

УДК 579.83:616.993(574)

ИЗУЧЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ ПЛАЗМИДА RHODOCOCCLUS EQUI У МЫШЕЙ

Ильгекбаева Г.Д. – профессор, д.в.н.

Мауланов А.З. – профессор, к.в.н.

Касымов Е.И. – профессор, д.в.н.

Отарбаев Б.К. – ассоциированный профессор, к.в.н.

Занилабдин М.З. – PhD докторант

Курман С. – PhD докторант

Жолдас У. – магистрант

Валиева Б.А.

НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет»,
г.Алматы, Республика Казахстан

Аннотация. В этом исследовании приведены результаты гистологической картины у белых мышей, зараженных плазидами *Rhodococcus equi* pVarA, pVarB и pVarN. Установлено, что во всех органах, где проводились гистологические исследования штаммы, содержавшие плазмиды, участвующие в эксперименте показали схожие результаты.

Ключевые слова: *Rhodococcus equi*, антиген, плазмид, гистологическое исследования.

Актуальность темы. *Rhodococcus equi* является одним из наиболее важных бактериальных патогенов у жеребят в возрасте от 1 до 3 месяцев, и инфекции, вызываемые этим организмом, характеризуются хронической гнойной бронхопневмонией с обширным абсцессом и энтеритом, связанным с гнойным лимфаденитом [1, 2]. Несмотря на важность заболевания, которое практически распространяется только на жеребят, патогенез, связанный с заражением *R. equi*, остается неясным [3]. Недавний интерес к механизмам вирулентности *R. equi*, несомненно, был стимулирован открытием антигенов и плазмид, ассоциированных с вирулентностью [4-6].

Штаммы с антигенами от 15 до 17 кДа содержали крупную плазмиду и были вирулентны у жеребят, тогда как мутанты этих штаммов, которые были излечены от крупной плазмиды, не содержали антигенов и демонстрировали потерю вирулентности [5, 7]. Совсем недавно было установлено, что генетическая область, ответственная за антигены массой от 15 до 17 кДа, находится в плазмиде вирулентности [8, 9]. Антигены массой от 15 до 17 кДа считается, что они являются важными детерминантами патогенности в связи с их локализацией на поверхности.

R. equi - факультативный внутриклеточный паразит, способный выживать и размножаться, в частности, в альвеолярных макрофагах лошадей [10]. Наличие плазмид вирулентности тесно связано с вирулентностью у экспериментально инфицированных жеребят и мышей [4], а плазмиды, несущие *R. equi*, выделены из естественных инфекций у жеребят [11], что позволяет

предположить, что плазмида вирулентности влияет на устойчивость к макрофагам или рост внутри клеток.

Целью наших исследований было изучение гистопатологических изменений у мышей, введенных разных плазмид штамма *R.equi*.

Материалы и методы исследования. Для определения вирулентность штаммов в опыте брали белых мышей клинический здоровых в возрасте от 5 до 6 недель с живой массой 15-20 г. Создали четыре группы по 5 гол в каждой.

Штаммы *R.equi* культивировали в триптон-соевом агаре. Для чего: 39,5 грамма питательной среды добавили в 1 литр дистиллированной воды и кипятили 2 мин до полного растворения агара, разлили в стерильные пробирки по 5-6 см³, стерилизовали при 121°C в течение 15 мин на автоклаве. После пробирки ставили в специальный прибор для скошивания агара и оставили на 2-3 часа в боксе. После чего их хранили в холодильнике при +2..+4° С. Делали посев каждого штамма и пробирки с агаром поместили в термостат 37°C на 48 часов. По истечений времени на агаре появился равномерный сплошной рост бактерий.

Перед инокуляции мышей бактериальные культуры промывали 4-5 см³ физиологическим раствором рН 7,0-7,2 и готовили десятикратное разведение.

В первую группу ввели штамм АТСС33701, содержащий плазмид рVarA; во вторую группу - штамм S4, содержащий плазмид рVarB и в третью группу - штамм Yokkaichi, содержащий плазмид рVarN в дозе 10⁸ из основных концентраций 10 млрд м.к. в 1 см³. Препарат ввели мышам внутривенно через боковую хвостовую вену в объеме 10 мкм.

Четвертая группа служила контролем.

Гистопатология. Все мыши подвергались вскрытию через 10 дней после введение препарата. После посмертного исследования были взяты образцы тканей легких, брыжеечные лимфатические узлы, кишечник. Образцы фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине и заливали в парафин. Срезы вырезали толщиной 4 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином.

Результаты исследования. У мышей, инфицированных штаммом АТСС33701, содержащий плазмид рVarA, при гистологическом исследований в тканях легких во всех долях определялся умеренно выраженные признаки эмфиземы с очагами дистелектаза. Кровеносные сосуды были умеренно наполнены кровью (рис.1). В брыжеечных лимфатических узлах отмечается увеличение размера белой пульпы по сравнению с контролем. Во многих лимфоидных фолликулах наблюдаются гиперплазия лимфоидных клеток и без центров размножения (рисунок 2). Встречаются также отдельные узелки с центрами размножения. Слизистая оболочка кишечника в большинстве случаев сохранены. Наблюдается гиперсекреция слизи с увеличением количества бокаловидных клеток, в собственном слое слизистой оболочки наблюдается наличие повышенного количества лимфоцитов, макрофагов соединительной ткани (рисунок 3).

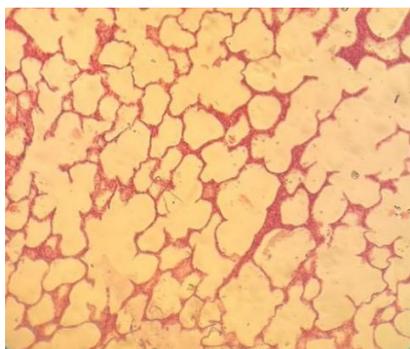


Рисунок 1. Легкие

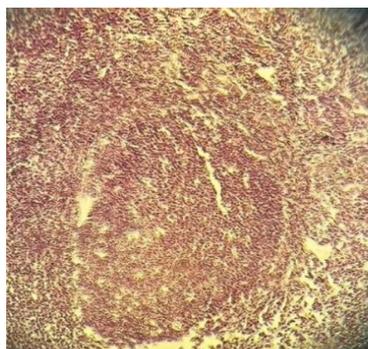


Рисунок 2. Брыжеечные лимфатические узлы



Рисунок 3. Толстый отдел кишечника

Гистопатологические исследования мышей, инфицированных штаммом S4, содержащий плазмид pVarB, показали следующие результаты: в легких отмечались участки расширения альвеолярной ткани. В некоторых участках заметны утолщение стенки межальвеолярных перегородок за счет инфильтрации лимфоидными клетками и единичными сегментоядерными лейкоцитами. Отмечаются участки легочной ткани, где кровеносные сосуды гиперемированы. В некоторых альвеолярных просветах содержатся серозная жидкость с десквамированными клетками альвеол (рисунок 4). Бронхи во всех участках легочной ткани без выраженных изменений.

Брыжеечные лимфатические узлы: в белой пульпе количество и диаметры лимфатических узелков заметно увеличены в размерах, по сравнению с таковыми в контрольной группе (рисунок 5). Во многих реактивных центрах лимфатических узелков отсутствует светлые зоны; в их темных зонах лимфоциты расположены плотно. Гистологическое строение кишечника белых не отличается от такового первой опытной группы. Слизистая оболочка кишечника в большинстве случаев сохранены. Наблюдается гиперсекреция слизи с увеличением количества бокаловидных клеток, в собственном слое слизистой оболочки наблюдается наличие повышенного количества лимфоцитов, макрофагов соединительной ткани (рисунок 6).

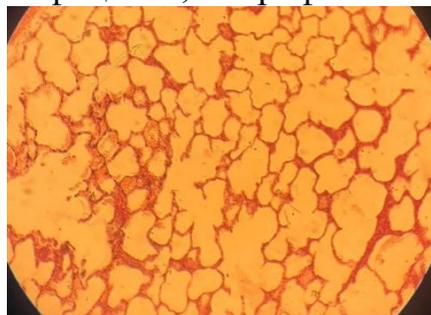


Рисунок 4. Легкие

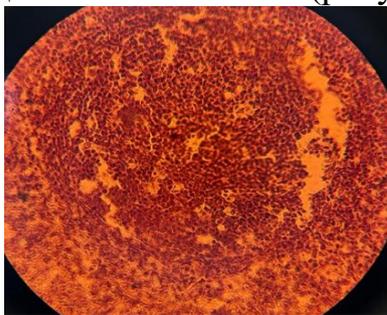


Рисунок 5. Брыжеечные лимфатические узлы

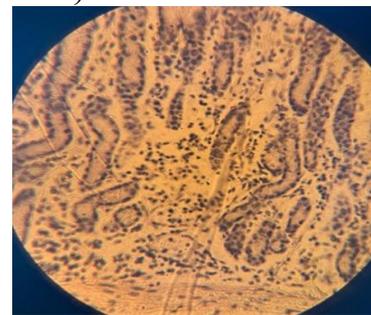


Рисунок 6. Толстый отдел кишечника

У мышей, инфицированных штаммом Yokkaichi, содержащий плазмид pVarN, при микроскопическом изучении в тканях легких отмечались участки чередования альвеолярной эмфиземы с разрывом перегородок и утолщение

межальвеолярных перегородок за счет интерстициального отека обильной инфильтрации лимфоидными и сегментоядерными клетками. В просвете альвеол наблюдались слущенные клетки альвеолярного эпителия и единичные сегментоядерные лейкоциты. В стенке бронх и в перибронхиальной соединительной ткани были обнаружены незначительные скопления нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов (рисунок 7).

Брыжеечные лимфатические узлы визуально сохраняют типичную структуру и не отличается от такового 2 группы. Вместе с тем отмечается увеличение размера лимфатических фолликулов. Герминативные центры лимфатических фолликулов выявляются в единичных случаях (рисунок 8).

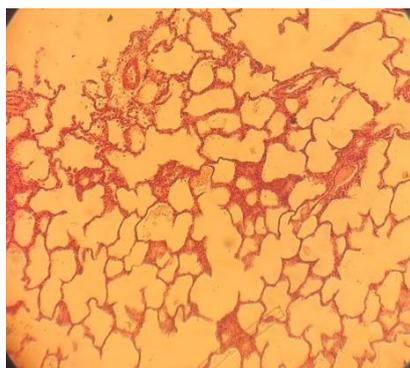


Рисунок 7. Легкие

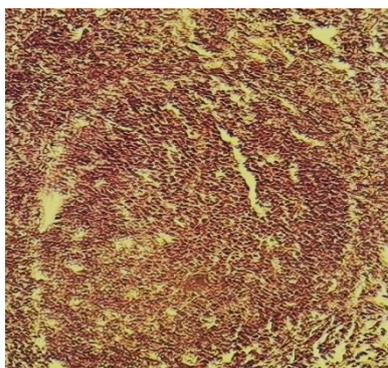


Рисунок 8. Брыжеечные лимфатические узлы

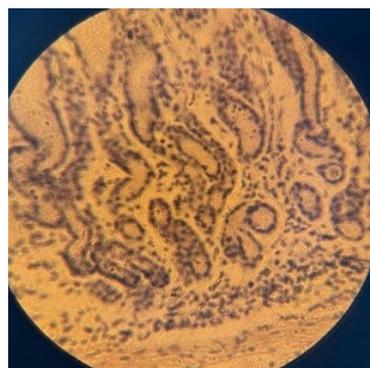


Рисунок 9. Толстый от-дел кишечника

Гистологическое строение кишечника не отличается от такового первой и второй опытной группы. Слизистая оболочка кишечника в большинстве случаев сохранены. Наблюдается гиперсекреция слизи с увеличением количества бокаловидных клеток, в собственном слое слизистой оболочки наблюдается наличие повышенного количества лимфоцитов, макрофагов соединительной ткани (рисунок 9).

Выводы

Во всех опытных группах, где проводились гистологические исследования у мышей, обработанных штаммами *R.equi*, содержавшие плазмиды pVarA, pVarB и pVarN, получены схожие результаты. Это подтверждают тот факт, что плазмид является наиболее важным вирулентным фактором *R.equi*, поскольку он связан с его способностью выживать и расти внутри макрофагов хозяина.

Финансирование. Данное исследование финансировалось Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант № AP19680565).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barton, M.D. and Hughes, K.L. (1980) *Corynebacterium equi*: a review. Vet. Bull. 50, 65-80.
2. Prescott, J.F. (1991) *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. Clin. Microbial. Rev. 4, 20-34.

3. Yager, J.A. (1987) The pathogenesis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Vet. Microbiol.* 14, 225-232.
4. Takai, S., Koike, K., Ohbushi, S., Izumi, C. and Tsubaki, S. [1991] Identification of 15 to 17-kilodalton antigens associated with virulent *Rhodococcus equi*. *J. Clin. Microbiol.* 29, 439-443.
5. Takai, S., Sekizaki, T., Ozawa, T., Sugawara, T., Watanabe, Y. and Tsubaki, S. (1991) Association between a large plasmid and 15- to 17-kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. *Infect. Immun.* 59, 4056-4060.
6. Tkachuk-Saad, O. and Prescott, J. (1991) *Rhodococcus equi* plasmids: isolation and partial characterization. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2696-2700.
7. Takai, S., Anzai, T., Wada, R., Kobayashi, C., Tsubaki, S., Kanemam, T. and Kamada, M., unpublished data.
8. Kanno, T., Asawa, T., Ito, H., Takai, S., Tsubaki, S. and Sekizaki, T. (1993) Restriction map of a virulence-associated plasmid of *Rhodococcus equi*. *Plasmid* 30, 309-311.
9. Sekizaki, T., Takai, S., Egawa, Y., Ikeda, T., Ito, H. and Tsubaki, S. Sequence of the *Rhodococcus equi* gene encoding the virulence-associated 15-to 17-kDa antigens. *Gene* 155, 135-136.
10. Zink, M.C., Yager, J.A., Prescott, J.F. and Fernando, M.A. (1987) Electron microscopic investigation of intracellular events after ingestion of *Rhodococcus equi* by foal alveolar macrophages. *Vet. Microbiol.* 14, 295-305.
11. Takai, S., Anzai, T., Sasaki, Y., Tsubaki, S. and Kamada, M. (1993) Virulence of *Rhodococcus equi* isolates from lesions of infected foals. *Bull. Equine Res. Inst.* 30, 9-14.