

## ИНФЕКТОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ САЛЬМОНЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Изучены особенности инфекционного процесса у мышей (СВА х С57 BL6)F1 при энтеральном заражении штаммами *S. typhimurium* и *S. enteritidis*. Штамм сальмонелл серовара *enteritidis* вызывал более выраженные изменения параметров инфекционного процесса (летальность, обсемененность органов, изменения клеточного состава лимфоидных органов, подавление бактерицидных свойств макрофагов) и характеризовался более высоким уровнем антилактоферриновой, антикомплементарной, антииммуноглобулиновой активности.

Широкое распространение сальмонеллез, возбудителями которых в настоящее время являются сальмонеллы сероваров *enteritidis* и *typhimurium*, определяет актуальность изучения механизмов длительного переживания сальмонелл в организме хозяина. Целью исследования явилось изучение особенностей инфекционного процесса при экспериментальной сальмонеллезной инфекции, вызванной сальмонеллами сероваров *typhimurium* и *enteritidis*, отличающимися по некоторым биологическим свойствам.

### Материалы и методы

Экспериментальная инфекция воспроизводилась на 2 группах мышей-самцов линии (СВАхС57BL6)F1 массой 18–20 г, которые были инфицированы энтерально в дозе  $2 \times 10^6$  бактерий на мыш: 1 группа мышей была заражена *Salmonella enteritidis* (штамм 1), 2 группа – *Salmonella typhimurium* (штамм 2). Первый штамм (*S. enteritidis*) по сравнению со 2 штаммом (*S. typhimurium*) имел более высокий уровень антикомплементарной (АКА), антилактоферриновой (АЛФА) активности, антииммуноглобулиновой активности в отношении IgG (AIg(G)A). По уровню антииммуноглобулиновой активности в отношении IgM (AIg(M)A), IgA (AIg(A)A) и антилизосимной активности (АЛА) исследуемые штаммы не различались. Оба штамма не обладали гемолитической, лецитовителлазной и антагонистической активностью (в отношении кишечной палочки К12). Штамм *S. enteritidis* был устойчив к тетрациклину и фурадонину, штамм *S. typhimurium* – к тетрациклину. В каждой группе были заражены по 72 мыши, контроль составили 36 интактных мышей.

У зараженных животных проводили бактериологические и иммунологические исследования крови, селезенки и кишечника на 7, 14, 28, 56, 70, 84, 98, 140, 154 сутки инфекции. Кровь и гомогенаты органов засеивали на среду Плоскирева и

висмут-сульфитный агар. Результаты бактериологического исследования органов выражались в Ig числа колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 мл крови или на 1 г ткани. Идентификацию выделенных из органов сальмонелл проводили по морфологическим, культуральным, биохимическим и антигенным свойствам [9].

У штаммов, выделенных из органов, определяли АЛА, АКА [2] и АЛФА [3]. Антииммуноглобулиновую активность сальмонелл – способность инактивировать иммуноглобулины А (A Ig(A)A), М (A Ig(M)A) и G (A Ig(G)A) – оценивали на основе иммуноферментного определения концентрации иммуноглобулинов после инкубации последних с культурами бактерий [8]. У экспериментальных мышей определяли массу и количество ядродержащих клеток тимуса, селезенки и костного мозга. Перитонеальные макрофаги получали путем промывания брюшной полости мышей охлажденной средой 199 с гепарином (5 ЕД/мл) и последующим наслаиванием на пластиковые чашки диаметром 40 мм и культивированием в течение 1 часа в среде RPMI 1640 с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma). Для определения продукции ИЛ12 полученные перитонеальные макрофаги в концентрации  $10^7$ /мл в культуральной среде (RPMI 1640 с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma), 2 мМ L-глутамина (Sigma) и 80 мкг/мл гентамицина вносили по 100 мкл в лунки 96-луночного планшета и инкубировали при 37°С и 95% влажности в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 часов. Далее в супернатанте определяли содержание ИЛ12 с использованием ИФА-наборов (Bio Source Int., США). Регистрацию результатов проводили на фотометре «Мультискан» (Labsystems, Финляндия) ( $\lambda=450$  нм). Бактерицидную активность макрофагов перитонеального экссудата исследовали в опытах *in vitro* на 7, 14, 28, 56 и 70 сутки инфекции с определением константы бактерицидности, рассчитываемой по разнице коли-

чества колоний (lg КОЕ/мл) сальмонелл, выросших на агаре до и после 1,5-часовой инкубации макрофагов, со взвесью сальмонелл 1 и 2 штамма [12]. Интенсивность кислородозависимых механизмов фагоцитоза перитонеальными макрофагами оценивали по способности восстанавливать спонтанно и при стимуляции зимозаном, опсонизированным пуловой мышшиной сывороткой, нитросиний тетразолий (НСТ) фотометрическим методом [7]. Для этого перитонеальные макрофаги инкубировали 40 мин. при 37°С в ячейках плоскодонного 96-луночного планшета по 2,5 x 10<sup>5</sup> клеток на лунку без зимозана (спонтанный НСТ-тест) и с добавлением зимозана (2 мг/мл; Sigma, стимулированный НСТ-тест) в присутствии 0,3 мг/мл НСТ (Sigma). Образовавшийся диформазан растворяли в 0,1 мл диметилсульфоксида (димексид, ОАО «Завод Химреактивкомплект», Россия) и после добавления 2н КОН измеряли оптическую плотность на фотометре «Мультискан» ( $\lambda=620$  нм). Результаты выражали в абсолютных значениях оптической плотности на 2,5 x 10<sup>5</sup> клеток. Титры противомикробных антител к О-антигену сальмонелл определяли в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) с использованием эритроцитарного сальмонеллезного О-диагностикума (ГУП по производству бактериальных препаратов им. Г.Н. Габричевского) и выражали в lg. Статистическая обработка результатов проводилась параметрическими и непараметрическими методами с использованием критерия Стьюдента [6] и критерия Вилкоксона – Манна – Уитни [5].

### Результаты и обсуждение

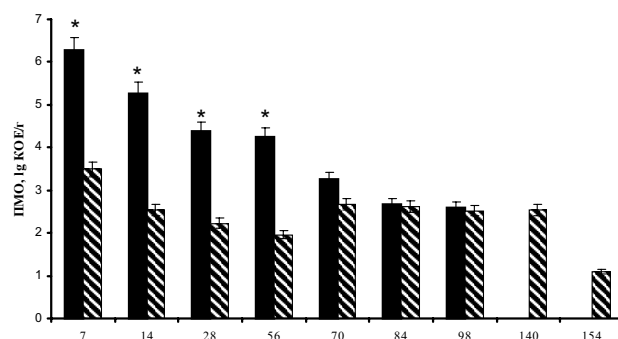
Проведенными исследованиями было установлено, что более высокий уровень летальности отмечался в течение первых 28 суток инфекции у мышей, зараженных *S. enteritidis* (27,8 ± 5,3%), тогда как у мышей, инфицированных *S. typhimurium*, гибель животных была значительно ниже и составила 11,1 ± 3,7% ( $p < 0,05$ ).

Инфекционный процесс у мышей обеих групп характеризовался длительным высевам бактерий из селезенки и кишечника. Максимальный высев бактерий из крови (5,82 ± 0,28 lg) отмечался в 1 неделю после заражения у мышей 1 группы и до 56 суток инфекции сохранялся на уровне 3,7 ± 0,02 lg. Результаты высеваемости сальмонелл из селезенки мышей, инфицированных *S. enteritidis* и *S. typhimurium*, представлены на рис 1, из которого следует, что в период с 7 по 56 сутки инфекции показатель микробной обсемененности (ПМО) селезенки у мышей 1 группы значительно превышал уровень обсемененности селезенки у мышей 2 группы. Начиная

с 70 суток существенных различий в уровне обсемененности селезенки у мышей обеих групп не наблюдалось. У животных 2 группы с 70 по 140 сутки инфекции отмечалась тенденция к увеличению ПМО. Уровень высеваемости сальмонелл из толстого кишечника был наибольшим у мышей 1 группы с максимумом высеваемости на 28 сутки (5,4 ± 0,08 lg КОЕ/г).

Анализ биологических свойств штаммов, выделенных из селезенки мышей на поздних сроках инфекции, показал, что независимо от сероваров сальмонелл происходило нарастание экспрессии АЛФА, АIg(A)А, АIg(M)А, АIg(G)А по сравнению с исходными штаммами. Наибольший рост отмечался в экспрессии антииммуноглобулиновой активности в отношении IgA, IgG и АЛФА у обоих штаммов сальмонелл (соответственно в 2,8; 1,7 и 1,7 раз для 1 штамма и в 3,2; 1,8 и 2,1 раз для 2 штамма). Усиление экспрессии антикомплемментарной активности выявлено только для серовара *typhimurium*. Существенных изменений в уровне АЛА у исследуемых штаммов (независимо от серовара), выделенных из органов, по сравнению с исходными не выявлено.

Изучение иммунологических особенностей течения экспериментальной сальмонеллезной инфекции выявило как общие типичные признаки стереотипной воспалительной реакции, развивающейся при экспериментальной бактериальной инфекции, так и некоторые отличия в зависимости от сероваров и свойств сальмонелл, используемых для заражения животных. Установлено снижение массы тимуса, количества тимоцитов и миелокариоцитов у мышей обеих групп на 7, 14, 28, 56, 70 сутки инфекции и, напротив, увеличение массы селезенки и количества спленоцитов с максимумом на 7, 14,



Примечание: По оси абсцисс – сроки инфекции (сутки); темные столбцы – уровень ПМО у мышей 1 группы, с косой штриховкой – 2 группы.

\* – достоверность отличий ПМО мышей 1 и 2 группы ( $p < 0,05$ )

Рисунок 1. Показатель микробной обсемененности селезенки мышей исследуемых групп в динамике сальмонеллезной инфекции

28 сутки. Наиболее выраженные изменения указанных параметров по сравнению с контролем отмечались у мышей 1 группы. Так, снижение массы тимуса у мышей 1 группы с 7 по 28 сутки инфекции происходило на 24-28%, а увеличение массы селезенки – на 149-686% от уровня контроля. У мышей 2 группы отмечено менее выраженное (14,5–15%) снижение массы тимуса и увеличение массы селезенки (45-56%) от уровня контроля.

Учитывая, что защита организма от сальмонелл больше связана с клеточно-опосредованным иммунитетом и регулируется сложной системой цитокинов, нами была изучена *in vitro* продукция ИЛ 12, секретируемого активированными макрофагами, на разных сроках инфекции. Результаты исследования спонтанной секреции ИЛ 12 перитонеальными макрофагами представлены на рис. 2.

Как следует из данных рис. 2, на 7 сутки инфекции только в супернатантах макрофагов мышей 1 группы по сравнению с контролем определялся более высокий уровень ИЛ 12. На 14 сутки инфекции спонтанная продукция ИЛ 12 снижалась по сравнению с контролем у мышей обеих групп. На 28 сутки инфекции уровень ИЛ 12 в супернатантах макрофагов мышей 1 группы достоверно возрастал по отношению к контролю. У мышей 2 группы секреция ИЛ 12 перитонеальными макрофагами на 7 и 28 сутки инфекции существенно не отличалась от уровня контроля. Тем самым выраженной активации перитонеальных макрофагов мышей, инфицированных штаммом *S. typhimurium*, в период инфекции с 7 по 28 сутки не происходило.

Известно, что макрофаги играют существенную роль в защите от внутриклеточнопаразитирующих сальмонелл [4]. Установлено, что бактерицидные свойства перитонеальных макрофагов мышей 1 группы оказались значительно ослаблены по сравнению с контролем (14-, 10-, и 6-кратное снижение константы бактерицидности соответственно на 14, 28 и 56 сутки инфекции,  $p < 0,05$ ), что свидетельствует о сохранении и размножении сальмонелл в макрофагах мышей, инфицированных *S. enteritidis*, в условиях *in vitro*. Существенных отличий в уровне бактерицидных свойств перитонеальных макрофагов серовара *typhimurium* по сравнению с контролем на 7, 14, 28, 56 и 70 сутки инфекции не выявлено.

Результаты анализа интенсивности кислородозависимых механизмов фагоцитоза перитонеальными макрофагами инфицированных мышей представлены на рис. 3 (А, Б), из кото-

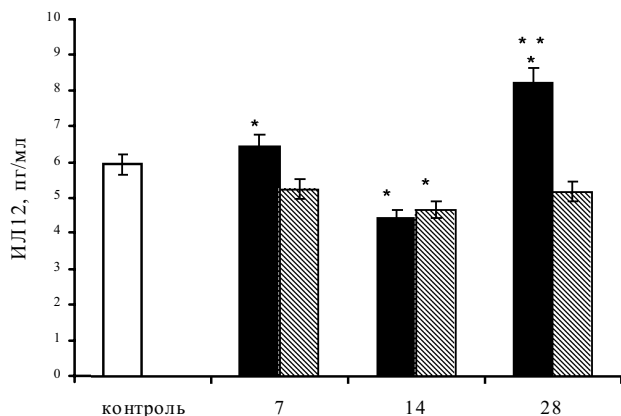
рого следует, что достоверное увеличение спонтанной и стимулированной зимозаном продукции супероксид-аниона по сравнению с контролем отмечалось на 14, 56 сутки инфекции у мышей 1 группы и на 14, 28, 56, 70 сутки – у мышей 2 группы. На ранних сроках инфекции более выраженные изменения продукции кислородных метаболитов отмечались у макрофагов мышей 1 группы. Так, если у мышей 1 группы по сравнению с контролем повышение продукции супероксид-аниона на 14 сутки инфекции составило 26% для спонтанного и 50% – для стимулированного НСТ-теста, то для макрофагов мышей 2 группы стимуляция была менее выражена и составила соответственно 13% и 37%.

Следует отметить, что в более поздние сроки инфекции показатели спонтанного и индуцированного НСТ-теста для макрофагов мышей 1 группы постепенно снижались, и на 70 сутки отмечалось угнетение по сравнению с контролем спонтанной и стимулированной продукции супероксид-аниона. Напротив, у мышей 2 группы на 56 сутки инфекции по сравнению с контролем определялись максимальные значения обоих показателей (увеличение на 35% спонтанного и 47% – стимулированного НСТ-теста). Таким образом, перитонеальные макрофаги мышей, инфицированные штаммом *S. enteritidis*, обладали более выраженной способностью к спонтанной (на 14 сутки) и индуцированной (на 14, 28 сутки) продукции активных кислородных метаболитов по сравнению с макрофагами мышей, зараженных *S. typhimurium*, что свидетельствует об усилении кислородозависимых механизмов фагоцитоза у макрофагов мышей этой группы. В то же время у макрофагов мышей, инфицированных *S. typhimurium*, наибольшее усиление продукции супероксид-аниона отмечалось на 56, 70 сутки, т. е. в более поздние сроки инфекции.

Исследование гуморального иммунного ответа, оцениваемое по уровню антител к О-антигену (О-АГ) сальмонелл в РПГА, показало, что у мышей обеих групп на 7 сутки инфекции в сыворотке крови количество антител составляло 1,2-1,38 lg. В последующие сроки инфекции у мышей обеих групп происходило дальнейшее нарастание уровня антител. Наиболее высокий титр антител отмечался на 28, 56 и 70 сутки инфекции у мышей 1 группы (соответственно  $2,2 \pm 0,12$ ;  $2,51 \pm 0,07$  и  $2,2 \pm 0,09$ lg) по сравнению со 2 группой (соответственно  $1,9 \pm 0,18$ ;  $1,9 \pm 0,09$  и  $1,3 \pm 0,06$ lg). Вместе с тем на 98, 140 и 154 сутки инфекции у мышей 2 группы отмечалось дальнейшее увеличение количе-

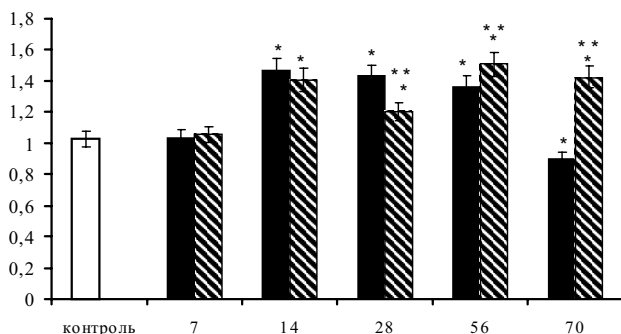
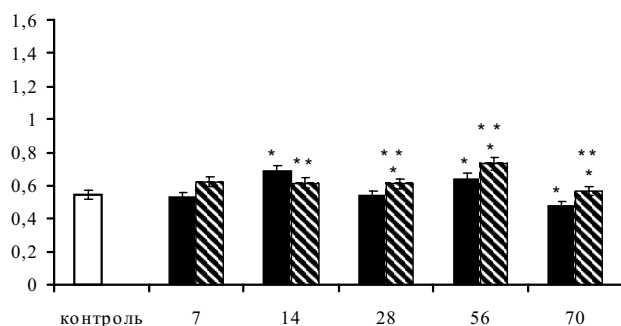
ства антител (соответственно до  $2,2 \pm 0,11$ ;  $2,4 \pm 0,15$  и  $1,9 \pm 0,18$  Ig), а у мышей 1 группы титр антител к О-антигену сальмонелл снижался до 1,0 Ig к 98 суткам инфекции. Тем самым независимо от серовара сальмонелл с 7 по 70 сутки инфекции выявлялся повышенный уровень антител к О-АГ сальмонелл. Однако наиболее

высокие значения содержания антител в этом временном диапазоне были характерны для мышей, инфицированных 1 штаммом (*S. enteritidis*). Но начиная с 70 суток уровень антител к О-антигену у *S. typhimurium* повышался с максимумом на 140 сутки инфекции, а у мышей 1 группы к 98 суткам имел минимальные значения.



По оси абсцисс: сроки инфекции (сутки); темный столбец – 1 группа, с косой штриховкой – 2 группа; \* – достоверность отличий с контролем ( $p < 0,05$ ); \*\* – достоверность отличий между 1 и 2 группами ( $p < 0,05$ )

Рисунок 2. Спонтанная продукция ИЛ12 перитонеальными макрофагами мышей



По оси ординат – абсолютные значения оптической плотности. По оси абсцисс – сроки инфекции (сутки); темные столбцы – показатели у мышей 1 группы, с косой штриховкой – 2 группы.

\* – достоверность отличий с контролем ( $p < 0,05$ )  
 \*\* – достоверность отличий 1 и 2 групп ( $p < 0,05$ )

Рисунок 3. Спонтанный (А) и стимулированный (Б) НСТ-тест перитонеальных макрофагов при экспериментальной сальмонеллезной инфекции

Таблица. Характеристика изменений свойств исследуемых штаммов сальмонелл и параметров инфекционного процесса при экспериментальной инфекции

Свойства сальмонелл и параметры инфекционного процесса	Степень выраженности признаков при заражении исследуемыми штаммами сальмонелл	
	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. typhimurium</i>
Изменение персистентных свойств сальмонелл:		
АЛА	–	–
АКА	–	↑
АЛФА	↑↑	↑
AIg(A)A	↑	↑↑
AIg(M)A	↑↑	↑
AIg(G)A	↑↑	↑
Летальность	↑↑	↑
Обсемененность органов	↑↑	↑
Снижение массы тимуса и количества тимоцитов	↓↓	↓
Увеличение массы селезенки и количества спленоцитов	↑↑	↑
Бактерицидность макрофагов	↓↓	–
Титр АТ к О-антигену сальмонелл	↑↑ (max на 56 сутки)	↑ (max на 140 сутки)
Продукция супероксида - аниона перитонеальными макрофагами:		
спонтанная	↑↑ (max на 14 сутки) ↓ (на 70 сутки)	↑↑ (max на 56 сутки)
индуцированная	↑↑ (max на 14 сутки) ↓ (на 70 сутки)	↑↑ (max на 56, 70 сутки)
Спонтанная продукция перитонеальными макрофагами ИЛ12	↑ (max на 28 сутки) ↓↓ (на 14 сутки)	– ↓ (на 14 сутки)

Примечание: ↑↑, ↓↓ – значительные отклонения по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ );  
 ↑, ↓ – менее выраженные отклонения по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ );  
 – – отсутствие достоверных изменений по сравнению с контролем

Обобщенные данные настоящего исследования, приведенные в таблице, свидетельствуют о том, что в динамике инфекционного процесса культуры *S. enteritidis*, высеваемые из селезенки, имели по сравнению с исходными штаммами более высокий уровень таких свойств, как антилактоферриновая активность и способность инактивировать иммуноглобулины классов G и M. При инфицирующей дозе  $2 \times 10^6$  бактерий на мышь и энтеральном способе заражения штамм *S. enteritidis* по сравнению со штаммом *S. typhimurium* оказался более вирулентным (высокая летальность, обсемененность органов) для мышей линии (СВАхС57ВL6)F1 и вызывал наиболее выраженные изменения лимфоидных органов (снижение массы и клеточного состава тимуса, увеличение массы и количества клеток селезенки). Высокий уровень антител к О-антигену сальмонелл в сыворотке у мышей обеих групп не способствовал элиминации сальмонелл из организма. Кроме того, штамм *S. enteritidis* в большей мере, чем штамм серовара *typhimurium*, на 14, 28, 56 сутки инфекции вызывал подавление бактерицидной способности перитонеальных макрофагов, которая не была связана с угнетением продукции активных форм кислорода. Напротив, в эти сроки инфекции происходило усиление спонтанного и в большей степени индуцированного зимозаном образования супероксид-аниона перитонеальными макрофагами мышей I группы. Супрессии бактерицидных свойств перитонеальных макрофагов мышей, зараженных *S. enteritidis*, могло способствовать и отсутствие выраженной активации спонтанной секреции ИЛ 12 в период до 28 суток инфекции, а также

подавление продукции данного цитокина макрофагами на 14 сутки. Известно, что ИЛ 12 является индуктором гамма-интерферона, одного из ведущих цитокинов, усиливающих клеточно-опосредованные механизмы иммунитета, обеспечивающие элиминацию внутриклеточно-паразитирующих возбудителей, в том числе и сальмонелл [11, 13, 14]. Длительной персистенции (до 154 суток) штамма *S. typhimurium* со средним уровнем обсемененности могло способствовать отсутствие как супрессии, так и выраженной активации этим штаммом бактерицидных свойств макрофагов. Отсутствие стимуляции продукции ИЛ12 макрофагами мышей, инфицированных данным штаммом, могло способствовать снижению микробицидного потенциала макрофагов и создавать условия для персистенции в них сальмонелл, поскольку в активированных макрофагах выживание внутриклеточных патогенов затруднено [10]. Вместе с тем, учитывая данные об иммуносупрессивном действии липополисахарида сальмонелл на клеточные механизмы иммунитета [1], можно предположить, что компоненты ЛПС используемого для воспроизведения экспериментальной инфекции штамма *S. enteritidis*, по сравнению со штаммом *S. typhimurium*, оказывали более выраженное иммуносупрессивное действие. Не исключено участие в подавлении антимикробных механизмов защиты выявленных у данных штаммов сальмонелл персистентных свойств (антикомплементарной, антилактоферриновой и антииммуноглобулиновой активности), способствовавших наряду с другими факторами длительному переживанию возбудителя в организме мышей.

**Список использованной литературы:**

1. Борисова Е.В. Иммуносупрессивное действие липополисахарида S- и R-форм сальмонелл и роль липида А // Журн. микробиол. – №5. – 1998. – С. 20-23.
2. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. – М.: Медицина, 1999. – С. 366.
3. Вальшева И.В. Вальшева А.В. . Карташова О.Л. и др. Новый метод определения антилактоферриновой активности микроорганизмов // Журн. микробиол. – 2003. – №4. – С. 64-67.
4. Воскресенский А.М. , Аркадьева Г.Е. Макрофаги в неспецифическом взаимодействии с инфекционными агентами // Иммунология. – 1984. – №3. – С. 10-15.
5. Гублер Е.В. , Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. – Ленинград.: Медицина, 1973. – С. 139.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая шк. – 1990. – С. 292.
7. Любимов Г.Ю., Земков Н.К., Вольский Н.М., Козлов В.А. Хемилюминесценция перитонеальных макрофагов при действии макрофагаактивирующего фактора // Иммунология. – 1992. – №1. – С. 40-45.
8. Способ определения антииммуноглобулиновой активности микроорганизмов. Патент РФ на изобретение №2236465 от 20 сентября 2004 г.
9. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М.О. Биргера. – М., – 1973. – С. 456.
10. Тотолян А.А., Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы. Серия учебных пособий. – СПб.: Наука, 2000. Т. 1. – С. 231.
11. Bost K.L., Clements J.D. Intracellular *Salmonella dublin* induces substantial secretion of the 40-kilodalton subunit of interleukin-12 (IL-12) but minimal secretion of IL-12 as a 70-kilodalton protein in murine macrophages // Infect Immun. – 1997. – Vol. 65. – №8. – P. 3186 – 3192.
12. Dissel J.T., Leijh P.C., Furth R. Differences in initial rate of intracellular killing of *Salmonella typhimurium* by resident peritoneal macrophages from various mouse strains // J. Immunol. – 1985. – Vol. 134 – №5 – P. 3404-3410.
13. E. Jouanguy, R. Duffinger, S. Dupuis et al. IL-12 and IFN- $\gamma$  in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men // Current Opinion in Immunology. – 1999. – №11. – P. 346-351
- Kincy-Cain T. , Clements J. D. , Bost K. L. Endogenous and exogenous interleukin-12 augment the protective immune response in mice orally challenged with *Salmonella dublin*. // Infect. Immun. – 1996. – Vol. 64. – №4. – P. 1437-1440.