

Л.П.Базанова, Е.Г.Токмакова, Г.А.Воронова, С.В.Балахонов, Т.И.Иннокентьева

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОТНОШЕНИЙ БЛОХИ *CITELLOPHILUS TESQUORUM ALTAICUS* (IOFF, 1936) И *YERSINIA PESTIS* С РАЗЛИЧНЫМ ПЛАЗМИДНЫМ СОСТАВОМ

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», Иркутск, Российская Федерация

Цель исследований. Изучение в эксперименте влияния штаммов *Yersinia pestis* с различным плазмидным составом на алиментарную активность и смертность *Citellophilus tesquorum altaicus*, частоту и динамику формирования биопленки в их организме. **Материалы и методы.** В опытах с *C. tesquorum altaicus* использованы штаммы: вирулентные трехплазмидный И-3230, изолированный в Монголии, и референтный для Тувинского очага И-2638, имеющий четыре плазмиды (pYT, pYV, pYP, pTP 33), а также селекционированный от него авирулентный изогенный клон И-3480, утративший две плазмиды (pYV, pYP). **Результаты и выводы.** Установлено, что штаммы И-2638 и И-3480, несущие плазмиду pTP33, более активно формировали биопленку в организме блох, а смертность была выше среди насекомых, инфицированных штаммом И-3230. Четырехплазмидный штамм И-2638 по всем исследуемым показателям превосходил трехплазмидный И-3230 и двухплазмидный И-3480, что может свидетельствовать о коадаптации возбудителя чумы и *C. tesquorum altaicus* из Тувинского очага и возможности функциональной роли плазмиды pTP33 в усилении формирования биопленки *in vivo*.

Ключевые слова: блоха *Citellophilus tesquorum altaicus*, *Yersinia pestis*, плазмиды, биопленка *in vivo*.

Корреспондирующий автор: Базанова Любовь Петровна, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

L.P.Bazanova, E.G.Tokmakova, G.A.Voronova, S.V.Balakhonov, T.I.Innokent'eva

Peculiarities of Interaction between *Citellophilus tesquorum altaicus* (Ioff, 1936) Flea and *Yersinia pestis* with Various Plasmid Composition

Irkutsk Research Anti-Plague Institute, Irkutsk, Russian Federation

Objective of the study is *in vitro* investigation of mutual relations between *Citellophilus tesquorum altaicus* and *Yersinia pestis* with various plasmid composition: influence of the strain on flea alimentary activity and mortality rate, frequency and dynamics of biofilm formation. **Materials and methods.** *C. tesquorum altaicus* were infected by three *Yersinia pestis* strains: virulent triple-plasmid I-3230 isolated in Mongolia, referential for the Tuva focus I-2638 carrying four plasmids (pYT, pYV, pYP, pTP 33) and also selected from it avirulent isogenic clone I-3480 that lost two plasmids (pYV, pYP). Peculiarities of interaction between fleas and *Y. pestis* strains were estimated through the lens of specimens with «conglomerates» and «blocks» for feeding, the period from infection prior to the beginning of conglomerates' formation, alimentary activity, and mortality rate of the infected fleas. **Results and conclusions.** It was revealed that alimentary activity of the infected insects was higher than that of the control group, and the highest – in fleas infected with I-2638 strain. Greater numbers of dead fleas at feeding was noted in specimens inoculated with I-3230 strain. Predominant significance of I-2638 strain was established in *C. tesquorum altaicus* biofilm formation both as «conglomerates» and «blocks». I-3480 strain also formed the conglomerates in fleas more actively than I-3230 lacking pTP33 plasmid. Thus, four-plasmid I-2638 strain surpassed triple-plasmid I-3230 and two-plasmid I-3480 strains in reference to all tested indicators except flea mortality rates. It may testify to co-adaptation of *Y. pestis* and *C. tesquorum altaicus* from the Tuva plague focus and to the possibility of a pTP33 functional role in enhancement of a biofilm formation *in vivo*.

Key words: *Citellophilus tesquorum altaicus* flea, *Yersinia pestis*, plasmid, *in vivo* biofilm.

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

Corresponding author: Lubov P. Bazanova, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Citation: Bazanova L.P., Tokmakova E.G., Voronova G.A., Balakhonov S.V., Innokent'eva T.I. Peculiarities of Interaction between *Citellophilus tesquorum altaicus* (Ioff, 1936) Flea and *Yersinia pestis* with Various Plasmid Composition. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:41–44. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-41-44

Специфичная блоха длиннохвостого суслика (*Spermophilus undulatus*) – *Citellophilus tesquorum altaicus* (Ioff, 1936) – является не только основным переносчиком возбудителя чумы в Тувинском природном очаге во время активизации эпизоотического процесса, но и его хранителем в межэпизоотический сезон [2, 3]. Циркулирующий в очаге возбудитель по своим морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам относится к основному подвиду *Yersinia pestis* subsp. *pestis* и имеет высокую

вирулентность [2]. Уникальной особенностью тувинских штаммов является наличие в геноме дополнительной четвертой плазмиды pTP33 с молекулярной массой 22 МДа (~33 тыс. п.н.). Полная нуклеотидная последовательность четвертой маркерной плазмиды, специфической для тувинских штаммов, определена, но ее функциональная роль только предполагается [1, 6]. Значение отдельных плазмид, детерминирующих основные факторы вирулентности возбудителя чумы для его существования в блохе-

переносчике, оценивалось на *Xenopsylla cheopis* [4, 8] и *Frontopsylla luculenta* [7].

Цель данной работы – изучить в эксперименте особенности взаимоотношений *C. tesquorum altaicus* и *Y. pestis* с различным плазмидным составом, оценить влияние штаммов на алиментарную активность, смертность блох и динамику формирования биопленки.

Материалы и методы

Опыты проведены на базе Иркутского научно-исследовательского противочумного института с лабораторной культурой блох *C. tesquorum altaicus*, началом которой послужили насекомые из Каргинской популяции Тувинского природного очага чумы. Эктопаразитов инфицировали тремя штаммами *Y. pestis*: вирулентными трехплазмидным штаммом И-3230, изолированным в Монголии (Хэнтейский аймак, Омнодэлгэр сомон), и референтным для Тувинского очага штаммом И-2638, имеющим четыре плазмиды (pYT, pYV, pYP, pTP 33), а также селекционированным от него авирулентным изогенным клоном И-3480, утратившим две плазмиды (pYV, pYP). Заражение, содержание и кормление инфицированных блох проведено аналогично опыту с *F. luculenta* [7]. Исходная зараженность насекомых для штаммов И-3230 и И-3480 составила 90 %, для штамма И-2638 – 100 %. Опыт продолжительностью 37 дней поставлен в осенне-зимний период. Проведено по 8 подкормок инфицированных и незараженных (контрольная группа) эктопаразитов, использована 441 блоха (272 ♀ и 169 ♂). Особенности взаимоотношений блох со штаммами возбудителя оценивали по доле особей с бактериальными «глыбками», полными и частичными блоками за подкормку, периоду от заражающего кормления до начала их формирования. Алиментарную активность определяли по доле пивших имаго от числа живых, а смертность – по доле мертвых от общего их количества при каждой подкормке. Статистическую обработку провели общепринятыми методами [5] с применением программы «Excel». Влияние различных факторов (штамм *Y. pestis*, пол блох) на изучаемые показатели оценивали с помощью одно- и двухфакторного дисперсионных анализов.

Результаты и обсуждение

Однофакторный дисперсионный анализ показал влияние зараженности блох возбудителем чумы на активность их кровососания ($F=4,84$; $P<0,01$). Доля пивших за подкормку инфицированных насекомых во всех трех случаях была выше, чем в контрольной группе, при этом – наиболее высокой у эктопаразитов, зараженных штаммом И-2638 (табл. 1).

Достоверного влияния фактора «штамм» на смертность инфицированных насекомых не выявлено. Однако у зараженных штаммом И-3230 отмечали большее число погибших за подкормку особей, как среди самок, так и среди самцов (табл. 1). При этом влияние фактора «пол» на исследуемый показатель значительно ($F=13,89$; $P<0,001$).

Среди блох, инфицированных штаммом И-3230, после пятой подкормки (16-е сутки) отмечены одна самка с полным и две с частичным «блоком». Первые особи с «глыбками» как среди самок, так и среди самцов отмечены после второй подкормки (5-е сутки). Доля заблокированных блох составила 2,3 % от взятых в опыт.

Среди самок, инфицированных штаммом И-2638, особи с частичным и полным «блоками» зарегистрированы после пятой (17-е сутки), шестой (21), седьмой (25) и восьмой (28) подкормок. Один самец с полностью сформировавшимся «блоком» отмечен после пятой подкормки (17-е сутки). Первые особи с «глыбками» выявлены среди самок и самцов после первой (4-е сутки) подкормки и далее таких особей отмечали во все последующие. Всего доля особей с полным и частичным «блоками» составила 11,6 % от взятых в опыт блох.

В группе блох, инфицированных штаммом И-3480, с полным «блоком» отмечены одна самка после третьей подкормки (8-е сутки) и самец после пятой подкормки (16-е сутки). С частичным «блоком» выявлена одна самка после восьмой подкормки (26-е сутки). Всего доля особей с полными и частичными «блоками» составила 1,9 % от числа взятых в опыт. Самки и самцы с «глыбками» отмечены при первой подкормке, на вторые сутки после заражения.

Различия в блокообразовании между штаммами значимы, если учитывать общее количество блох с полными и частичными «блоками». Так, четырех-

Таблица 1

Влияние штаммов чумного микроба с различным плазмидным составом на алиментарную активность и смертность блох *C. tesquorum altaicus*

Штамм чумного микроба	Самки			Самцы		
	Всего в опыте	Доля особей за подкормку, %		Всего в опыте	Доля особей за подкормку, %	
		пивших	погибших		пивших	погибших
И-3230	80	92,9±1,99	6,9±3,41	48	92,3±3,05	21,5±6,52
И-2638	108	95,1±2,03	4,2±1,01	56	98,0±1,32	10,7±2,70
И-3480	84	92,3±1,35	4,6±1,47	65	94,9±2,05	9,4±1,77
Контроль	62	87,0±3,86	4,7±0,99	40	88,3±2,61	10,6±2,14

Таблица 2

Влияние штамма чумного микроба и пола блохи на формирование конгломератов в организме *C. tesquorum altaicus*. Двухфакторный дисперсионный анализ

Источник вариации	df	MS	F
Пол	1	141,70	1,06
Штамм	2	6883,21	51,62**
Взаимодействие	2	776,16	5,82*
Случайная	42	133,34	

Примечание. *P<0,01; **P<0,001

плазмидный референтный штамм И-2638 по частоте образования «блоков» у *C. tesquorum altaicus* превосходил как трехплазмидный И-3230 (t=2,97; P<0,01), так и двухплазмидный И-3480 (t=3,14; P<0,001).

В формировании биопленки (конгломератов всех визуализируемых форм) у *C. tesquorum altaicus* выявлено преобладающее значение четырехплазмидного штамма И-2638. Среди блох, инфицированных штаммом И-2638, доля содержащих биопленку особей в среднем за подкормку составила (46,8±5,35) %. Данный показатель у селекционированного от него штамма И-3480 также выше (22,6±3,51), чем у И-3230 (8,2±1,95), не имеющего плазмиды рТР33. Кроме того, особи с «глыбками» среди блох, инфицированных штаммами И-2638 и И-3480, выявлены уже на вторые сутки, а среди зараженных трехплазмидным штаммом И-3230 только на пятые сутки после заражающего кормления.

Двухфакторный дисперсионный анализ показал достоверное влияние фактора «штамм» на формирование биопленки в организме *C. tesquorum altaicus* (табл. 2). Установлено взаимодействие факторов «пол блохи» и «штамм». Так, штамм И-3230 более активно формировал конгломераты в организме самок, а штаммы И-2638 и И-3480 – в организме самцов.

Выявлены половые различия в динамике формирования биопленки чумным микробом в организме *C. tesquorum altaicus* по доле особей с конгломератами за подкормку и максимумах их выявления (рисунок). У зараженных трехплазмидным штаммом И-3230 самцов формирование «глыбок» отмечали только после второй и третьей подкормок, а у самок – начиная со второй подкормки до конца опыта, причем с возрастанием доли таких особей. У самцов,

инфицированных штаммами И-2638 и 3480, наблюдалась примерно аналогичная динамика образования конгломератов, в то время как у самок она была прямо противоположна. Так, если доля самок, зараженных штаммом И-2638, со сформировавшимися «глыбками» к концу опыта шла на снижение, то среди зараженных штаммом И-3480 доля таких особей увеличивалась.

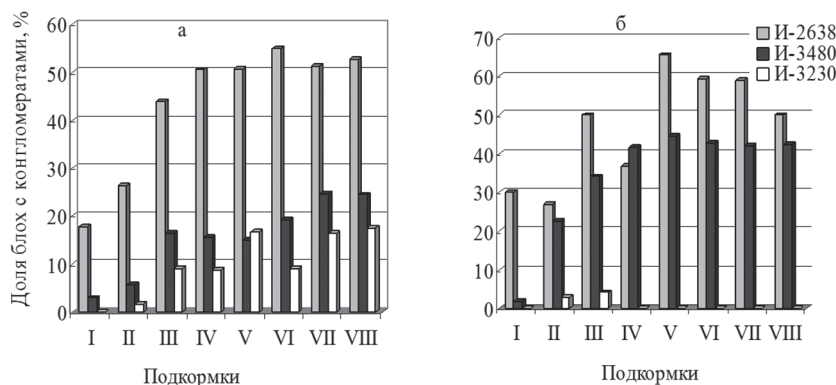
Блохи, инфицированные штаммом И-2638, осуществили трансмиссию возбудителя чумы пяти зверькам из восьми. В одном случае передача зарегистрирована бактериологическим методом (на 6-е сутки после заражения блох), в четырех других – серологическим. Эктопаразиты, зараженные штаммами И-3480 и И-3230, передали возбудителя в одном случае из восьми (И-3480 на 12-е сутки, И-3230 на 16-е сутки), что выявлено серологическим методом.

Таким образом, в результате проведенных опытов установлено, во-первых, существенное влияние зараженности эктопаразитов *Y. pestis* на активность их кровососания. Доля пивших за подкормку насекомых была выше во всех трех случаях среди инфицированных блох, причем наиболее высокой у эктопаразитов, зараженных четырехплазмидным штаммом И-2638.

Во-вторых, выявлены значимые различия между штаммами в блокообразовании. Так, референтный для Тувинского природного очага четырехплазмидный штамм И-2638 по частоте формирования «блоков» у *C. tesquorum altaicus*, превосходил как трехплазмидный И-3230, так и двухплазмидный И-3480, и блохи, инфицированные этим штаммом, чаще осуществляли передачу возбудителя.

В-третьих, четырехплазмидный штамм И-2638 формировал биопленку (конгломераты всех форм) в организме блох, происходящих от эктопаразитов с территории этого же очага, почти в пять раз, а селекционированный от него двухплазмидный штамм И-3480 в три раза чаще, чем трехплазмидный И-3230, и в более ранние сроки. В предыдущем исследовании отмечено, что штаммы, имеющие плазмиду рТР33, по способности формировать биопленку в среднем более, чем в пять раз превосходили трехплазмидный штамм И-3230 и в организме блох *F. luculenta* [6].

Ранее наблюдали ускоренную гибель блох *F. luculenta* из Забайкальского природного очага



Динамика формирования биопленки (конгломератов) возбудителя чумы с различным плазмидным составом в организме блох *C. tesquorum altaicus*: а – самки; б – самцы

чумы, зараженных вирулентным четырехплазмидным штаммом И-2638 [6]. В то время как в анализируемом эксперименте более высокая смертность *C. tesquorum altaicus* имела место в группе особей, инфицированных штаммом И-3230 из Монголии. Приведенные факты могут свидетельствовать о коадаптации возбудителя чумы и блох *C. tesquorum altaicus* из Тувинского природного очага и возможности функциональной роли плазмиды rTP33 в усилении формирования биопленки *in vivo*.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афанасьев М.В., Балахонов С.В., Токмакова Е.Г., Половинкина В.С., Сидорова Е.А., Синьков В.В. Анализ нуклеотидной последовательности плазмиды rTP33 *Yersinia pestis* из Тувинского природного очага чумы. *Генетика*. 2016; 9:1012–20.
2. Балахонов С.В., Вержуцкий Д.Б., Корзун В.М., Вершинин Е.А., Немченко Л.С., Чипанин Е.В., Шестопалов М.Ю., Иннокентьева Т.И., Попков А.Ф., Михайлов Е.П., Ооржак Л.М., Вахрушева З.П., Агапов В.А. Современное состояние природных очагов чумы Сибири. *Журн. инф. патол.* 2009; 3(16):16–20.
3. Вержуцкий Д.Б., Ткаченко В.А., Попов В.В., Колосов В.М. О сохранении возбудителя чумы в Тувинском природном очаге. *Журн. инф. патол.* 2003; 4(10):31–2.
4. Воронова Г.А., Токмакова Е.Г., Балахонов С.В., Базанова Л.П. Взаимоотношения штаммов чумного микроба с различным плазмидным составом и блох *Xenopsylla cheopis* (Roths, 1903). *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* 2011; 2:15–8.
5. Елисеєва И.И., Юзбашев М.М. Общая теория статистики. М.: Финансы и статистика; 2006. 656 с.
6. Оглодин Е.Г., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Одинокоев Г.Н., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Структурно-функциональный анализ криптических плазмид штаммов *Yersinia pestis* из двух природных очагов чумы России. *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 4:82–5.
7. Токмакова Е.Г., Базанова Л.П., Воронова Г.А., Балахонов С.В. Особенности взаимоотношений блохи *Frontopsylla luculenta luculenta* (Jordan et Rothschild, 1923) и возбудителя чумы с различным плазмидным составом. *Мед. паразитол. и паразитарн.*

бол. 2016; 1:38–41.

8. Hinnebusch B.J., Ficher E.R., Schwan T.G. Evaluation of the role *Yersinia pestis* plasminogen activator and other plasmid-encoded factors in temperature-dependent blockage of the flea. *J. Infect. Dis.* 1998; 178(5):1406–15.

References

1. Afanas'ev M.V., Balakhonov S.V., Tokmakova E.G., Polovinkina V.S., Sidorova E.A., Sin'kov V.V. [Analysis of nucleotide sequence of *Yersinia pestis* rTP33 plasmid from Tuva natural plague focus]. *Genetika*. 2016; 9:1012–20.
2. Balakhonov S.V., Verzhutsky D.B., Korzun V.M., Vershinin E.A., Nemchenko L.S., Chipanin E.V., Shestopalov M.Yu., Innokent'eva T.I., Popkov A.F., Mikhailov E.P., Oorzhak L.M., Vakhrusheva Z.P., Agapov V.A. [Present status of natural plague foci in Siberia]. *Zh. Infek. Patol.* 2009; 3(16):16–20.
3. Verzhutsky D.B., Tkachenko V.A., Popov V.V., Kolosov V.M. [Concerning plague agent persistence in Tuva natural focus]. *Zh. Infek. Patol.* 2003; 4(10):31–2.
4. Voronova G.A., Tokmakova E.G., Balakhonov S.V., Bazanova L.P. [Interaction between *Yersinia pestis* strains with different plasmid structure and *Xenopsylla cheopis* fleas]. *Med. Parazitol. i Parazitarn. Bol.* 2011; 2:15–8.
5. Eliseeva I.I., Yuzbashev M.M. [General Theory of Statistics]. M.: Finansy i statistika; 2006. 656 p.
6. Oglodin E.G., Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Odiokov G.N., Guseva N.P., Kutyrev V.V. [Structural-functional analysis of cryptic plasmids in *Yersinia pestis* strains from two natural plague foci of Russia]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; 4:82–5.
7. Tokmakova E.G., Bazanova L.P., Voronova G.A., Balakhonov S.V. [Peculiarities of interaction between *Frontopsylla luculenta luculenta* (Jordan et Rothschild, 1923) and *Yersinia pestis* with different plasmid structure]. *Med. Parazitol. i Parazitarn. Bol.* 2016; 1:38–41.
8. Hinnebusch B.J., Ficher E.R., Schwan T.G. Evaluation of the role *Yersinia pestis* plasminogen activator and other plasmid-encoded factors in temperature-dependent blockage of the flea. *J. Infect. Dis.* 1998; 178(5):1406–15.

Authors:

Bazanova L.P., Tokmakova E.G., Voronova G.A., Balakhonov S.V., Innokent'eva T.I. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Об авторах:

Базанова Л.П., Токмакова Е.Г., Воронова Г.А., Балахонов С.В., Иннокентьева Т.И. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Поступила 24.04.17.