



GLP-PLANET
28.06.2023-30.06.2023 г. Санкт-Петербург

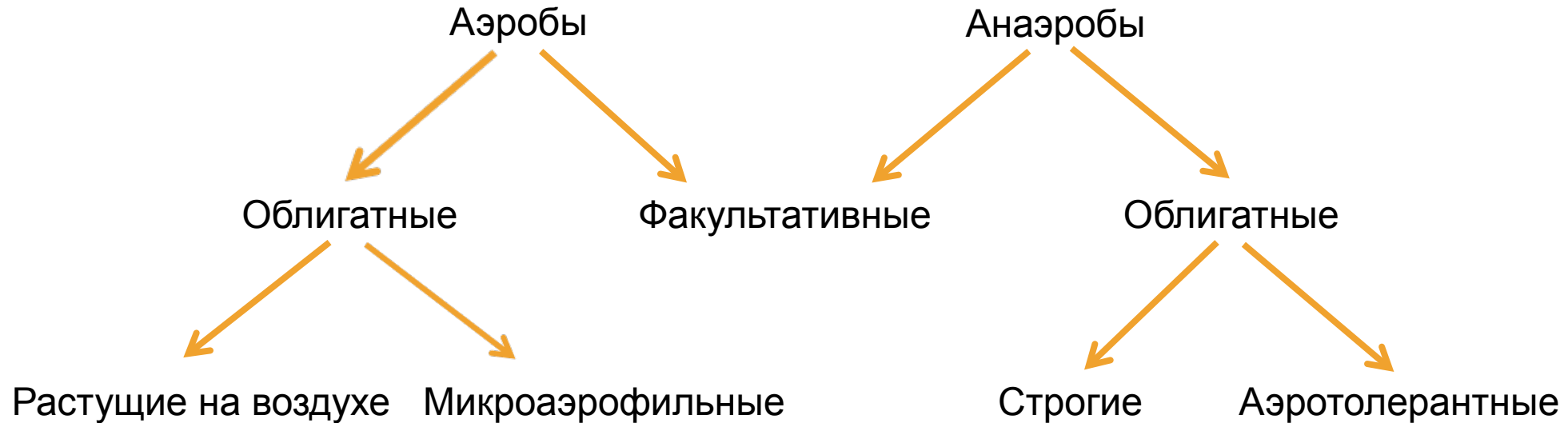


Сессия 3. Биотехнологические лекарственные средства. Программа доклинических исследований

Заражение животных микроаэрофильными патогенами, выбор тест-системы, культивирование патогена

Боровкова Кристина Евгеньевна
Руководитель лаборатории микробиологии

Классификация прокариот по отношению к молекулярному кислороду



Облигатные аэробы – растут только в присутствии кислорода;

Микроаэрофилы – требуется низкая концентрация кислорода (обычно 2–10%) и, для многих, высокая концентрация углекислого газа (например, 10%);

Факультативные анаэробы – растут как в присутствии кислорода, так и в анаэробных условиях;

Облигатные анаэробы – развиваются при полном отсутствии кислорода;

Аэротолерантные анаэробы – переносят атмосферный кислород в течение ограниченного времени.

Методы работы с микроорганизмами чувствительными к присутствию кислорода

1. Культивирование в **анаэроостате**.
2. Культивирование в **контейнере инкубационном с газогенирирующими пакетами**.
3. Культивирование в **эксикаторе** с поглотителями молекулярного кислорода.
4. Использование **восстанавливающих агентов** в питательной среде: тиогликолят натрия, цистеин, дитиотрейтол, аскорбиновая кислота.
5. Выращивание **совместно с аэробными** или **факультативно-анаэробными** бактериями.
6. Использование **анаэробной рабочей станции**.



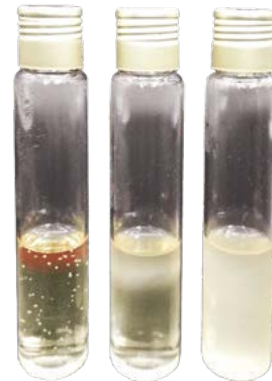
1



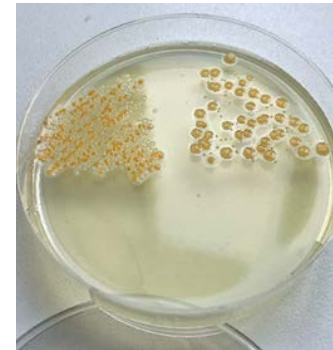
2



3



4



5



6

Helicobacter pylori

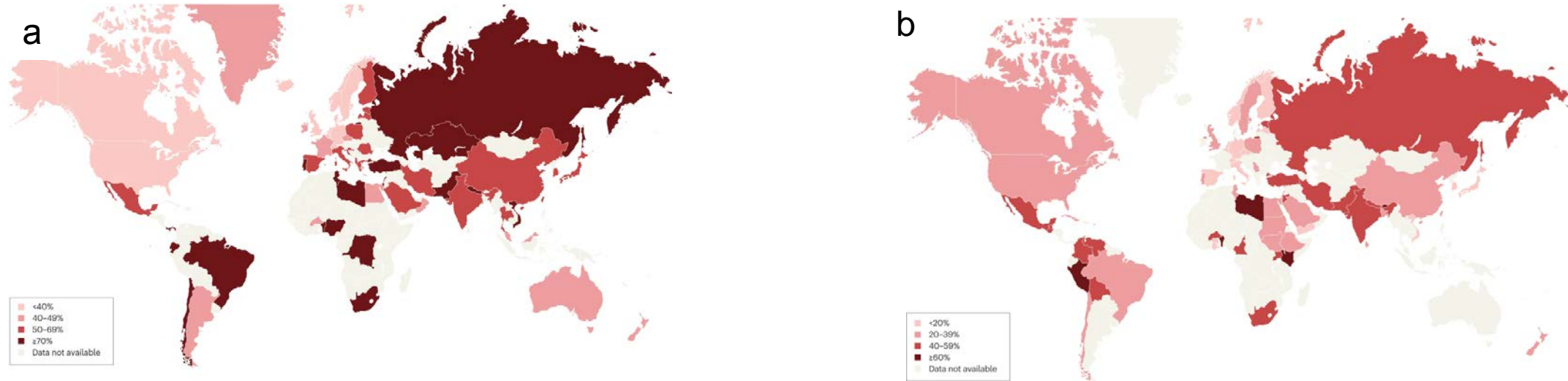


Рисунок 1 – Глобальная карта распространенности инфекции *Helicobacter pylori* среди взрослых в 1970–2016 гг. (часть **a**) и среди детей и подростков (младше 20 лет) в 2000–2021 гг. (часть **b**).

Malfertheiner P, Camargo MC, El-Omar E, Liou JM, Peek R, Schulz C, Smith SI, Suerbaum S. Helicobacter pylori infection. Nat Rev Dis Primers. 2023 Apr 20;9(1):19.

Helicobacter pylori – один из самых массовых патогенов человека, по данным за 2022 год **более 40% взрослого населения** мира по-прежнему **инфицированы *H. pylori*** [1].

Инфекция *Helicobacter pylori* вызывает **хронический гастрит**, который может прогрессировать до тяжелых гастродуоденальных патологий, включая **язвенную болезнь**, **рак желудка** и **лимфому слизистой оболочки желудка**. Около 80% людей с инфекцией *H. pylori* остаются бессимптомными, но гастрит развивается у всех людей с инфекцией [2].

1. *Li Y, Choi H, Leung K, Jiang F, Graham DY, Leung WK. Global prevalence of Helicobacter pylori infection between 1980 and 2022: a systematic review and meta-analysis. Lancet Gastroenterol Hepatol. 2023 Jun;8(6):553-564.*
2. *Malfertheiner P, Camargo MC, El-Omar E, Liou JM, Peek R, Schulz C, Smith SI, Suerbaum S. Helicobacter pylori infection. Nat Rev Dis Primers. 2023 Apr 20;9(1):19.*

Helicobacter pylori

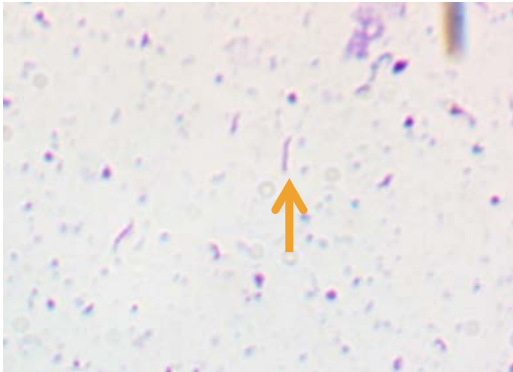


Рисунок 2 – Микроскопия культуры *Helicobacter pylori* 1000x (окраска по Граму)

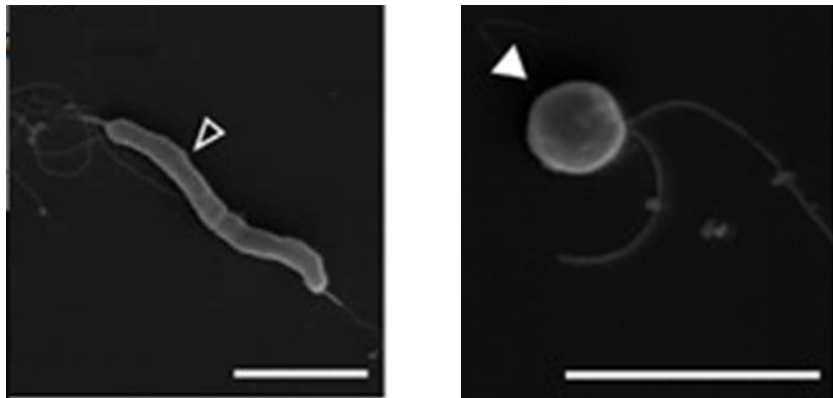


Рисунок 3 – электронная микроскопия *Helicobacter pylori* (Черная стрелка – спиралевидная форма; белая стрелка – кокковидная форма)

Основные факторы патогенности *H. pylori*:

- многочисленные адгезины,
- CagA-протеин (продукт островка патогенности в геноме, получившего наименование cag PAI),
- VacA – вакуолизирующий цитотоксин
- а также ряд ферментов агрессии – муциназа, протеаза, уреаза, фосфолипаза A1, A2, C.

Основная **экологическая ниша** *H. pylori* – **слизистая оболочка желудка**. До 98% колонизирующей популяции находится в подслизистом слое, на поверхности клеток секреторного эпителия и около 2% - внутриклеточно [3].

3. Методы лабораторной диагностики инфекции, обусловленной *Helicobacter pylori* : пособие для врачей – СПб. : ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2014. – 60 с.

Диагностика инфекции обусловленной *Helicobacter pylori*

Диагностический тест	Чувствительность	Специфичность	Достоинства	Недостатки
Быстрый уреазный тест	98%	99%	Быстрый и дешевый	Чувствительность снижается после лечения
Гистология	95%	95%	Удобство хранения и транспортировки образцов, возможность проведения ретроспективного анализа, оценка степени обсемененности <i>H. pylori</i> и состояния слизистой оболочки желудка	Во многом зависит от правильного выполнения биопсии, приготовления препаратов и их окраски, квалификации патолога
Культуральный метод	30-90%	100%	Высокая специфичность, дает возможность изучения штаммов <i>H. pylori</i> другими методами	Низкая чувствительность, высокая цена, длительность, зачастую – недоступность
Молекулярно-биологические методы	88-95%	100%	Чувствительный и специфичный метод, дает возможность определения отдельных генов для оценки патогенности <i>H. pylori</i> , наличия мутации, определяющих резистентность к антибиотикам, быстрота получения результата	Считается экспериментальным, не способен выявить активную инфекцию, не рекомендован после проведения лечения
Серологическое исследование методом ELISA	85-92%	79-83%	Дешевый и доступный, рекомендован для диагностики лечения	Не способен выявить активную инфекцию, низкая диагностическая значимость у детей, нельзя использовать для контроля эрадикации
Дыхательный тест с мочевиной ¹³ C/ ¹⁴ C	95%	96%	Неинвазивный, высокая специфичность, чувствительность, точность и воспроизводимость, рекомендован для диагностики до и после лечения, может быть использован у детей	Дорогой, требуется специальная аппаратура, на результат влияет прием антисекреторных препаратов
Определение антигена <i>H. pylori</i>	95%	94%	Неинвазивный, простота получения материала, рекомендуется для диагностики до и после лечения	Высокая цена, не дает оценить активность инфекции

Модель инфекционного, ассоциированного *Helicobacter pylori*, воспаления желудочно-кишечного тракта у лабораторных песчанок

Цель исследования – отработка модели инфекционного, ассоциированного *H. pylori* воспаления желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) у лабораторных песчанок.

Задачи:

- ▶ 1. Индуцировать патологию ЖКТ внутрижелудочным введением суспензии *H. pylori* лабораторным песчанкам;
- ▶ 2. Выбрать систему оценки тяжести развившейся патологии по микроскопическим изменениям в тканях ЖКТ;
- ▶ 3. Проанализировать прогрессирование патологии в динамике через 8, 16 и 24 недели.

Модель инфекционного, ассоциированного *Helicobacter pylori*, воспаления желудочно-кишечного тракта у лабораторных песчанок

Тест-система – 30 половозрелых самцов монгольских песчанок

Обоснование выбора тест-системы:

Наиболее часто используемые животные модели *H. pylori*: мыши, монгольская песчанка, морская свинка, гнотобиотические поросята, нечеловекообразные приматы.

Преимущества песчанок - **простота содержания** и **размер** животных, в отличие от мышей, в различных исследованиях доказано, что длительная колонизация песчанок *H. pylori* приводила к **желудочной патологии, сходной с таковой у людей** включая **развитие пептических язв, кишечной метаплазии и аденокарциномы желудка** [4].

4. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jul;19(3):449-90.

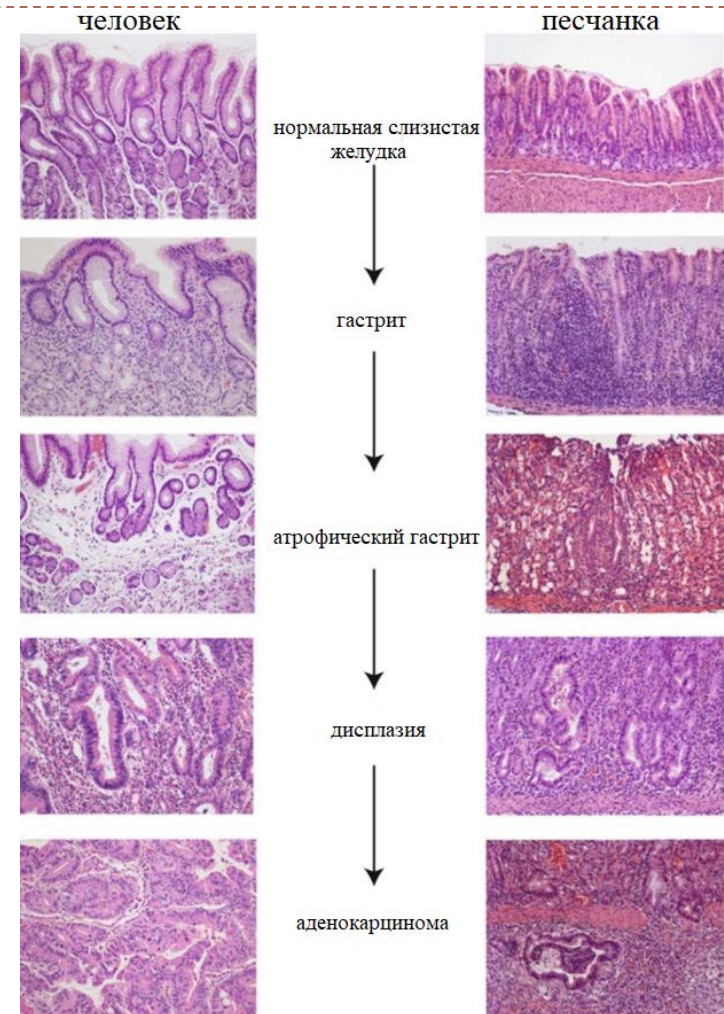
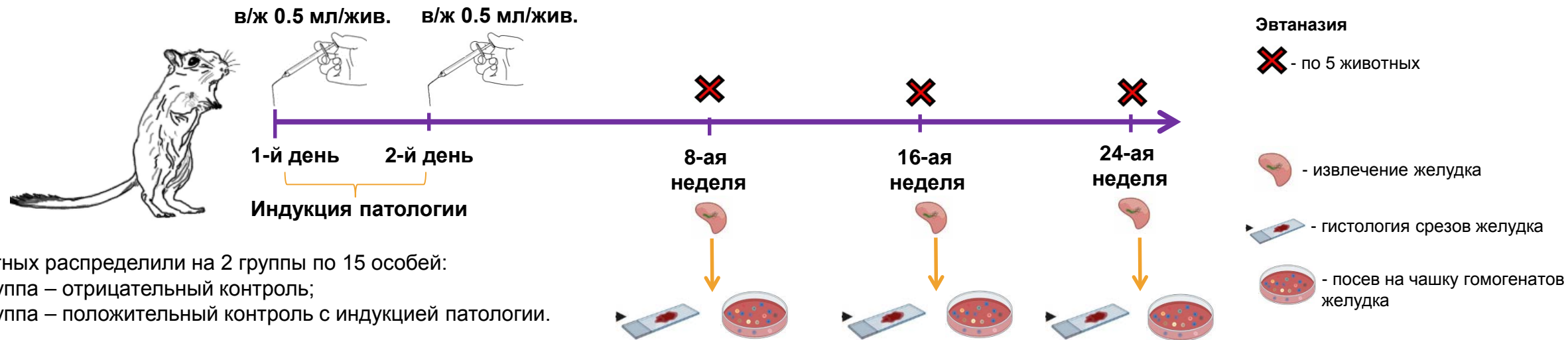


Рисунок 4 – Гистологическая картина развития язвы желудка у человека и песчанки. Окраска гематоксилином и эозином

Noto M.J., Romero-Gallo J. The Mongolian Gerbil: A Robust Model of *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Inflammation and Cancer // *Methods in molecular biology.* – 2016. – 1422. – P. 263-280

Моделирование патологии



Животных 2-й группы внутрижелудочно двукратно (через день) **инфицировали** суспензией свежей культуры *H. pylori* (клинический изолят, полученный из коллекции Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера) в концентрации $2,0 \times 10^9$ КОЕ/мл в объеме 0,5 мл.

Животным 1-й группы по аналогичной схеме вводили стерильный **триптон-соевый бульон** (среда для культивирования *H. pylori*).

Патоморфологический анализ

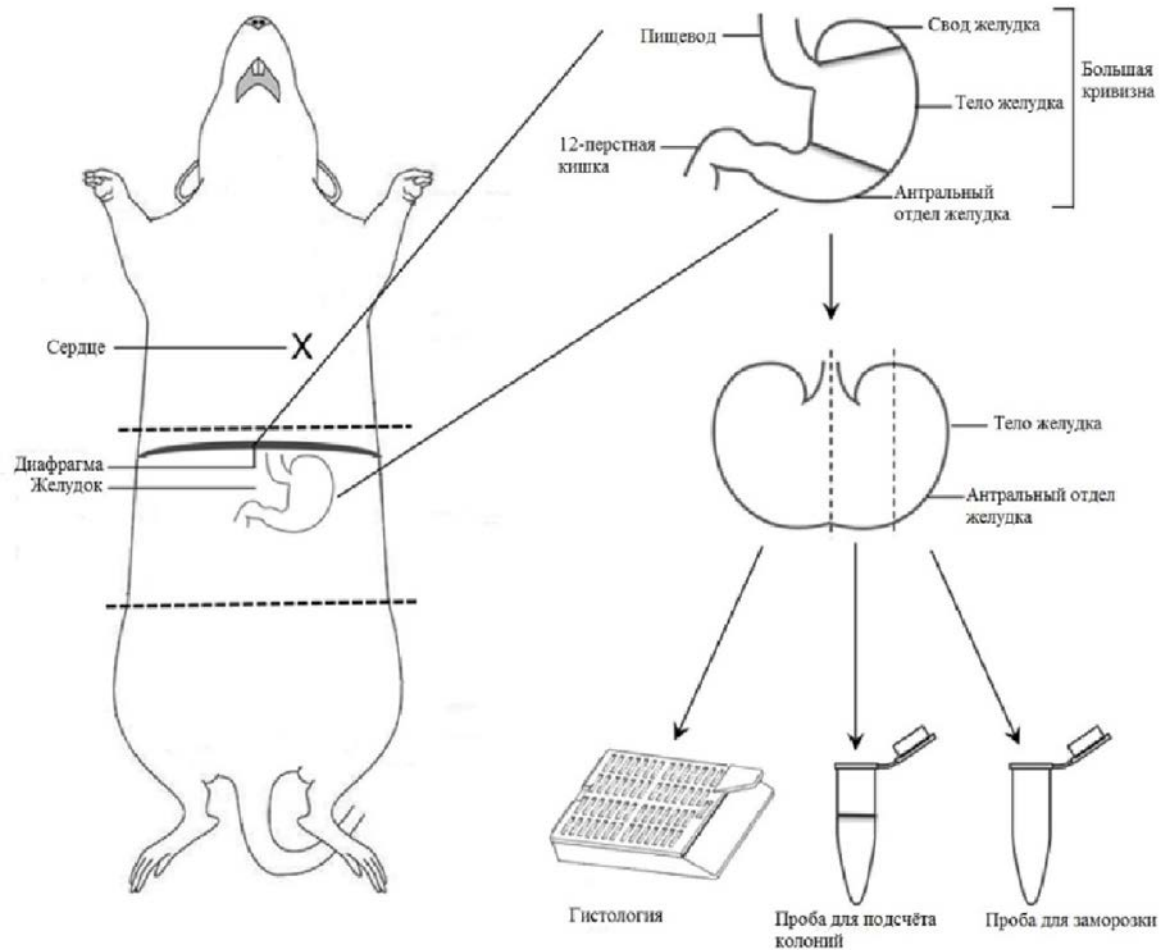


Рисунок 5 - Вскрытие песчанки и извлечение желудка

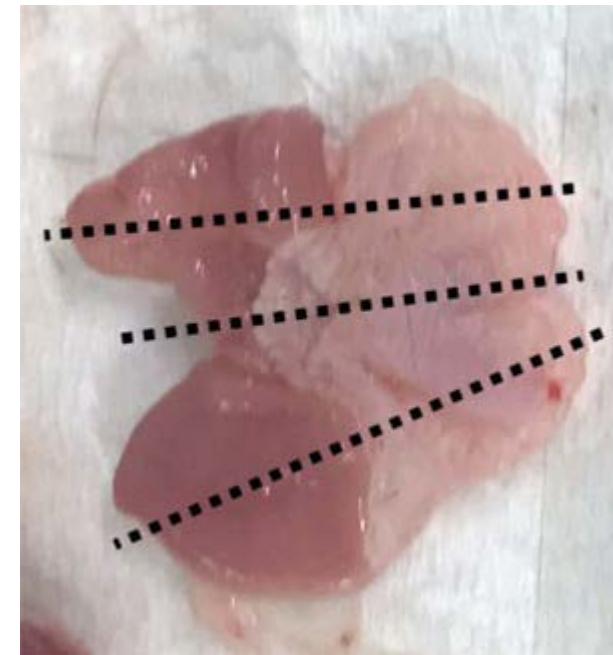
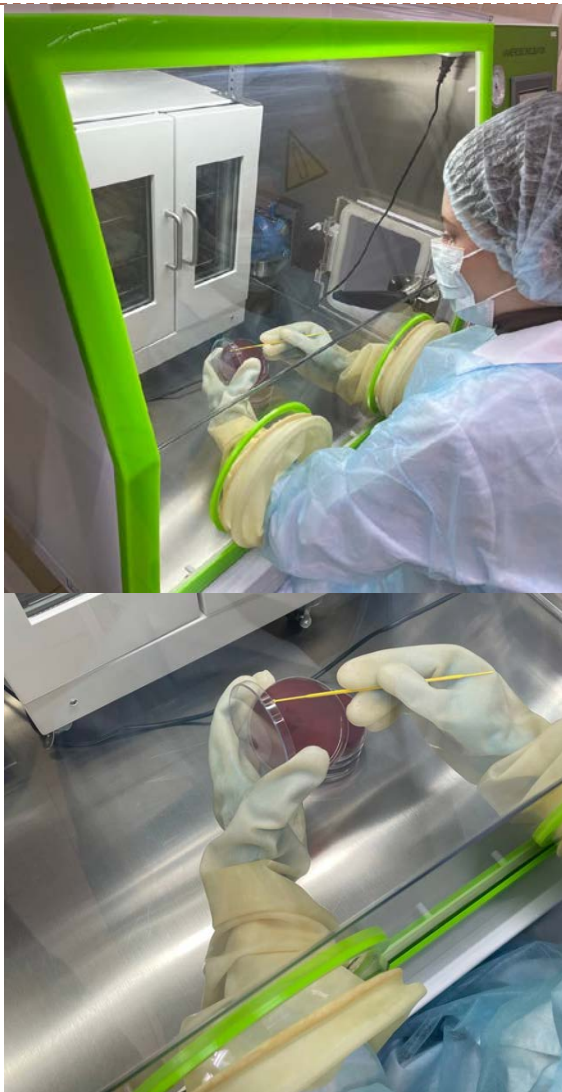


Рисунок 6 – Схема получения срезов желудка

Микробиологический анализ



H. pylori является **микроаэрофильной бактерией**, поэтому для успешного ее культивирования необходим **особый состав газовой среды**. Оптимальным составом газовой среды является: содержание кислорода – 5%, углекислого газа – 7-10%, азота – 80-85%, водорода – 8-10%.

Работу с чистой культурой и посев гомогенатов проводили в **анаэробной станции**.



Рисунок 7 – Рост *H. pylori* на среде Колумбийский агара с кровью и добавкой IsoVitalex. Характерные мелкие колонии в форме росы

Морфологическая оценка степени выраженности патологии

Для морфологической оценки степени выраженности патологии использованы визуально-аналоговые шкалы, предложенные в Сиднейской системе.

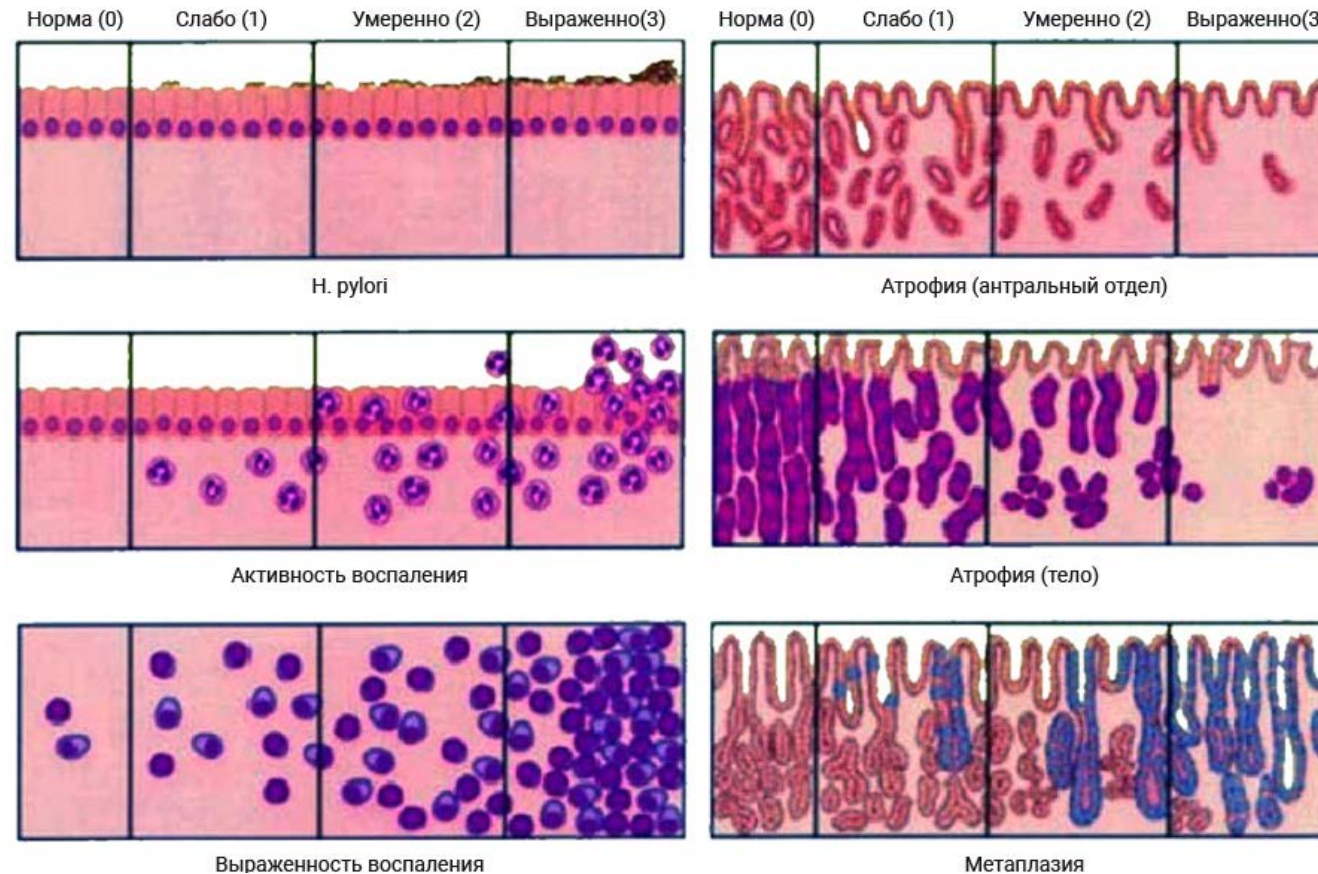


Рисунок 8 – Визуально-аналоговая шкала для морфологической оценки степени выраженности патологии

Результаты исследования

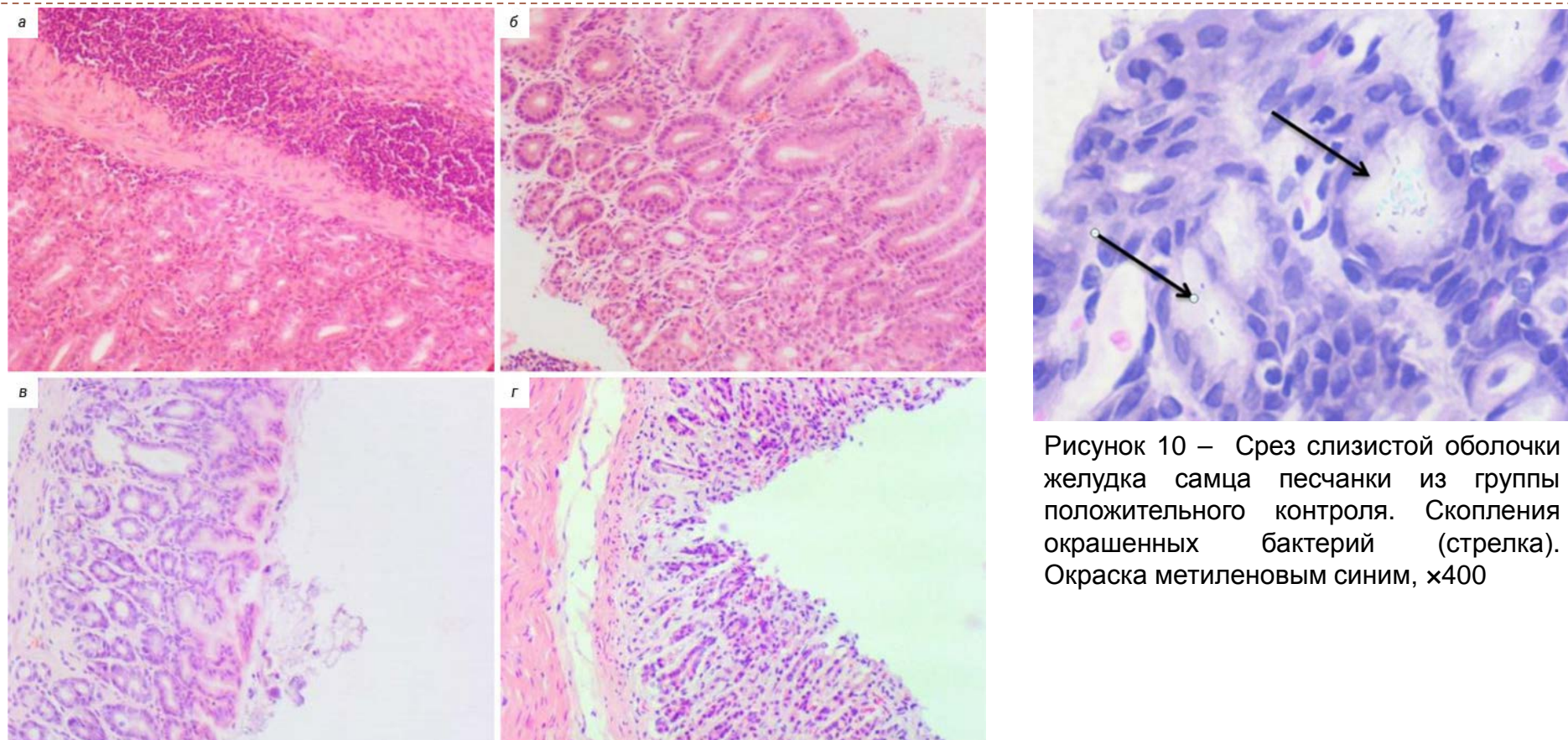


Рисунок 10 – Срез слизистой оболочки желудка самца песчанки из группы положительного контроля. Скопления окрашенных бактерий (стрелка). Окраска метиленовым синим, $\times 400$

Рисунок 9 – Срез слизистой оболочки желудка самца песчанки из группы положительного контроля (24-я неделя):

- а – лимфомакрофагальная воспалительная инфильтрация в подслизистом слое;
- б – слабо выраженное расширение желез, атрофия, диффузная воспалительная инфильтрация между ними;
- в – умеренно выраженная атрофия желез, воспалительная инфильтрация между ними;
- г – эрозивно-язвенное поражение. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

Результаты исследования

Выявлено, что пероральное введение культуры *H. pylori* песчанкам приводило к возникновению и прогрессированию экспериментальной патологии в течение 24 недель.

Развитие патологии сопровождалось **морфологическими изменениями слизистой оболочки желудка**, характерными для **катарального гастрита** с тенденцией к хронизации процесса. Результаты морфометрического исследования представлены в таблице.

Группа	Показатель, баллы						
	локализация*		воспаление		атрофия эпителия	метаплазия	обсемененность <i>H.pylori</i>
	анtrum	тело	степень выраженности	активность			
8 нед							
1-я (n=5)	0	0	0	0	0	0	0
2-я (n=5)	5	0	8	11	6	0	0
16 нед							
1-я (n=5)	0	0	0	0	0	0	0
2-я (n=5)	5	1	11	9	9	0	3
24 нед							
1-я (n=5)	0	0	0	0	0	0	0
2-я (n=5)	5	2	13	10	13	0	5

Примечание: * – количество выявленных случаев.

**СПАСИБО ЗА
ВНИМАНИЕ!**