

инфекций. МУ 3.1.1027-01. М.: Минздрав России; 2002. С. 55.

5. Корнеев Г.А., Тарасов М.А., Кузнецов А.А. и др. // Отлов, учет и прогноз численности мелких млекопитающих и птиц в природных очагах инфекций. МУ 3.1.1029-01. М.: Минздрав России; 2002. С. 71.

6. Магомедов М.Р.Д., Ахтаев М.-Х.Р. Зависимость питания и состояние популяции гребеншиковой песчанки (*Meriones tamariscinus*) от динамики кормовых ресурсов. Зоол. журн. 1993; 72(2):101–110.

7. Павлов А.Н. К вопросу о распространении полуденных и гребеншиковых песчанок на правом берегу реки Волги. Труды Ростовского-на-Д. НИПЧИ. Сталинград; 1959; XIV:235–43.

8. Попов Н.В., Удовиков А.И., Яковлев С.А., и др. Оценка влияния роли современного потепления климата на формировании нового природного очага чумы песчаночного типа на территории европейского Юго-Востока России. Поволжский экологический журнал. 2007; 1:55–64.

9. Попов Н.В., Корнеев Г.А., Санджиев В.Б.-Х. Эколого-эпизоотологические последствия ирригации и орошения Нижнего Поволжья. РЭТ-инфо. 2000; 3:21–2.

10. Раль Ю.М. Очерк экологии гребеншиковой песчанки *Meriones tamariscinus* Call. Грызуны и борьба с ними. Саратов; 1941; 1:179–207.

11. Сувернева Э.А., Тихомиров Э.Л., Тихомирова Н.И. // Распространение песчанок и их блох на территории Северо-Западного Прикаспия в 1970–1988 гг. Эпизоотология и профилактика особо опасных инфекций в антропогенных ландшафтах. Саратов, 1990. С. 74–80.

12. Тихомиров Э.Л. Особенности проявления эпизоотий чумы в условиях антропогенной трансформации ландшафтов (на примере Прикаспийского Песчаного очага чумы) [дис. ... канд. биол. наук]. Саратов; 1991. 133 с.

13. Удовиков А.И., Санджиев В.Б.-Х., Толоконникова С.И., и др. Динамика численности малого суслика в регионе Северо-Западного Прикаспия в XX столетии и факторы, ее определяющие. Биоресурсы и биоразнообразие экосистем Поволжья.

Саратов; 2005. С 195–7.

14. Шилова С.А., Чабовский А.В., Неронов В.В. Экономические перестройки и природные очаги инфекции. РЭТ-инфо. 2004; 1:8–10.

15. Яковлев С.А. Эпизоотологические последствия орошения Прикаспийской низменности [дис. ... канд. биол. наук]. Саратов; 1996. 118 с.

S.A. Yakovlev, G.V. Sangadzhieva, A.I. Udovikov, V.B.-H. Sandzhiev, V.P. Ossipov, V.V. Dikanskaya, N.V. Popov

Assessment of the Influence of Irrigation and Watering on the Changing of the Western Boundary of Tamarisk Gerbil *Meriones Tamariscinus* Pallas, 1773 (*Rodentia*, *Cricetidae*) Natural Habitat in the Territory of the Republic of Kalmykia

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov; Elista Plague Control Station, Elista; Astrakhan Plague Control Station, Astrakhan

The modern boundaries of distribution of tamarisk gerbil – *Meriones Tamariscinus* (Pallas, 1773) were determined in the territory of the republic of Kalmykia. Shown was the role of irrigation and watering of the land in the expansion of its natural habitat to the north and north-west. Epizootologic and epidemiologic consequences of tamarisk gerbil settling in the territory of Pre-Caspian North-Western steppe natural focus of plague were considered. The tendency of formation of the integrated plague natural focus of the gerbil type in the North-Western Pre-Caspian region and Ciscaucasia was confirmed.

Key words: tamarisk gerbil, house mouse, irrigation and watering of the land, natural habitat changing, biocenotic structure of the plague natural focus, epizootologic consequences.

Поступила 04.05.08.

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 616.932+616.981.48

И.М.Крепостнова, Л.Ф.Ливанова, С.А.Бугоркова,
Н.И.Смирнова

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ СКОНСТРУИРОВАННОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ДИПЛАЗМИДНОГО ШТАММА *VIBRIO CHOLERAЕ* СЕРОГРУППЫ O139, ПРОДУЦИРУЮЩЕГО В-СУБЪЕДИНИЦУ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА И ФАКТОР КОЛОНИЗАЦИИ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ CFA/I

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Показано, что сконструированный авирулентный диплазмидный штамм *Vibrio cholerae* KM182, продуцирующий В-субъединицу холерного токсина и фактор колонизации кишечной палочки CFA/I (обеспечивающих формирование антитоксического и антиколонизирующего иммунитета соответственно), способен защищать иммунизированных модельных лабораторных животных от экспериментальной холеры, вызванной вирулентным штаммом холерного вибриона O139 серогруппы. Определены оптимальные иммунизирующие и заражающие дозы.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae* O139 серогруппы, плаزمид, метод RITARD, В-субъединица холерного токсина, фактор колонизации CFA/I.

Эпидемически опасные штаммы холерного вибриона относятся к двум серогруппам – O1 (*Vibrio cholerae* классический и эльтор биовар) и O139 (*V. cholerae* O139 с синонимом Бенгал). Вспышки холеры, впервые вызванные в 1992 г. возбудителем *V. cholerae* O139 серогруппы в Индии и Бангладеш (бенгальская холера), продолжают регистрироваться в ряде регионов Юго-Восточной Азии (Киргизия, Узбекистан, Казахстан, Гонконг, Япония и др.) и в не-

которых странах Европы (Германия, Великобритания, Дания, Франция и др.) [4, 6, 7, 9, 12]. Что касается Российской Федерации, то в последнее десятилетие продолжает существовать проблема неконтролируемой миграции и пребывания на территории страны иностранных граждан и лиц без гражданства, что обеспечивает реальную возможность завоза бенгальской холеры на ее территорию [3]. Между тем до сих пор отсутствуют отечественные живые безопасные

и эффективные вакцины против возбудителя холеры новой серогруппы, способные индуцировать напряженный и длительный иммунитет у населения всех возрастных групп [11]. Такая ситуация обусловила конструирование нами авирулентного штамма холерного вибриона O139 серогруппы с высокой продукцией основных протективных антигенов – В-субъединицы холерного токсина и фактора колонизации энтеротоксигенных штаммов кишечной палочки CFA/I, обеспечивающих формирование анти-токсического и антиколонизирующего иммунитета соответственно.

В качестве носителя генов протективных антигенов нами был использован авирулентный, выделенный из воды штамм *V. cholerae* 170 серогруппы O139, геном которого, по данным полимеразной цепной реакции (ПЦР), лишен основных генов вирулентности [5]. В клетки этого штамма с помощью конъюгационных скрещиваний последовательно были введены конъюгативные рекомбинантные плазмиды pIEM3, содержащая клонированный ген *ctxB*, кодирующий продукцию иммуногенной В-субъединицы холерного токсина, и несущая ген резистентности к тетрациклину Tc^r и канамицину Km^r [2], и pCFAI. Плазмида pCFAI содержит клонированный ген *cfaI*, контролирующий биосинтез основного фактора колонизации CFA/I патогенных для человека штаммов кишечной палочки и ген резистентности к триметоприму Tr^r [10]. Было установлено, что введенные в состав плазмид клонированные гомо- и гетерологичные гены *ctxB* и *cfaI* в условиях *in vitro* и *in vivo* стабильно наследовались и обеспечивали эффективную продукцию двух основных защитных антигенов.

Цель работы – определение протективных свойств сконструированного нами диплазмидного штамма, обозначенного как *V. cholerae* KM182 (pIEM3)(pCFAI).

Материалы и методы

Протективные свойства штамма *V. cholerae* KM182 определяли на модели взрослых кроликов породы «шиншилла», иммунизированных внутрижелудочно этим штаммом, с последующим заражением их вирулентным штаммом с помощью RITARD (removable intestinal tie-adult rabbit diarrhea) – техники. Метод RITARD основан на внутрикишечном заражении вирулентными штаммами *V. cholerae* взрослых кроликов [13] с предварительным наложением особой скользящей временной лигатуры на подвздошную кишку в области мезоаппендикса на срок, необходимый для адгезии и ранней колонизации тонкого кишечника холерными вибрионами, и последующего мониторинга инфекционного процесса в течение 5 суток. При этом регистрировали клинические признаки экспериментальной холеры: диарея (наличие жидких каловых масс, их цвет). Ежедневно осуществляли забор ректального мате-

риала с последующим высевом на 1 % пептонную воду и щелочной агар.

Внутрижелудочную иммунизацию осуществляли трехкратно с интервалом в 21 день взрослым кроликам массой 2,5–3 кг живыми клетками изучаемого штамма. Клетки вводили по методу Crau с соавт. [8], используя желудочный зонд. Для нейтрализации кислого содержимого желудка было введено (с помощью желудочного зонда) 15 мл 5 % раствора гидрокарбоната натрия с интервалом в 15 мин. Иммунизирующие дозы составляли 10^9 м.к. и $5 \cdot 10^{10}$ м.к. в 1 мл бульона LB (таблица).

На 14-е сутки после последней иммунизации кроликов заражали вирулентным штаммом. Контролем служили 2 интактных животных, зараженных аналогичным образом. Патолого-анатомические исследования как опытных, так и контрольных животных проводили по мере их гибели и после умерщвления их хлороформом по истечении 5 сут. Оценивали изменения внутренних органов по состоянию кровеносных сосудов, наличию признаков дистрофии. В желудочно-кишечном тракте описывали состояние сосудов, степень наполнения кишечника содержимым, определяли его цвет, характер и объем. Для гистологических исследований брали кусочки внутренних органов – сердце, легкие, печень, селезенку, почки с надпочечником, мезентериальные лимфатические узлы и 3 отрезка тонкого и толстого кишечника, которые фиксировали в 10 % водном растворе формалина. После фиксированные кусочки внутренних органов изучали по общепринятой схеме [1].

Результаты и обсуждение

Для изучения протективных свойств штамма *V. cholerae* KM182(pIEM3)(pCFAI) O139 серогруппы, содержащего антигены, обеспечивающие анти-бактериальный (O139 соматический антиген и полисахаридная капсула), антитоксический (В-субъединица холерного токсина), антиколонизирующий (фактор колонизации кишечной палочки CFA/I) иммунитет, взрослые кролики были проиммунизированы внутрижелудочно в дозах, указанных в таблице. В качестве контроля были использованы интактные кролики.

Интактные кролики, зараженные по методу

Дозы заражения и иммунизации, используемые для изучения протективных свойств потенциально вакцинного штамма *V. cholerae* KM182

№ группы	Доза иммунизации, м.к.	Доза заражения, м.к.	% выживших животных	Клиническое проявление инфекционного процесса
Контроль	0	10^9	0	++++
1	10^9	10^8	100	-
2	10^9	10^9	50	-
3	$5 \cdot 10^{10}$	10^8	100	-
4	$5 \cdot 10^{10}$	10^9	50	-

RITARD токсигенным штаммом *V. cholerae* P16064 в дозе 10^9 м.к., пали в течение 24 ч после заражения с характерной для холерной инфекции патоморфологической картиной острой диареи с последующим высевом чистой культуры холерного вибриона. При гистологических исследованиях обнаружены дистрофические изменения органов, гемодинамические нарушения в виде различной степени выраженности полнокровия сосудов, в почках значительные поля некротического нефроза, в кишечнике выраженный катар.

Иммунные кролики через 14 дней после последней иммунизации были заражены по методу RITARD вирулентным штаммом *V. cholerae* P16064 O139 серогруппы в дозах 10^8 м.к. и 10^9 м.к. Все выжившие кролики (срок наблюдения 5 дней) были умерщвлены хлороформом.

В зависимости от иммунизирующей и заражающей доз все опытные животные были поделены на 4 экспериментальные группы (всего 8 животных).

Животные 1-й и 3-й опытных групп доживали до 5-х суток в 100 % случаев. У этих животных были обнаружены минимальные гемодинамические расстройства в виде незначительного полнокровия сосудов паренхиматозных органов и серозной оболочки тонкого кишечника. В тонком кишечнике содержалось небольшое количество серозно-слизистого содержимого желтого или желтовато-зеленоватого цвета. В толстом кишечнике было обычное содержимое. При гистологических исследованиях у животных этих групп регистрировали признаки умеренного функционального напряжения паренхиматозных элементов внутренних органов (печень, миокард) и незначительное очаговое полнокровие сосудов. Хотя у животных 3-й группы наблюдали на фоне полнокровия сосудов коры и мозгового вещества почек очаги некронефроза, умеренное полнокровие капиллярных клубочков, усиление клеточности ряда клубочков. В кишечнике отмечены относительно минимальные доброкачественные изменения: умеренная очаговая гидропическая дистрофия эпителия, незначительное очаговое полнокровие сосудов подслизистой оболочки, небольшие циркуляторные нарушения – умеренный очаговый отек подслизистой оболочки. Наблюдалось увеличение количества МЭЛ (межэпителиальных лимфоцитов) в тонком кишечнике с признаками их активации, усиление гиперпластической реакции в строме ворсин и собственной пластинки слизистой за счет увеличения количества лимфоцитов и плазматических клеток, появление бластических элементов. Такого рода изменения больше были выражены у животных 3-й группы. У животных этих групп отмечены достаточно четкие признаки вторичного иммунного ответа со стороны периферических органов иммунной системы, обычно в лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником. Наблюдалась гиперплазия клеток в периартериальных муфтах селезенки

с накоплением значительного числа бластических элементов в этих зонах (Т-зонах). В светлых центрах фолликулов и мозговых тяжах лимфатических узлов, зародышевых центрах и маргинальных зонах мальпигиевых телец селезенки чуть в меньшей степени регистрировали гиперпластические процессы и усиление митотической активности (В-зоны). Образование крупных светлых центров в фолликулах лимфоидных органов у животных 3-й группы отражало формирование наиболее полноценной иммунной реакции. В лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником (пейеровы бляшки), наблюдали активацию Т- и В- зон, накопление плазматических клеток и плазмобластов в купольной части лимфоидных образований. Все эти показатели показывают на достаточно высокую активность лимфоидных органов, даже с признаками некоторой гиперактивации, что можно объяснить завышенной дозой иммунизации.

Во 2-й и 4-й группах выжило 50 % кроликов. У выживших животных отмечали умеренную инъекцию сосудов серозной оболочки тонкого кишечника, регистрировали наличие незначительного объема серозно-слизистого желтоватого содержимого в верхних отделах тонкого кишечника и несколько в большом объеме слизистого желтовато-зеленоватого содержимого в нижних отделах тонкого кишечника. В толстом кишечнике кашицеобразное содержимое коричневого цвета. Умеренное полнокровие коркового вещества почек.

При гистологическом исследовании внутренних органов у животных этих групп отмечали достаточно выраженные признаки вторичного иммунного ответа, Т-зоны в селезенке и мезентериальных лимфатических узлах широкие плотные, с признаками активации (усиления митотической активности).

У животных 2-й группы у 50 % (павшие) наблюдался умеренный катар тонкого кишечника с наполнением жидкостью серозной слизи желтого цвета, в нижнем отделе скопление газа и кашицы только у павших животных. У выживших в течение 5 сут зараженных кроликов не наблюдалось изменений со стороны внутренних органов. Гистологические изменения наблюдали только у павших животных. У выживших животных не выявлены признаки специфического инфекционного воспаления. Обнаружено умеренное проявление активности в периферических лимфоидных органах, умеренное функциональное напряжение со стороны внутренних органов. Выжившие животные 4-й группы не имели макроскопических изменений внутренних органов.

Таким образом, сконструированный авирулентный штамм *V. cholerae* KM182 обладал достаточной протективностью. Оптимальная доза иммунизации, защищающая лабораторных животных от развития инфекционного процесса при заражении их высоковирулентным штаммом *V. cholerae* P16064 в дозе 10^8 , составила 10^9 м.к./мл.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. М.: Медицина, 1982.
2. Ильина Т.С., Смирнов Г.Б., Смирнова Н.И. и др. Рекombинантная плазмидная ДНК, кодирующая синтез В-субъединицы холерного токсина, способ ее конструирования и штамм бактерий *Vibrio cholerae* продуцент В-субъединицы холерного токсина. АС № 1505022 от 18.09.87.
3. Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Безмертвый В.Е. и др. Холера в мире, странах СНГ и России: эпидемиологическая обстановка (1998–2007 г.) Холера и патогенные для человека вибрионы. Сб. матер. пробл. комиссии. Ростов н/Д, 2008; 21:13–6.
4. Ощипенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Федоров Ю.М., Подосинникова Л.С., Горбеев А.В. Холера в начале XXI века. Прогноз. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 3:44–8.
5. Осин А.В., Ливанова Л.Ф., Ерошенко Г.А., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Изучение особенностей наследования и экспрессии рекombинантной плазмиды с клонированными генами холерного токсина в авирулентном штамме. Холера и патогенные для человека вибрионы. Сб. матер. пробл. комиссии. Ростов н/Дону, 2002; 15:103–6.
6. Alam M., Hasan N.A., Sadique A., Bhuiyan N.A., Ahmed K.U., Nusrin S. et al. Seasonal cholerae caused by *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 in the coastal aquatic environment of Bangladesh. Appl. Environ. Microbiol. 2006; 72(6):4096–104.
7. Albert M.J., Siddique A.K., Islam M.S. Large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. Lancet. 1993; 341:704.
8. Cray W.C., Tokunaga E., Pierse N.F. Successful colonization and immunization of adult rabbits by oral inoculation with *Vibrio cholerae* O1. Infect. Immun. 1983; 41(20):735–41.
9. Faruque S.M., Chowdhury N., Kamruzzaman M., Shafi Ahmad O., Faruque A.S.G., Salam M.A. et al. Emerg. Infect. Dis. 2003; 9(9):1116–22.
10. Evans D.G., Evans D.J., Clegg S., Pauley J.A. Purification and characterization of the CFA1 antigen of enterotoxigenic

- Escherichia coli*. Infect. Immun. 1979; 25(2):738–48.
11. Ledon T., Valle E., Valmaseda T., Faruque A.S.G., Ansaruzzaman M., Faruque S.M. et al. Construction and characterization of O139 cholera vaccine candidates. Vaccine 2003; 21(11–12):1282–91.
12. Outbreak verification list. 27. WHO. Geneva, Switzerland 2005.
13. Spira W.M., Sack R.B., Froelich J.F. Simple adult rabbit model for *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. Infect. Immun. 1981; 32:739–47.

I.M.Krepostnova, L.F.Livanova, S.A.Bugorkova,
N.I.Smirnova

Investigation of Protective Properties of the Constructed Recombinant Biplasmid Strain of *Vibrio cholerae* O139 Serogroup Producing Cholera Toxin B Subunit and *Escherichia coli* Colonization Factor CFA/1

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe",
Saratov

The constructed avirulent biplasmid *Vibrio cholerae* strain KM182 producing cholera toxin B subunit and *Escherichia coli* colonization factor CFA/1 (providing for antitoxic and anti-colonization immunity formation, correspondently) was demonstrated to protect immunized model laboratory animals from experimental cholera caused by the virulent *Vibrio cholerae* O139 strain. The optimal doses for immunization and challenging were determined.

Key words: *Vibrio cholerae* O139 Serogroup, plasmid, RITARD method, cholera toxin B subunit, colonization factor CFA/1.

Поступила 10.07.08.

УДК 616.981.452:575

Л.М.Куклева, Г.А.Ерошенко, В.Е.Куклев, Я.М.Краснов, Н.П.Гусева, Г.Н.Одинокоев, В.В.Кутырев

СРАВНЕНИЕ ПОЛНОЙ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА *rhaS* У ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ ОСНОВНОГО И НЕОСНОВНЫХ ПОДВИДОВ

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Определена полная нуклеотидная последовательность гена *rhaS* – регуляторного гена *rha* локуса хромосомы у штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов, а также у *Y. pseudotuberculosis* I–III сероваров. Установлено наличие в гене *rhaS* значимых и незначительных нуклеотидных замен, которые, по-видимому, являются причиной различной способности к ферментации рамнозы у штаммов возбудителя чумы (основного и неосновных подвидов) и псевдотуберкулеза.

Ключевые слова: возбудитель чумы, основной и неосновные подвиды *Y. pestis*, ферментация рамнозы, нуклеотидная последовательность.

Ферментация рамнозы является одним из важнейших диагностических признаков, позволяющих дифференцировать возбудителей чумы и псевдотуберкулеза. *Yersinia pseudotuberculosis* активно использует этот углевод в качестве источника углерода и энергии, тогда как штаммы основного подвида *Y. pestis* не способны к ферментации рамнозы [1, 5]. Штаммы неосновных подвидов чумного микроба, занимающие промежуточное положение между основным подвидом *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, способны ферментировать рамнозу, хотя выраженность этого признака у разных подвидов варьирует. Так, штаммы кавказского и алтайского подвидов активно ферментируют рамнозу в первые 24–48 ч от начала культивирования, а штаммы улэгейского подвида – в более поздние сроки через (48–96 ч)

[3]. Для штаммов гиссарского подвида отмечена изменчивость сроков проявления этого признака (от 1–2 сут до ее полного отсутствия) [4]. Причины столь существенных различий в проявлении способности к ферментации рамнозы у штаммов основного и неосновных подвидов остаются к настоящему моменту невыясненными. Устойчивое отсутствие этого признака у штаммов основного подвида *Y. pestis* свидетельствует о наличии генетического дефекта в генах локуса *rha*, кодирующего ферменты утилизации рамнозы.

Л-рамноза (метилпентоза) утилизируется бактериальными клетками с помощью группы ферментов, синтез которых детерминируется генами, расположенными в *rha* локусе. Строение рамнозного регулона подробно изучено на модели кишечной палочки.