

УДК 616.993.19-002.2:615.381

ОЦЕНКА ВИРУЛЕНТНОСТИ КРИПТОСПОРИДИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ, НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ МЫШЕЙ ЛИНИИ SCID И ПО ПОКАЗАТЕЛЮ ЭКСЦИСТИРОВАНИЯ

Пономаренко Я.В.¹, Карташев В.В.¹, Малышева М.И.¹, Амбалов Ю.М.¹,
Донцов Д.В.¹, Санникова И.В.²

¹Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, e-mail: d_dontcov@mail.ru;

²Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, e-mail: dr.sannikova@mail.com

Криптоспориоз у больных ВИЧ-инфекцией в Российской Федерации характеризуется отсутствием диареи, которая большинством авторов расценивается в качестве одного из основных клинических проявлений указанной нозологической единицы. В попытке объяснить эту особенность нами была изучена вирулентность криптоспоридий на экспериментальной модели мышей линии SCID (Arrowood M. J. et al. 2005) и по определению показателя активности эксцистирования ооцист методом прямой иммунофлюоресценции с помощью диагностического набора CryptoCel (Cellabs, Австралия). В ходе выполненного исследования было установлено, что оба изученные параметра никаким образом не сочетались с наличием или же с отсутствием диареи у больных ВИЧ-инфекцией. В представленной статье обсуждаются возможные варианты объяснения этих особенностей.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, криптоспориоз, клиника, диарея, вирулентность криптоспоридий.

VIRULENCE EVALUATION OF HIV PATIENTS CRYPTOSPORIDIUM ISOLATES IN AN ANIMAL MODEL IN SCID MICE AND ON EXCYSTATION INDEX

Ponomarenko Ya.V.¹, Kartashev V.V.¹, Malysheva M.I.¹, Ambalov Yu.M.¹,
Dontsov D.V.¹, Sannikova I.V.²

¹Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, e-mail: d_dontcov@mail.ru;

²Stavropol State Medical University, Stavropol, e-mail: dr.sannikova@mail.com

Cryptosporidiosis in patients with HIV infection in Russia is characterized by a number of clinical features, in particular, the absence of diarrhea in many patients at the early stages of HIV infection. Diarrhea is regarded as one of the main clinical manifestations of cryptosporidiosis. In an attempt to explain this feature the virulence of Cryptosporidium has been studied in the experimental infection model in SCID mice and excystation activity of the oocysts (Arrowood M. J. et al. 2005). It is shown that none of the studied parameter in no way was connected with the presence or absence of diarrhea in patients with HIV infection. Possible options for an explanation of these features are discussed.

Keywords: HIV infection, cryptosporidiosis, clinical manifestation, diarrhea, Cryptosporidium virulence.

Криптоспориоз у больных ВИЧ инфекцией в России характеризуется высокой частотой бессимптомных форм [1]. В литературе мы не нашли ни одной работы, в которой бы была выполнена оценка их вирулентности или жизнеспособности у больных ВИЧ инфекцией с наличием или при отсутствии диареи. Мыши линии SCID, у которых отсутствуют Т- и В-лимфоциты, представляют собой одну из наиболее адекватных экспериментальных моделей для оценки биологических свойств криптоспоридий, прежде всего, их инфекционности [6]. Удалось обнаружить только одну работу, в которой было выполнено исследование заразительности

ооцист, выделенных от больных ВИЧ инфекцией, путем инокуляции новорожденным мышам [8].

Цель исследования – оценить вирулентность ооцист криптоспоридий, полученных от больных ВИЧ инфекцией с диареей и без нее, а также их жизнеспособность, сопоставить полученные результаты с клиническими проявлениями криптоспоридиоза у больных ВИЧ.

Материалы и методы. Для экспериментального заражения криптоспоридиями были использованы самки мышей SCID в возрасте 5-6 недель. На всех этапах животные содержались в стерильных условиях, получали стерильную пищу и стерильную воду, воздух подвергался круглосуточному кондиционированию и стерилизации. Для заражения были использованы ооцисты, предварительно выделенные из испражнений 24 больных ВИЧ-инфекцией, из числа которых у 12 человек на момент выявления криптоспоридиоза наблюдалась диарея, а у других 12 пациентов криптоспоридиоз не сопровождался диареей.

Концентрацию и очистку ооцист из испражнений больных ВИЧ-инфекцией осуществляли путем двойного последовательного центрифугирования в градиенте сахарозы и заключительного центрифугирования в градиенте хлорида цезия [2]. Каждому животному для заражения в состоянии эфирного наркоза вводили в желудок с помощью катетера по 1000 ооцист в 0,15 мл стерильной дистиллированной воды. После заражения каждое животное изолировали в отдельную клетку. Учитывая высокую резистентность ооцист к действию дезинфицирующих средств, предпринимали строгие меры по профилактике заражения персонала. Весь потенциально заразный материал перед утилизацией подвергали стерилизации в автоклаве.

Для сбора испражнений клетки с животным помещали в металлические кюветы, на дно которых наливали 2,5 % раствора $K_2Cr_2O_7$ слоем 1–1,5 см. Это предотвращало высыхание испражнений, к тому же раствор $K_2Cr_2O_7$ губительно действует на флору кишечника и дополнительно выполняет функцию дезодоранта. В 2,5 % растворе $K_2Cr_2O_7$ ооцисты криптоспоридий сохраняют свою жизнеспособность на протяжении многих месяцев.

Спустя пять дней от момента заражения начинали исследовать испражнения животных с целью получения ряда дополнительных данных об экспериментальной инфекции у каждого животного, зараженного разными изолятами паразита от разных больных ВИЧ-инфекцией. Эти данные включали: а) продолжительность инкубационного периода, который исчислялся от момента заражения до первого обнаружения ооцист в испражнениях; б) время достижения пика концентрации ооцист в испражнениях животного; в) сравнительную оценку концентрации ооцист в испражнениях различных животных, инфицированных изолятами паразита от разных

больных ВИЧ-инфекцией. Впервые эти показатели были предложены и использованы для оценки патогенности ооцист авторами из Японии [6].

Для обнаружения ооцист вначале взвешивали пластиковые центрифужные пробирки объемом 1,5 мл, каждую пробирку маркировали и фиксировали ее вес. Фрагмент свежих фекалий от каждого животного помещали в отдельную пробирку и снова ее взвешивали, вычисляя массу испражнений. Далее к испражнениям добавляли 0,1 М фосфатно-солевой буфер рН 7,4 в соотношении 1:5 (вес к объему), содержимое пробирок перемешивали при помощи механической мешалки до полной гомогенизации. Пробирки помещали в штатив в вертикальном положении и выдерживали в холодильнике при температуре 4° С в течение одного часа. После этого с помощью пипетки отбирали 25 мкл надосадочной жидкости, из которой готовили мазок на предметном стекле. Исследование ооцист в мазках проводили методом прямой иммунофлюоресценции с помощью набора CryptoCel (Cellabs, Австралия).

После достижения пика концентрации ооцист в испражнениях мышей, последних использовали в качестве источника ооцист для других лабораторных исследований. С этой целью испражнения мышей собирали ежедневно в пластиковые контейнеры индивидуально от каждого животного и хранили в холодильнике при температуре 4 ° С в 2,5 % растворе K₂Cr₂O₇. Один раз в неделю выполняли очистку и концентрацию ооцист из полученных от животных испражнений методом центрифугирования в градиенте сахарозы и градиенте хлорида цезия.

Оценку жизнеспособности ооцист, выделенных из испражнений больных ВИЧ инфекцией с криптоспориозом, проводили по показателю их эксцистирования, т.е. оценивали активность выхода спорозоитов из ооцист после воздействия стимулятора.

Перед исследованием из испражнений больных выделяли ооцисты криптоспоридий путем их концентрации и очистки в градиенте сахарозы и градиенте хлорида цезия.

Для стимуляции эксцистирования спорозоитов ооцисты в количестве 104 инкубировали в 100 мкл свежеприготовленного раствора таурохолата натрия с конечной концентрацией 0,75 % в фосфатно-солевом буфере при температуре 37 °С в течение двух часов [2]. После инкубации ооцисты отмывали, добавляя в пробирки по 1 мл фосфатно-солевого буфера, содержимое пробирок центрифугировали при ускорении 5000 × g в течение 10 минут и удаляли надосадочную жидкость. К осадку добавляли фосфатно-солевой буфер в объеме 50 мкл, содержимое пробирок тщательно перемешивали. Для оценки эксцистирования производили микроскопическое исследование ооцист во влажном мазке на предметном стекле в световом микроскопе при увеличении 400×. Количество полностью или частично эксцистированных ооцист суммировали. Параллельно подсчитывали также и не освобожденные от спорозоитов

ооцисты. Когда общее число обнаруженных в препарате ооцист достигало ста, подсчет прекращали. Сумма частично и полностью эксцистированных ооцист представляла собой показатель их жизнеспособности в процентах

Результаты. Инфекцию удалось воспроизвести у всех 24 мышей, зараженных ооцистами из испражнений 24 больных ВИЧ инфекцией (12 больных криптоспориديозом с диареей и 12 больных – без диареи). Клинические проявления криптоспоридиоза отсутствовали у всех зараженных животных. На протяжении всего эксперимента и в отдаленные сроки наблюдения все мыши остались живы.

Первое появление ооцист в испражнениях мышей было отмечено в период с 9-го по 18-й день от момента заражения. При этом, на 9–12 день наблюдения появление ооцист в испражнениях было зафиксировано у 3 мышей (12,5 %), начиная с 13-го по 15 день – у 12 (50,0 %) мышей, а в период с 16-го по 18-й день – у остальных 9 мышей (37,5 %). Связь длительности инкубационного периода с наличием или отсутствием диареи у больных, из испражнений которых были получены ооцисты для заражения мышей, отсутствовала.

Концентрация ооцист в испражнениях мышей достигала пика в период от 32-го до 52-го дня с момента заражения. Пик был достигнут на 32–39 день у 5 (20,8 %) животных, в том числе у всех трех, у которых было отмечено самое раннее появление ооцист. У 8 (33,3 %) мышей пик экскреции ооцист наблюдался на 40–47 день наблюдения, причем это было отмечено у всех тех 8 животных из 12, у которых появление ооцист в испражнениях наблюдалось в период с 13 по 15 день от заражения. У остальных 11 (45,8 %) мышей экскреция ооцист достигала максимума на 48–52 день эксперимента. Непараметрический коэффициент корреляции Спирмена позволил установить прямую связь между сроками первого появления ооцист в испражнениях мышей после заражения и временем достижения максимума их концентрации в кале ($R=0,45$ при $p < 0,05$). Связи этих показателей с наличием или отсутствием диареи также установить не удалось.

По истечении двух месяцев данного эксперимента было отмечено, что концентрация ооцист в испражнениях разных животных была неодинаковой. Наиболее высоким было содержание ооцист у 8 мышей, причем у всех 5 животных с пиком концентрации в ранние сроки после заражения. Низкая концентрация ооцист, напротив, определялись в испражнениях 7 мышей, причем все эти животные были из числа тех 11, у которых наблюдалось отсроченное достижение максимума экскреции ооцист в первые два месяца эксперимента. Статистический анализ показал, что имеется обратная зависимость между сроком первого обнаружения ооцист и их максимальной концентрацией в испражнениях мышей ($R=-0,42$ при $p < 0,05$). Еще более выраженная обратная зависимость была выявлена между двумя другими параметрами,

временем достижения максимальной концентрации ооцист, с одной стороны, и самой концентрацией ооцист в кале, с другой ($R=-0,70$ при $p<0,001$). Иными словами, концентрация ооцист в испражнениях была тем выше, чем в более ранние сроки от момента заражения они обнаруживались впервые, а также чем раньше их концентрация достигала пика. Установить связь этих параметров с наличием или отсутствием диареи у больных ВИЧ инфекцией с криптоспориديозом не удалось.

Известно, что жизнеспособность и вирулентность ооцисткриптоспоридий может быть оценена с помощью различных методов, среди которых биологическая модель на мышах общепризнана в качестве золотого стандарта. Эта модель настолько чувствительна, что экспериментальная инфекция у новорожденных мышей может быть воспроизведена при заражающей дозе всего 25 ооцист [7], а у мышей SCID при заражающей дозе всего 10 ооцист.

В выборе заражающей дозы в 10^3 ооцист для одного животного мы ориентировались на исследования авторов из Японии [6]. По их данным о вирулентности криптоспоридий можно судить по срокам первого появления ооцист в испражнениях. В дополнение к рекомендованным этими авторами показателям мы исследовали также два других, таких как срок достижения максимума концентрации ооцист в кале мышей от момента заражения, а также сам показатель концентрации.

Биологическая модель позволила обнаружить разницу в вирулентности криптоспоридий, полученных от разных больных ВИЧ инфекцией. Наши исследования показали, что из 24 исследованных образцов испражнений больных ВИЧ только в 3 (12,5 %), если ориентироваться на сроки первого появления ооцист в кале мышей, или в 5 (20,8 %) образцах, если ориентироваться на время достижения пика экскреции ооцист, содержались высоковирулентные криптоспоридии. Это число высоковирулентных криптоспоридий может быть увеличено до 8 (33,3 %), если ориентироваться на самую высокую концентрацию ооцист паразита, которая была зафиксирована в испражнениях этих 8 мышей по итогам двух месяцев наблюдения. Таким образом, результаты экспериментальной инфекции у мышей SCID дают основание предполагать, что у подавляющей части больных ВИЧ криптоспоридиоз был вызван штаммами паразита с невысокой вирулентностью.

Связь изученных параметров экспериментальной инфекции у мышей с наличием или отсутствием диареи при криптоспоридиозе у больных ВИЧ инфекцией отсутствовала. Это свидетельствовало о том, что наличие или отсутствие диареи в большей мере определялось состоянием организма больного, чем вирулентностью и патогенностью каждого отдельного изолята паразита.

Оценка жизнеспособности ооцисткриптоспоридий, выделенных от больных ВИЧ инфекцией, по показателю эксцистирования. При изучении воды, как основного фактора передачи криптоспоридиоза, оценка жизнеспособности ооцист стала одной из неотъемлемых характеристик возбудителя. Напротив, при клинических исследованиях до последнего времени этот параметр пока не изучался, только в одной публикации авторы представили результаты оценки жизнеспособности ооцист, полученных от больных криптоспоридиозом, на биологической модели [8]. Ранее было показано, что оценка жизнеспособности ооцист методом витальной окраски нуклеиновых кислот 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) и пропидий йодидом (PI) имеет корреляцию, исчисляемую коэффициентом 0,997, с другим показателем – способностью ооцист освобождать спорозоиты (эксцистироваться) в определенных условиях [5]. С другой стороны, более поздние исследования выявили трудности при оценке результатов витальной окраски, обусловленные неспецифической адсорбцией красителя на примесях, содержащихся в исследуемом материале вместе с ооцистами [9]. Поэтому для оценки жизнеспособности ооцисткриптоспоридий, выделенных из испражнений больных ВИЧ инфекцией, нами был выбран показатель активности высвобождения из них спорозоитов (показатель эксцистирования).

Эксцистирование наступает в результате ряда стимулов, которые имитируют условия, имеющие место при попадании ооцист в организм хозяина. Например, стимулом к высвобождению спорозоитов является их инкубация при температуре 37 °С. Это своеобразный сигнал паразиту, что он попал в организм теплокровного хозяина, где есть условия для размножения. Другим мощным стимулом для освобождения спорозоитов является воздействие на ооцисты желчных кислот и их солей. В естественных условиях заражения такой стимул к освобождению спорозоитов действует после прохождения ооцистами желудка (следует отметить, ооцисты являются высоко резистентными к действию кислой среды) и их попадании в тонкий кишечник, который является основным местом паразитирования. Комбинированное воздействие температуры 37 °С и желчных кислот (в нашем исследовании – таурохолата натрия) оказывает мощный кумулятивный эффект на освобождение спорозоитов, что позволяет добиваться эксцистирования уже спустя 45 минут инкубации ооцист в подобных условиях.

Исследование выполняло несколько задач. С одной стороны, оно представляло собой попытку ответить на вопрос, является ли бессимптомное течение криптоспоридиоза признаком начинающегося выздоровления, с другой – давало возможность оценить в сравнении эпидемиологическую опасность больного криптоспоридиозом с диарей и без диареи. Известно,

что в периоде ремиссии или реконвалесценции при отсутствии клинических проявлений, больной продолжает выделять ооцисты, но среди них начинают преобладать нежизнеспособные формы [3, 4].

Исследование было выполнено у 25 больных с криптоспориديозом с 4А стадией ВИЧ инфекции. Из их числа у 13 человек криптоспоридиоз протекал бессимптомно, а у 12 больных сопровождался диареей. Оценка активности эксцистирования в результате стимуляции очищенных ооцисткриптоспоридий 0,75 % раствором таурохолатата натрия и инкубации при температуре 37 °С в течение двух часов показала следующее. У 13 больных ВИЧ инфекцией без диареи средний показатель эксцистирования составил 82,7 %±11,4 %. У других 12 больных ВИЧ инфекцией, у которых криптоспоридиоз сопровождался диареей, показатель эксцистирования был 85,3 %±12,1 %. Статистически значимая разница этих двух показателей отсутствовала ($p > 0,05$).

Заключение. Таким образом, у больных ВИЧ инфекцией содержащиеся в испражнениях ооцисты характеризовались одинаково высокой степенью жизнеспособности независимо от наличия или отсутствия клинических проявлений в виде диареи. Используемый нами метод оценки жизнеспособности ооцист позволяет считать, что больные ВИЧ инфекцией с криптоспоридиозом без диареи представляют такую же эпидемиологическую опасность, как и больные с диареей. Высокий процент эксцистирования ооцисткриптоспоридий у больных с субклинической формой криптоспоридиоза не дает оснований полагать, что отсутствие диареи являлось признаком ремиссии или начавшегося выздоровления.

Список литературы

1. Карташев В.В., Амбалов Ю.М., Бекетова Е.В и др. Криптоспоридиоз у больных с ранними стадиями ВИЧ-инфекции в Ростове-на-Дону // Инфекционные болезни. – 2008. – № 2. – С. 50-52.
2. Arrowood M.J. In vitro cultivation of cryptosporidium species // Clin.Microbiol. Rev. – 2002. – Vol. 15(3). – P. 390-400.
3. Bukhari Z., Smith H.V. Cryptosporidium parvum: oocyst excretion and viability patterns in experimentally infected lambs // Epidemiol. Infect. – 1997. – Vol.119(1). – P. 105-108.
4. Caccio S.M., Pozio E. Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis // Expert Rev Anti Infect. Ther. – 2006. – Vol.4(3). – P. 429-443.

5. Campbell A.T., Robertson L.J., Smith H.V. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes // *Appl Environ Microbiol.* – 1992. – Vol. 58(11). – P. 3488-3493.
6. Hikosaka K., Satoh M., Koyama Y., Nakai Y. Quantification of the infectivity of *Cryptosporidium parvum* by monitoring the oocyst discharge from SCID mice // *Vet. Parasitol.* – 2005. – Vol. 25(34). – P. 173-176.
7. Korich D.G., Marshall M.M., Smith H.V. Inter-laboratory comparison of the CD-1 neonatal mouse logistic dose-response model for *Cryptosporidium parvum* oocysts // *J. Eukaryot Microbiol.* – 2000. – Vol.47(3). – P. 294-298.
8. Raccurt C.P., Brasseur P., Verdier R.I. et al. Human cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* spp. in Haiti // *Trop Med. Int. Health.* – 2006. – Vol.11, no. 6. – P.929-934.
9. Tsushima Y., Karanis P., Kamada T. Viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts detected in river water in Hokkaido, Japan // *J. Vet. Med. Sci.* – 2003. – Vol. 65(5). – P. 585-589.