

Патоморфологические изменения в респираторном отделе легких белых мышей при экспериментальной чуме

С.А. Витязева, Т.П. Старовойтова, Г.Б. Мухтургин,
В.И. Дубровина (dubrovina-valya@mail.ru), С.В. Балахонов (adm@chumin.irkutsk.ru)

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт»
Роспотребнадзора

Резюме

В работе представлены данные об изменениях в респираторном отделе легких белых мышей при экспериментальной чуме, вызванной штаммами *Yersinia pestis* с разным плазмидным составом из Тувинского и Горно-Алтайского природных очагов чумы и их селекционными клонами. Выявлены морфологические и структурные изменения в легких, которые проявляются разной степенью активации иммунного ответа и выраженностью патологического процесса, вызванного *Y. pestis subsp. altaica* и *Y. pestis subsp. pestis* и их изогенными плазмидными вариантами.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, плазмиды, легкие

Pathological Changes in Respiratory Part of Lungs White Mice with Experimental Plague

S.A. Vityazeva, T.P. Starovoitova, G.B. Mukhturgin, V.I. Dubrovina (dubrovina-valya@mail.ru), S.V. Balakhonov (adm@chumin.irkutsk.ru)
«Irkutsk Antiplague Research Institute» of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance

Abstract

The paper presents data on changes in the respiratory part of lungs of white mice with experimental plague caused by *Yersinia pestis* strains with different plasmid composition of Tuva and Gorno-Altai natural foci of plague and breeding clones. Morphological and structural changes in the lungs, which appear different degree of activation of the immune response and the severity of the pathological process caused by *Y. pestis subsp. altaica* and *Y. pestis subsp. pestis* and their isogenic plasmid options.

Key words: *Yersinia pestis*, plasmids, lungs

Введение

Центральным звеном в патогенезе чумы является способность возбудителя к быстрому распространению и размножению в макроорганизме. При попадании в организм *Yersinia pestis* можно обнаружить в паренхиматозных органах уже через 1 – 3 часа – в зависимости от способа заражения. Такому быстрому диссеминированию бактериальной клетки в макроорганизме способствует выработка фермента гиалуронидазы, увеличивающего проницаемость тканевых структур, что приводит к нарушению микроциркуляции и геморрагическим проявлениям в различных органах и тканях. Степень патологических изменений проявляется в зависимости от вирулентности заражающего штамма возбудителя [1, 2].

Подавляющее большинство факторов вирулентности *Y. pestis* связано с плазмидным составом [3, 4]. Геном возбудителя чумы алтайского подвида – *Yersinia pestis subsp. altaica* имеет три плазмиды – *pYV* (45 МДа), *pYP* (6 МДа) и *pYT* (61 МДа), их роль хорошо изучена в реализации патогенных свойств иерсиний. Штаммы иерсиний с наличием плазмиды *pYV* проявляют фенотипические признаки, действие которых направлено на подавление фаго-

цитарной активности клеток иммунной системы. Плазмиды *pYP* и *pYT* видоспецифичны, первая – детерминирует синтез бактериоцина пестицина 1 и активатора плазминогена, вторая – кодирует два наиболее хорошо изученных фактора вирулентности – мышинный токсин и F1-капсулы [1, 2, 3, 5 – 7]. Отличительный признак возбудителя, циркулирующего в Тувинском очаге, – наличие в геноме дополнительной четвертой плазмиды *pTP33* (22,5 МДа) с неустановленной функцией. Предполагают, что данная плаزمидка представляет собой генетически модифицированный вариант резидентной плазмиды, несущей гены *pla* (активатор плазминогена) и *pstI* (пестицин 1) [6].

Утрата одной из плазмид приводит к изменению культуральных свойств и к снижению или полной утрате вирулентности возбудителя, то есть способности вызывать патологические изменения, которые нередко приводят к несовместимости с жизнью человека и животного. При любом способе заражения отмечаются изменения в легких, это связано с тем, что легкие являются первым тканевым фильтром по пути оттока лимфы в кровь.

Цель работы – выявить особенности патоморфологических изменений в респираторном отделе

легких белых мышей, инфицированных *Y. pestis* с разным плазмидным составом.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали семь штаммов чумного микроба, полученных из коллекции музея живых культур Иркутского научно-исследовательского противочумного института (табл. 1).

Экспериментальной моделью в опытах служили 178 беспородных, но стандартных по условиям содержания и весу (18 – 20 г) белых мышей обоего пола. Животные были разделены на семь групп по 24 особи в каждой и одну – контрольную (10 особей). Инфекционный процесс вызывали введением белым мышам подкожно культуры чумного микроба всех выбранных для исследования штаммов в дозе 10^6 м.к./0,5 мл. Контрольная группа получала подкожно физиологический раствор в том же объеме.

Животных усыпляли хлороформом через 1, 3, 7, 10 и 14 суток и немедленно вскрывали. Работу с экспериментальными животными осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» 2003 года (Приложение к Приказу МЗ СССР № 775 от 12.08.1977 г.). Вскрытие проводили с подробным описанием патоморфологических изменений и отбором образцов для бактериологического исследования (регионарный и отдаленный лимфатические узлы, печень, селезенка, легкие, кровь). Материал, забираемый на исследование (легкие), фиксировали в 10%-ом нейтральном фор-

малине, затем обезвоживали по стандартной методике и заливали в целлоидин. Целлоидиновые срезы толщиной 4 – 5 мкм окрашивали гематоксилином-эозином, метиленовым синим, метиловым зеленым-пиронином, трехвалентное железо выявляли по Перлсу, патологический белок и коллаген – по Маллори [4]. Количественную оценку пиронинофильных клеток (плазматических) проводили с помощью компьютерной программы «Морфометрия». Автоматический анализ изображения осуществляли с помощью светового микроскопа Zeiss (Германия) с видеокамерой Moticam 2000, разрешение – 1392 x 1040 пикселей, об. 100.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы «Статистика», версия 6.1 (Copyright © StatSoft, Inc. 19842001, ИПЧИ 31415926535897). Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$; $p < 0,01$.

Результаты и обсуждение

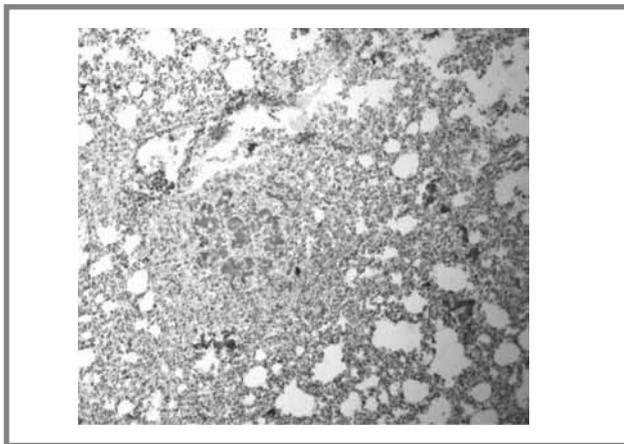
При заражении референтными штаммами *Y. pestis* И-3560 и *Y. pestis* И-2638 гибель белых мышей наступала в течение пяти суток с развитием септической формы чумы. Поражение легких выражалось в виде характерной серозно-геморрагической сливной пневмонии с резкой гиперемией и отеком ткани. У большинства животных в патологический процесс были вовлечены все доли легких. Гистологически отмечалось полнокровие ткани легких с множественными очагами геморрагической пневмонии и с крупными участками кровоизлияний. Кровеносные сосуды расширены,

Таблица 1.
Характеристика штаммов чумного микроба

Штамм	Место выделения	Плазмидный состав
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-2638	Тувинский природный очаг чумы	<i>pYP</i> (6 мДа) <i>pYV</i> (45 мДа) <i>pYT</i> (61 мДа) <i>pTP33</i> (22,5 мДа)
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3479*	Иркутский противочумный институт	<i>pYP</i> (6 мДа) <i>pYT</i> (61 мДа) <i>pTP33</i> (21,5 мДа)
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3480*	Иркутский противочумный институт	<i>pYT</i> (61 мДа) <i>pTP33</i> (21,5 мДа)
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>pestis</i> И-3560	Горно-Алтайский природный очаг чумы	<i>pYP</i> (6 мДа) <i>pYV</i> (45 мДа) <i>pYT</i> (61 мДа) <i>pTP33</i> (22,5 мДа)
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2359	Горно-Алтайский природный очаг чумы	<i>pYP</i> (6 мДа) <i>pYV</i> (45 мДа) <i>pYT</i> (65 мДа)
<i>Y. pestis</i> subsp. <i>altaica</i> И-2948	Горно-Алтайский природный очаг чумы	<i>pYV</i> (45 мДа) <i>pYT</i> (65 мДа)
<i>Y. pestis</i> subsp. ** <i>altaica</i> И-2948/3	Горно-Алтайский природный очаг чумы	<i>pYT</i> (65 мДа)

Примечание: * Штаммы селекционированы из штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* И-2638; **штамм селекционирован из атипичного штамма *Y. pestis* subsp. *altaica* И-2948.

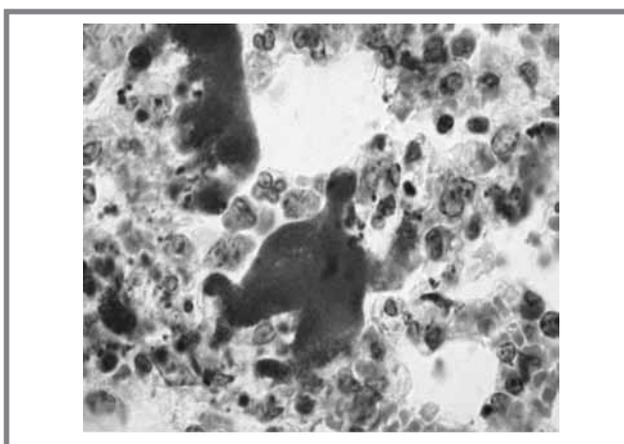
Рисунок 1.
Легкое белой мыши, инфицированной штаммом *Y. pestis* И-3560.
Крупный пневматический очаг, участки ателектаза.
Окраска гематоксилином-эозином, увелич. 10 x 10



полнокровны, стаз эритроцитов. Межальвеолярные перегородки отечны, с наличием нейтрофилов, лимфоцитов и других клеток. Выявлены изменения некротического характера (рис. 1), участки дистелектаза, а также скопление в альвеолах и мелких бронхах серозного экссудата и десквамированного альвеолярного эпителия. Имели место парез крупных сосудов и альтерация стенок сосудов.

При оценке клеточного состава межальвеолярных перегородок легких установлено резкое увеличение клеток гранулоцитарного (в 8 – 9 раз, $p < 0,001$), лимфатического (в 10 раз, $p < 0,001$) ряда и эозинофилов (в 4 раза, $p < 0,001$) за счет снижения числа альвеолоцитов (в 4 раза, $p < 0,001$), которые являются компонентом аэрогенного барьера и осуществляют газообмен. Данные изменения приводят к нарушению кислородного гомеостаза, нарушению структуры легкого и фор-

Рисунок 2.
Легкое белой мыши, инфицированной *Y. pestis* И-2638.
Инfiltrация межальвеолярных перегородок клетками гранулоцитарного ряда. Наличие чумных палочек в альвеолярном экссудате. Окраска метиленовым синим, увелич. 10 x 100



мированию ателектаза (рис. 2). Увеличение клеток лимфоидного ряда указывает на быстро развивающийся воспалительный процесс.

При заражении животных штаммами *Y. pestis* И-3560 и *Y. pestis* И-2638 отложения белковых комплексов (окраска по Маллори) в легочной ткани не регистрируется, поскольку заболевание развивается стремительно быстро и данная патология не успевает развиваться. При этом увеличение содержания железа в легочной ткани отмечается на ранних сроках исследования (3-и сутки), что связано с выходом его из эритроцитов путем гемолиза.

При заражении белых мышей изогенными вариантами вирулентного штамма *Y. pestis* И-2638, лишенных плазмид *pYV* (*pCad*⁻) и *pYP* (*pPst*⁻), гибель животных не наступала. При патоморфологическом исследовании органов и тканей захлороформированных животных, инфицированных штаммами *Y. pestis* И-3479 и *Y. pestis* И-3480, признаки развития чумы и изменения в легких отсутствовали.

При микроскопии установлены расширение просвета бронхов, незначительная диффузная перибронхиальная инфильтрация лейкоцитами (рис. 3); кровеносные сосуды, входящие в сосудисто-бронхиальный пучок, кровенаполнены, альвеолярные перегородки утолщены за счет клеточной инфильтрации. У животных, зараженных штаммом *Y. pestis* И-3480, данные изменения выявлялись только на 3-и сутки, а у белых мышей, зараженных штаммом *Y. pestis* И-3479, – на 7-е сутки.

Достоверных различий в показателях клеточного состава межальвеолярных перегородок легких животных, зараженных штаммами *Y. pestis* И-3480 и *Y. pestis* И-3479, по сравнению с контролем не выявлено.

Гибель животных, инфицированных штаммом *Y. pestis* И-2359, наступала после семи суток наблюдения и составила 60% от взятых в эксперимент белых мышей данной группы. При вскрытии

Рисунок 3.
Легкое белой мыши, инфицированной *Y. pestis* И-3479.
Расширение просвета бронха, кровенаполненные кровеносные сосуды.
Окраска гематоксилином-эозином, увелич. 10 x 10

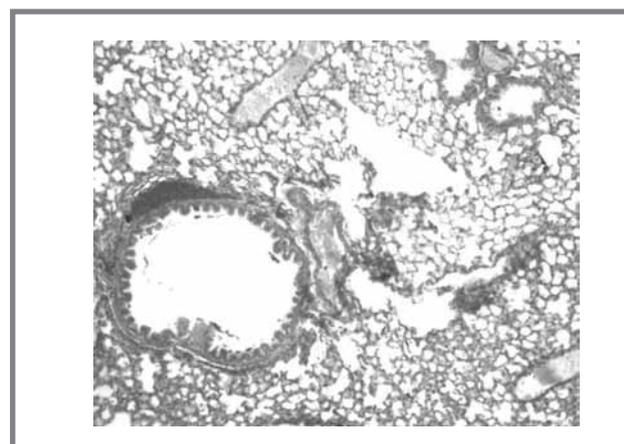
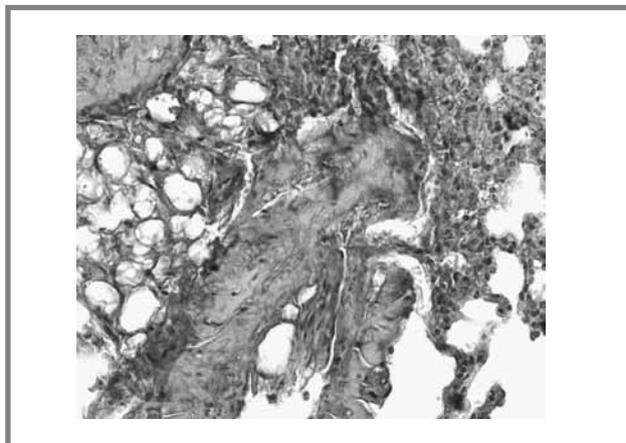


Рисунок 4.
Легкое белой мыши, инфицированной *Y. pestis*
И-2359.
Отложение патологического белка.
Окраска по Маллори, увелич. 10 x 40



в легких отмечено резко выраженное венозное полнокровие, из них у 40% животных – наличие в центральных отделах легких очагов серовато-красного цвета. Гистологически имела место распространенная и неравномерно выраженная инфильтрация межальвеолярных перегородок гистиоцитами, эпителиоидными и лимфоидными клетками. Изучение клеточного состава межальвеолярных перегородок респираторного отдела легких белых мышей этой группы свидетельствует о резком снижении числа альвеолоцитов за счет увеличения полиморфно-ядерных лейкоцитов и лимфоцитов, а также об увеличении числа макрофагов в 2,8 раза больше, чем в контроле ($p < 0,001$).

Следует отметить, что при окраске по Маллори в интиме и адвентиции стенок кровеносных сосудов на 7-е сутки выявлено отложение патологического белка, которое может быть связано с выраженностью инфекционного процесса (рис. 4). Эти данные подтверждаются отложением железа в легочной ткани во все сроки наблюдения.

При заражении штаммом *Y. pestis* И-2948 ($pYP-pYV-pYT^+$) гибель белых мышей наступала после 10 суток и составила 15% от количества животных, взятых в опыт, что значительно меньше, чем при заражении *Y. pestis* И-2359 ($pYP-pYV-pYT^+$). Сравнительный анализ патоморфологических изменений показал, что у животных, инфицированных штаммом *Y. pestis* И-2948, визуальные изменения в легких при вскрытии выявлены не были.

При этом гистологически имели место единичные периваскулярные узелки, сформированные из лимфоидных элементов, а также инфильтрация межальвеолярных перегородок лимфоцитами, макрофагами и нейтрофилами.

Можно сделать вывод, что атипичный штамм *Y. pestis* И-2948, лишенный плазмиды патогенности, вызывает развитие затяжного инфекционного процесса с низким падежом экспериментальных животных.

Макроскопические и микроскопические изменения у белых мышей, зараженных селекционным клоном *Y. pestis* И-2948/3 ($pYP-pYV-pYT^+$), не регистрировались во все сроки наблюдения.

Установлено, что при окраске по Маллори в легочной ткани экспериментальных животных, инфицированных штаммами *Y. pestis* И-2948 и *Y. Pestis* И-2948/3, отложение белковых комплексов выявлено в более поздние сроки (10 сутки), при этом данный процесс выражен незначительно.

Таким образом, сравнительный анализ показал, что инфекционный процесс, вызванный введением белым мышам штаммов *Y. pestis* И-3560 и *Y. pestis* И-2638 ($pYP-pYV-pYT^+pTP33^+$), вызывает у животных инфекционный процесс, при котором патоморфологическая картина легких указывает на развитие чумной пневмонии в отличие от штаммов с неполным набором плазмид (*Y. pestis* И-3479, *Y. pestis* И-3480, *Y. pestis*-2948 и *Y. pestis*-2948/3). Важно отметить, что штамм *Y. pestis* И-2359 ($pYP-pYV-pYT^+$) занимает промежуточное положение между исследованными штаммами и вызывает слабовыраженное развитие инфекционного процесса у экспериментальных животных.

Выводы

1. При оценке патоморфологических изменений в макрокартине легких лабораторных животных, инфицированных *Y. pestis* с разным плазмидным составом, показана ведущая роль плазмиды pYV .
2. Выявлены морфологические и структурные изменения в легких при экспериментальной чумной инфекции, которые проявляются разной степенью активации иммунного ответа и выраженностью патологического процесса, вызванного *Y. pestis* subsp. *altaica* и *Y. pestis* subsp. *pestis* и их изогенными плазмидными вариантами.

Литература

1. Каграманов В.С., Асеева Л.Е., Вагнер В.П. Показатели кислотно-щелочного равновесия крови у экспериментальных животных под влиянием «мышинного» токсина и капсульного антигена *Yersinia pestis*., Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. 2001; 3: 8 – 11.
2. Анисимов А.Н. Факторы *Y. pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 1: Молекул. ген., микробиол. и вирусол. 2002; 3: 3 – 23.
3. Исупов И.В., Бугоркова С.А., Кутырев В.В. Патоморфологические аспекты доклинических испытаний различных вакцин против чумы, сибирской язвы и холеры. Саратов: Приволжское книжное издательство; 2004: 18.
4. Бугоркова С.А., Куклев В.Е., Бугоркова Т.В., Мальхина З.В., Кутырев В.В. Сравнительное морфологический анализ экспериментальной чумной инфекции, обусловленной штаммами *Yersinia pestis* с различной генетической характеристикой. Проблемы особо опасных инфекций. 2008; 4 (98): 49 – 53.
5. Лебедева С.А., Трухачев А.Л., Иванова В.С., Арутюнов Ю.И., Божко Н.В., Веркина Л.М. и др. Вариабельность возбудителя чумы и проблемы его диагностики. Ростов-на-Дону: Антей; 2009: 533.
6. Балахонов С.В. Обнаружение нуклеотидных последовательностей генов *pla*, *pstI* и *cafI* на криптической плазмиде 33 *kd* штаммов *Yersinia pestis* из тувинского очага чумы: 8-й Международный симпозиум по *Yersinia*. Турку (Финляндия). 2002; 10.

7. Самойлов Л.В. Сравнительное изучение развития клинических форм экспериментальной чумы при аэрогенном и подкожном заражении вирулентными штаммами *Y. pestis* и их изогенными вариантами с различным плазмидным профилем. Проблемы особо опасных инфекций. 2008; 3 (97): 66, 67.

References

1. Kagramanov V.S., Aseeva L.E., Wagner V.P. Indicators of acid-base balance of blood in experimental animals under the influence of the «mouse» toxin and capsular antigen of *Yersinia pestis*. Zh. microbiology, epidemiology and immunology. 2001; 3: 8 – 11 (in Russian).
2. Anisimov A.N. Factors *Y. pestis* ensuring the circulation and preservation of the plague pathogen in natural foci of ecosystems. Report 1: Molecular genetics, microbiology and virusology 2002; 3: 3 – 23 (in Russian).
3. Isupov I.V., Bugorkova S.A., Kutryev V.V. Pathological aspects of the preclinical testing of vaccines against plague, anthrax and cholera. Saratov: Privolzhskoye publishing house; 2004: 18 (in Russian).
4. Bugorkova S.A., Kuklev V.E., Bugorkova T.V., Malyhina Z.V., Kutryev V.V. Comparative morphological analysis of experimental plague infection caused by *Yersinia pestis* strains with different genetic characteristics. Problems of especially dangerous infections. 2008; 4 (98): 49 – 53 (in Russian).
5. Lebedeva S.A., Trukhachev A.L., Ivanova V.S., Arutyunov Yu.I., Bozhko N.V., Verkina L.M. et al. Variability of plague and problems of its diagnostics. Rostov-on-Don: Antay; 2009: 533 (in Russian).
6. Balahonov S.V. Detection of *pla*, *pst* and *cafI* gene nucleotide sequences in cryptic plasmid 33 kb *Yersinia pestis* strains from Tuva plaque focus: Abstracts in: 8th International Symposium on Turku (Finland). 2002; 10 (in Russian).
7. Samoilov L.V. Comparative study of the clinical forms of plague in aerogenic experimental and subcutaneous infection of virulent *Y. pestis* strains and their isogenic variants with different plasmid profiles. Problems of especially dangerous infections. 2008; 3 (97): 66, 67 (in Russian).

ИНФОРМАЦИЯ CDC

Вакцинация против гриппа.

Рекомендации Консультативного комитета США по иммунопрофилактике гриппа на сезон 2015 – 2016 годов (выдержки)

Ежегодная вакцинация рекомендована всем лицам, достигшим 6-месячного возраста, не имеющим противопоказаний. Оптимальный срок начала прививочной кампании – октябрь, длительность – весь период циркуляции вируса.

Дети в возрасте 6 месяцев – 8 лет первично прививаются двумя дозами вакцины с интервалом 4 или более недель. В последующем прививки проводят ежегодно однократно.

В текущий эпидсезон детей 6 месяцев – 8 лет, вакцинированных до июля 2015 года трех- или четырехвалентной вакциной, прививают однократно, непривитых детей этого возраста, а также детей с неизвестным прививочным анамнезом – двукратно с интервалом 4 недели.

В эпидсезон 2015 – 2016 годов будут использоваться трехвалентные гриппозные вакцины, содержащие гемагглютинин (ГА) из производного от А/Калифорния/7/2009(H1N1)- подобного вируса, А/Швейцария /97115293/2013(H3N2)- подоб-ного вируса и В/Пхукет/3072/2013-подобного вируса (Ямагатской линии). Заменены вирусы гриппа подтипа А(H3N2) и типа В по сравнению с эпидсезоном 2014 – 2015 годов. В четырехвалентные гриппозные вакцины входят вышеуказанные штаммы и В/Брисбен/60/2008 Викторианской линии.

За 2014 год в США лицензированы вакцины Afluria – инактивированный препарат для в/м применения лицам 18 – 64 лет, Flublok – рекомбинантная трехвалентная вакцина для лиц 18 – 49 лет, Fluzone – четырехвалентная вакцина для внутрикожного применения лицам 18 – 64 лет.

Прививки допускается проводить как инактивированными, так и живыми вакцинами, которые имеют большее количество противопоказаний и потому не разрешены для использования у значительной группы лиц (лица в возрасте моложе 2-х и старше 49 лет; дети 2 – 17 лет, получающие аспирин или препараты, содержащие аспирин; лица с тяжелыми аллергическими реакциями после

предшествовавшего введения любой гриппозной вакцины или ее компонентов; беременность; иммунодефицитные состояния; аллергические реакции на куриные яйца; дети 2 – 4-х лет, страдающие бронхиальной астмой или нарушениями дыхания в последний перед прививкой год; лица, получавшие в течение 48 часов перед прививкой гриппозные противовирусные препараты). Лица, привитые живой гриппозной вакциной, в течение 7 суток должны избегать контакта с субъектами, страдающими тяжелыми формами иммунодефицитных состояний, в связи с теоретическим риском возможности их инфицирования вакцинным вирусом.

Противопоказаниями к применению инактивированных вакцин являются тяжелые формы аллергических реакций на куриные яйца или предшествующую прививку гриппозной вакциной. Что касается вакцинации лиц с более легкими формами аллергии к куриным яйцам, в Руководстве содержатся рекомендации с учетом характера и тяжести проявления пищевой аллергии. В рекомбинантной вакцине Flublok овальбумин отсутствует. Вместе с тем этот препарат не предназначен для вакцинации беременных, иммунизацию которых рекомендуется осуществлять на любом сроке беременности другими инактивированными вакцинами.

Рекомендации содержат таблицу, в которую включены все гриппозные вакцины, лицензированные в США (инактивированные трехвалентные – 5; инактивированные четырехвалентные – 4; рекомбинантная трехвалентная – 1; живая четырехвалентная – 1), форма их выпуска, указания о содержании мертиолята и овальбумина, возрастные ограничения, наличие латекса в компонентах первичной упаковки, способ применения, противопоказания и предостережения.

К рекомендациям прилагается библиография (40 ссылок).

Источник: <http://www.cdc.gov/mmvr/pdf/wk/mm6430.pdf>

Подготовил Н.А. Озерецковский