

# СПОСОБ ОТБОРА ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИ БЛИЗКИХ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS*, ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ВИРУЛЕНТНОСТИ ДЛЯ МОРСКИХ СВИНОК

Н.В. Анисимов, Т.И. Комбарова, М.Е. Платонов, С.А. Иванов, М.А. Сухова, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов

ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия

**Резюме.** Сравнительный анализ близкородственных вирулентных и авирулентных штаммов микроорганизмов на уровне геномов, транскриптомов и/или протеомов лежит в основе поиска новых факторов патогенности — потенциальных молекулярных мишеней для этиотропного лечения, вакцинопрофилактики и иммунотерапии инфекционных болезней. Целью настоящей работы была апробация способа анимализации «полевочьих» штаммов чумного микроба, авирулентных для морских свинок при подкожном заражении, позволяющего отобрать филогенетически близкие пары штаммов, которые отличаются по степени патогенности для морских свинок. Анимализацию культур *Y. pestis* проводили на самцах морских свинок четырехкратными тестикулярными пассажами со снижением инфицирующей дозы. Отсутствовала взаимосвязь между способностью вызывать генерализованный инфекционный процесс (гибель) при тестикулярном и подкожном заражении морских свинок, но при тестикулярном пассировании в культуре бактерий было возможно накопление субпопуляции, обладающей высокой вирулентностью и при подкожном заражении этого вида животных. Использованный методический подход может быть успешно применен для подбора филогенетически близких пар бактериальных штаммов, принципиально отличающихся по степени их избирательной вирулентности.

**Ключевые слова:** *Yersinia pestis*, полевочьи штаммы, избирательная вирулентность, морские свинки, анимализация, тестикулярные пассажи.

## SELECTION OF PHYLOGENETICALLY CLOSELY-RELATED *YERSINIA PESTIS* STRAINS DIFFERING IN THEIR VIRULENCE FOR GUINEA PIGS

Anisimov N.V., Kombarova T.I., Platonov M.E., Ivanov S.A., Sukhova M.A., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P.

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

**Abstract.** Genomic, transcriptome or (and) proteomic comparison of closely related virulent and avirulent microbial strains underlies the search for new pathogenicity factors, potential molecular targets for etiotropic therapy, vaccine prevention and immunotherapy of infectious diseases. This investigation was aimed in testing the ability of method of testicular animalization to select

### Адрес для переписки:

Анисимов Андрей Павлович  
142279, Россия, Московская область, п. Оболенск,  
ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии.  
Тел.: 8 (4967) 36-01-17. Факс: 8 (4967) 36-00-10.  
E-mail: a-p-anisimov@yandex.ru

### Contacts:

Andrey P. Anisimov  
142279, Russian Federation, Moscow Region, Obolensk, State  
Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology.  
Phone: +7 (4967) 36-01-17. Fax: +7 (4967) 36-00-10.  
E-mail: a-p-anisimov@yandex.ru

### Библиографическое описание:

Анисимов Н.В., Комбарова Т.И., Платонов М.Е., Иванов С.А., Сухова М.А., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Способ отбора филогенетически близких штаммов *Yersinia pestis*, отличающихся по вирулентности для морских свинок // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 4. С. 373–376. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-373-376

### Citation:

Anisimov N.V., Kombarova T.I., Platonov M.E., Ivanov S.A., Sukhova M.A., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. Selection of phylogenetically closely-related *Yersinia pestis* strains differing in their virulence for guinea pigs // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 4, pp. 373–376. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-373-376

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 14-15-00599).

phylogenetically close pairs of *Y. pestis* strains, which dramatically differ in their pathogenicity for guinea pigs, from the populations of as a rule subcutaneously avirulent for guinea pigs “vole” strains of the plague pathogen. Animalization of *Y. pestis* cultures were performed on guinea pig males by fourfold testicular passage with reducing infective dose. There was no correlation between the ability to cause generalized infectious process (death) after testicular and subcutaneous infection of guinea pigs, but testicular passages made it possible to enrich bacterial culture with a portion of microbes displaying high virulence after subcutaneous infection of this animal species. The methodical approach under study can be successfully applied for selection of pairs of phylogenetically closely related bacterial strains, dramatically differing in their degrees of selective virulence.

**Key words:** *Yersinia pestis*, vole strains, selective virulence, guinea pigs, animalization, testicular passage.

## Введение

Сравнительный анализ вирулентных и авирулентных штаммов (в идеале изогенных или хотя бы из одного клонального кластера) на уровне геномов, транскриптомов и/или протеомов лежит в основе современных подходов, направленных на изучение молекулярных механизмов патогенеза инфекционных болезней и поиск новых факторов патогенности болезнетворных микробов — потенциальных молекулярных мишеней для этиотропного лечения, вакцинопрофилактики и иммунотерапии [4]. Классической моделью при изучении взаимоотношений бактериальных патогенов с организмом хозяина является возбудитель чумы — *Yersinia pestis* [8]. Внутривидовая изменчивость привела к формированию широкого спектра внутривидовых групп (биоваров, подвидов, экотипов, плазмидоваров, генотипов и т.д.) *Y. pestis*, адаптированных к циркуляции в популяциях более 200 видов диких грызунов и отличающихся по спектру чувствительных к ним млекопитающих и по вирулентности. «Классические» штаммы чумного микроба основного подвида, циркулирующие в популяциях сурков, сусликов, песчанок, крыс, морских свинок и луговых собачек, обладают, как правило, «универсальной» вирулентностью, вызывая летальную инфекцию как у мелких грызунов, так и у людей. Штаммы же *Y. pestis*, выделенные из популяций различных видов полевок, высоковирулентны для своих основных хозяев и лабораторных мышей, но, за редким исключением, авирулентны для морских свинок и человека [9]. Незначительное число полевочьих изолятов, циркулирующих в тех же географических регионах, что и штаммы с избирательной вирулентностью, сохранили высокую вирулентность для морских свинок ( $LD_{50}$  от  $10$  до  $10^2$  КОЕ). Так, несмотря на филогенетическую близость, изоляты *Y. pestis*, выделенные из Ленинанканского горного очага, были более вирулентными для морских свинок, чем штаммы из Занзегурско-Карабахского очага [3]. Сравнение на полногеномном, транскриптомном и/или протеомном уровне филогенетически близких штаммов возбудителя чумы, принципиально отличающихся по своей вирулентности в отношении морских свинок (человека?), предоставляет возможность выявления новых потенциальных молекуляр-

ных мишеней (факторов патогенности?) для специфической профилактики и/или терапии чумы. В настоящей публикации представлен апробированный нами способ анимализации штаммов *Y. pestis*, позволяющий отобрать филогенетически близкие штаммы чумного микроба, отличающиеся по вирулентности для морских свинок.

## Материалы и методы

В работе использовали 60 штаммов *Y. pestis* subsp. *microtus* из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск», 310 беспородных белых мышей обоего пола ( $19 \pm 2$  г), разведенных в ГНЦ ПМБ, и 109 беспородных морских свинок обоего пола ( $225 \pm 25$  г) из питомника филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Солнечногорский район, п. Андреевка (Московская область). Штаммы для заражения лабораторных животных выращивали в течение 48 ч при температуре  $28^\circ\text{C}$  на агаре Хоттингера производства ФГБУН ГНЦ ПМБ. Генотипирование изолятов чумного микроба проводили как описано ранее [10].

Выбор штаммов для тестикулярной анимализации [2] проводили путем подкожного заражения четырёхсуточной культурой каждого из изолятов четырех беспородных белых мышей (по две мыши на дозы 100 и 1000 КОЕ в объеме 0,1 мл). В последующие эксперименты брали культуры, выделенные от животных, павших от меньшей дозы в наиболее ранние сроки (время наблюдения 10 сут) в группах, где погибли все четыре мыши. Тестикулярные пассажи проводили четырехкратно со снижением инфицирующей дозы после двух раундов анимализации с  $10^9$  до  $10^8$  КОЕ (в объеме 0,1 мл). Непосредственно перед тестикулярным заражением проводили анестезию 0,2% раствором «Рометара» (Bioveta, Чехия). Раствор вводили в объеме 0,5 мл подкожно, в паховую складку. Если животные не погибали в течение четырех суток, их умерщвляли. Для последующих пассажей брали культуры, выделенные из органов (мозг или селезенка), удаленных от места введения бактерий.

Оценку величин  $LD_{50}$  проводили при подкожном заражении беспородных белых мышей и морских свинок 10-кратными разведениями 28-градусных культур *Y. pestis* в изотоническом

растворе NaCl в объеме 0,1 мл на животное. Брали по четыре животных на одну дозу. Для мышей диапазон заражающих доз составил  $10^3$ –1 КОЕ, а для морских свинок —  $10^6$ –10 КОЕ. Погибших животных вскрывали и подвергали бактериологическому исследованию. За оставшимися животными наблюдали 21 день, затем умерщвляли. Вычисление величин  $LD_{50}$  проводили по методу Kärber [5].

## Результаты и обсуждение

Известно, что во время многолетнего коллекционного хранения штаммы патогенных бактерий часто утрачивают целый ряд признаков, описанных при выделении. В первую очередь, это касается снижения в популяции доли микробных клеток, сохранивших вирулентность на исходном уровне. Большинство «полевочьих» штаммов, хранящихся в «ГКПМ-Оболensk», выделены до распада СССР в природных очагах чумы, расположенных вне территории РФ [3]. Получение свежих изолятов микроорганизмов первой группы патогенности из-за рубежа практически невозможно в силу политических причин.

Показано, что при подкожном введении морским свинкам в одном шприце смеси вирулентных и авирулентных бактерий чумного микроба, при содержании в смеси первых менее 1/1000, возможно развитие так называемого «феномена переживания» Н.Н. Гинсбурга [1], при котором процесс в организме животного протекает не как инфекционный, а как вакцинальный: накопления вирулентных бактерий не происходит. В связи с этим было решено использовать методический подход, применяемый для повышения остаточной вирулентности/иммуногенности вакцинного штамма чумного микроба [2], последовательные тестикулярные пассажи микробной культуры через организм морской свинки. Гемато-тестикулярный барьер препятствует попаданию дифференцирующихся половых клеток в кровь и в лимфу, то есть развитию аутоиммунной реакции [12] и, соответственно, защищает введенные внутритестикулярно бактерии от иммунной системы хозяина, позволяя именно вирулентным клеткам размножаться с опережением, накапливаться и вызывать генерализованную инфекцию.

Предварительно вирулентность 60 коллекционных штаммов *Y. pestis* subsp. *microtus* (54 штамма bv. *caucasica* и 6 штаммов bv. *ulegeica*) оценивали на модели беспородных белых мышей, что позволило отобрать 13 высоковирулентных штаммов чумного микроба (9 — bv. *caucasica* и 4 — bv. *ulegeica*), подкожное введение которых привело к гибели в более ранние сроки всех инфицированных животных.

Анализ данных о способности штаммов чумного микроба вызывать после тестикулярного

введения генерализацию инфекции и гибель морских свинок, а также изучения тяжести патоморфологических изменений при чумной инфекции послужили основой для выбора штаммов для дальнейших исследований. У морских свинок, использованных для пассажей, наблюдали сходную патоморфологическую картину независимо от принадлежности заражающего штамма к биовару *caucasica* или *ulegeica*. У животных, павших на 1–2 сут после заражения, отмечали увеличение в размерах регионарных лимфатических узлов с геморрагической инфильтрацией; увеличение в размерах и полнокровие печени и селезенки. При гибели животных на 3–4 сут или при эвтаназии на 4 сут преобладали некротические изменения. Штаммы bv. *ulegeica* И-3189 и bv. *caucasica* С-290 после тестикулярных заражений вызывали гибель морских свинок на 1–4 сут и были отобраны как потенциально высоковирулентные. Остальные штаммы, требующие эвтаназии животных при пассировании, рассматривали в качестве авирулентных штаммов сравнения. Два штамма bv. *ulegeica*: И-2422, И-3189 и три — bv. *caucasica*: С-290, С-824, С-590 использовали для сравнительного определения вирулентности.

Величины  $LD_{50}$  для всех штаммов при подкожном заражении мышей не превышали 10 КОЕ. Для морских свинок оказался вирулентным только штамм bv. *ulegeica* И-3189 ( $LD_{50} = 68$  (17–271) КОЕ). Величины  $LD_{50}$  всех остальных штаммов (И-2422, С-290, С-824, С-590), включая субкультуру штамма И-3189, взятую до тестикулярных пассажей, превышали максимальную из использованных для подкожного заражения морских свинок дозу —  $10^6$  КОЕ. Таким образом, отсутствовала прямая зависимость между способностью вызывать генерализованный инфекционный процесс (гибель) при тестикулярном и подкожном заражении морских свинок, но при тестикулярном пассировании в культуре бактерий было возможно накопление субпопуляции, обладающей высокой вирулентностью и при подкожном заражении этого вида животных.

Использованный методический подход, заключающийся в анимализации путем последовательных тестикулярных пассажей, как правило, авирулентных для морских свинок при подкожном заражении «полевочьих» штаммов чумного микроба, может быть успешно применен для дифференциации бактериальных культур чумного микроба по степени их избирательной вирулентности. Отобранные в этих экспериментах филогенетически близкие пары штаммов *Y. pestis*, отличающихся по степени патогенности для морских свинок, будут подвергнуты полногеномному секвенсу и протекционному анализу с целью идентификации факторов избирательной вирулентности чумного микроба.

## Список литературы/References

1. Гинсбург Н.Н. Живые вакцины. История, элементы теории, практика. М.: Медицина, 1969. С. 304–313. [Ginsburg N.N., Zhivye vaksiny. Istoriya, elementi teorii, praktika [Live vaccines. History, elements of theory, practice]. Moscow: Meditsina, 1969, pp. 304–313].
2. Патент RU № 2510825. Способ получения препарата на основе вакцинного штамма чумного микроба: 2012. Опубл. 10.04.2014, Бюл. № 10. [Patent RU #2510825. Sposob polucheniya preparata na osnove vaksinnogo shtamma chumnogo mikroba [Method of obtaining preparation based on vaccine strain of plague microbe]: 2012, Publ. 10.04.2014, Bull. no. 10].
3. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2004, vol. 17, pp. 434–464.
4. Ellison D.W., Clark T.R., Sturdevant D.E., Virtaneva K., Porcella S.F., Hackstadt T. Genomic comparison of virulent *Rickettsia rickettsii* Sheila Smith and avirulent *Rickettsia rickettsii* Iowa. *Infect. Immun.*, vol. 76, pp. 542–550.
5. Finney D.J. Statistical Method in Biological Assay. 3<sup>rd</sup> ed. Charles Griffin, London, 1978.
6. Johnson T.J., Abraham J.E., Hunter S.S., Hauglund M., Tatum F.M., Maheswaran S.K., Briggs R.E. Comparative genome analysis of an avirulent and two virulent strains of avian *Pasteurella multocida* reveals candidate genes involved in fitness and pathogenicity. *BMC Microbiol.*, 2013, vol. 13:106. doi: 10.1186/1471-2180-13-106
7. Niikura M., Ono E., Yanagawa R. Molecular comparison of antigens and proteins of virulent and avirulent clones of *Leptospira interrogans* serovar copenhageni, strain Shibaura. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. A.*, 1987, vol. 266, pp. 453–462.
8. Perry R.D., Fetherston J.D. *Yersinia pestis* — etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1997, vol. 10, pp. 35–66.
9. Platonov M.E., Evseeva V.V., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. Molecular typing of *Yersinia pestis*. *Mol. Gen. Microbiol. Virol.*, 2013, vol. 28, pp. 41–45.
10. Platonov M.E., Evseeva V.V., Svetoch T.E., Efremenko D.V., Kuznetsova I.V., Dentovskaya S.V., Kulichenko A.N., Anisimov A.P. Phylogeography of *Yersinia pestis* vole strains isolated from natural foci of the Caucasus and South Caucasus. *Mol. Gen. Microbiol. Virol.*, 2012, vol. 27, pp. 108–111.
11. Uda A., Sekizuka T., Tanabayashi K., Fujita O., Kuroda M., Hotta A., Sugiura N., Sharma N., Morikawa S., Yamada A. Role of pathogenicity determinant protein C (PdpC) in determining the virulence of the *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* SCHU. *PLoS One*, 2014, vol. 9, e89075.
12. Zhao S., Zhu W., Xue S., Han D. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cell. Mol. Immunol.*, 2014, vol. 11, pp. 428–437. doi: 10.1038/cmi.2014.38

## Авторы:

**Анисимов Н.В.**, аспирант лаборатории сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская область, Россия;  
**Комбарова Т.И.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская область, Россия;  
**Платонов М.Е.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская область, Россия;  
**Иванов С.А.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская область, Россия;  
**Сухова М.А.**, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии туляремии отдела особо опасных инфекций ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская область, Россия;  
**Дентовская С.В.**, д.м.н., зав. лабораторией микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская область, Россия;  
**Анисимов А.П.**, д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская область, Россия.

## Authors:

**Anisimov N.V.**, PhD Candidate, Laboratory of Antrax, Department of Especially Dangerous Infectious Diseases, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;  
**Kombarova T.I.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for Biological Testing, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;  
**Platonov M.E.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for Plague Microbiology, Department of Especially Dangerous Infectious Diseases, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;  
**Ivanov S.A.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory for Plague Microbiology, Department of Especially Dangerous Infectious Diseases, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;  
**Sukhova M.A.**, PhD Candidate, Junior Researcher, Laboratory for Tularemia Microbiology, Department of Especially Dangerous Infectious Diseases, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;  
**Dentovskaya S.V.**, PhD, MD (Medicine), Head of Laboratory for Plague Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;  
**Anisimov A.P.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Science, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation.