

С.А.Бугоркова, Н.А.Осина, Т.В.Бугоркова, Л.Ф.Ливанова, Н.И.Смирнова, В.В.Кутырев

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* С РАЗНЫМ НАБОРОМ ДЕТЕРМИНАНТ ВИРУЛЕНТНОСТИ НА ОРГАНИЗМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЖИВОТНОГО

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

При сопоставлении данных клинико-морфологического анализа с результатами морфометрической оценки изменений у крольчат-сосунков, внутрикишечно зараженных холерными вибрионами с разным набором детерминант вирулентности, показано, что необходимым условием для развития холерогенной реакции у крольчат является обязательное присутствие в геноме холерного вибриона гена *ctxA*. Экспериментальная инфекция в этом случае сопровождается превышением учитываемых морфометрических параметров в почках и печени по сравнению с интактными животными. Изменения у крольчат, зараженных *ctxA*⁻ штаммами, носят в большей степени адаптационно-компенсаторный характер и в незначительной мере обусловлены ZOT и ACE токсинами холерного вибриона. Реакция апудоцитов кишечника крольчат зависит от генотипа штаммов *V. cholerae*, используемых для заражения, и коррелирует со степенью выраженности морфологических изменений в кишечнике и внутренних органах экспериментальных животных.

Ключевые слова: холерный вибрион, детерминанты вирулентности, экспериментальная инфекция.

Возможность реализации патогенных свойств холерного вибриона в макроорганизме зависит от наличия в геноме микроба соответствующих детерминант вирулентности. В патогенезе холеры ведущая роль принадлежит токсинам, под влиянием которых происходит формирование основных патологических процессов, ведущих к обезвоживанию организма [4]. Продукцию последних связывают с наличием у вибрионов генов *ctxAB*, *zot*, *ace*, представленных в коровой области профага СТХφ [15]. Не меньшее значение отводится этапу колонизации кишечника холерными вибрионами, продуктивность которого обусловлена наличием у патогена хромосомных генов (*tcpA-F*), входящих в состав острова патогенности VPI и кодирующих биосинтез пилей адгезии (TCP) – основного фактора колонизации [8, 10, 13].

Цель настоящего исследования – сопоставить данные клинико-морфологического анализа с результатами морфометрической характеристики изменений у крольчат-сосунков, зараженных холерными вибрионами с разным набором детерминант вирулентности.

Материалы и методы

В работе использованы 23 природных штамма *V. cholerae* биовара эльтор и 1 штамм – *V. cholerae* классического биовара, выделенные от больных, носителей и из внешней среды.

Для проведения ПЦР-анализа культур *V. cholerae* применяли тест-систему «ГенХол – Тест-система для выявления ДНК *Vibrio cholerae* (*ctxA*⁺) методом ПЦР» (ТУ 8895-006-01898109-2007, производства ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб»). Работу выполняли в соответствии с инструкцией к препарату. Для выявления *tcpA* гена использовали олигонуклеотидные праймеры, предложенные S.P.Keasler, R.H.Hall [14], *zot* и *ace* генов — праймеры, предложенные A.Basu et

al. [11], проводя амплификацию фрагментов *tcpA*, *zot* и *ace* генов с данными праймерами в соответствии с авторскими рекомендациями.

Для воспроизведения экспериментальной холеры 64 кролика-сосунка 7–8-дневного возраста массой 140–165 г внутрикишечно [12] заражали 4-часовой агаровой культурой *V. cholerae* в дозе 1·10⁷ м.к., контрольным крольчатам («К») внутрикишечно вводили 0,2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Всех павших и усыпленных хлороформом животных по истечении срока наблюдения (48 ч) подвергали патолого-анатомическому исследованию. Гистологический материал, фиксированный в 10 % нейтральном растворе формалина, обрабатывали по общепринятой схеме [3]. Полутонкие срезы окрашивали гематоксилином и эозином [2], альциановым синим и Шифф-реактивом [6], импрегнировали серебром по Гримелиусу [6]. Морфометрическую обработку проводили с помощью аппаратно-программного комплекса МЕКОС-Ц и программы ДММ (версия 2.1.0.0).

Результаты и обсуждение

Интенсивность развития специфического инфекционного процесса у крольчат, обусловленного заражением *V. cholerae* с разным набором детерминант вирулентности, оценивали по результатам учета макроскопических изменений (табл. 1).

Для морфометрического исследования экспериментальных животных объединили в три группы: 1-я – крольчата, зараженные культурами штаммов с генотипом *ctxA*⁺, *ace*⁺, *zot*⁺, *tcpA*⁺; 2-я – зараженные культурами штаммов с генотипом *ctxA*⁻, *tcpA*⁺; 3-я – зараженные культурами штаммов с генотипом *ctxA*⁻, *tcpA*⁻.

В 1-й группе регистрировали 100 % гибель крольчат в первые 25–30 ч наблюдения и развитие у них характерной холерогенной реакции в кишечнике

Характеристика штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы в тестах *in vitro* и *in vivo*

Штаммы <i>V. cholerae</i>	Генетическая характеристика штаммов	Процент павших зараженных животных с		Вирулентность <i>in vivo</i>
		холерогенной реакцией	энтеропатогенной реакцией	
M1259, M1273, M1268, M674, 358, 569B, 410, 968	ctxA ⁺ , ace ⁺ , zot ⁺ , tcpA ⁺	100	0	Вирулентные
M1258, M1262, M1256, 1265	ctxA ⁻ , ace ⁻ , zot ⁻ , tcpA ⁻	0	40	Слабовирулентные
M1191	ctxA ⁻ , ace ⁺ , zot ⁺ , tcpA ⁺	0	50	
M661, M1183,	ctxA ⁻ , ace ⁺ , zot ⁺ , tcpA ⁻	0	0	Авирулентные
203, M1336, KM27	ctxA ⁻ , ace ⁻ , zot ⁻ , tcpA ⁺	0	0	
M1397, M1398, M1242, M1257, M1280, KM26	ctxA ⁻ , ace ⁻ , zot ⁻ , tcpA ⁻	0	0	

на фоне различной степени выраженности гемодинамических расстройств со стороны внутренних органов, особенно при заражении *V. cholerae* eltor M674 и *V. cholerae cholerae* 569B.

При гистологическом исследовании органов животных 1-й группы наблюдали дистрофические изменения паренхиматозных элементов в печени и почках на фоне выраженного полнокровия сосудов. По результатам морфометрического исследования отмечали резкое полнокровие капилляров коркового вещества почек и относительно выраженное полнокровие сосудов мозгового вещества (табл. 2). Суммарная площадь капилляров коркового вещества на единицу площади среза в этой группе в 3 раза превышала аналогичный показатель в группе контрольных крольчат. Более выраженным полнокровием сосудов коркового вещества было на введение холерных вибрионов штаммов *V. cholerae* M1259 и *V. cholerae* M1273 (11562,48±4888,23 и 10072,34±3756,22 мкм² соответственно). Средний показатель количества почечных телец на единицу площади среза у животных в этой группе почти в 2 раза был ниже аналогичного показателя у контрольных крольчат. Наблюдали выраженную гидропическую дистрофию эпителия извитых канальцев почек вплоть до появления участков некротической гибели клеток и различной степени

выраженности явления отека и полнокровия сосудистых клубочков. Отмечали выраженные признаки нарушенного белкового и жирового обмена в гепатоцитах, особенно при заражении холерными вибрионами классического биовара (штамм *V. cholerae* 569B), так ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ) гепатоцитов у них составлял 0,16 (у животных из группы «К» – 0,28). У крольчат этой группы резко снижались процессы экстрamedулярного кроветворения в печени, а на фоне некоторого запустения внутридольковых синусоидальных печеночных гемокапилляров регистрировали резкое полнокровие центральных вен и уменьшение числа звездчатых ретикулоэндотелиоцитов (табл. 2). Эти изменения свидетельствовали о снижении не только синтетической функции гепатоцитов и детоксицирующих возможностей органа, но и защитных реакций макроорганизма, обусловленных адекватным функционированием ретикулоэндотелиоцитов. Наблюдаемые частичная редукция лимфатических фолликулов в мезентериальных лимфатических узлах и относительная инверсия слоев коркового вещества надпочечников при умеренном снижении феохромии мозгового вещества отражали степень функционального напряжения процессов адаптации у экспериментальных животных.

В кишечнике крольчат регистрировали выра-

Таблица 2

Морфометрическая характеристика изменений у крольчат-сосунков, зараженных *V. cholerae* O1 серогруппы

Определяемый показатель	Группы штаммов			Контроль (К)
	1-я	2-я	3-я	
Площадь почечного тельца в мкм ² (M±m)	2789,42±1096,08	2095,74±813,64	1995,55±649,06	1810,68±673,87
Площадь сосудистого клубочка в мкм ² (M±m)	1802,48±731,70*	928,900±368,46	884,390±381,49	836,13±327,05
Суммарная S капилляров коры в мкм ² (M±m)	9373,320±2684,13*	8961,29±3184,45*	3635,900±579,500	2978,64±975,6
Суммарная S капилляров мозгового вещества в мкм ² (M±m)	25426,01±5770,65	31867,12±8096,22	12530,52±3029,04	19788,92±1098,24
Количество почечных телец на S = 317706 мкм ² (M±m)	8,70±1,84*	12,79±2,55	11,88±3,34	19,8±1,24
Средняя S центральных вен печени в мкм ² (M±m)	49127,53±2774,28*	47814,69±27466,31	23800,41±3110,34	27356,84±6112,05
Суммарная S печеночных капилляров в мкм ² (M±m)	43682,65±17092,83	47391,91±9536,68	61297,42±21777,73	50759,18±4043,91
Ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ) гепатоцитов	0,2	0,24	0,3	0,28
Количество ретикулоэндотелиоцитов в одном поле зрения среза (M±m)	9,5±2,82*	10,2±3,02	11,43±3,12	29,7±3,02

* Достоверность результатов по отношению к контролю p < 0,05.

женный отек слизистой и подслизистой оболочек, гидропическую дистрофию энтероцитов, неравномерное полнокровие сосудов подслизистой оболочки, местами отчетливое увеличение размеров одних бокаловидных клеток на фоне резкого опустошения других, изменение секреторного профиля последних в сторону накопления в них кислых мукополисахаридов (КМПС). Клетки нейроэндокринной (APUD) системы (табл. 3) реагировали дегрануляцией, что приводило к уменьшению количества апудоцитов во всех отделах кишечника. Наименьший показатель количества апудоцитов в тонком кишечнике крольчат 1-й группы регистрировали на введение холерных вибрионов штамма *V. cholerae* M674 – $3,75 \pm 0,32$ клеток (у эталонного вирулентного штамма *V. cholerae* 569B – $4,5 \pm 0,25$ клеток). Наивысшее значение – на введение вибрионов штамма *V. cholerae* M1268 – $5,40 \pm 0,78$ клетки. В функциональном отношении преобладали опустошенные клетки. Количество опустошенных апудоцитов в группе достигало ($78,65 \pm 11,83$) % (в группе «К» – 18,92 %), а для крольчат, зараженных холерными вибрионами классического биовара и погибших с развитием максимальной холерогенной реакции в кишечнике, этот показатель достигал 91,11 %. Холерные вибрионы классического биовара не вызывали активации синтетических процессов в апудоцитах, в отличие от вибрионов биовара eltor, при введении которых регистрировали разной степени усиление синтетических процессов в клетках APUD-системы. Так, на заражение *V. cholerae* M674 показатель гистохимической активности клеток значительно превышал аналогичный показатель у животных из группы «К» и составлял 10,67 %. В толстом кишечнике сохранялась тенденция к уменьшению в 2,2 раза количества клеток APUD-системы, по сравнению с показателем в группе «К», и усилению процессов опустошения апудоцитов.

Во 2-й и 3-й группах отмечали гибель единичных животных в первые 48 ч наблюдения с развитием в кишечнике энтеропатогенной реакции на фоне неравномерного умеренного полнокровия сосудов внутренних органов при заражении штаммами: *V. cholerae* M1258, M1256, M1262, M1191. Максимальные макроскопические изменения были характерны для введения культуры штамма *V. cholerae* M1191 (генотип – $ctxA^-$, zot^+ , ace^+ , $tcrA^+$). Регистрируемые при

гистологическом исследовании дистрофические и гемодинамические нарушения были умеренными. По результатам морфометрического исследования более выраженное полнокровие капилляров коркового и мозгового вещества почек отмечали у животных, зараженных холерными вибрионами с генотипом $ctxA^-$, $tcrA^+$ – 2-я группа (табл. 2). Холерные вибрионы с генотипом $ctxA^-$, $tcrA^-$ (3-я группа) вызывали развитие неравномерного кровенаполнения капилляров коркового и мозгового вещества почек. У крольчат 2-й и 3-й групп регистрировали уменьшение в 1,5 раза по сравнению с показателем для группы «К» количества почечных телец, в первую очередь при введении штаммов *V. cholerae* M661 и M1191. Отмечали очаговую гидропическую дистрофию эпителия извитых канальцев почек и незначительное полнокровие сосудистых клубочков у животных, зараженных холерными вибрионами штаммов *V. cholerae*: M1242, M661, M1183, M1191, среди которых лишь штамм *V. cholerae* M1242 был лишен генов, кодирующих синтез Zot и Ace токсинов.

В печени крольчат 2-й и 3-й групп регистрировали умеренные признаки нарушенного белкового и жирового обмена, без резкого изменения в системе печеночной гемоциркуляции. ЯЦИ гепатоцитов в группах был близок к показателю у контрольных животных. Отмечали снижение активности экстрамедулярного кроветворения. На фоне незначительного полнокровия внутридольковых синусоидальных печеночных гемокапилляров у крольчат, зараженных штаммами *V. cholerae* M1242 и M1257, и умеренного запускания капилляров при введении штамма *V. cholerae* M1191 регистрировали относительное полнокровие центральных вен. Наблюдали снижение количества ретикулоэндотелиоцитов в 2,9–2,6 раза соответственно по сравнению с показателем у крольчат из группы «К». На фоне умеренного снижения синтетической функции гепатоцитов, при введении отдельных штаммов как с генотипом $ctxA^-$, $tcrA^+$, так и $ctxA^-$, $tcrA^-$ страдала детоксицирующая способность органа. Изменения со стороны лимфоидных органов не носили четкой зависимости от генотипа штаммов, используемых для заражения, и отражали функциональную незрелость иммунной системы крольчат. Реакция надпочечников свидетельствовала о включении адаптационных механизмов макроорганизма.

Таблица 3

Реакция апудоцитов кишечника крольчат-сосунков, зараженных *V. cholerae* O1 серогруппы

Группы штаммов	Определяемый показатель					
	Тонкий кишечник			Толстый кишечник		
	Количество апудоцитов (M±m)	Опустошенные клетки, %	Гистохимически активные клетки, %	Количество апудоцитов (M±m)	Опустошенные клетки, %	Гистохимически активные клетки, %
1-я	4,69±0,53*	78,65±11,83*	6,07±3,86*	2,34±0,57*	36,51±5,64	22,25±5,45
2-я	6,56±0,99	31,36±3,44	8,92±4,07*	3,83±0,84	40,13±6,75	7,04±2,14*
3-я	6,02±0,87	32,99±3,42	7,46±4,25*	3,77±0,73	41,39±2,45	7,22±3,07*
Контроль (К)	7,92±0,98	18,92±1,48	2,13±0,96	5,13±0,64	24,95±4,6	23,78±3,8

* Достоверность результатов по отношению к контролю $p < 0,05$.

В кишечнике животных наблюдали очаговый умеренный отек слизистой оболочки, гидрорическую дистрофию отдельных энтероцитов, умеренное полнокровие сосудов подслизистой оболочки. У отдельных крольчат, зараженных культурами штаммов M661, M1183, M1191, 203, отмечали полнокровие млечных синусов, увеличение количества бокаловидных клеток в толстом кишечнике на фоне умеренного повышения среди них числа клеток, содержащих КМПС. Эти изменения чаще регистрировали у животных, зараженных холерными вибрионами, в геноме которых присутствовали гены *zot* и *ase*. У животных 2-й и 3-й групп наблюдали умеренное функциональное напряжение апудоцитов кишечника (табл. 3), несколько активировался процесс накопления биологически активных веществ (БАВ) в клетках, с увеличением гистохимически активных форм. При этом процентное содержание опустошенных апудоцитов было в 1,7 раза выше, чем у животных из группы «К». Максимальное опустошение клеток регистрировали на введение *V. cholerae* M1242.

Данные о генетическом разнообразии клинических штаммов возбудителя холеры [5] свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения особенностей пато- и морфогенеза инфекционного процесса, обусловленного ими.

Выявленные при морфометрическом анализе особенности в реакции крольчат на внутрикишечное введение различных по набору детерминант вирулентности холерных вибрионов свидетельствуют о сложности механизма взаимодействия микро- и макроорганизма. Показателями функционирования генов холерного вибриона в макроорганизме являются нарушения, возникающие в ответ на инокуляцию микроба, морфологическими эквивалентами которых можно считать развитие патологических или адаптационно-компенсаторных реакций.

Показано, что патогенетическая потенция микроба носит выраженный полидетерминантный характер, но необходимым условием для развития холерогенной реакции у крольчат является обязательное присутствие в геноме холерного вибриона гена *ctxA*. *CtxA*⁺ штаммы холерного вибриона вызывали у экспериментальных животных почти 3-кратное превышение учитываемых морфометрических параметров в почках по сравнению с интактными крольчатами, изменение в большей степени, чем в других группах, показателей функционального состояния печени, но имел место определенный разброс величин определяемых характеристик внутри группы животных, зараженных такими штаммами. Между тем, при отсутствии гена *ctxA*, несмотря на наличие в геноме исследуемых штаммов генов *zot*, *ase* и *tcpA*, отмечали формирование иных нарушений в организме биомодели, носящих в большей степени адаптационно-компенсаторный характер и в незначительной мере обусловленных *ZOT* и *ACE* токсинами холерного ви-

бриона. Полученные данные согласуются с результатами исследования роли варибельности генома профага СТХФ в изменении вирулентности *V. cholerae* биовара эльтор [9].

Процессы синтеза и секреции БАВ апудоцитами лежат в основе взаимосвязанной деятельности различных органов и систем макроорганизма [7]. По результатам исследования реакция апудоцитов кишечника крольчат находилась в зависимости, с одной стороны, от отдела кишечника, а с другой – от особенностей генотипа штаммов холерного вибриона, используемых для заражения, и коррелировала со степенью выраженности морфологических изменений в кишечнике и внутренних органах экспериментальных животных.

Таким образом, морфометрическая оценка изменений у крольчат-сосунков при введении холерных вибрионов штаммов с разным набором детерминант вирулентности, повышая информативность исследования, позволила уточнить роль отдельных факторов патогенности микроба в формировании экспериментального инфекционного процесса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кветной И.М., Южаков В.В. Окрасивание ткани эндокринных желез и элементов АПУД- системы. Микроскопическая техника. М.; 1996. 328 с.
2. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.; 1969. 645 с.
3. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. М.; 1969. 367 с.
4. Монахова Е.В., Писанов Р.В. Токсины холерных вибрионов. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2005; 1:7–18.
5. Осин А.В., Нефедов К.С., Ерошенко Г.А., Смирнова Н.И. Сравнительный анализ геномов холерных вибрионов эльтор, выделенных до начала и в разные периоды седьмой пандемии холеры. Генетика. 2005; 41(1): 53–62.
6. Пирс Э. Гистохимия. В.В. Португалова (ред.). М., 1962. 962 с.
7. Райхлин И.Т., Кветной И.М., Осадчук М.А. АПУД-система (общепатологические и онкологические аспекты). Обнинск, 1993. 174 с.
8. Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Сравнительный анализ молекулярно-генетических особенностей геномов и их эволюционных преобразований у возбудителей холеры, чумы и сибирской язвы. Молекул. генетика, микробиол. и вирусол. 2006; 2:9–19.
9. Смирнова Н.И., Осин А.В., Нефедов К.С. и др. Варибельность генома профага СТХФ и ее роль в изменении вирулентных свойств *Vibrio cholerae* биовара эльтор. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 6:20–6.
10. Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М., Бардых И.Д., Винокур Н.И. Адгезивность и некоторые другие свойства *Vibrio cholerae* с *tcp+ctx+* генотипом, изолированных из объектов внешней среды на территории Ростовской области в 2002 году. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2004; 6:3–6.
11. Basu A., Mukhopadhyay A.K., Sharma C. et al. Heterogeneity in the organization of the CTX genetic element in strains of *Vibrio cholerae* O139 Bengal isolated from Calcutta, India and Dhaka, Bangladesh and its possible link to the dissimilar incidence of O139 cholera in the two locales. Microb. Pathog. 1998; 24(3):175–83.
12. Dutta N.K., Habbu M.K. Experimental cholera in infant rabbit: a method for chemotherapeutic investigation. Brit. J. Pharmacol. 1955; 10:153–9.
13. Karaolis D.K., Lan R., Kaper J.B., Reeves P.R. Comparison of *Vibrio cholerae* pathogenicity islands in sixth seventh pandemic strains. Infect. Immun. 2001; 69(3):1947–52.
14. Keasler S.P., Hall R.H. Detection and biotyping *Vibrio cholerae* O1 with multiplex polymerase chain reaction. Lancet. 1993; 341:1661.
15. Waldor M.K., Lasar S., Kimsey H., Williams J., Mekalanos J.J. CTXφ: a novel filamentous phage encoding cholera toxin. Bacterial Protein Toxins: Eight European Workshop. 1998; 29:363–71.

S.A.Bugorkova, N.A.Ossina, T.V.Bugorkova, L.F.Livanova,
N.I.Smirnova, V.V.Kutyrev

**Morphometric Assessment of the Influence
of *Vibrio cholerae* Strains with Different Set
of Virulence Determinants on Experimental Animal Organism**

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Comparison of clinical and morphological analysis data and the results of morphometric assessment of changes in suckling rabbits infected intraintestinally with cholera vibrios with different set of virulence determinants proved the presence of *ctxA* gene in *Vibrio cholerae* genome to be the necessary condition for the development of cholera reaction. Experimental infection in this case is followed by the excess of the considered morphometric parameters in kidneys and liver in comparison with those of the intact animals. Changes in suckling rabbits infected with *ctxA*⁻ strains are mainly of the adaptive and compensatory character and are determined by ZOT and ACE toxins of *Vibrio cholerae* to some extent. The reaction of the suckling rabbits' intestinal apudocytes depends on the genotype of *V. cholerae* strains used for

challenge and correlates with the intensity of morphological changes in the intestine and internal organs of experimental animals.

Key words: cholera vibrio, virulence determinants, experimental infection.

Об авторах:

Бугоркова С.А., Осина Н.А., Бугоркова Т.В., Ливанова Л.Ф., Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Bugorkova S.A., Ossina N.A., Bugorkova T.V., Livanova L.F., Smirnova N.I., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 03.09.09.