

Моделирование бруцеллеза у мышей в условиях лаборатории уровня биологической безопасности 2

В.И.Дятлова, Т.В.Гапельченкова, В.А.Казаков, С.В.Дентовская

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Бруцеллез – это зоонозное заболевание, вызываемое патогенными штаммами бруцелл, представляющее собой серьезную угрозу как для сельского хозяйства, так и для общественного здравоохранения. Наиболее часто в качестве модели бруцеллеза используются мыши. Они не являются естественными хозяевами бруцелл, и развитие заболевания у них зависит от вирулентности, заражающей дозы штамма, способа инокуляции, а также от породы, возраста, пола и физиологического состояния животных. В статье представлена разработка мышеской модели бруцеллеза на основе вакцинового штамма *Brucella abortus* 19BA, применимая для работы в условиях лаборатории уровня биологической безопасности 2. Мы изучили динамику течения инфекции, фиксируя изменения веса, патогистологической картины и бактериальной обсемененности паренхиматозных органов у мышей линии BALB/c на протяжении 56 дней. Предложенная мышеская модель является эффективной, относительно безопасной и может быть использована для рутинного тестирования противобруцеллезных профилактических и лечебных препаратов на ранних этапах их разработки.

Ключевые слова: бруцеллез, мыши, гистология, бактериальная обсемененность, биобезопасность, вакцины

Для цитирования: Дятлова В.И., Гапельченкова Т.В., Казаков В.А., Дентовская С.В. Моделирование бруцеллеза у мышей в условиях лаборатории уровня биологической безопасности 2. Бактериология. 2025; 10(4): 47–51. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-4-47-51

Simulation of brucellosis in a mouse model in the biosafety level-2 laboratory

V.I.Dyatlova, T.V.Gapelchenkova, V.A.Kazakov, S.V.Dentovskaya

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

Brucellosis is a zoonotic disease caused by pathogenic strains of *Brucella*, posing a serious threat to both agriculture and public health. Mice are frequently used as a model for brucellosis research. They are not natural hosts for *Brucella*, and disease development depends on factors such as strain virulence, inoculating dose, method of inoculation, breed, age, sex, and physiological status of the animals.

This article presents the development of a mouse model for brucellosis using the vaccine strain *Brucella abortus* 19BA, suitable for use in biosafety level-2 laboratory. We studied the dynamics of infection by monitoring changes in weight, pathological histology, and bacterial contamination of the spleen and liver of BALB/c mice over 56 days.

The proposed mouse model is effective, relatively safe, and can be used for routine testing of anti-brucellosis prophylactic and therapeutic agents during early development stages.

Key words: brucellosis, mice, histology, bacterial contamination, biosafety, vaccines

For citation: Dyatlova V.I., Gapelchenkova T.V., Kazakov V.A., Dentovskaya S.V. Simulation of brucellosis in a mouse model in the biosafety level-2 laboratory. Bacteriology. 2025; 10(4): 47–51. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-4-47-51

Для корреспонденции:

Дятлова Варвара Ивановна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0003

Статья поступила 30.05.2025, принята к печати 25.12.2025

For correspondence:

Varvara I. Dyatlova, MD, PhD, Senior Researcher, Plague Microbiology Laboratory, Department of Especially Dangerous Infections, FBIS State Research center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

The article was received 30.05.2025, accepted for publication 25.12.2025

Бруцеллы наиболее часто используются для моделирования бруцеллеза [1–4]. Хотя мышиная модель широко применяется для изучения вирулентности штаммов бруцелл, а в последнее время и для оценки защитной эффективности новых вакцин, нет четкого консенсуса относительно условий эксперимента (например, штаммов мышей, доз, способов введения заражающих штаммов и времени заражения) [5].

Штамм *Brucella abortus* S19 был выделен Buck из молока коровы в США и аттенуирован путем пассажей при комнатной температуре в течение года [6–8]. Вакцина S19, разработанная на основе живого аттенуированного штамма *B. abortus* S19, использовалась во всем мире с момента ее внедрения в 1941 г. до 1990-х гг. [6]. В настоящее время ее все еще используют для специфической профилактики бруцеллеза в некоторых развивающихся странах [7, 8].

Поскольку штамм *B. abortus* S19 возник в результате спонтанной мутации, точный молекулярный механизм, вызвавший утрату вирулентности, до конца не изучен. Было показано, что штамм *B. abortus* S19 несет делецию протяженностью 702 п.н. между генами *eryC* и *eryD*, участвующими в катаболизме эритрита [9]. Однако делеции в генах катаболизма эритрита сами по себе не могут полностью объяснить снижение вирулентности штамма [10, 11]. Jacob, Curtiss показали, что аттенуированный штамм *B. abortus* S19 способен персистировать в организме мышей на протяжении минимум 8 нед. после внутрибрюшинного, подкожного и внутривенного введения [12].

Вариант аттенуированного штамма *B. abortus* S19, имевшийся в лаборатории бруцеллеза Института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, оказался лабильным, при рассеве культуры на агаре диссоциировал с образованием колоний R-формы. Путем селекции была получена стойкая иммуногенная популяция S-формы колоний культуры штамма *B. abortus* S19, названная в отличие от исходной *B. abortus* 19BA. Остаточная вирулентность штамма *B. abortus* 19BA была изучена Вершиловой в экспериментах на морских свинках и белых мышах, и было показано, что развитие иммунитета против бруцеллеза при вакцинации данным штаммом проходит две фазы: нестеп-

рильную и стерильную [13]. В нашей работе мы использовали штамм *B. abortus* 19BA для моделирования бруцеллезной инфекции у мышей.

Цель настоящей работы состояла в моделировании бруцеллезной инфекции у мышей линии BALB/c после введения вакцинного штамма *B. abortus* 19BA для оценки возможности использования вакцинного штамма в качестве заражающего при тестировании протективности противобруцеллезных вакцин.

Материалы и методы

Штаммы бактерий. Вакциненный штамм *B. abortus* 19BA (ГКПМ-Оболенск) выращивали на плотной питательной среде Бруцеллагар (БА) (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), pH 7,2 ± 0,2, при повышенном содержании углекислого газа (5%) в течение 48 ч при температуре 37 ± 1°C. Все работы осуществляли в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил и норм САНПИН 3.3686-21 («Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 №4).

Лабораторные животные. С полученными из филиала «Апрелевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России самками мышей линии BALB/c весом 17,0 ± 1,0 г обращались в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». Протокол экспериментов с животными одобрен комитетом по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ (ВП-2024/7 от 06.11.2024).

Заражение животных. Животным экспериментальной группы внутрибрюшинно вводили штамм *B. abortus* 19BA в дозе 10⁶ КОЕ на мышь. Контрольная группа состояла из интактных неиммунизированных животных.

Эвтаназия и вскрытие лабораторных животных. Эвтаназию проводили путем ингаляции CO₂ на 7, 14, 21, 28 и 56-е сутки после введения *B. abortus* 19BA. Вскрывали по 3 мыши и определяли обсемененность органов (селезенка, печень). Также отбирали образцы органов для гистологиче-

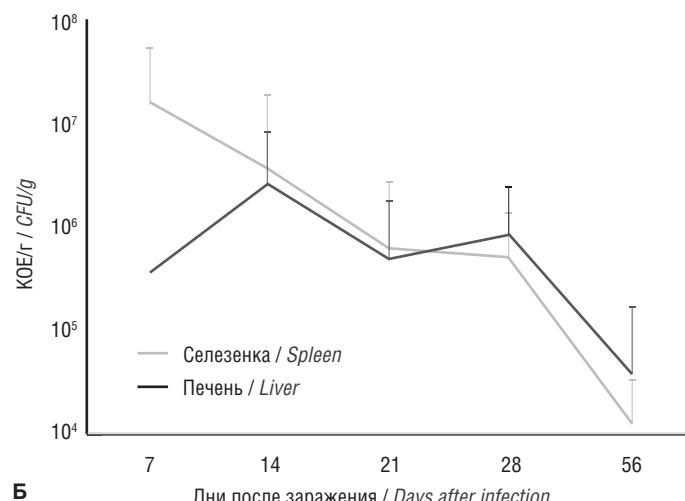


Рис. 1. Средние значения веса (A) и показателя обсемененности селезенки и печени (Б) мышей линии BALB/c после внутрибрюшинного введения штамма *B. abortus* 19BA ($m \pm CI$). ** $p < 0,01$.

Fig. 1. Average values of weight (A) and spleen and liver contamination index (B) of BALB/c mice after intraperitoneal administration of *B. abortus* strain 19BA ($m \pm CI$). ** $p < 0,01$.

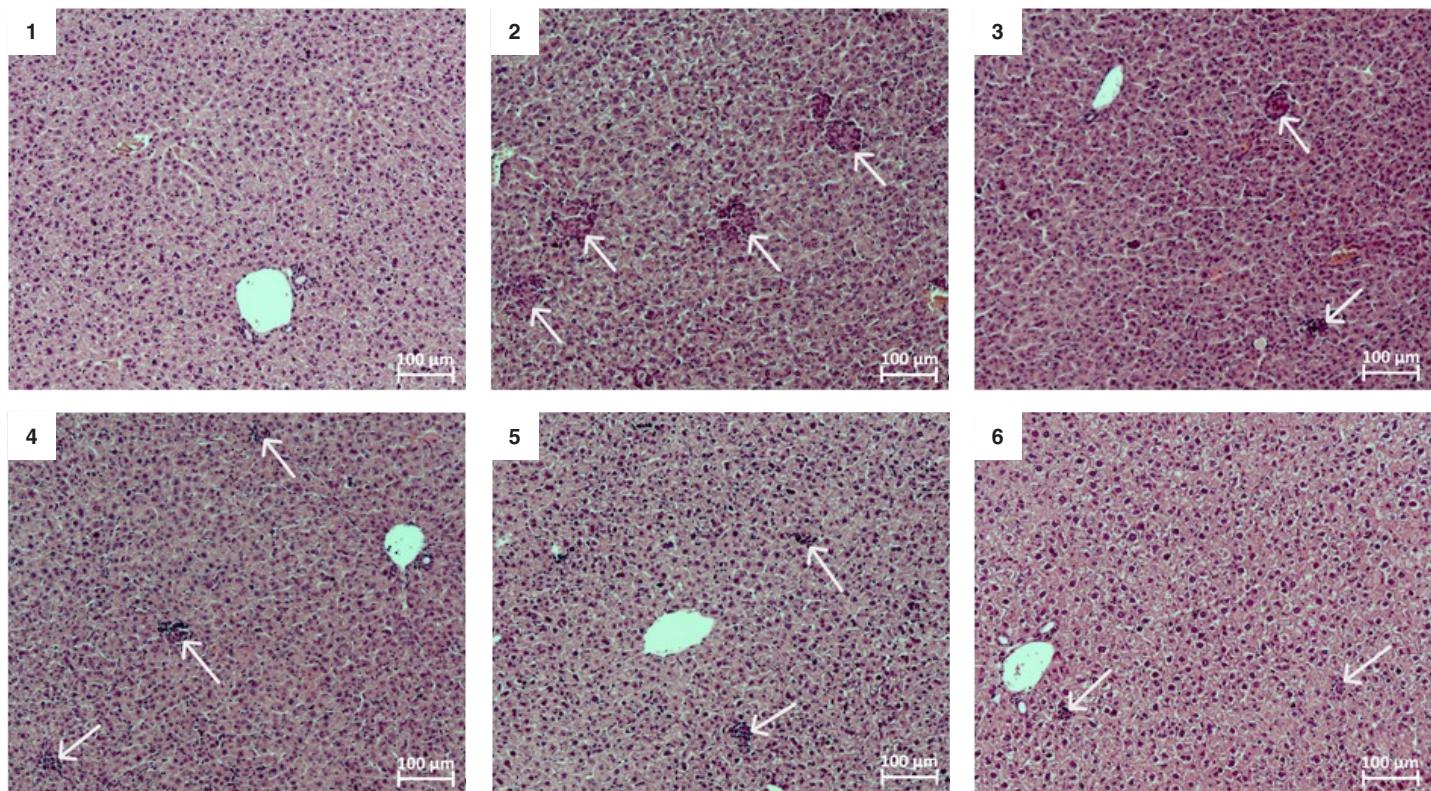


Рис. 2. Гистологические препараты печени мышей: 1 – фрагмент интактного животного, 2 – через 7 дней, 3 – 14 дней, 4 – 21 день, 5 – 28 дней, 6 – 56 дней после заражения. Белыми стрелками показаны микрогранулемы. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 100$.

Fig. 2. Histological preparations of mouse liver: 1 – fragment of an intact animal, 2 – 7 days, 3 – 14 days, 4 – 21 days, 5 – 28 days, 6 – 56 days after infection. White arrows indicate microgranulomas. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 100$.

ского исследования. Полученные органы после определения веса растирали в физиологическом растворе в асептических условиях, серийные разведения полученных супензий высевали на чашки с БА, с последующим пересчетом числа колоний на массу органа (КОЕ/г).

Гистология. Образцы печени и селезенки зараженных мышей фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина, подвергали дальнейшей вырезке и промывке в водопроводной воде, дегидратировали в этиловых спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм, окрашенные гематоксилином и эозином, изучали с помощью обычной световой микроскопии на микроскопе AxioScope.A1 (Carl Zeiss, Германия). Микрофотографии гистологических препаратов получали с помощью камеры высокого разрешения AxioCam 305 color (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения ZEN 2.6 lite (Carl Zeiss, Германия).

Статистические методы. Статистический анализ проводили, используя Graph Pad Prism 8 (GraphPad Software, США), в частности однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$. 95%-е доверительные интервалы вирулентного штамма для иммунизированных и неиммунизированных животных расчитывали с использованием метода Кербера [14].

Результаты исследования и их обсуждение

Бруцеллы не вызывают гибели лабораторных животных, поэтому бактериальная нагрузка и гистопатологиче-

ские изменения в селезенке и других органах являются основными показателями протекания бруцеллезной инфекции [1–4].

Для определения вирулентности аттенуированного штамма *B. abortus* 19ВА провели внутрибрюшинное заражение мышей линии BALB/c в дозе 10^6 КОЕ/мышь. Контрольных (здоровых) и инфицированных мышей ежедневно осматривали и взвешивали. Заражение приводило к возникновению признаков заболевания и выраженному снижению массы тела на 2–14-е сутки после введения вакцинного штамма, восстановление нормального веса и его прирост наблюдали к 56-му дню. В контрольной группе вес животных колебался в пределах 17–18 г в течение всего эксперимента (рис. 1а).

Штамм *B. abortus* 19ВА высевался из органов мышей на протяжении всего эксперимента. Наибольший уровень колонизации селезенки выявляли на 7-е сутки после заражения, с постепенным снижением к 56-му дню (рис. 1б). Максимальную обсемененность печени наблюдали на 14-е сутки, со значительным снижением числа колоний при высевах к 56-му дню. Достоверность различий между средней обсемененностью органа на 7-й и 56-й дни была выявлена для высевов из печени ($p < 0,01$), но не из селезенки ($p = 0,216$). Полученные результаты свидетельствуют о способности аттенуированного штамма *B. abortus* 19ВА диссеминировать и сохраняться в организме мышей в течение 8 нед. после внутрибрюшинного введения, что согласуется с данными литературы [12].

При гистологическом исследовании паренхиматозных органов (печень и селезенка) зараженных *B. abortus* 19ВА

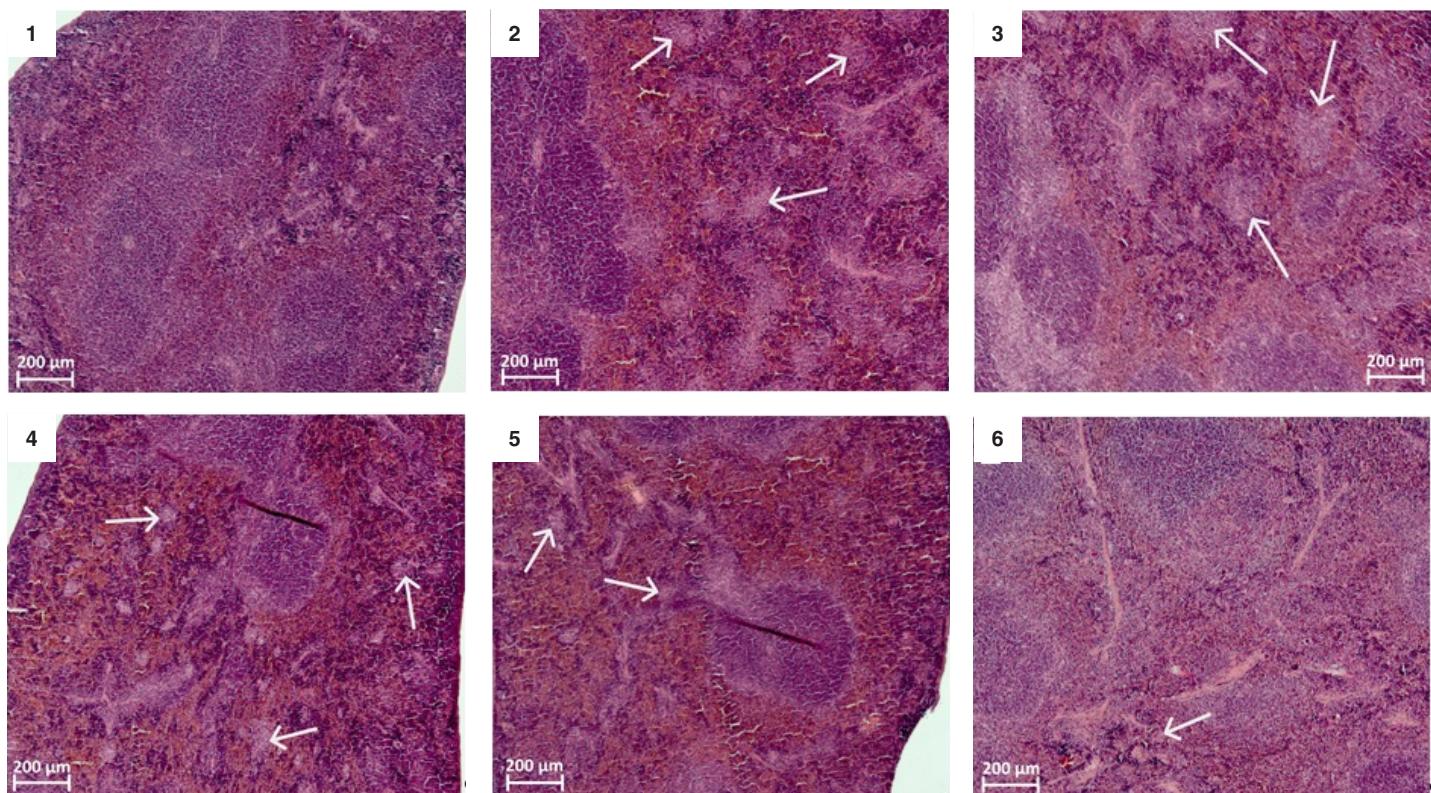


Рис. 3. Гистологические препараты селезенок мышей: 1 – фрагмент интактного животного, 2 – через 7 дней, 3 – 14 дней, 4 – 21 день, 5 – 28 дней, 6 – 56 дней после заражения. Белыми стрелками показаны гранулемы. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 50$.

Fig. 3. Histological preparations of mouse spleens: 1 – fragment of an intact mouse, 2 – 7 days, 3 – 14 days, 4 – 21 days, 5 – 28 days, 6 – 56 days after infection. White arrows indicate granulomas. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification $\times 50$.

мышей были выявлены признаки продуктивного спленита и грануломатозного гепатита, характерных для хронического течения бруцеллеза [15].

В частности, во всех долях печени обнаруживали многочисленные мелкие гранулемы, состоящие преимущественно из клеток мононуклеарного ряда, с минимизацией их размеров в течение всего периода наблюдения. Кроме того, на 7-й и 14-й дни исследования в печени встречали единичные мелкие очаги некроза гепатоцитов, а с 14-го дня наблюдения в разных долях органа находили многочисленные очаги экстрамедуллярного гемопоэза. На 56-й день в печени отмечали минимизацию размеров микрогранулем, в некоторых полях зрения наблюдали очаги экстрамедуллярного гемопоэза (рис. 2).

Селезенка на всех сроках наблюдения у зараженных мышей была существенно увеличена в размерах. При изучении ее функциональной морфологии на 7, 14 и 21-й дни исследования отмечалась выраженная гиперплазия белой пульпы, а также явления гистиоцитоза и многочисленные гранулемы вариабельного размера в красной пульпе органа. В поздние сроки наблюдения отмечалась минимизация количества и размеров гранулем в красной пульпе органа, в лимфоидных фолликулах белой пульпы обнаруживались герминативные центры. На 56-й день сохранялась спленомегалия за счет гиперплазии белой пульпы, в которой встречались крупные герминативные центры. В красной пульпе обнаруживались гистиоцитоз, усиленный экстрамедуллярный гемопоэз, в отдельных полях зрения были видны мелкие гранулемы (рис. 3).

Мыши являются наиболее широко применяемой моделью начиная с 1911 г., когда они впервые были использованы для тестирования вакцины против бруцеллеза [15]. Несмотря на то, что результаты, полученные на мышах, нельзя полностью интерпретировать в отношении инфекции у человека, тем не менее они дают ценную информацию о патогенезе заболевания, прежде всего благодаря использованию инбредных, мутантных, нокаутных и трансгенных животных. Кроме того, они позволяют оценить влияние различных профилактических и лекарственных препаратов на течение заболевания. Исход бруцеллеза у мышей зависит от вирулентности штаммов бруцелл, заражающей дозы, способа инокуляции, а также от породы, возраста, пола и физиологических особенностей животных. Поэтому при исследовании инфекции на мышах необходимо использовать наиболее полно охарактеризованные модели.

В нашей работе мы разработали мышью модель бруцеллеза на основе вакцинного штамма *B. abortus* 19ВА, применимую для работы в условиях лаборатории уровня биологической безопасности 2. Все животные после внутрибрюшинного введения аттенуированного штамма *B. abortus* 19ВА имели соматические признаки развития заболевания, подтвержденные бактериологическим и патогистологическим исследованием органов. Выраженное падение веса у мышей на 7-й день после заражения ассоциировалось с высоким уровнем обсемененности и патологического повреждения тканей селезенки, а наибольшая обсемененность печени на 14-й день совпадала с увеличением числа очагов экстрамедуллярного гемопоэза в органе. Несмотря на видимую поло-

жительную динамику течения инфекции, на 56-й день все еще обнаруживались бактерии при высевах из органов, а также сохранялась картина продуктивного спленита и гранулематозного гепатита при гистологическом исследовании.

Таким образом, аттенуированный штамм *B. abortus* 19BA при внутрибрюшинном введении можно использовать для воспроизведения бруцеллезной инфекции у мышей линии BALB/c с выраженными патогистологическими изменениями и обсемененностью печени и селезенки в условиях лаборатории уровня биологической безопасности 2. Данная модель является более безопасной и облегчает работу исследователей при тестировании большого количества кандидатных субъединичных противобруцеллезных вакцин или лечебных препаратов на ранних этапах разработки.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках государственного задания НИОКР 3.1.2.

Funding information

The work was carried out within the framework of the state R&D assignment 3.1.2.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Работа с животными

Все работы с животными проводились в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». Протокол экспериментов с животными одобрен комитетом по биоэтике ФБУН ГНЦПМБ (№ ВП-2024/7 от 06.11.2024).

Work with animals

All work with animals was conducted in accordance with GOST 33216-2014 "Guidelines for the keeping and care of laboratory animals." The animal experiment protocol was approved by the Bioethics Committee of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology (No VP-2024/7 dated November 6, 2024).

Литература / References

1. Lalsiamthara J, Lee JH. Development and trial of vaccines against *Brucella*. *J Vet Sci*. 2017 Aug 31;18(S1):281-290. DOI: 10.4142/jvs.2017.18.S1.281
2. Dorneles EM, Sriranganathan N, Lage AP. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. *Vet Res*. 2015 Jul 8;46(1):76. DOI: 10.1186/s13567-015-0199-7
3. Silva TM, Costa EA, Paixão TA, Tsolis RM, Santos RL. Laboratory animal models for brucellosis research. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:518323. DOI: 10.1155/2011/518323
4. Grilló MJ, Blasco JM, Gorvel JP, Moriyón I, Moreno E. What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Vet Res*. 2012 Apr 13;43(1):29. DOI: 10.1186/1297-9716-43-29

5. Elizalde-Bielsa A, Muñoz PM, Zúñiga-Ripa A, Conde-Álvarez R. A Review on the Methodology and Use of the Pregnant Mouse Model in the Study of *Brucella* Reproductive Pathogenesis and Its Abortifacient Effect. *Microorganisms*. 2024 Apr 26;12(5):866. DOI: 10.3390/microorganisms12050866
6. Olsen SC, Stoffregen WS. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert Rev Vaccines*. 2005 Dec;4(6):915-28. DOI: 10.1586/14760584.4.6.915
7. Crasta OR, Folkerts O, Fei Z, Mane SP, Evans C, Martino-Catt S, et al. Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes. *PLoS One*. 2008 May 14;3(5):e2193. DOI: 10.1371/journal.pone.0002193
8. Yang X, Skyberg JA, Cao L, Clapp B, Thornburg T, Pascual DW. Progress in *Brucella* vaccine development. *Front Biol (Beijing)*. 2013 Feb 1;8(1):60-77. DOI: 10.1007/s11515-012-1196-0
9. Perkins SD, Smith SJ, Atkins HS. Towards a *Brucella* vaccine for humans. *FEMS Microbiol Rev*. 2010 May;34(3):379-94. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2010.00211.x
10. Sperry JF, Robertson DC. Inhibition of growth by erythritol catabolism in *Brucella abortus*. *J Bacteriol*. 1975 Oct;124(1):391-7. DOI: 10.1128/jb.124.1.391-397.1975
11. Smith H. The biochemical challenge of microbial pathogenicity. *J Appl Bacteriol*. 1984 Dec;57(3):395-404. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1984.tb01405.x
12. Jacob JM, Curtiss R 3rd. Characterization of *Brucella abortus* S19 as a challenge strain for use in a mouse model of brucellosis. *Microbes Infect*. 2021 May-Jun;23(4-5):104809. DOI: 10.1016/j.micinf.2021.104809
13. Вершилова ПА. Живая вакцина против бруцеллеза. Профилактика инфекций живыми вакцинами. М.: Медгиз, 1960;270-302. / Vershilova PA. Zhivaya vaktsina protiv brutselleza. Profilaktika infektsii zhivymi vaktsinami. M.: Medgiz Publ., 1960;270-302. (In Russian).
14. Karber G. Screening methods in pharmacology. *Arch Exptl Pathol Pharmakol*. 1931;162:480-483.
15. Hamad SM, Abd Al-Kareem AY, Abdulla NA. Histopathological changes in liver and spleen of mice infected with brucellosis. *J of University of Anbar for Pure Science (JUAPS)*. 2014;8(2):1-5. DOI: 10.37652/juaps.2014.123908

Информация о соавторах:

Гапельченкова Татьяна Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Казаков Виталий Анатольевич, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Дентовская Светлана Владимировна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Tatiana V. Gapelchenkova, Researcher of Plague microbiology laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Vitaly A. Kazakov, MD, PhD, DSc, Leading Research scientist of laboratory for molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Svetlana V. Dentovskaya, MD, PhD, DSc, Chief Researcher of Plague microbiology laboratory, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor