидный осадок, легко распадающийся при встряхивании.

Характерными признаками роста возбудителя чумы на плотной питательной среде являются замедленный стадийный рост (видимые при помощи светового микроскопа через 8-12 часов стадии формирования колонии, условно называемые «нити» и «битое стекло»; через 18-24 часа - стадия «кружевные платочки» - мелкие плоские полупрозрачные колонии с неровным краем; через 36-48 часов - стадия «зрелая макроколония» - видимые невооруженным глазом типичные серовато-белые, блестящие, с неровным краем колонии, которые под световым микроскопом выглядят выпуклыми с более темным, мелкозернистым центром и плоским волнистым краем - «кружевная зона»). Вместе с тем, отдельные штаммы различаются по скорости смены стадий роста, морфологии зрелых колоний, в том числе их сходством с колониями возбудителя сибирской язвы.

Для изучения особенностей морфологии роста возбудителя чумы на практических занятиях используют авирулентные штаммы *Y. pestis* КМ 2011, *Y. pestis* КМ 130(3), *Y. pestis* КМ 2012; *Y. pestis* КМ 2014. Для этих целей штаммы *Y. pestis* КМ 2011, *Y. pestis* КМ 130 (3), *Y. pestis* КМ 2012, *Y. pestis* КМ 2014 выращивают 20 часов в бульоне и на агаре Хоттингера рН 7,2 при температуре 28°C, а затем под микроскопом и визуально оценивают морфологию роста бактерий. При этом для всех штаммов характерен типичный рост в бульоне, в то время как на плотной питательной среде штаммы *Y. pestis* КМ 2014 отличаются замедленной сменой стадий развития колоний, *Y. pestis* КМ 130 (3) отличаются формированием колоний с непигментированным центром, штамм *Y. pestis* КМ 2014 - быстрой сменой и формированием видимой невооруженным глазом колоний через 20 часов культивирования.

Использование штамма *Y. pestis* КМ 2011 позволяет изучить типичные стадии развития колонии в течение 48 часов, включая формирование зрелой макроколонии с выпуклым светло-коричневым центром, окруженной «кружевной зоной».

Использование штамма *Y. pestis* КМ 2014 позволяет под световым микроскопом детально изучить стадию развития колоний «битое стекло», а использование штамма *Y. pestis* КМ 130(3) - развитие колоний с непигментированным центром и длительное сохранение стадии «кружевные платочки» - один из важных диагностических критериев.

Использование быстрорастущего штамма *Y. pestis* КМ 2012 уже через 20 часов позволяет получить видимые невооруженным взглядом колонии. Кроме того, выращенные колонии при изучении под световым микроскопом имеют выраженное сходство по морфологии с колониями возбудителя сибирской язвы (крупные колонии с рыхлым бугристым центром, неровным краем и отсутствием «кружевной зоны»). Это необходимо знать обучающимся при решении бактериологических задач по дифференциации возбудителей чумы и сибирской язвы.

Пример 3. Использование штаммов набора при изучении чувствительности возбудителя чумы к бактериофагам

При лабораторной диагностике чумы специфичность выделяемой бактериальной культуры должна быть подтверждена пробой с чумными бактериофагами Л413«С» и Покровской. Определение чувствительности к более видоспецифичному бактериофагу Л413«С» проводят с помощью стандартных методов, в том числе метода «стерильного пятна». Практически все штаммы возбудителя чумы чувствительны к нему и образуют «стерильное пятно» (отсутствие роста) при контакте цельного фага Л-413«С» с бактериальной культурой, выращенной на плотной питательной среде. Вместе с тем, в природе существуют фагорезистентные штаммы, что необходимо знать обучающимся при обосновании отнесения культуры к виду *Y. pestis*.

Для изучения данных особенностей на практических занятиях используют авирулентные штаммы *Y. pestis* КМ 2011 и *Y. pestis* КМ 2024. Штамм *Y. pestis* КМ 2011 лизируется цельным фагом Л-413«С» и в месте лизиса отмечают «стерильное пятно» - отсутствие роста штамма. Штамм *Y. pestis* КМ 2024 не лизируется цельным фагом Л-413«С», «стерильное пятно» не формируется.

На этапе расширенной индикации выделенной бактериальной культуры наряду с фагом Л-413«С» используют бактериофаг чумной Покровской (специфичный для *Y. pestis*, но лизирующий до 25% штаммов *Y. pseudotuberculosis*) и бактериофаг диагностический псевдотуберкулезный. Чувствительность исследуемой культуры к данным бактериофагам определяют по стандартной методике - метод дифференциального рабочего титра (ДРТ). При постановке теста используют цельный бактериофаг и его десятикратные разведения 1:10, 1:100, 1:1000. Заключение о том, что исследуемая культура является возбудителем чумы, делают, если она лизируется в разведении, определенном как ДРТ и выше.

Для изучения чувствительности к чумному бактериофагу Покровской используют авирулентные штаммы *Y. pestis* КМ 2011 и *Y. pestis* КМ 2024. Штаммы лизируются цельным чумным бактериофагом Покровской, а также в разведениях 1:10, 1:100, 1:1000; цельным диагностическим псевдотуберкулезным бактериофагом и в разведении 1:10. Обучающиеся должны усвоить, что полученный отрицательный результат не дает основания для отрицания принадлежности штамма к виду *Y. pestis*.

Пример 4. Использование штаммов набора при изучении *in vitro* факторов вирулентности возбудителя чумы - фибринолитической и плазмокоагуляционной активностей

Для оценки вирулентности штаммов возбудителя чумы *in vitro* определяют косвенные признаки наличия ряда детерминант вирулентности хромосомной (область *rgm*) и плазмидной локализации (плазида *pCad*). Штаммы *Y. pestis*, имеющие оба фактора как правило, являются вирулентными. Штаммы, содержащие один фактор, характеризуются сниженной вирулентностью. При отсутствии обоих факторов штаммы как правило, являются авирулентными.

Для детекции на практических занятиях области *rgm*, расположенной на хромосоме,

применяют методику оценки признака пигментсорбции с использованием авирулентных штаммов *Y. pestis* КМ 2011 и *Y. pestis* КМ 2012.

Штамм *Y. pestis* КМ 2011 (Pgm^-) при культивировании на средах Джексона-Берроуза 5
вырастает в виде крупных бесцветных колоний, что отличает его от вирулентных штаммов (Pgm^+), у которых все колонии вырастают мелкими и пигментированными.

При культивировании штамма *Y. pestis* КМ 2012 (Pgm^+) 40% колоний пигментированные, остальные - бесцветные, что позволяет сделать предположение о сниженной вирулентности штамма.

10 Для детекции на практических занятиях плазмиды pCad применяют методику оценки признака зависимости роста штаммов *Y. pestis* от ионов кальция при температуре 37°C с использованием авирулентных штаммов *Y. pestis* КМ 2012 и *Y. pestis* КМ 2008.

Штамм *Y. pestis* КМ 2012, не содержащий плазмиду pCad, при культивировании на среде Хигучи-Смита (в условиях дефицита кальция) вырастает при 37°C в течение 48 15
часов в виде типичных по морфологии колоний, а при последующем изменении температуры культивирования на 28°C новые колонии не появляются.

Особенности роста вирулентных штаммов изучают с использованием штамма *Y. pestis* КМ 2008, имеющего плазмиду pCad. При культивировании данного штамма в течение 48 часов при 37°C отмечают рост единичных колоний, а при последующем 20
изменении температуры на 28°C и культивировании в течение 24 часов обнаруживают, что формирование типичных колоний возбудителя чумы увеличивается в пятьдесят раз.

Кроме того, к основным факторам патогенности *Y. pestis* также относят ферменты фибринолизин и плазмокоагулазу. Плазмокоагулаза способствует образованию блока 25
преджелудка у блохи (переносчика возбудителя чумы) и формированию биопленки. При попадании в организм теплокровных животных и человека возбудитель чумы активизирует фибринолизин для растворения нитей фибрина и преодаления неспецифических факторов защиты макроорганизма.

30 Определение фибринолитической и плазмокоагулирующей способности применяют на этапе окончательной идентификации выделенной культуры *Y. pestis*. Применяют стандартный метод, основанный на использовании цитратной кроличьей плазмой [6].

Для изучения данных особенностей на практических занятиях используют авирулентные штаммы *Y. pestis* КМ 2008 и *Y. pestis* КМ 2024.

35 При постановке теста на плазмокоагулазу со штаммом *Y. pestis* КМ 2008 отмечают образование плотного сгустка фибрина, заполняющего всю пробирку с трудом отделяющегося от стенок пробирки. Результат оценивают как 4+, что подтверждает наличие выраженной плазмокоагулирующей способности. При постановке теста со штаммом *Y. pestis* КМ 2024 не отмечают формирование сгустка фибрина. Результат 40
оценивают как отрицательный, что свидетельствует об отсутствии плазмокоагулирующей способности.

При постановке теста на фибринолитическую активность со штаммом *Y. pestis* КМ 2008 отмечают полное растворение сгустка фибрина. Результат оценивают как 4+, что подтверждает наличие выраженной фибринолитической активности. При постановке теста со штаммом *Y. pestis* КМ 2024 не отмечают растворение сгустка фибрина. 45
Результат оценивают как отрицательный, что свидетельствует об отсутствии способности к растворению сгустка фибрина.

Пример 5. Использование штаммов набора при лабораторной диагностике чумы иммунологическими методами

В связи с тем, что почти все штаммы чумного микроба, циркулирующие в природных очагах, в отличие от других патогенных для человека иерсиний, имеют способность к синтезу видоспецифичного антигена F1, этот признак используют в комплексе основных методов индикации. Исследования проводят с помощью таких иммунологических методов, как метод флуоресцирующих антител (МФА) и иммуноферментный анализ (ИФА).

Большинство ИФА тест-систем направлены на поиск F1 или антител к нему. Вместе с тем, штаммы, у которых отсутствует плаزمида pFra (pMT1), не дают положительной реакции в ИФА.

При моделировании проб, применяемых на практических занятиях для изучения с помощью ИФА, используют авирулентные штаммы с разным плазмидным составом *Y. pestis* KM 2011, *Y. pestis* KM 260 (12) и *Y. pestis* KM-130 (3).

При исследовании с помощью ИФА штамма *Y. pestis* KM 2011 (pFra⁺ pPst⁺ pCad⁺) и штамма *Y. pestis* KM-130 (3) (pFra⁺ pPst⁻ pCad⁻) получают положительный результат, свидетельствующий о принадлежности штаммов к виду *Y. pestis*. При исследовании штамма *Y. pestis* 260 (12) (pFra⁻ pPst⁻ pCad⁻) получают отрицательный результат, который не дает основания для отрицания принадлежности штамма к виду *Y. pestis*.

Для постановки МФА используют препарат «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие чумные адсорбированные лошадиные сухие (ИДЧФ)», который позволяет обнаружить: штаммы, имеющие три плазмиды (pPst⁺ pFra⁺ pCad⁺), штаммы, утратившие плазмиду pFra (pPst⁺ pFra⁻ pCad⁺); штаммы, утратившие плазмиду pPst (pPst⁻, pFra⁺ pCad⁺). Вместе с тем, если штаммы утратили две плазмиды (pPst⁻ pFra⁻ pCad⁺) или все плазмиды (pPst⁻ pFra⁻ pCad⁻), то препарат ИДЧФ не эффективен. При моделировании проб для изучения с помощью МФА используют авирулентные штаммы *Y. pestis* KM 2011, *Y. pestis* KM 260 (12) и *Y. pestis* KM-130 (3) с разным плазмидным составом.

Результаты МФА со штаммом *Y. pestis* KM 2011 (pFra⁺ pPst⁺ pCad⁺) оценивают как специфическое свечение с яркостью 4+ - 3+ у 3-5 клеток в каждом поле зрения; со штаммом *Y. pestis* KM-130 (3) (pFra⁺ pPst⁻ pCad⁻) - как специфическое свечение с яркостью 3+ у 2-5 клеток в каждом поле зрения; со штаммом *Y. pestis* 260 (12) (pFra⁻ pPst⁻ pCad⁻) специфическое свечение отсутствует (отрицательный результат). Полученный отрицательный результат не дает основания для отрицания принадлежности штамма к виду *Y. pestis*.

Пример 6. Использование штаммов набора при лабораторной диагностике чумы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

В схеме лабораторной диагностики чумы ПЦР используют как на этапе индикации при исследовании биологического материала и объектов окружающей среды, так и при идентификации выделенных культур и внутривидовом дифференциации штаммов *Y. pestis*.

Для выявления ДНК возбудителя чумы используют различные ДНК-мишени: гены *pla* (плаزمиды pPst), *caf1* (плазмиды pFra), *ymt* (плазмиды pFra), *irp2* (хромосома, остров высокой патогенности), *lcrV* (плазмиды pCad), уор-оперон (плазмиды pCad), а также ряд видоспецифичных генов хромосомной локализации. Однако известны штаммы *Y. pestis*, утратившие одну или более плазмид, в связи с чем более надежным представляется амплификация фрагментов хромосомных генов, видоспецифичных для чумного микроба. Подтверждение принадлежности выделенных культур к виду *Y. pestis* (ген 3a) сопряжено

с дифференциацией авирулентных штаммов чумного микроба от вирулентных по генетическим факторам, определяющим наличие полноценного острова высокой патогенности (ген *irp2*) и генов уор-оперона плазмиды pCad (ген *lcrV*).

При освоении метода ПЦР в схеме лабораторной диагностики чумы на практических занятиях используют авирулентные штаммы с разным набором родо- и видоспецифичных генов патогенности: *Y. pestis* КМ 2011, *Y. pestis* КМ 2012, *Y. pestis* КМ-130 (3), *Y. pestis* КМ 260 (12).

Применение штамма *Y. pestis* КМ 2011 позволяет провести диагностику возбудителя чумы, содержащего гены *pla*, *3a*, *caf1*, *lcrV* и не имеющего генов *hmsH* и *irp2*.

Применение штамма *Y. pestis* КМ 2012 позволяет провести диагностику возбудителя чумы, содержащего гены *pla*, *3a*, *caf1*, *hmsH*, *irp2*, и не имеющего гена *lcrV*.

Применение штамма *Y. pestis* КМ 130 (3) позволяет провести диагностику возбудителя чумы, содержащего гены *3a*, *caf1* и не имеющего генов *pla*, *lcrV*, *hmsH* и *irp2*.

Применение штамма *Y. pestis* КМ 260 (12) позволяет провести диагностику возбудителя чумы, не имеющего генов *pla*, *3a*, *caf1*, *lcrV*, *hmsH* и *irp2*.

Пример 7. Использование штаммов набора при лабораторной диагностике чумы биологическим методом

В схеме лабораторной диагностики чумы биологический метод является обязательным на этапе индикации, выделения и накопления бактериальной культуры. При заражении вирулентными штаммами *Y. pestis* лабораторные животные заболевают и погибают на 3-5-ые сутки наблюдения; при вскрытии отмечаются характерные для чумы патоморфологические изменения. Из участков пораженных паренхиматозных органов (лимфоузлов, селезенки, печени, легких) и крови выделяют культуру возбудителя чумы.

При изучении биологического метода в схеме лабораторной диагностики чумы на практических занятиях используют авирулентные штаммы *Y. pestis* КМ 2010 ($LD_{50}=10^8$ м.к.) и *Y. pestis* КМ 2013 ($LD_{50}=2 \cdot 10^6$ м.к.).

Методику заражения и вскрытия на практических занятиях преподаватели демонстрируют обучающимся на авирулентном штамме *Y. pestis* КМ 2013. При подкожном заражении данным штаммом у погибших лабораторных животных обнаруживают типичные для чумы патоморфологические изменения подкожной клетчатки и внутренних органов: в месте введения материала - полнокровие сосудов, кровоизлияния; увеличение и гиперемия лимфатических узлов; пропитывание тканей, окружающих лимфоузлы студневидной серозно-геморрагической жидкостью; в легких очаги кровоизлияния и участки уплотнения темно-красного цвета (очаги пневмонии); селезенка, печень увеличены, дряблой консистенции, полнокровны, с участками некроза. При посевах на плотные питательные среды из всех внутренних органов и крови животных, зараженных *Y. pestis* КМ 2013, выделяют культуру возбудителя чумы.

Однако манипуляции при заражении и вскрытии лабораторных животных относятся к процедурам с высоким риском инфицирования, что определяет необходимость использования обучающимися для самостоятельной работы авирулентного штамма *Y. pestis* КМ 2010, который обладает более низкой вирулентностью, обеспечивает биологическую безопасность при наличии типичной патоморфологической картины и выделение бактериальной культуры из тканей внутренних органов.

Пример 8. Использование штаммов набора для освоения алгоритма дифференциации биоваров основного подвида возбудителя чумы и алгоритма дифференциации основного подвида от неосновных

В соответствии с классификацией вид *Y. pestis* делят на основной подвид - *subspecies*

(ssp) *pestis* и группу неосновных подвигов: алтайский - *ssp. altaica*, кавказский - *ssp. caucasica*, улегейский - *ssp. ulegeica*, гиссарский - *ssp. hissarica*. В основном подвиде выделяют три биовары: *antique*, *medievalis*, *orientalis* [1]. Заболевания человека чумой могут возникать при инфицировании штаммами основного подвида, реже неосновных подвигов, в частности кавказского подвида.

Дифференциацию штаммов возбудителя чумы на подвиды и биовары проводят с учетом различной экспрессии ряда признаков: ферментации рамнозы, мелибиозы, арабинозы, глицерина, изучения денитрифицирующей способности, чувствительности к пестицину, продукции пестицина и чувствительности к пестицину I, плазмокоагулирующей способности, фибринолитической активности, пестициногенной активности [1, 11].

При изучении алгоритма дифференциации биоваров основного подвида возбудителя чумы на практических занятиях используют авирулентные штаммы *Y. pestis* КМ 2011, *Y. pestis* КМ 2012, *Y. pestis* КМ 2010.

Для изучения таксономических признаков штаммов основного подвида биовара *orientalis* на практических занятиях используют штамм *Y. pestis* КМ 2011, обладающий типичными признаками: ферментация рамнозы (-), мелибиозы (-), арабинозы (+), глицерина (-); чувствительность к пестицину (-); плазмокоагулазная активность (+), фибринолитическая активность (+); продукция пестицина (+); способность к денитрификации (+).

Для изучения таксономических признаков штаммов основного подвида биовара *antiqua* на практических занятиях используют авирулентный штамм *Y. pestis* КМ 2012, обладающий типичными признаками: ферментация рамнозы (-), мелибиозы (-), арабинозы (+), глицерина (+); чувствительность к пестицину (-); плазмокоагулазная активность (+), фибринолитическая активность (+); продукция пестицина (+); способность к денитрификации (+).

Для изучения таксономических признаков штаммов основного подвида биовара *medievalis* на практических занятиях используют авирулентный штамм *Y. pestis* КМ 2010, обладающий типичными признаками: ферментация рамнозы (-), мелибиозы (-), арабинозы (+), глицерина (+); чувствительность к пестицину (-); плазмокоагулазная активность (+), фибринолитическая активность (+); продукция пестицина (+); способность к денитрификации (-).

При изучении алгоритма дифференциации основного подвида возбудителя чумы от неосновных дополнительно используют авирулентный штамм *Y. pestis* КМ 2013, обладающий типичными признаками *ssp. caucasica*: ферментация рамнозы (+), мелибиозы (+), арабинозы (+), глицерина (+), чувствительность к пестицину (+), плазмокоагулазная активность (-), фибринолитическая активность (-), продукция пестицина (-), способность к денитрификации (+).

Использование штаммов набора позволяет обучающимся на практических занятиях, используя регламентированные критерии и алгоритмы, отнести штаммы к основному подвиду *Y. pestis*, а также провести дифференциацию биоваров основного подвида. Применение на практических занятиях авирулентных штаммов позволяет наряду с отработкой алгоритмов дифференциации снизить риск лабораторного инфицирования обучающихся.

Пример 9. Использование штаммов при дифференциации *Y. pestis* от возбудителей псевдотуберкулеза грызунов, кишечного иерсиниоза, пастереллеза

Патогенные для человека иерсинии (возбудители кишечного иерсиниоза, псевдотуберкулеза грызунов) и пастереллы могут вызывать инфекционные болезни со

схожими с чумой клиническими проявлениями. Кроме того, возбудители псевдотуберкулеза и пастереллеза, распространенные повсеместно, в том числе на территории природных очагов чумы, вызывают массовые эпизоотии среди грызунов. Все это определяет необходимость проведения дифференциации возбудителя чумы от возбудителей псевдотуберкулеза, кишечного иерсиниоза, пастереллеза на основании морфологических, культуральных, биохимических, иммунологических, молекулярно-генетических признаков.

Для проведения дифференциации возбудителя чумы и псевдотуберкулеза используют авирулентный штамм *Y. pestis* КМ 2011, обладающий типичными видовыми признаками, и штаммы *Y. pseudotuberculosis* КМ 2004, *Y. pseudotuberculosis* КМ 2005, *Y. pseudotuberculosis* КМ 2006, позволяющие продемонстрировать как типичные видовые признаки, так и разнообразие биологических свойств отдельных штаммов.

Применение штамма *Y. pseudotuberculosis* КМ 2005 позволяет обучающимся по ряду типичных видовых признаков отнести выделенную бактериальную культуру к виду *Y. pseudotuberculosis* и отдифференцировать ее от *Y. pestis* КМ 2011 на основании ряда физиолого-биохимических признаков: а) рост бактериальной культуры на питательных средах в S-форме: на плотных питательных средах в течение 24 часов формируются видимые невооруженным глазом гладкие, полупрозрачные, серовато-белые, с блестящей поверхностью и ровными краями колонии, с характерным голубоватым оттенком при просмотре в отраженном свете; в жидких питательных средах - на дне рыхлый осадок, бульон гомогенно мутный; б) наличием подвижности при 22°C и отсутствием ее при 37°C; в) наличие способности ферментировать мочевины, рамнозу, глицерин; образовывать сероводород; отсутствие фибринолитической и плазмокоагуляционной активности; г) отсутствие специфического свечения при постановке МФА с «Иммуноглобулинами диагностическими чумными люминесцентными»; г) отсутствие продукции антигена F1 при постановке ИФА с сертифицированными тест-системами для индикации *Y. pestis*; д) отрицательные результаты при постановке ПЦР с использованием сертифицированных тест-систем для индикации и идентификации *Y. pestis* и положительных результатов ПЦР с использованием сертифицированных тест-систем для индикации и идентификации *Y. pseudotuberculosis*; е) резистентность к цельному чумному бактериофагу Л413С, наличие чувствительности к чумному бактериофагу Покровской (цельному и в разведении 1:10) и к бактериофагу диагностическому псевдотуберкулезному (цельному и в разведениях 1:10, 1:100, 1:1000).

Применение штамма *Y. pseudotuberculosis* КМ 2004 позволяет в отличие от *Y. pseudotuberculosis* КМ 2005 продемонстрировать: способность возбудителя псевдотуберкулеза к росту на питательных средах в R-форме (на плотных питательных средах формируются колонии серо-белого цвета, с выпуклым зернистым центром, с буроватым оттенком; с неровным краем, d=2-2,5 мм; в жидких питательных средах - на дне рыхлый осадок, бульон прозрачный); резистентность к чумным бактериофагам Л-413«С», Покровской и псевдотуберкулезному диагностическому бактериофагу.

Применение штамма *Y. pseudotuberculosis* КМ 2006 позволяет в отличие от *Y. pseudotuberculosis* КМ 2005 продемонстрировать: наличие роста на плотных питательных средах в R- и S-формах; чувствительность к псевдотуберкулезному диагностическому бактериофагу (цельному и в разведениях 1:10, 1:100, 1:1000); отсутствие чувствительности к чумным бактериофагам Л-413«С» и Покровской.

Для проведения дифференциации возбудителей чумы и кишечного иерсиниоза на практических занятиях используют вакцинный штамм *Y. pestis* КМ 2011 и штамм *Y. enterocolitica* КМ 2007, обладающие типичными видовыми признаками.

Применение штамма *Y. enterocolitica* КМ 2007 позволяет обучающимся по ряду типичных видовых признаков отнести выделенную бактериальную культуру к виду *Y. enterocolitica* и отдифференцировать ее от *Y. pestis* КМ 2011 на основании ряда физиолого-биохимических признаков: а) рост на питательных средах в S-форме: на плотной питательной среде при 28°C в течение 24 часов формируются мелкие, блестящие, гладкие, выпуклые колонии; на вторые сутки инкубации - колонии d=2-2,5 мм, круглые, с ровным краем, прозрачные, в отраженном свете - серовато-белые, в проходящем свете -голубоватые; в жидкой питательной среде - рост в виде равномерного помутнения; б) наличием подвижности при 22°C и отсутствием ее при 37°C; в) наличие способности ферментировать мочевины, сахарозу, отсутствие ферментации рамнозы; отсутствие фибринолитической и плазмокоагулазной активности; г) отсутствие специфического свечения при постановке МФА с «Иммуноглобулинами диагностическими чумными люминесцентными»; г) отсутствие продукции антигена F1 при постановке ИФА с сертифицированными тест-системами для индикации *Y. pestis*; д) отрицательные результаты при постановке ПЦР с использованием сертифицированных тест-систем для индикации и идентификации *Y. pestis* и положительных результатов ПЦР с использованием сертифицированных тест-систем для индикации и идентификации *Y. enterocolitica*; е) резистентность к чумным бактериофагам Л413«С» и Покровской.

Для проведения дифференциации возбудителей чумы и пастереллеза используют авирулентный штамм *Y. pestis* КМ 2011 и штамм *P. multocida* КМ 2003, обладающие типичными видовыми признаками.

Применение штамма *P. multocida* КМ 2003 позволяет обучающимся по ряду типичных видовых признаков отнести выделенную бактериальную культуру к виду *P. multocida* и отдифференцировать ее от *Y. pestis* КМ 2011 на основании ряда физиолого-биохимических признаков: а) рост бактериальной культуры S-форме: в при культивировании на плотной питательной среде в течение 24 часов формируются мелкие, круглые, выпуклые, прозрачные, с гладкой поверхностью и ровным краем колонии; в жидкой питательной среде - равномерное помутнение бульона и образование слизистого осадка на дне пробирки; б) оптимальная температура роста - 37°C; в) наличие способности ферментировать сахарозу; отсутствие ферментации мальтозы, глицерина; отсутствие плазмокоагулазной и фибринолитической активности; г) отсутствие специфического свечения при постановке МФА с «Иммуноглобулинами диагностическими чумными люминесцентными»; д) отсутствие продукции антигена F1 при постановке ИФА с сертифицированными тест-системами для индикации *Y. pestis*; д) отрицательные результаты при постановке ПЦР с использованием сертифицированных тест-систем для индикации и идентификации *Y. pestis*; е) резистентность к чумным бактериофагам Л413«С» и Покровской.

Таким образом, набор содержит штаммы, необходимые для всестороннего изучения вопросов микробиологии и регламентированных методов лабораторной диагностики чумы.

Использование набора позволяет обеспечить в полном объеме реализацию планов практических занятий, обучающимся самостоятельно на авирулентных штаммах приобрести навыки работы с возбудителем чумы и освоить регламентированные методы индикации, идентификации и дифференциации *Y. pestis*. Кроме того, использование авирулентных штаммов *Y. pestis* позволяет минимизировать вероятность лабораторного инфицирования обучающихся, тем самым обеспечивая биологическую безопасность практических занятий.

Источники информации

1. Анисимов А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 1. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, - 2002. - №3. - С. 3-23.

2. Балахонов С.В., Логачев А.И., Иннокентьева Т.И. Штамм бактерий *Yersinia pestis* subsp. *pestis* КМ 1190 (И-3244), содержащий плазмиду рУХ 16, для внутривидовой дифференциации чумного микроба. Патент RU №2118362 РФ. Дата публикации 27.08.1998.

3. Билялов З.А, Силантьев В.В., Степанов В.М., Айкимбаев А.М., Мартиневский И.Л., Дмитровский А.М., Сапожников В.И. Штамм бактерий *Yersinia pestis* - тест-объект в генетических и микробиологических исследованиях. Патент RU №2002802 РФ. Дата публикации 15.11.1993.

4. Воробьев А.А., Боев Б.В., Бондаренко В.М., Гинцбург А.Л. Проблема биотерроризма в современных условиях [Текст] // ЖМЭИ. - 2002. - №3. - С. 3-12.

5. Жаринова Н.В., Царева Н.С., Щедрин В.И. Малецкая О.В., Лунева Т.М., Мезенцева О.Н. Штамм бактерий *Yersinia pestis*, используемый в качестве тест-штамма центрально-кавказского высокогорного природного очага чумы. Патент RU №2317325 РФ. Дата публикации 20.02.2008.

6. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство / Под ред. акад. РАМН Г.Г. Онищенко и акад. РАМН В.В. Кутырева. Изд-е 2-е. - М.: ЗАО «Шико», 2013. - 560 с.

7. Мартиневский И.Л., Проценко О.А., Филиппов А.А., Алтынбеков З.Б., Плотников О.П., Солодовников Н.С., Степанов В.М. Штамм бактерий *Yersinia pestis*, используемый как тест-объект для уточнения структуры и функции плазмиды кальцийзависимости у возбудителя чумы. Патент RU №2034023 РФ. Дата публикации 30.04.1995.

8. Мартиневский И.Л., Проценко О.А., Филиппов А.А., Плотников О.П., Солодовников Н.С., Степанов В.М. Штамм бактерий *Yersinia pestis*, используемый для уточнения строения и функции плазмиды синтеза фракции I и токсигенности чумного микроба. Патент RU №2034024 РФ. Дата публикации 30.04.1995.

9. Мартиневский И.Л., Степанов В.М. Некрасова Л.Е., Проценко О.А., Филиппов А.А., Плотников О.П., Солодовников Н.С. Штамм чумного микроба *Yersinia pestis*, используемый в качестве тест-объекта для определения строения и функции новой дополнительной плазмиды возбудителя чумы. Патент RU №1825375 РФ. Дата публикации 30.06.1993.

10. Мартиневский И.Л., Степанов В.М. Штамм бактерий *Yersinia pestis* - продуцент фракции I чумного микроба. Патент RU №2031938. Дата публикации 27.03.1995.

11. Никифоров К.А., Одинокоев Г.Н., Новичкова Л.А., Ерошенко Г.А. Дифференциация штаммов штаммов *Yersinia pestis* Алтайско-Гиссарской группы неосновных подвидов методом ПЦР. Проблемы особо опасных инфекций. 2015; №1; 71-74.

12. Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации [Текст]: методические указания МУ 3.1.3.2355-08. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. - 103 с. - Утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 30 апр. 2008 г.

13. Основные требования к вакцинным штаммам чумного микроба. Методические указания. МУ 3.3.1.1113-02. Утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 02.03.2002. 7 с.

14. Основы государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2025 года и

дальнейшую перспективу (утв. Президентом РФ 01.11.2013 N Пр-2573), <http://docs.cntd.ru/document/499057916> (accessed 11 March 2016).

15. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики чумы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней [Текст]: методические указания. МУК 4.2.2940-11. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. - 55 с.

16. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. - М.: «Медицина», 2004. - 192 с.

17. Савостина Е.П., Попов Ю.А., Каштанова Т.Н., Ящечкин Ю.А. Анализ геномного полиморфизма типовых и атипичных штаммов возбудителя чумы с использованием полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, - 2004. - №1. - С. 22-26.

18. Самойлова С.А. Влияние условий культивирования на популяционный состав штаммов чумного микроба, обладающих различным плазмидным профилем. Дисс. канд. мед. наук. - Саратов, 1991 г.; 157 с.

19. Филиппов А.А., Проценко О.А., Мартиневский И.Л., Плотников О.П., Солодовников Н.С., Алтынбеков З.Б., Степанов В.М. Штамм бактерий *Yersinia pestis*, предназначенный для определения строения и функции новой дополнительной плазмиды мол.м. 19 МД у возбудителя чумы из таласского очага. Патент RU №2038376 РФ. Дата публикации 27.06.1995.

20. 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 RU №2203316 РФ. Дата публикации 27.04.2003.

(57) Формула изобретения

Набор штаммов бактерий, используемый для обучения вопросам микробиологии и методам лабораторной диагностики чумы, содержащий авирулентные штаммы *Yersinia pestis* подвида *pestis* биовара *orientalis* КМ 2011, подвида *pestis* биовара *antiqua* КМ 2008, КМ 2012, КМ 260 (12), КМ 130(3), подвида *pestis* биовара *medievalis* КМ 2010, КМ 2014, КМ 2024, подвида *caucasica* КМ 2013, штаммы *Yersinia pseudotuberculosis* КМ 2004, КМ 2005, КМ 2006, *Yersinia enterocolitica* КМ 2007 и штамм *Pasteurella multocida* КМ 2003, депонированные в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб».

35

40

45