

Н.А.Киршева, Е.А.Ганина, Т.И.Комбарова, Р.З.Шайхутдинова, С.В.Дентовская, А.П.Анисимов

ИНФЕКЦИОННАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C К ЗАРАЖЕНИЮ *PHOTORHABDUS ASYMBIOTICA* И *PHOTORHABDUS TEMPERATA*

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk

Проведена сравнительная оценка вирулентности представителей рода *Photorhabdus* (семейство *Enterobacteriaceae*), отличающихся по патогенности для человека, в отношении мышей при подкожном (п/к) и внутрибрюшинном (в/б) заражении. Показано, что исключительно энтомопатогенный штамм *P. temperata* subsp. *cinerea* 3107^T авирулентен для мышей линии BALB/c ($LD_{50\text{ п/к}} > 10^8$ КОЕ, $LD_{50\text{ в/б}} > 10^8$ КОЕ), а гибель лабораторных животных вызывают только бактерии вида *P. asymbiotica*, выделенные от больных людей: subsp. *australis* AU81 ($LD_{50\text{ п/к}} = 3,2 \cdot 10^7$ ($10^7 - 3,2 \cdot 10^8$) КОЕ, $LD_{50\text{ в/б}} = 10^6$ ($2,5 \cdot 10^5 - 4,0 \cdot 10^6$) КОЕ) и subsp. *asymbiotica* US86 ($LD_{50\text{ п/к}} = 3,2 \cdot 10^7$ ($10^7 - 3,2 \cdot 10^8$) КОЕ, $LD_{50\text{ в/б}} = 5,6 \cdot 10^7$ ($1,4 \cdot 10^7 - 2,8 \cdot 10^8$) КОЕ). Определены патоморфологические изменения в органах животных, зараженных штаммами *Photorhabdus* spp.

Ключевые слова: вновь возникающие инфекции, фоторабдоз, *Photorhabdus asymbiotica*, *Photorhabdus temperata*.

N.A.Kirsheva, E.A.Ganina, T.I.Kombarova, R.Z.Shaikhutdinova, S.V.Dentovskaya, A.P.Anisimov

Infectious Sensitivity of BALB/c Mice to Infestation with *Photorhabdus asymbiotica* and *Photorhabdus temperata*

State Research Centre of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Carried out is the comparative assessment of *Photorhabdus* genera (*Enterobacteriaceae* family) representatives, different in their pathogenicity for humans, virulence for mice in case of subcutaneous and intraperitoneal inoculation. It is indicated that entomopathogenic strain *P. temperata* subsp. *cinerea* 3107^T alone is avirulent for BALB/c mice ($LD_{50\text{ subcut}} > 10^8$ КОЕ, $LD_{50\text{ intraperit}} > 10^8$ КОЕ); while the death of laboratory animals is caused only by *P. asymbiotica* bacteria, isolated from infected people: subsp. *australis* AU81 ($LD_{50\text{ subcut}} = 3,2 \cdot 10^7$ ($10^7 - 3,2 \cdot 10^8$) КОЕ, $LD_{50\text{ intraperit}} = 10^6$ ($2,5 \cdot 10^5 - 4,0 \cdot 10^6$) КОЕ) and subsp. *asymbiotica* US86 ($LD_{50\text{ subcut}} = 3,2 \cdot 10^7$ ($10^7 - 3,2 \cdot 10^8$) КОЕ, $LD_{50\text{ intraperit}} = 5,6 \cdot 10^7$ ($1,4 \cdot 10^7 - 2,8 \cdot 10^8$) КОЕ). Identified are the patho-morphological changes in the organs of animals, inoculated with *Photorhabdus* spp. strains.

Key words: re-emerging infections, photorhabdosis, *Photorhabdus asymbiotica*, *Photorhabdus temperata*.

Род *Photorhabdus* семейства *Enterobacteriaceae* включает три вида подвижных, биOLUMИНЕСЦЕНТНЫХ, энтомопатогенных почвенных грамотрицательных бактерий: *P. temperata*, *P. luminescens* и *P. asymbiotica*. Бактерии всех трех видов образуют симбиотические комплексы с нематодами семейства *Heterorhabditidae*, вызывающие гибель личинок широкого круга насекомых [3]. *Photorhabdus* spp. колонизируют кишечный тракт молодых особей почвенных нематод. Нематоды проникают в организм личинок чувствительных насекомых и обсеменяют его бактериями, которые размножаются и секретируют инсектицидные токсины, вызывая гибель насекомого и способствуя как собственной репродукции, так и размножению нематод за счет обеспечения их питательными веществами, содержащимися в трупe насекомого. Фоторабдусы выделяют целый спектр антимикробных субстанций, препятствующих размножению других микроорганизмов в трупe насекомого. После поглощения тканей погибшего насекомого, обсемененных фоторабдусами, нематоды перебираются в организм нового хозяина [2].

В конце 1980-х – начале 1990-х годов в США и Австралии зарегистрировали несколько случаев необычных заболеваний людей, сопровождавшихся появлением на коже гноящихся язв, поражением

мягких тканей, в 80 % случаев – гематогенной диссеминацией с образованием вторичных септических очагов поражения, а в 30 % случаев – бактериемией. Из пораженных тканей были выделены бактерии вида *P. asymbiotica*, причем заболевания, вызванные австралийским подвидом – subsp. *Australis*, протекали тяжелее, чем инфекция, вызванная американским подвидом – subsp. *asymbiotica*. Вероятно, число заболевших людей значительно выше, чем это отражено в научных публикациях. В большинстве случаев при лабораторной диагностике этот микроорганизм расценивают как вторичную микрофлору раневых поверхностей, а не этиологический агент заболевания [5].

Показано, что *P. asymbiotica* – факультативный внутриклеточный патоген, способный размножаться в человеческих макрофагоподобных клетках и клетках насекомых. Штаммы австралийского подвида, в отличие от американского, способны к инвазии в нефагоцитирующие клетки человека. Клинические изоляты из Австралии вызывают апоптоз макрофагоподобных клеток уже через 6 ч после начала эксперимента, а американские – только через 24 ч [4].

В доступной литературе мы не обнаружили данных о воспроизведении фоторабдоза на модели теплокровных лабораторных животных. В данной работе проведена оценка инфекционной чувствительности

мышей линии BALB/c к заражению *P. asymbiotica* и *P. temperata*.

Материалы и методы

В работе использовали клинические изоляты *P. asymbiotica* AU81 (subsp. *australis*) и US86 (subsp. *asymbiotica*) [4], предоставленные R.Zumbihl (Université Montpellier II, UMR1133 Laboratoire EMIP, F-34095 Montpellier, France), и штамм *P. temperata* subsp. *cinerea* 3107^T [6], полученный от T.Lakatos (Research and Extension Centre for Fruit Growing, Vadastag 2, H-4244 Ujfehértó, Hungary). Бактерии выращивали на агаре Хоттингера с добавлением 1 % гемолизированной крови в течение 24 ч при температуре 28 °C.

Оценку вирулентности проводили на мышах линии BALB/c при подкожном и внутрибрюшинном введении десятикратных разведений (от 10⁸ КОЕ до 1 КОЕ) культур *Photorhabdus* spp. в изотоническом растворе NaCl в объеме 0,1 мл на животное (по четыре животных в группе). Наблюдение за зараженными животными проводили в течение 21 сут. Погибших в ходе эксперимента и умерщвленных после его завершения животных вскрывали и подвергали бактериологическому исследованию. Вычисление величин LD₅₀ проводили по методу Kärber в модификации И.П.Ашмарина и А.А.Воробьева [1].

Кусочки органов животных (регионарные лимфатические узлы, селезенка, тимус, печень, легкое, почка, тонкий и толстый кишечник) фиксировали в 10 % формалине при комнатной температуре, дегидратировали в спиртах восходящей концентрации, заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4 мкм для микроскопии окрашивали гематоксилин-эозином.

Результаты и обсуждение

Проведена оценка вирулентности трех штаммов *Photorhabdus* spp. Мы использовали два способа заражения мышей: подкожный и внутрибрюшинный, т.к. естественный путь заражения человека фоторабдозом пока не установлен [7], а инфекционная чувствительность при разных способах заражения может значительно отличаться. Как при п/к, так и при в/б способе введения гибель мышей, зараженных максимальными дозами *P. asymbiotica* AU81 и *P. asymbiotica* US86, наблюдали в течение первых трех суток. Средние сроки гибели для *P. asymbiotica* US86 составили при п/к заражении 2,7 сут, при в/б – 1 сут, а для *P. asymbiotica* AU81 при п/к заражении – 1 сут, при в/б – 1,4 сут. Мы не выявили достоверных отличий в величине LD₅₀ штаммов *P. asymbiotica* обоих подвидов при подкожном способе введения (таблица). При внутрибрюшинном заражении мышей LD₅₀ для *P. asymbiotica* subsp. *australis* AU81 была достоверно ниже аналогичного показателя для *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* US86. В то же время мыши,

зараженные *P. temperata* 3107^T, оставались живыми на протяжении всего срока наблюдения. Таким образом, штаммы вида *P. asymbiotica*, способные вызывать заболевания у людей, оказались вирулентными и для лабораторных животных, в то время как представитель патогенного только для насекомых вида *P. temperata* не вызывал гибели мышей.

У погибших животных в месте введения микробной культуры наблюдали ярко-выраженную гиперемию и инъекцию сосудов подкожной клетчатки. В высевах из органов павших мышей (регионарный лимфоузел, печень, селезенка) и крови из сердца отмечали рост колоний заражающих штаммов. На 8-е сутки у части мышей, выживших после заражения *P. asymbiotica* AU81 и US86, на коже хвоста появились язвенные гнойно-некротические очаги диаметром 1–3 мм, при бактериологических посевах коростовых образований которых выявили рост культур *P. asymbiotica*. Известно, что гнойное поражение мягких тканей с образованием абсцессов является характерным клиническим симптомом фоторабдоза человека [5]. Появление отдаленных от места введения гнойных очагов у мышей подтверждает гематогенную диссеминацию возбудителя в ходе инфекционного процесса.

Характер патоморфологических изменений органов мышей, павших после заражения штаммами *P. asymbiotica* AU81 и US86, был сходен. Имело место неравномерное полнокровие и стаз крови в кровеносных сосудах подкожной клетчатки. В некоторых сосудах легких отмечено изменение состояния крови – в норме гомогенная плазма выглядела как рыхлое сплетение тонких волокон. В печени наблюдали дистрофию и цитоллиз отдельных гепатоцитов. В почках – резкое полнокровие мозгового слоя. Кроме того, обнаружили делимфотизацию органов иммуногенеза: селезенки, лимфатических узлов, тимуса. При этом штамм AU81 вызывал более тяжелое течение инфекции. Наряду с указанной патологией, в синусах красной пульпы селезенки, как и в сосудах легких, имели место агрегация и выпадение компонентов плазмы в виде нитчатых структур, в тимусе – мелкоглыбчатый распад лимфоцитов.

Мы не выявили патологии во внутренних органах мышей, выживших после заражения любым из исследованных штаммов. Изменения, затрагивающие лимфатическую систему, имели продуктивный характер и, видимо, были обусловлены иммунной

Вирулентность штаммов *Photorhabdus* spp. для мышей линии BALB/c

Штамм <i>Photorhabdus</i> spp.	LD ₅₀ КОЕ*	
	п/к заражение	в/б заражение
<i>P. asymbiotica</i> subsp. <i>asymbiotica</i> US86	3,2·10 ⁷ (10 ⁷ –3,2·10 ⁸)	5,6·10 ⁷ (1,4·10 ⁷ –2,8·10 ⁸)
<i>P. asymbiotica</i> subsp. <i>australis</i> AU81	3,2·10 ⁷ (10 ⁷ –3,2·10 ⁸)	10 ⁶ (2,5·10 ⁵ –4,0·10 ⁶)
<i>P. temperata</i> subsp. <i>cinerea</i> 3107 ^T	> 10 ⁸	> 10 ⁸

*95 % доверительный интервал указан в круглых скобках.

перестройкой лимфоидной ткани. У мышей, зараженных штаммом US86, морфологическая перестройка в лимфоидных органах соответствовала гуморальному типу иммунного ответа. Имело место значительное накопление плазматических клеток и плазмобластов в гиперплазированной красной пульпе селезенки и мозговом веществе лимфатических узлов, проходящее на фоне активной пролиферации в центрах размножения лимфатических фолликулов. В иммунный процесс была вовлечена и лимфоидная ткань кишечника. Отмечено увеличение количества и размеров субэпителиальных скоплений лимфоцитов в толстом кишечнике, а также значительное усиление инфильтрации плазматическими клетками слизистой оболочки толстого и тонкого кишечника. Кроме того, у мышей выявили признаки стимуляции Т-клеточного звена иммунитета. Были увеличены активность и количество лимфоцитов в корковом и мозговом веществе тимуса, а также в тимусзависимых зонах селезенки и лимфатических узлов. У мышей, зараженных штаммом AU81, были наиболее выражены изменения в селезенке и лимфатических узлах: клеточная пролиферация в В-зависимых зонах лимфоидной ткани и плазмоклеточная трансформация лимфоцитов, характерные для гуморальной иммунной реакции. При этом общая интенсивность иммунной перестройки в организме была несколько ниже, чем у мышей, зараженных штаммом US86. Меньше плотность клеточной инфильтрации тимусзависимых зон. В кишечнике лимфоидная ткань на уровне контроля. Наряду с продуктивной иммунной реакцией, у мышей, зараженных штаммом AU81, в крови обнаружили увеличение количества полиморфно-ядерных лейкоцитов. Визуально отмечали повышение количества лейкоцитов в сосудах легких, печени, синусах селезенки. Так как очаги гнойного воспаления во внутренних органах мышей не выявлены, то, вероятно, лейкоцитоз в данном случае был обусловлен пролонгацией острой фазы язвенного дерматита.

Реакция на введение непатогенного для теплокровных животных штамма *P. temperata* 3107^T была ограничена образованием небольшого количества плазматических клеток в селезенке и лимфатических узлах.

Таким образом, впервые определены величины LD₅₀ для штаммов *P. asymbiotica* US86 (subsp. *asymbiotica*), AU81 (subsp. *australis*) и *P. temperata* 3107^T (subsp. *cinerea*) при подкожном и внутрибрюшинном заражении мышей (подобраны модельные лабораторные животные для изучения фоторабдоза человека) и определены патоморфологические изменения в органах животных, зараженных штаммами *Phototrabdus* spp. Гибель экспериментальных мышей при заражении штаммами *P. asymbiotica* US86

и AU81 была вызвана токсическим действием на организм и связана с расстройством гемодинамики, изменением свертываемости крови, нарушением лимфопоеза в органах иммуногенеза. Прямое токсическое повреждение клеток выявили только в печени и (для штамма *P. asymbiotica* AU81) тимусе. Наиболее патогенным оказался штамм AU81 австралийского подвида как по тяжести патологии у павших, так и по длительности лейкоцитоза у выживших животных. Для мышей, выживших после заражения штаммами *P. asymbiotica* US86 и AU81, характерен морфологически выраженный процесс плазматизации лимфоидной ткани, связанный с сохранением необходимости выработки гуморальных факторов защиты. Патолого-анатомическим признаком заболевания являются гнойно-некротические язвы в коже выживших животных. Штамм *P. temperata* 3107^T не патогенен и не иммуногенен для мышей. Характер гистологических изменений не зависел от способа заражения.

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ № 10-04-00501-а. Выражаем глубокую благодарность доктору R.Zumbihl и доктору T.Lakatos за предоставленные штаммы *Phototrabdus* spp.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. 180 с.
2. An R., Grewal P.S. Molecular mechanisms of persistence of mutualistic bacteria *Phototrabdus* in the entomopathogenic nematode host. PLoS One. 2010; 5(10):e13154.
3. Clarke D.J. *Phototrabdus*: a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. Cell Microbiol. 2008; 10(11):2159–67.
4. Costa S.C.P., Girard P.A., Brehelin M., Zumbihl R. The emerging human pathogen *Phototrabdus asymbiotica* is a facultative intracellular bacterium and induces apoptosis of macrophage-like cells. Infect. Immun. 2009; 77(3):1022–30.
5. Gerrard J., Waterfield N., Vohra R., French-Constant R. Human infection with *Phototrabdus asymbiotica*: an emerging bacterial pathogen. Microbes Infect. 2004; 6(2):229–37.
6. Tóth T., Lakatos T. *Phototrabdus temperata* subsp. *cinerea* subsp. nov., isolated from *Heterotrabdus* nematodes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008; 58(Pt 11):2579–81.
7. Waterfield N., Ciche T., Clarke D. *Phototrabdus* and a host of hosts. Annu. Rev. Microbiol. 2009; 63:557–74.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.; 1962. 180 p.

Authors:

Kirshcheva N.A., Ganina E.A., Kombarova T.I., Shaikhutdinova R.Z., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

Об авторах:

Киришева Н.А., Ганина Е.А., Комбарова Т.И., Шайхутдинова Р.З., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Московская обл., п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 28.06.11.