

ПРОБЛЕМЫ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

№ 1-2 (71-72)

И. Г. ДРОЗДОВ, И. Н. ЕЖОВ, С. В. САМОЙЛОВА, А. П. АНИСИМОВ,
А. К. НИКИФОРОВ

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БЕСКАПСУЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

Саратов

Коллекция штаммов чумного микроба, утративших способность синтезировать видоспецифический капсульный антиген (Ф1), охарактеризована по основным видовым признакам. Показано, что штаммы возбудителя чумы с дефектами ряда детерминант патогенности (Ф1, «мышинного» токсина, признака пигментсорбции, продукции пестицина I, фибринолизина и плазмокоагулазы) сохраняют способность вызывать инфекционный процесс у лабораторных животных. Увеличение сроков жизни животных при заражении такими культурами и способность штаммов чумного микроба с фенотипом Fga⁻ вызывать повышенный процент гибели иммунизированных животных свидетельствуют о возможном участии атипичных вариантов возбудителя в формировании затяжных форм чумной инфекции в популяциях диких грызунов, имеющих значительную иммунную прослойку.

Как известно, дефектные по способности продуцировать видоспецифический капсульный антиген (Ф1) и некоторые другие детерминанты вирулентности штаммы *Yersinia pestis* периодически выделяются из природных очагов чумы [3, 6].

В последнее время таким атипичным вариантам приписывается способность вызывать затяжные формы инфекционного процесса [7], что может иметь значение в длительном поддержании эпизоотии, а возможно, и в сохранении возбудителя в межэпизоотический период. Кроме того, в литературе описан единичный факт получения штамма чумного микроба с фенотипом Fga⁻ Tox⁻, который по сравнению с исходной культурой *Y. pestis* 358 приобрел способность вызывать повышенный процент гибели белых мышей, иммунизированных живой чумной вакциной EV НИИЭГ [1]. Указанное обстоятельство дает основание считать актуальным дальнейшее изучение атипичных культур возбудителя чумы, полученных как и лабораторных условиях, так и из объектов внешней среды.

В связи с этим представляло интерес охарактеризовать по основным биологическим свойствам набор бескапсульных штаммов, полученных нами ранее способом направленного делеционного мутагенеза [2].

Таблица 1
Фенотипическая характеристика штаммов чумного микроба, использованных в исследованиях

Обозначение штаммов	Питательные потребности	Продукция		Кальцийзависимость при 37 °С	Пигментсорбция	Ферментативные свойства				Чувствительность к бактериофагам			
		Ф и «мышьного» токсина	пестицинал			глицерина	рамнозы	мочевинны	фибринолиз	плазмокоагуля	Л413С	Чумному диагностическому	
231(708)	met., phe, thr, cys	+/*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
231pFS23	"	-/*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
231pFra ⁻	"	+/*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
231Psb ⁻	"	+/*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
231pFS23Psb ⁻	"	+/*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
231pPst ⁻	"	+/*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
231pPst ⁻ pFS23	"	+/*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
358	met., phe, thr	-/*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
358pFra ⁻	"	+/*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
358pPst ⁻	"	+/*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
358pPst ⁻ pFS23	"	+/*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* В числителе — отсутствие (—) или наличие (+) продукции Ф1, в знаменателе — отсутствие (—) или наличие (+) продукции «мышьного» токсина.

Изучение видовых характеристик чумного микроба осуществляли в соответствии с методами, описанными в «Наставлении по изучению свежесделанных штаммов возбудителя чумы» [5]. Для культивирования микроорганизмов использовался агар Хоттингера (pH 7,2), выращивание испытуемых штаммов производили при 28 и 37 °С. Иммунизация лабораторных животных осуществлялась чумной живой вакциной EV (серия 13) производства научно-исследовательского противочумного института Кавказа и Закавказья подкожно в дозе 10 тыс. КОЕ за 21 сут до заражения исследуемыми штаммами. Вирулентность штаммов определяли при подкожном заражении белых мышей и морских свинок суспензиями двухсуточных агаровых культур, приготовленных в 0,89 % раствора хлорида натрия в объеме 0,2 мл. Вычисление LD₅₀ и доверительного интервала проводили по методу Кербера [4] на персональном компьютере Olivetti с использованием программы Super Calc-4.

Характеристика фенотипических свойств полученных штаммов представлена в табл. 1, из которой видно, что утрата клетками чумного микроба способности синтезировать капсульный антиген (Ф1) не отразилась на проявлении основных культуральных, биохимических свойств, если они не были нами специально модифицированы. Результаты экспериментов по подкожному заражению лабораторных животных свидетельствуют, что практически все сконструированные нами бесфракционные штаммы чумного микроба по показателям вирулентности достоверно не отличались от исходных вариантов (табл. 2). Вместе с тем наблюдалось увеличение сроков жизни животных при заражении культурами, имеющими фенотип Fra⁻, что дает основание для предположения об участии таких культур в формировании затяжных форм чумной инфекции в популяциях диких грызунов. Описанная закономерность сохранялась и при сочетанной утрате способности продуцировать Ф1 с другими детерминантами вирулентности, такими как пигментсорбция, продукция «мышьного токсина», фибринолизина, плазмокоагулазы и пестицина I.

Полученные данные свидетельствуют о возможном участии штаммов, обладающих дефектами ряда детерминант патогенности, в развитии инфекционного процесса у диких грызунов в природных очагах чумы.

Кроме того, с целью выяснения роли «классических» детерминант вирулентности в формировании иммунологической специфичности возбудителя чумы были выполнены эксперименты по заражению

Таблица 2

Характеристика вирулентных свойств бескапсульных штаммов и их исходных вариантов

Штаммы <i>Y. pestis</i>	Вирулентность при подкожном способе заражения*			
	белых мышей		морских свинок	
	LD ₅₀ (KOE)	средний срок жизни, сут	LD ₅₀ (KOE)	средний срок жизни, сут
231(708)	3 (1-18)	7,3 (4-6)	4 (1-22)	8,1 (5-9)
231pPst ⁻	1 (0-4)	6,9 (4-7)	4 (1-21)	8,6 (5-9)
231Psb ⁻	4 (1-21)	7,8 (5-8)	6 (2-26)	8,9 (6-10)
231pFS23	5 (1-42)	8,2 (7-10)	27 (5-210)	10,2 (8-13)
231pFra ⁻	8 (2-41)	7,9 (7-10)	2 (0-5)	9,7 (8-10)
231Psb ⁻ pFS23	13 (3-63)	8,6 (6-12)	267(67-966)	24,5 (9-26)
231pPst ⁻ pFS23	1 (0-4)	6,5 (6-11)	9 (1-45)	12,7 (9-16)
358	7 (1-27)	4,6 (3-5)	13 (3-63)	8,6 (5-9)
358pFS23	5 (1-42)	7,8 (6-10)	13 (3-63)	11,2 (9-15)
358pFra ⁻	3 (1-18)	6,2 (6-8)	10 (2-15)	10,6 (8-13)
358pPst ⁻ pFS23	2 (1-16)	9,2 (7-12)	26 (6-22)	13,8 (10-16)

* Здесь и в табл. 3: достоверный интервал вычислялся для вероятности 95%.

полученными нами штаммами иммунных лабораторных животных. Результаты этих экспериментов представлены в табл. 3. Как видно из таблицы, все штаммы с фенотипом Fra⁻Tox⁻ проявляли способность вызывать повышенный процент гибели белых мышей, иммунизированных живой чумной вакциной EV НИИЭГ, что выразилось в снижении показателей LD₅₀ на 2-3 порядка и согласуется с данными, полученными Акимовичем и Шаниной [1]. Однако изменения иммунологической (антигенной) специфичности в наших экспериментах удалось получить и при заражении лабораторных животных штаммами, избирательно утратившими способность к синтезу капсулы, без исключения продукции «мышинного» токсина, что подтверждает ведущую роль капсульного антигена возбудителя чумы в создании специфического иммунитета у белых мышей. Несомненно, интерес вызывает и тот факт, что ФІ, по-видимому, не играет заметной роли в формировании иммунного ответа у морских свинок, как, впрочем, и другие исследованные в наших экспериментах «классические» детерминанты вирулентности

Таблица 3

Результаты заражения иммунных белых мышей и морских свинок экспериментальными штаммами возбудителя чумы

Штаммы <i>Y. pestis</i>	Показатели		LD ₅₀ (KOE)*		Средний срок жизни, сут	
	для белых мышей	для морских свинок	для белых мышей	для морских свинок	белые мыши	морские свинки
231(708)	1,0×10 ⁵ (2,0×10 ⁴ -6,0×10 ⁵)	5,6×10 ⁵ (1,2×10 ⁵ -1,9×10 ⁶)	5,8 (3-16)	11,0 (6-10)	5,8 (3-16)	11,0 (6-10)
231pPst ⁻	3,2×10 ⁵ (5,0×10 ⁴ -1,3×10 ⁶)	1,5×10 ⁶ (3,8×10 ⁵ -6,0×10 ⁶)	6,9 (5-18)	12,2 (7-23)	6,9 (5-18)	12,2 (7-23)
231Psb ⁻	2,5×10 ⁵ (5,8×10 ⁴ -8,7×10 ⁵)	1,0×10 ⁶ (2,6×10 ⁵ -4,0×10 ⁶)	6,2 (3-17)	11,5 (6-17)	6,2 (3-17)	11,5 (6-17)
231pFS23	1,0×10 ³ (2,0×10 ² -6,0×10 ³)	6,9×10 ⁵ (8,7×10 ⁴ -2,1×10 ⁶)	8,3 (6-30)	16,5 (8-30)	8,3 (6-30)	16,5 (8-30)
231pFra ⁻	2,1×10 ³ (4,0×10 ² -9,0×10 ³)	7,0×10 ⁵ (3,0×10 ⁵ -1,1×10 ⁶)	9,1 (7-30)	17,2 (7-30)	9,1 (7-30)	17,2 (7-30)
231Psb ⁻ pFS23	2,5×10 ³ (5,8×10 ² -9,0×10 ³)	2,5×10 ⁶ (5,8×10 ⁵ -9,0×10 ⁶)	8,6 (6-28)	17,6 (8-30)	8,6 (6-28)	17,6 (8-30)
231pPst ⁻ pFS23	2,3×10 ³ (5,8×10 ² -9,3×10 ³)	1,6×10 ⁶ (4,0×10 ⁵ -6,2×10 ⁶)	9,5 (8-30)	16,7 (7-29)	9,5 (8-30)	16,7 (7-29)
358	3,2×10 ⁵ (7,0×10 ⁴ -1,6×10 ⁶)	1,0×10 ⁶ (2,6×10 ⁵ -4,0×10 ⁶)	6,3 (3-15)	11,8 (5-21)	6,3 (3-15)	11,8 (5-21)
358pFS23	3,0×10 ² (7,3×10 ¹ -1,7×10 ³)	1,5×10 ⁶ (3,8×10 ⁵ -6,0×10 ⁶)	8,9 (6-28)	17,8 (6-30)	8,9 (6-28)	17,8 (6-30)
358pFra ⁻	2,7×10 ³ (5,2×10 ² -1,2×10 ⁴)	6,8×10 ⁵ (1,7×10 ⁵ -3,1×10 ⁶)	8,7 (7-27)	17,6 (6-30)	8,7 (7-27)	17,6 (6-30)
358pPst ⁻ pFS23	1,8×10 ³ (5,7×10 ² -8,0×10 ³)	1,7×10 ⁶ (4,2×10 ⁵ -6,4×10 ⁶)	9,3 (7-30)	18,0 (7-30)	9,3 (7-30)	18,0 (7-30)

(исключение составили продукты, детерминируемые генами плазмиды pCad, которые не изучались, т. к. мы не располагали высоковирулентными штаммами чумного микроба с повреждениями функций плазмиды кальцийзависимости, и «pH 6» антиген). Средний срок жизни иммунных животных, зараженных штаммами с фенотипом Fra⁻, также заметно увеличивался.

Таким образом, результаты проверки биологических свойств атипичных штаммов *Y. pestis*, полученных экспериментальным путем, дают основание считать направленный поиск таких культур в природных очагах чумы и их всестороннее изучение важной научно-практической задачей.

Хотя полученные результаты и не могут дать целостного представления о течении сложных эпизоотических процессов в природных условиях, они с большой долей вероятности позволяют предположить возможность участия атипичных штаммов чумного микроба в развитии инфекционного процесса, а также в формировании затяжных форм чумной инфекции в популяциях диких грызунов, имеющих значительную иммунную прослойку.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акимович В. В., Шанина Л. Н. // Вопр. микробиол. и лаб. диагн. особо опасных инф. — Саратов, 1965. — С. 54-58. — 2. Анисимов А. П., Ежов И. И., Захарова Н. М. и др. // Генет. и биохим. возбудит. особо опасных инф. — Матер. Российской науч. конф. — Волгоград, 1992. — С. 6. — 3. Анисимов П. И. // Генет. и микробиол. природно-очагов. инф. — Саратов, 1984. — С. 3-9. — 4. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. — Л., 1962. — 5. Наставление по изучению свежевыделенных штаммов возбудителя чумы. — Алма-Ата. — 1972. — 6. Пунский Е. Е., Адаменко Н. И. // Медико-географические пробл. аридной зоны. — Ашхабад, 1982. — С. 36-38. — 7. Williams J. E., Cavanaugh D. C. // Experiment. — 1983. — V. 39, N 4. — P. 408-409.