

Биологическая модель экспериментального бартонеллеза

Бондаренко А.В.

Национальный медицинский университет, Харьков, Украина

Bondarenko A.V.

National medical university, Kharkiv, Ukraine

Biological model of experimental bartonellosis

Резюме. Представлена технология экспериментального бартонеллеза после интраперитонеального введения лабораторным животным образцов биологического материала, содержащего возбудитель. В качестве биологической модели использовались белые нелинейные мыши с искусственно сформированным (при помощи циклофосфамида) иммунодефицитным состоянием.

Ключевые слова: биологическая модель, *Mus musculus* L., циклофосфамид, бартонеллез, *B. henselae*, *B. quintana*.

Медицинские новости. – 2014. – № 1. – С. 79–81.

Summary. Technology of experimental bartonellosis after intraperitoneal introduction of biological material samples containing causative agent to laboratory animals, is presented in the article. As a biological model white nonlinear mice were used with the artificially formed (by the usage of cyclophosphamide) immunodeficient state.

Keywords: biological model, *Mus musculus* L., cyclophosphamide, bartonellosis, *B. henselae*, *B. quintana*.

Meditsinskie novosti. – 2014. – N 1. – P. 79–81.

Бартонеллезы – группа инфекционных заболеваний, обусловленных факультативно внутриклеточными бактериями, нуждающимися для роста в гемине или продуктах распада эритроцитов, передающихся обычно трансмиссивным путем и характеризующихся развитием острых и хронических форм с полиморфизмом клинических проявлений и возможностью поражения всех органов и систем. Род *Bartonella* постоянно расширяется и сейчас охватывает около 40 видов и подвидов. Для человека патогенны 13 видов бартонелл разной степени вирулентности: *B. alsatica*, *B. bacilliformis*, *B. clarridgeiae*, *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. henselae*, *B. kohlerae*, *B. melophagi*, *B. quintana*, *B. rochalimae*, *B. tamiiae*, *B. vinsonii*, *B. washoensis* [6]. Для других видов бартонелл, выделенных от разных животных, вирулентность для человека в настоящее время еще не доказана.

Два вида бартонелл могут вызывать широкий спектр синдромов у иммунодефицитных лиц: *B. henselae* (возбудитель болезни кошачьих царапин) и *B. quintana* (возбудитель траншейной лихорадки). При этом иммунный статус больных рассматривается как ключевой фактор, определяющий характер формирующегося инфекционного процесса. Биологической особенностью *B. henselae* и *B. quintana* является их уникальная способность стимулировать пролиферацию клеток эндотелия и рост мелких сосудов в их капиллярной части, что приводит к развитию псевдо-неопластического процесса. Ангио-пролиферация развивается обычно при уровне CD4 клеток меньше 100/мм³ [11].

После установления в начале 90-х годов XX века этиологического значения бартонелл в заболеваемости людей и животных в разных странах мира активно разрабатываются лабораторные модели для искусственного воссоздания бартонеллеза у подопытных животных [3, 5, 7, 9]. Такие исследования направлены на изучение особенностей патогенеза бартонеллезозов; установление закономерностей иммунологических реакций и формирования специфического и неспецифического иммунитета; определение в условиях *in vivo* результативности (специфичности, чувствительности, воспроизводимости) методов лабораторной диагностики; эффективности этиотропной терапии и средств специфической иммунопрофилактики; выявление естественного резервуара инфекции и механизмов передачи патогена.

Цель исследования – разработка биологической модели для воссоздания экспериментального бартонеллеза, характеризующейся унифицированностью и простотой технологического воспроизведения, дешевизной и доступностью для широкого практического применения.

Материалы и методы

Алгоритм воссоздания экспериментального бартонеллеза состоял из последовательных этапов:

- 1) искусственное формирование иммунодефицитного состояния у нелинейных белых мышей (*Mus musculus* L.);
- 2) подготовка образцов исследуемого биологического материала;
- 3) заражение подготовленными образцами лабораторных животных с ис-

кусственно сформированным иммунодефицитным состоянием;

4) отбор от умерших или умерщвленных (методом хлороформного наркоза) подопытных животных образцов секционного материала (органов и тканей-мишеней);

5) верификация этиологии путем экспресс-детекции возбудителей методом ПЦР в отобранных образцах секционного материала.

Искусственное иммунодефицитное состояние у белых нелинейных лабораторных животных создавали путем однократной подкожной инъекции 250 мкг/кг циклофосфамида в форме лекарственного препарата «Циклофосфан®» (ОАО «Киевмедпрепарат», Украина) за 3–4 часа перед введением образцов исследуемого биологического материала. Подкожный способ введения препарата (в отличие от интрабрюшинного) обеспечивал более равномерное поступление вещества в систему кровообращения и кроветворные органы, снижал скорость элиминации препарата из организма животного, что позволяло формировать длительное по времени (до 7–10 суток) иммунодефицитное состояние, достаточное для размножения и накопления бартонелл. Оптимальной является эмпирически определенная нами доза препарата 250 мкг/кг, которая обеспечивала формирование достаточно выраженного и стойкого иммунодефицитного состояния и не приводила к непредсказуемой гибели части (около 12% и больше) подопытных животных, что отмечалось при введении 500 мкг/кг и больше.

Отобранные образцы крови вносили в стерильные емкости с антикоагулянтом

(с отсутствующей антимикробной активностью) для предотвращения свертывания крови. При проведении исследований использовали вакуумные системы забора крови Venosafe™, Teguto Eugore N.V. (Бельгия) и пробирки VF-052SDK (рабочий объем 2 мл) с антикоагулянтом K2-EDTA. Образцы крови однократно замораживали при температуре -20°C и размораживали при комнатной температуре, что обеспечивало разрушение клеток крови и высвобождение микрочастиц патогена. Образцы биологического материала твердой консистенции тщательно гомогенизировали (путем измельчения или растирания) и разводили стерильной дистиллированной водой в соотношении 1:9, перемешивали до образования равномерной суспензии. Перед гомогенизацией поверхность клещей дезинфицировали путем погружения их на 10 минут в 70% этиловый спирт. Гомогенизировали все тело клеща, так как возбудители могли находиться в разных его тканях и органах (слюнных железах, лимфе, кишечнике и т. д.). Для введения лабораторным животным отбирала супернатант (после отстаивания и самовольного оседания в осадок крупноразмерных частиц) суспензии гомогенизированных образцов. Все манипуляции при отборе и подготовке для исследования образцов биологического материала осуществляли с соблюдением правил асептики для предотвращения дополнительной их контаминации посторонней микрофлорой.

Нелинейным белым мышам с искусственно сформированным иммунодефицитным состоянием вводили образцы различного биологического материала (в объеме 0,3 мл) путем интраперитонеальной инъекции, что обеспечивало большую площадь для аппликации возбудителей с высокой достоверностью контакта последних с клетками-мишенями (макрофагами, лейкоцитами, эритроцитами и др.). Срок наблюдения за зараженными подопытными животными составлял 8–10 суток, так как в этот период концентрация возбудителей в тканях и органах достигает максимального значения [5, 10].

Для точной верификации этиологии инфекционного процесса от погибших и умерщвленных животных применяли наиболее доступный и технологически дешевый стандартный вариант ПЦР. При этом верификация этиологии базируется на выявлении методом ПЦР основных клинически значимых видов бартоелл в образцах крови (отобранной путем пункции сердца с соблюдением правил

асептики) у подопытных животных, зараженных образцами исследуемого биологического материала. Целесообразность отбора образцов крови обосновывается простотой выполняемых манипуляций, а также полным совпадением полученных нами (позитивных и негативных) результатов ПЦР при параллельном исследовании образцов крови и других тканей и органов (селезенки, костного мозга, печени, лимфоузлов), отобранных от одних и тех же подопытных животных.

Для воссоздания стандартного ПЦР применяли доступные на территории Украины относительно дешевые и уже подготовленные для непосредственного использования коммерческие наборы реагентов фирмы IsoGene Lab. Ltd (Москва, Россия): «Комплект реактивов для универсальной пробоподготовки» – Diatom® DNA Prep 100 (включает реактивы для выделения и очистки из образцов биологического материала ДНК с целью дальнейшей амплификации определенного ее фрагмента); «Набор реагентов для амплификации ДНК» – Gene Pak® DNA PCR Core (включает универсальные реакционные смеси, которые не содержат праймерных систем, использовался для амплификации специфических фрагментов генома *B. henselae* и *B. quintana* при добавлении специально синтезированных праймеров, соответствующих гену *gltA*, с нуклеотидными последовательностями CAT TTC TGT TGG AAA TCC TAG и TTT TAA TGT AAT GCC AGA ATA A); «Маркер молекулярной массы ДНК M50, M100» – Gene Pak™ DNA Ladder M50, M100 (включает смеси фрагментов ДНК разной молекулярной массы, отличающиеся на 50 или 100 пар нуклеотидов соответственно, использовался для сравнительного установления размера образуемых ампликонов при воссоздании ПЦР с синтезированными праймерами); «Универсальный внутренний контроль УВК-90» (включает наборы реактивов для мониторинга возможных потерь ДНК при ее выделении из исследуемых образцов биологического материала и для определения возможного ингибирования ПЦР в процессе ее воссоздания) [8].

Результаты и обсуждение

Зарубежные исследователи при создании биологических моделей экспериментального бартоеллеза, в первую очередь, используют те виды животных, которые являются естественными хозяевами для возбудителей (кошек, собак, койотов, приматов и хлопковых крыс) [3, 5, 10]. Эксперименты на этих животных позволяют с большой достоверностью воссоздать естественное течение ин-

фекционного процесса, но возникает ряд существенных недостатков, связанных с недоступностью таких животных для широкого применения в практике, их высокой стоимостью, трудностями содержания в условиях лаборатории и технической сложностью проведения исследований, а также ограниченными возможностями создания унифицированной лабораторной модели для всех видов бартоелл, что обусловлено способностью каждого вида патогена размножаться и накапливаться лишь в определенном виде чувствительных к ним животных.

В последние годы отмечена тенденция к росту исследований, направленных на разработку технически более удобных моделей экспериментального воссоздания бартоеллезов, основанных на использовании наиболее распространенных лабораторных животных – чаще всего мышей, значительно реже – крыс, морских свинок, кролей [4, 10]. Следует отметить, что у обычных белых нелинейных лабораторных мышей экспериментальный бартоеллез характеризуется полным отсутствием или чрезвычайно слабо выраженными симптомами заболевания без существенного размножения и накопления в их организме возбудителей, быстрой элиминацией последних даже в условиях бактериемии у подопытных животных на начальном этапе после их заражения.

Указанные обстоятельства побуждают исследователей применять генетически клонированные сингенные линии мышей с врожденным иммунодефицитом и характеризующиеся высоким уровнем чувствительности к возбудителям разных инфекционных заболеваний [4]. Однако такие линейные животные являются относительно дорогостоящими, достаточно дефицитными, нуждаются в специальных условиях для изолированного содержания и размножения, что предотвращало бы гибель животных при случайном инфицировании. Это существенно усложняет стабильное обеспечение линейными иммуносупрессивными животными лабораторий и широкое практическое их использование как биологической модели. Поэтому потенциально наиболее перспективным для широкого практического применения может быть биологический способ, основанный на использовании белых нелинейных лабораторных мышей с индуцируемым иммунодефицитным состоянием. Последнее удается сформировать путем введения подопытным животным химических соединений, имеющих необходимый спектр иммунодепрес-

сивного действия. Сегодня существует большой перечень лекарственных препаратов, характеризующихся разнотипными механизмами иммунодепрессии без проявления противобактериальной активности. Это позволяет осуществлять обоснованный выбор для применения именно тех химических соединений, которые обеспечивают адекватное воссоздание нужного иммуносупрессивного состояния у подопытных животных с отсутствием нежелательного бактерицидного или бактериостатического действия на бартонеллы.

Выбор препарата «Циклофосфан®» (ОАО «Киевмедпрепарат», Украина) для искусственного формирования иммунодефицитного состояния у белых нелинейных мышей обоснован детально изученными механизмами его иммуносупрессивного действия, отсутствием противобактериальной активности, дешевизной и доступностью [2].

Созданная нами биологическая модель экспериментального бартонеллеза является пригодной для проведения как диагностических, так и эпидемиологических, эпизоотических, экологобиологических и др. исследований образцов биологического материала разного происхождения, в том числе образцов материала твердой и жидкой консистенции, с отсутствием или наличием контаминации посторонней микрофлорой.

При наблюдении за животными в ходе эксперимента выявлялась их преждевременная гибель и возникновение клинических признаков заболевания: снижение подвижности и аппетита, инертность при тактильном и звуковом раздражении, сгорбленная посадка, хромота, метеоризм, потеря около 30% массы тела. Нами проведено определение и сравнение уровня морбидности (преждевременной гибели и заболеваемости) в трех различных группах лабораторных животных: 1-я группа – контрольные интактные животные (n=7); 2-я группа – контрольные животные с искусственно сформированным иммунодефицитным состоянием (n=7); 3-я группа – подопытные животные с иммунодефицитным

состоянием, зараженные образцами исследуемого биологического материала (n=87).

Результаты исследований показали, что в отличие от животных 1-й и 2-й групп у подопытных 3-й группы возникало клинически выраженное заболевание в 67,8% случаев, что приводило в 39,0% случаев к преждевременной гибели животных на 3–10-е сутки после их заражения. При этом в дальнейшем при использовании метода ПЦР установили, что непосредственно бартонеллез был причиной преждевременной гибели подопытных животных в 13,0% случаев; приводил к возникновению у них клинических признаков заболевания без гибели на протяжении наблюдения в 33,3%; протекал при отсутствии выраженных симптомов инфекции в 41,6%.

Для подтверждения размножения и накопления бартонелл у подопытных животных 3-й группы избирательно (с учетом позитивного результата ПЦР) провели сравнительное определение методом реакции непрямой иммунофлюоресценции количества корпускулярного антигена (клеток и микроколоний) бактерий рода *Bartonella* в образцах исследуемого биологического материала и секционного материала животных (кровь, селезенка, костный мозг, печень, лимфоузлы). Результаты исследований продемонстрировали накопление бактерий в тканях и органах-мишенях зараженных животных, которые превышали исходные концентрации этих микроорганизмов в соответствующих образцах биологического материала больше чем в 10^2 – 10^3 раз. Кроме того, сравнительный анализ результатов обнаружения бартонелл методом ПЦР в одних и тех же образцах биологического материала без использования и с применением этапа размножения и накопления патогена путем выращивания в условиях *in vivo* (предложенная биологическая модель) демонстрирует существенный ($p < 0,05$) рост выявления возбудителей с 6,9 до 13,8%.

Выводы:

1. Разработана биологическая модель экспериментального бартонеллеза: в качестве лабораторных животных с повышенной

чувствительностью к заражению и накоплению возбудителя применяются белые нелинейные мыши с искусственно сформированным иммунодефицитным состоянием.

2. Биологическая модель, основанная на подкожном введении лабораторным животным иммунодепрессивного препарата «Циклофосфан®» в дозе 250 мг/кг, характеризуется унифицированностью и простотой воссоздания, значительно дешевле аналогов и доступна для широкого практического использования.

3. Заражение образцами биологического материала, потенциально инфицированными бартонеллами, белых нелинейных мышей с искусственно сформированным иммунодефицитным состоянием позволяет в целом повысить уровень выявления возбудителей (с дальнейшей верификацией последних методом ПЦР) в 2 раза, что может быть использовано для диагностики бартонеллезов у людей и животных путем обнаружения возбудителей в образцах биологического материала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко А.В., Похил С.И., Бондаренко О.В., Тимченко О.М. // Проблемы безперервної медичної науки та освіти. – 2011. – № 1. – С. 51–53.
2. Телетин Л.Ю. Экспериментальная фармакогенетика циклофосфамида: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: спец. 14.03.06. «Фармакология, клиническая фармакология». – М., 2010. – 46 с.
3. Abbott R.C., Chomel B.B., Kasten R.W. et al. // Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. – 1997. – Vol. 20, N 1. – P. 41–51.
4. Bakaletz L.O. // Microbiology. – 2004. – Vol. 2, N 7. – P. 552–568.
5. Chiaraviglio L., Duong S., Brown D.A. et al. // Am. J. Path. – 2010. – Vol. 176, N 6. – P. 2753–2763.
6. Chomel B.B., Kasten R.W. // J. Appl. Microbiol. – 2010. – Vol. 109. – P. 743–750.
7. De Souza Zanutto M., Mamizuka E.M., Raiz R. Jr. et al. // Med. Trop. Sao Paulo. – 2001. – Vol. 43. – P. 257–261.
8. Gene Pak® DNA PCR test. Набор реагентов для обнаружения ДНК возбудителей инфекционных заболеваний методом полимеразной цепной реакции. ТУ 9398-001-73867468-2005 / Инструкция // ООО «Лаборатория Изоген». – 2010. – 14 с.
9. Gupta L., Slater L., Wu C.C. et al. // J. Infect. Dis. – 1997. – Vol. 176. – P. 206–216.
10. Kosoy M.Y., Regnery R.L., Kosaya O.I., Chids J.E. // J. Wildlife Dis. – 1999. – Vol. 35, N 2. – P. 275–284.
11. Mosepele M., Mazo D., Cohn J. // Clin. Dev. Immunol. – 2012. – Vol. 2012. – P. 612809.

Поступила 03.11.2013 г.

Статья размещена на сайте www.mednovosti.by (Архив МН) и может быть скопирована в формате Word.

К сведению авторов!

Авторы, опубликовавшие в журнале «Медицинские новости» статьи с черно-белыми иллюстрациями и желающие дополнить их другими мультимедийными данными (видео, слайд-шоу, цветные иллюстрации, звук, анимация, объемное изображение), могут на льготных условиях разместить их в электронном мультимедийном международном журнале «Международные обзоры: клиническая практика и здоровье». Принимаются и ранее не опубликованные работы, содержащие мультимедийную информацию.

Подробности на сайте www.mednovosti.by. Тел. (+375-17) 327-07-54.