

ТЕОРЕТИЧНА І ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

УДК 579.881:616.995.7

*А.В. Бондаренко**Харківський національний медичний університет***АНАПЛАЗМОЗ: ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-БІОЛОГІЧНА МОДЕЛЬ**

Подано технологію експериментального анаплазмозу після інтраперитонеального введення лабораторним тваринам зразків біологічного матеріалу, що містить збудник. Як біологічна модель використовувалися білі нелінійні миші зі штучно сформованим (при використанні циклофосфаміду) імунодефіцитним станом.

Ключові слова: біологічна модель, *Mus musculus* L., циклофосфамід, анаплазмоз, *Anaplasma phagocytophilum*.

Сьогодні до маловивченої групи захворювань відноситься нещодавно описана анаплазмозна інфекція, яка є достатньо поширеною в Європейських країнах. Анаплазмоз уходить до групи трансмісійних інфекційних захворювань людини, рогатої худоби та ссавців і викликається бактеріями роду *Anaplasma* [1–4]. Методам етіологічної верифікації анаплазмозу відводиться вирішальне значення в діагностиці захворювання, тому що клінічний перебіг характеризується лише синдромом загальної інтоксикації і, як правило, не супроводжується специфічними клінічними проявами [5–7].

У різних країнах світу активно розробляються лабораторні моделі для штучного відтворення анаплазмозу у дослідних тварин [8, 9]. Кінцевою метою таких досліджень є: вивчення особливостей патогенезу; встановлення закономірностей імунологічних реакцій і формування специфічного та неспецифічного імунітету; визначення в умовах *in vivo* результативності (специфічності, чутливості, відтворюваності) методів етіологічної діагностики; ефективності етіотропної терапії і засобів специфічної імунопрофілактики; встановлення природного резервуара інфекції і механізмів передачі патогену.

Мета дослідження – розробка уніфікованої біологічної моделі для відтворення експериментального анаплазмозу, що характеризується простотою технологічного відтворення, дешевизною та доступністю для широкого практичного застосування.

Матеріал і методи. Алгоритм відтворення експериментального анаплазмозу складався з таких послідовних етапів: 1) штучне формування імунодефіцитного стану у нелінійних білих мишей (*Mus musculus* L.); 2) підготовка зразків досліджуваного біологічного матеріалу; 3) зараження підготовленими зразками лабораторних тварин зі штучно сформованим імунодефіцитним станом; 4) відбір від померлих або таких, що було вбито (методом хлороформного наркозу), дослідних тварин зразків секційного матеріалу (органів- і тканин-мішеней); 5) верифікація етіології шляхом експрес-детекції збудників методом ПЛР у відібраних зразках секційного матеріалу.

Штучний імунодефіцитний стан у білих нелінійних лабораторних тварин створювали шляхом одноразової підшкірної ін'єкції 250 мкг/кг циклофосфаміду у формі лікарського препарату «Циклофосфан» (ВАТ «Київмедпрепарат», Україна) за 3–4 години перед

© А.В. Бондаренко, 2014

уведенням тваринам зразків досліджуваного біологічного матеріалу. При підшкірному способі введення препарату останній надходив у систему кровообігу і кровотворні органи більш рівномірно, ніж при інтраперитонеальному способі, швидкість елімінації препарату з організму тварини знижувалась, що забезпечувало формування тривалішого за часом (до 7–10 діб) імунодефіцитного стану, достатнього для розмноження і накопичення анаплазм. Оптимальною є емпірично визначена нами доза препарату 250 мкг/кг. Ін'єкція цієї дози забезпечує формування достатньо вираженого і стійкого імунодефіцитного стану і не призводить до непередбачуваної загибелі частини (близько 12 % і більше) дослідних тварин, що відмічалось при введенні 500 мкг/кг і більше.

Відібрані зразки крові вносили до стерильних ємностей з антикоагулянтном (з відсутньою антимікробною активністю) для запобігання згортанню крові. При проведенні досліджень використовували вакуумні системи забору крові Venosafe™, Terumo Europe N.V. (Бельгія) і пробірки VF-052SDK (робочий об'єм 2 мл) з антикоагулянтном K2-EDTA. Зразки крові одноразово заморожували при температурі -20 °C і розморожували при кімнатній температурі, що призводило до руйнування клітин крові і вивільнення мікроколоній патогену. Зразки біологічного матеріалу твердої консистенції ретельно гомогенізували (шляхом подрібнення або розтирання) і розводили стерильною дистильованою водою у співвідношенні 1:9 (об'єм/об'єм відповідно) з подальшим перемішуванням до утворення рівномірної суспензії. Перед гомогенізацією поверхню кліщів дезінфікували шляхом занурення останніх на 10 хвилин у 70 % етиловий спирт. Гомогенізували все тіло кліща, оскільки збудники могли знаходитися в різних його тканинах і органах (слинних залозах, лімфі, кишечнику і т. д.). Для введення лабораторним тваринам відбирали супернатант (після відстоювання й самовільного осадження в осад великорозмірних часток) суспензії гомогенізованих зразків. Усі маніпуляції при відборі та підготовці для дослідження зразків біологічного матеріалу здійснювали з дотриманням правил асептики, щоб запобігти додатковій їх контамінації сторонньою мікрофлорою.

Нелінійним білим мишам зі штучно сформованим імунодефіцитним станом вводили зразки різного біологічного матеріалу (в об'ємі 0,3 мл) шляхом інтраперитонеальної ін'єкції, що забезпечувало велику площу для аплікації збудників з високою достовірністю контакту останніх з клітинами-мішенями (макрофагами, лейкоцитами, еритроцитами та ін.). Термін спостереження за зараженими дослідними тваринами становив 8–10 діб, оскільки в цей годинний період досягає максимального значення концентрація збудників у тканинах і органах тварин [8].

Для точної верифікації етіології інфекційного процесу від загиблих та морталізованих тварин (методом гіпернаркозування хлороформом) застосовували найбільш доступний і технологічно дешевий стандартний варіант ПЛР. При цьому верифікація етіології ґрунтується на виявленні методом ПЛР основних клінічно значущих видів анаплазм (*A. phagocytophilum*) у зразках крові (відібраної шляхом пункції серця з дотриманням правил асептики) у дослідних тварин, заражених зразками досліджуваного біологічного матеріалу. Доцільність відбору саме зразків крові обґрунтовується простотою виконуваних для цього маніпуляцій, а також повним збігом отриманих нами (позитивних і негативних) результатів ПЛР при паралельному дослідженні зразків крові та інших тканин і органів (селезінки, кісткового мозку, печінки, лімфовузлів), відібраних від одних і тих самих дослідних тварин. Для відтворення стандартних ПЛР застосовували доступні на території України, відносно дешеві і вже підготовлені до безпосереднього використання комерційні набори реагентів фірми «IsoGene Lab. Ltd» (м. Москва, РФ): «Комплект реактивів для універсальної пробоподготовки» – Diatom®DNA Prep 100 (включає реактиви для виділення і очищення із зразків біологічного матеріалу ДНК з метою подальшої ампліфікації певного її фрагмента); «Набор реагентов для амплификации ДНК» – Gene Pak®DNA PCR test: E2136 (включає реакційні суміші з праймерною системою Eph для ампліфікації специфічного фрагмента генома *A. phagocytophilum*); «Маркер молекулярной массы ДНК M50, M100» – GenePak™ DNA Ladder M50, M100 (включає суміші фрагментів ДНК різної молекулярної

маси, що відрізняється кількістю пар нуклеотидів відповідно, і використовується для порівняльного встановлення розміру утворених ампліконів при відтворенні ПЛР з синтезованими праймерами); «Універсальний внутрішній контроль УВК-90» (включає набори реактивів для моніторингу можливих втрат ДНК при її виділенні з досліджуваних зразків біологічного матеріалу і для визначення можливого інгібування ПЛР у процесі її відтворення) [10].

Зарубіжні дослідники при створенні біологічних моделей експериментального анаплазмозу в першу чергу використовують ті види тварин, які є природними хазяями для збудників: коней, великої рогатої худоби, овець, білохвостих оленей, собак, деревних щурів і білоногих мишей [8, 9]. Використання вказаних тварин в експерименті, хоч і дозволяє з великою достовірністю відтворити природний перебіг інфекційного процесу, але має ряд істотних недоліків, пов'язаних з їх недоступністю для широкого застосування у практиці, високою вартістю таких тварин, труднощами утримання останніх в умовах лабораторії і технічною складністю проведення на них експериментів, а також обмеженнями відносно можливості створення уніфікованої лабораторної моделі для всіх видів анаплазм, що зумовлено здатністю кожного виду патогену розмножуватися і накопичуватися лише у чутливих до них тварин певного виду.

У зв'язку з цим останніми роками відмічена тенденція до збільшення кількості досліджень, спрямованих на розробку технічно зручніших моделей експериментального відтворення анаплазмозів, заснованих на використанні найбільш поширених лабораторних тварин: найчастіше – мишей, значно рідше – щурів, морських свинок та кролів [11]. Слід зазначити, що у звичайних білих нелінійних лабораторних мишей експериментальний анаплазмоз характеризується повною відсутністю або надзвичайно слабо вираженими симптомами захворювання без істотного розмноження і накопичення в їх організмі збудників, швидкою елімінацією останніх навіть в умовах бактеріємії у дослідних тварин на початковому етапі після їх зараження. Через вказані обставини дослідники повинні застосовувати генетично клоновані сингенні

лінії мишей з уродженням імунodefіцитом і таких, що характеризуються високим рівнем чутливості до збудників різних інфекційних захворювань [11]. Проте такі лінійні тварини є відносно дорогими, досить дефіцитними, потребують спеціальних умов для їх ізольованого утримання і розмноження, що запобігало б загибелі тварин при випадковому інфікуванні. Це істотно ускладнює стабільне забезпечення лінійними імуносупресивними тваринами лабораторій і широке практичне їх використання як біологічної моделі. Тому потенційно найбільш перспективним для широкого практичного застосування може бути біологічний спосіб, заснований на використанні білих нелінійних лабораторних мишей з індукованим імунodefіцитним станом. Останній вдається сформувати шляхом введення дослідній тварині хімічних сполук, що мають необхідний спектр імунodeпресивної дії. Існує багато лікарських препаратів, що характеризуються різнотипними механізмами імунodeпресії без прояву протибактерійної активності. Це дозволяє здійснювати обґрунтований вибір для застосування саме тих препаратів, які забезпечують адекватне відтворення потрібного імуносупресивного стану у дослідних тварин з відсутністю небажаної бактерицидної або бактеріостатичної дії на анаплазми.

Вибір препарату «Циклофосфан» (ВАТ «Київмедпрепарат», Україна) для штучного формування імунodefіцитного стану у білих нелінійних мишей обґрунтований детально вивченими механізмами його імуносупресивної дії, відсутністю протибактерійної активності, дешевизною та доступністю [12].

Результати та їх обговорення. Створена нами біологічна модель експериментального анаплазмозу є придатною для проведення як діагностичних, так і епідеміологічних, епізоотичних, еколого-біологічних та інших досліджень зразків біологічного матеріалу різного походження, у тому числі зразків матеріалу твердої і рідкої консистенції, з відсутністю і наявністю контамінації сторонньою мікрофлорою.

В ході експерименту спостерігались виникнення у тварин клінічних ознак захворювання: зниження рухливості й апетиту, інертність при тактильному і звуковому роздратуванні, згорблена постава, кульгавість,

метеоризм, втрата близько 30 % маси тіла – та їх передчасна загибель. Нами визначено і порівняно рівень морбідності (передчасної загибелі і захворюваності) в трьох різних групах лабораторних тварин: група № 1 – контрольні інтактні тварини; група № 2 – контрольні тварини зі штучно сформованим імунodefіцитним станом; група № 3 – дослідні тварини з імунodefіцитним станом, заражені зразками досліджуваного біологічного матеріалу. Результати цих досліджень показали, що на відміну від контрольних тваринних груп № 1 і 2 у дослідних тварин групи № 3 виникало клінічно виражене захворювання. При цьому надалі при використанні методу ПЛР було встановлено, що анаплазмоз був причиною передчасної загибелі дослідних тварин у 17,4 % випадків, призводив до виникнення у них клінічних ознак захворювання без загибелі впродовж терміну спостереження в 43,8 % випадків, протікав за відсутності виражених симптомів інфекції в 31,3 % випадків.

Для підтвердження розмноження і накопичення анаплазм у дослідних тварин групи № 3 вибірково (з урахуванням позитивного результату ПЛР) було проведено порівняльне визначення методом реакції непрямой імунofлюоресценції [13] кількості корпускулярного антигену (клітин і мікроколоній) бактерій роду *Anaplasma* в зразках досліджуваного біологічного матеріалу, якими заражалися дослідні тварини, і в зразках секційного матеріалу від останніх – тканин і органів, які потенційно можуть містити найбільшу кількість клітин збудників (кров, селезінка, кістковий мозок, печінка, лімфовузли). Результати цих досліджень продемонстрували накопичення бактерій у тка-

нинах і органах-мішенях заражених тварин, які перевищували початкові концентрації цих мікроорганізмів у відповідних зразках досліджуваного біологічного матеріалу більше ніж у 10^2 – 10^3 разів. Крім того, при порівняльному аналізі результатів виявлення анаплазм методом ПЛР в одних і тих самих зразках біологічного матеріалу без використання і з використанням етапу розмноження і накопичення патогену шляхом вирощування в умовах *in vivo* (запропонована біологічна модель) встановлено істотне ($p < 0,05$) зростання виявлення збудників з 6,9 до 18,4 %.

Висновки

1. Розроблена біологічна модель експериментального анаплазмозу полягає в тому, що як лабораторні тварини з підвищеною чутливістю до зараження і накопичення збудника застосовуються білі нелінійні миші зі штучно сформованим імунodefіцитним станом.

2. Біологічна модель, заснована на підшкірному введенні лабораторним тваринам імунodeпресивного препарату «Циклофосфан» у дозі 250 мкг/кг, характеризується уніфікованістю та простотою відтворення, значно дешевше за аналоги і доступна для широкого практичного використання.

3. Зараження зразками біологічного матеріалу, потенційно інфікованими анаплазмами, білих нелінійних мишей зі штучно сформованим імунodefіцитним станом дозволяє в цілому підвищити рівень виявлення збудників (з подальшою верифікацією останніх методом ПЛР) у 2 рази, що може бути використано для діагностики анаплазмозів у людей і тварин шляхом виявлення збудників у зразках біологічного матеріалу.

Список літератури

1. Dumler J. S. Anaplasma and Ehrlichia infection / J. S. Dumler // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2005. – V. 1063. – P. 361–373.
2. Ismail N. Human ehrlichiosis and anaplasmosis / N. Ismail, K. C. Bloch, J. W. McBride // Clin. Lab. Med. – 2010. – № 1. – P. 261–292.
3. Identification of *Anaplasma phagocytophila* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) variants in blood from sheep in Norway / S. Stuen, I. Van De Pol, K. Bergstro [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2002. – V. 40, № 9. – P. 3192–3197.
4. Isolation of an *Anaplasma* sp. organism from white-tailed deer by tick cell culture / U. G. Munderloh, C. M. Tate, M. J. Lynch [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2003. – V. 41, № 9. – P. 4328–4335.
5. Білецька Г. В. Гранулоцитарний анаплазмоз людини (ГАЛ). Результати серологічної розвідки ГАЛ в Україні / Г. В. Білецька, І. І. Бень, А. М. Шульган // Сучасні проблеми

епідеміології, мікробіології та гігієни : наук.-практ. конференція : збірник матеріалів. – Львів, 2010. – С. 443–449.

6. Гранулоцитарный анаплазмоз человека: особенности клинических проявлений в России / М. В. Афанасьева, Н. Н. Воробьева, Э. И. Коренберг [и др.] // Инфекционные болезни. – 2006. – Т. 4, № 2. – С. 24–28.

7. Bakken J. S. Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis / J. S. Bakken, J. S. Dumler // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2006. – V. 1078. – P. 236–247.

8. Experimental infection of C3H/HeJ mice with the NY18 isolate of *Anaplasma phagocytophilum* / U. Blas-Machado, J. Fuente, E. F. Blouin [et al.] // Vet. Pathol. – 2007. – V. 44. – P. 64–73.

9. Experimental infection of white-tailed deer with *Anaplasma phagocytophilum*, etiologic agent of human granulocytic anaplasmosis / C. Tate, D. Mead, M. Page Luttrell [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2005. – V. 43, № 8. – P. 3595–3601.

10. Gene Pak® DNA PCR test. Набор реагентов для обнаружения ДНК возбудителей инфекционных заболеваний методом полимеразной цепной реакции. ТУ 9398-001-73867468-2005 : инструкция. – М. : «Лаборатория Изоген», 2010. – 14 с.

11. Bakaletz L. O. Developing animal models for polymicrobial diseases / L. O. Bakaletz // Microbiology. – 2004. – V. 2, № 7. – P. 552–568.

12. Телегин Л. Ю. Экспериментальная фармакогенетика циклофосфамида : автореф. дис. на соискание ученой степени д-ра мед. наук : спец. 14.03.06 «Фармакология, клиническая фармакология» / Л. Ю. Телегин. – М., 2010. – 46 с.

13. Пат. № 56975 Україна, МПК7 C12N1/20. Спосіб діагностики анаплазмозної інфекції шляхом виявлення антигену збудника в реакції непрямой імуофлюоресценції (РНІФ) / Похил С. І., Тимченко О. М., Чигиринська Н. А. [та ін.] ; заявник та патентовласник ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова АМН України», Харківський національний медичний університет МОЗ України. – № и201004219 ; заявл. 12.04.10 ; опубл. 10.02.11, Бюл. № 3.

А.В. Бондаренко

АНАПЛАЗМОЗ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

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

Ключевые слова: биологическая модель, *Mus musculus L.*, циклофосфамид, анаплазмоз, *Anaplasma phagocytophilum*.

A.V. Bondarenko

ANAPLASMOSIS: EXPERIMENTAL-BIOLOGICAL MODEL

Technology of experimental anaplasmosis after intraperitoneal introduction of biological material samples containing causative agent to laboratory animals is presented. White nonlinear mice with the artificially formed (by the usage of cyclophosphamide) immunodeficient state were used as a biological model.

Key words: biological model, *Mus musculus L.*, cyclophosphamide, anaplasmosis, *Anaplasma phagocytophilum*.

Поступила 30.01.14