

УДК 619:616-07:616.15:(619:579.852.13)

Новикова О.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент
Ананчиков М.А., кандидат ветеринарных наук, доцент
Гордиевская О.Н., младший научный сотрудник

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

ИЗУЧЕНИЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЗАРАЖЕНИИ БЕЛЫХ МЫШЕЙ *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

Резюме

В статье представлены результаты изучения изменений гематологических показателей и фагоцитарной активности лейкоцитов крови у белых мышей при их экспериментальном заражении *Clostridium perfringens*.

Полученные экспериментальные результаты свидетельствуют о разнонаправленном влиянии инфекционной нагрузки клостридий на изменения в составе крови мышей, особенно на ранних сроках наблюдения. Так, заражение мышей дозой $5,0 \times 10^7$ микробных клеток/мышь вызывает снижение практически всех изучаемых гематологических показателей. Заражение мышей дозой $5,0 \times 10^5$ микробных клеток/мышь, напротив, сопровождается лейкоцитозом на ранних сроках наблюдения и эритроцитозом – на позднем сроке наблюдения. Независимо от дозы инфекционной нагрузки *Clostridium perfringens* снижалась фагоцитарная активность лейкоцитов – фагоцитарный показатель и степень завершённого фагоцитоза.

Ключевые слова: белые мыши, *Clostridium perfringens*, гематологические показатели, фагоцитарная активность лейкоцитов крови.

Summary

The article presents the results of the study of changes in hematological parameters and phagocytic activity of white mice blood leukocytes during experimental infection with *Clostridium perfringens*.

The obtained experimental results testify to the multidirectional influence of clostridium infectious load on changes in the blood composition of mice, especially in the early periods of observation; so infection of mice with a dose of $5,0 \times 10^7$ microbial cells/mouse causes a decrease in almost all studied hematological parameters. On the contrary, infection of mice with a dose of $5,0 \times 10^5$ microbial cells/mouse is accompanied by leukocytosis in the early period of observation and erythrocytosis in the late period of observation. The phagocytic activity of leukocytes, i.e. phagocytic index and the degree of completed phagocytosis in blood leukocytes, decreased regardless of the dose of *Clostridium perfringens* infectious load.

Keywords: white mice, *Clostridium perfringens*, hematological parameters, phagocytic activity of blood leukocytes.

Поступила в редакцию 23.04.2024 г.

ВВЕДЕНИЕ

Clostridium perfringens являются анаэробами, грампозитивными спорообразующими бактериями, имеют широкое распространение в окружающей среде и способны вызывать тяжелые заболевания у людей и животных. Вирулентные свойства различных штаммов *Clostridium perfringens* зависят от их способности продуцировать в организме хозяина токсины и ферменты, которые обладают литической активностью, вызывают разрушение целостности структуры тканей различной локализации и вызывают множество гистотоксических и энтеротоксических заболеваний [1, 2].

Штаммы *Clostridium perfringens* относят к семи основным токсинотипам: тип А (альфа-токсин), тип В (альфа-, бета- и эpsilon-токсины), тип С (альфа- и бета-токсины), тип D (альфа- и эpsilon-токсины), тип Е (альфа- и йота-токсины), тип F (альфа- и энтеротоксин) и тип G (альфа- и NetB-токсины) [3].

Целью исследований являлось изучение гематологических показателей и фагоцитарной активности лейкоцитов крови белых мышей при их экспериментальном заражении штаммом *Clostridium perfringens* тип А (КМИЭВ-В153).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Модель острой и подострой формы клостридиоза воспроизводили путем внутривентриального введения мышам штамма *Clostridium perfringens* (КМИЭВ-В153). Опыт проводили на белых мышах массой 16–18 г.

Штамм *Clostridium perfringens* тип А (КМИЭВ-В153) получен из коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Штамм *Clostridium perfringens* пересекали со среды Китт-Тароцци на 5%-ный кровяной агар и через 24 часа культивирования в анаэробных условиях при температуре 37 °С смывали бактерии с поверхности агара стерильным физиологическим раствором, доводили на денситометре концентрацию микробных клеток до $1,0 \times 10^9$ микробных клеток/1 мл и путем разведения получали концентрации: $1,0 \times 10^8$ микробных клеток/1 мл и $1,0 \times 10^6$ микробных клеток/1 мл.

Для воспроизведения клостридиоза мышей опытных групп внутривентриально заражали *Clostridium perfringens* в объеме 0,5 мл: в 1-й группе инфекционная нагрузка составила $5,0 \times 10^7$ микробных клеток/мышь, во 2-й – $5,0 \times 10^5$ микробных клеток/мышь, 3-я группа – контроль (0,5 мл стерильного физиологического раствора/мышь). В каждой группе было 12 животных.

Для изучения гематологических показателей и фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови в качестве стабилизатора крови использовали 2,5%-ный стерильный раствор цитрата натрия.

Определение гематологических показателей проводили с использованием гематологического анализатора Mythic 18 (Швейцария). Кровь отбирали через 24, 48 часов и 10 суток после заражения мышей *Clostridium perfringens*.

Изучение фагоцитарной активности лейкоцитов проводили через 24 часа и 10 суток после заражения. Тест-микробом служила суточная культура условно-патогенного штамма *Staphylococcus epidermidis* (КМИЭВ-В149). Определяли фагоцитарный показатель – % лейкоцитов, участвующих в фагоцитозе, фагоцитарное число – среднее арифметическое количество микробных клеток в одном лейкоци-

те. Для определения способности лейкоцитов крови дезинтегрировать микробные клетки изучали степень завершенности фагоцитарного процесса внутри лейкоцитов [8]. Кровь инкубировали с микробной взвесью в соотношении 4:1 в течение 45 минут при температуре 37 °С. По истечении этого срока лейкоцитарно-микробную взвесь распределяли в виде двух мазков на поверхности 1,8%-ного сердечно-мозгового агара в чашке Петри. Затем готовили препарат-отпечаток, а чашку с оставшимся мазком для подрашивания микробных клеток помещали в термостат при температуре 37 °С на 3 часа. По истечении указанного интервала времени готовили второй препарат-отпечаток. Мазки фиксировали и окрашивали по Романовскому-Гимза. Жизнеспособные микробные клетки окрашивались в сине-фиолетовый цвет, а погибшие – розово-синий.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью критерия t-Стьюдента для независимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Внутривентриальное введение мышам *Clostridium perfringens* в дозе $5,0 \times 10^7$ микробных клеток/мышь сопровождалось гибелью 25 % животных в группе в течение 48 часов после заражения, что свидетельствовало об остром течении инфекционного процесса, индуцированного клостридиями. Во 2-й группе ($5,0 \times 10^5$ микробных клеток/мышь) гибели животных не наблюдали. Во 2-й и 3-й группах сохранность мышей на протяжении всего опыта составила 100 %.

Результаты изучения гематологических показателей представлены в таблице 1. Через 48 часов после заражения *Clostridium perfringens* в 1-й группе (острое течение клостридиоза) отмечали снижение в крови лейкоцитов, моноцитов, гранулоцитов, тромбоцитов ($p < 0,01$); во 2-й группе (подострое течение клостридиоза), напротив, количество лейкоцитов, лимфоцитов, гранулоцитов, моноцитов, эритроцитов и гемоглобина ($p < 0,01$) увеличивалось. Спустя 10 суток после заражения в 1-й группе увеличивалось по сравнению с контролем количество моноцитов и гранулоцитов ($p < 0,01$), количество лейкоцитов, лимфо-

цитов и эритроцитов восстанавливалось до уровня значений контрольных величин. Во 2-й группе повышенное количество эритроцитов регистрировали через 48 часов и 10 суток после заражения ($p < 0,01$), остальные показатели спустя 10 суток после заражения были на уровне значений контрольных величин.

Результаты изучения фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови мышей представлены в таблице 2. На всех сроках наблюдения в группах № 1 и № 2 отмечали достоверно значимое из-

менение активности лейкоцитов крови. Особенно выраженные изменения наблюдали у мышей группы № 1 через 10 суток после заражения: на фоне течения острого клостридиоза отмечали снижение фагоцитарной активности лейкоцитов (фагоцитарный показатель), показатель завершенность фагоцитоза составил 2 %. В контрольной группе значение этого показателя составило 55,8 %. При этом в обеих опытных группах отмечали разрастание тест-культуры *St. epidermidis* вне лейкоцитов.

Таблица 1 – Изучение гематологических показателей у мышей на разных сроках после заражения *Clostridium perfringens*

Группа	Гематологические показатели (M±m)						
	лейкоциты, $10^9/л$	лимфоциты, $10^9/л$	моноциты, $10^9/л$	гранулоциты, $10^9/л$	эритроциты, $10^{12}/л$	гемоглобин, г/л	тромбоциты, $10^9/л$
через 24 часа после заражения							
№ 1	4,5±0,16*	4,0±0,8	0,5±0,1*	0,4±0,1*	4,5±0,05*	70,4±16,8*	82,6±21,1*
№ 2	8,1±0,9	6,43±0,2*	0,9±0,04	1,2±0,2*	5,8±0,04	121,6±3,0	502±81,9
Контроль	7,2±0,9	5,7±0,7	0,8±0,08	0,75±0,1	5,8±0,08	123,5±4,7	492±53,1
через 48 часов после заражения							
№ 1	5,3±0,3	3,75±0,1*	0,5±0,08*	0,55±0,1	6,8±0,8	133,5±9,9	120±18,9*
№ 2	9,95±0,7*	7,2±1,3	1,1±0,08*	1,6±0,1**	7,85±0,4*	160,5±4,7*	329±17,2
Контроль	6,9±0,9	5,8±0,9	0,8±0,08	0,35±0,04	5,8±0,4	114,5±9,9	320±40,5
через 10 суток после заражения							
№ 1	7,5±1,6	4,95±0,9	1,23±0,4*	1,3±0,4*	7,2±0,2	137,3±6,4	306±83,1
№ 2	6,7±1,9	5,4±1,6	0,95±0,2	0,45±0,17	8,1±0,7*	152,8±14,6	280,3±82
Контроль	7,7±0,3	4,7±0,9	0,8±0,07	0,55±0,03	6,36±0,2	132±10,3	336±48,7

Примечание – *достоверное различие по сравнению с контролем при $p < 0,01$, **достоверное различие по сравнению с контролем при $p < 0,05$

Таблица 2 – Изучение фагоцитарной активности лейкоцитов крови и показателя завершенности фагоцитоза на разных сроках после заражения *Clostridium perfringens*

Группа	Показатели фагоцитарной активности лейкоцитов крови мышей по отношению к <i>Staphylococcus epidermidis</i> (M±m)		
	фагоцитарный показатель, %	фагоцитарное число, у.е.	показатель завершенного фагоцитоза, %
через 24 часа после заражения			
№ 1	25,6±3,2*	1,6±0,1	27,7±2,8*
№ 2	44,4±0,9*	1,9±0,5	30,4±1,6*
Контроль	70,9±1,8	2,1±0,1	52,0±2,4
через 10 суток после заражения			
№ 1	32,3±2,3*	1,5±0,1	2,0±0,1*
№ 2	48,5±2,7*	1,8±0,4	13,8±0,4*
Контроль	72,4±0,9	2,4±0,3	55,8±2,4

Примечание – *достоверное различие по сравнению с контролем при $p < 0,01$

ВЫВОДЫ

1. При остром течении клостридиоза, сопровождающегося гибелью 25 % животных в группе, на ранних сроках наблюдения (через 24 и 48 часов) отмечали эритроцитопению, лейкопению, тромбоцитопению. Спустя 10 суток после заражения наблюдали нормализацию всех измененных показателей до уровня значений контрольных величин. Однако на этом сроке наблюдения отмечали увеличение количества моноцитов и гранулоцитов в крови мышей.

2. При подостром течении клостридиоза на всех сроках наблюдения сохранность мышей составила 100 %. В крови животных на ранних сроках наблюдения (через 24 и 48 часов) отмечали лейкоцитоз и эритроцитоз, количество тромбоцитов оставалось на уровне контрольных величин. Спустя 10 суток после заражения в крови мышей сохранялся эритроцитоз, остальные изучаемые показатели были на уровне контрольных значений.

3. При изучении фагоцитарной активности лейкоцитов, независимо от инфекционной нагрузки *Clostridium perfringens*, на всех сроках наблюдения отмечали снижение фагоцитарного показателя и завершенности фагоцитоза в лейкоцитах. Показатель завершенного фагоцитоза в группах № 1 и № 2 составил, соответственно, 2 % и 13,8 % против 55,8 % в контроле.

4. Полученные результаты свидетельствуют о разнонаправленном влиянии инфекционной нагрузки *Clostridium perfringens* на изменения в составе крови мышей, особенно на ранних сроках наблюдения. Так, заражение мышей дозой $5,0 \times 10^7$ микробных клеток/мышь вызывает снижение практически всех изучаемых гематологических показателей. Заражение мышей дозой $5,0 \times 10^5$ микробных клеток/мышь, наоборот, сопровождается эритроцитозом и лейкоцитозом. При этом в обеих опытных группах на всех сроках наблюдения резко снижалась фагоцитарная активность лейкоцитов крови по отношению к *Staphylococcus epidermidis*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. *Lethal effects and cardiovascular effects of purified alpha- and theta-toxins from Clostridium perfringens* / D. L. Stevens [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 1988. – Vol. 157. – P. 272–279.
2. Kiu, R. *An update on the human and animal enteric pathogen Clostridium perfringens* / R. Kiu, L. J. Hall // *Emerg. Microbes Infect.* – 2018. – № 7. – P. 141.
3. Rood, J. I. *Expansion of the Clostridium perfringens toxin-based typing scheme* / J. I. Rood [et al.] // *Anaerobe.* – 2018. – № 53. – P. 5–10.
4. Titball, R. W. *The Clostridium perfringens alpha-toxin* / R. W. Titball, C. E. Naylor, A. K. Basak // *Anaerobe.* – 1999. – № 5. – P. 51–64.
5. *Towards an understanding of the role of Clostridium perfringens toxins in human and animal disease* / F. A. Uzal [et al.] // *Future Microbiol.* – 2014. – № 9. – P. 361–377.
6. Nauseef, W. M. *Neutrophils at work* / W. M. Nauseef, N. Borregaard // *Nat Immunol.* – 2014. – № 15. – P. 602–611.
7. *A study of Clostridium perfringens fulminant infection complicated by severe intravascular hemolysis* / Y. Doteuchi [et al.] // *Hosp. J. Med.* – 2012. – № 37 (1). – P. 61–66.
8. Берман, В. М. *Завершенный фагоцитоз. Сообщение 1. Новый методический принцип изучения завершенной фагоцитарной реакции* / В. М. Берман, Е. М. Славская // *Журнал микробиологии.* – 1958. – № 3. – С. 8–13.