

Научная статья/Research Article

УДК 619:616.9.48.636.4

DOI: 10.36718/1819-4036-2024-4-128-135

Александр Сергеевич Тищенко

Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина, Краснодар, Россия
tishhenko.a@edu.kubsau.ru

ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭШЕРИХИОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ЭКЗОТОКСИНАМИ *ESCHERICHIA COLI*

Эшерихиозная инфекция является актуальной проблемой для животноводства. Патогенные варианты кишечной палочки, обладая широким набором вирулентных факторов, попадая в организм, могут привести к осложнениям и поражению различных систем органов, в том числе за пределами желудочно-кишечного тракта. Гистопатологические исследования способствуют лучшему пониманию механизмов патогенеза, реакций хозяина и взаимодействий на тканевом уровне при различных формах эшерихиозной инфекции, а также разработке профилактических и терапевтических стратегий. Цель исследования – изучение влияния экзотоксинов патогенных кишечных палочек на гистологическую картину внутренних органов и систем у кроликов. Материалом для исследования служили патогенные изоляты кишечной палочки и смесь их экзотоксинов. В работе применяли молекулярно-генетические, бактериологические, серологические, биологические и гистопатологические методы исследований. В результате установили характерные гистологические признаки, связанные с токсикоинфекциями патогенных *Escherichia coli*, продуцирующими шигаподобные, термостабильные и термолабильные экзотоксины. Выявили разрушение микроворсинок в дистальных отделах тонкой и ободочной кишки, тромботическую микроангиопатию в почках, которая включала отек эндотелия, тромбоз в клубочковых капиллярах, отложение фибрина, мезангиолиз и повреждение канальцевого эпителия. Со стороны центральной нервной системы наблюдали периваскулярное сужение, воспаление мозговых оболочек, некроз нейронов и глиоз. Также отмечали патогистологические эффекты в виде токсической дистрофии печени и эмфиземы легких. Таким образом, специфические закономерности гистологического повреждения тканей указывают на механизмы взаимодействия различных патотипов кишечных палочек, что может способствовать совершенствованию стратегий лечения и профилактики токсигенного эшерихиоза.

Ключевые слова: эшерихиозная инфекция, кишечная палочка, экзотоксины, гистопатология, токсикоинфекция, кролики

Для цитирования: Тищенко А.С. Гистопатологические изменения при экспериментальной эшерихиозной инфекции, вызванной экзотоксинами *Escherichia coli* // Вестник КрасГАУ. 2024. № 4. С. 128–135. DOI: 10.36718/1819-4036-2024-4-128-135.

Alexander Sergeevich Tishchenko

Kuban State Agrarian University named after I.T. Trubilin, Krasnodar, Russia
tishhenko.a@edu.kubsau.ru

HISTOPATHOLOGICAL CHANGES IN EXPERIMENTAL ESCHERICHIA INFECTION CAUSED BY ESCHERICHIA COLI EXOTOXINS

Escherichia infection is a pressing problem for livestock farming. Pathogenic variants of Escherichia coli, having a wide range of virulence factors, when entering the body, can lead to complications and damage to various organ systems, including those outside the gastrointestinal tract. Histopathological studies contribute to a better understanding of the mechanisms of pathogenesis, host responses and interactions at the tissue level in various forms of Escherichia infection, as well as the development of preventive and therapeutic strategies. The purpose of research is to study the effect of exometabolites of pathogenic Escherichia coli on the histological picture of internal organs and systems in rabbits. The material for the study was pathogenic isolates of Escherichia coli and a mixture of their exometabolites. The work used molecular-genetic, bacteriological, serological, biological and histopathological research methods. As a result, characteristic histological signs associated with toxic infections of pathogenic Escherichia coli producing Shiga-like, heat-stable and heat-labile exotoxins were established. Destruction of microvilli in the distal small intestine and colon, thrombotic microangiopathy in the kidneys, which included endothelial edema, thrombosis in the glomerular capillaries, fibrin deposition, mesangiolytic and damage to the tubular epithelium were revealed. From the central nervous system, perivascular narrowing, inflammation of the meninges, neuronal necrosis and gliosis were observed. Pathohistological effects in the form of toxic liver dystrophy and pulmonary emphysema were also noted. Thus, specific patterns of histological tissue damage indicate mechanisms of interaction between different pathotypes of Escherichia coli, which may help improve strategies for the treatment and prevention of toxigenic escherichiosis.

Keywords: *Escherichia coli infection, Escherichia coli, exotoxins, histopathology, toxicoinfection, rabbits*

For citation: *Tishchenko A.S. Histopathological changes in experimental escherichia infection caused by Escherichia coli exotoxins // Bulliten KrasSAU. 2024;(4): 128–135 (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2024-4-128-135.*

Введение. Эшерихиоз, как инфекция, вызываемая патогенными вариантами кишечной палочки (*Escherichia coli*), является серьезной проблемой, как в ветеринарии, так и в общественном здравоохранении во всем мире [1, 2].

Возбудитель инфекции, в зависимости от патотипа, охватывает целый ряд клинических проявлений – от легкого гастроэнтерита до тяжелых системных инфекций. При этом гистопатологические исследования играют решающую роль в выяснении изменений на тканевом уровне, лежащих в основе патогенетических механизмов, происходящих при развитии эшерихиозной токсикоинфекции, тем самым помогая клиницистам и исследователям лучше понять прогрессирование заболевания и разработать целенаправленные терапевтические стратегии [3].

Гистопатологические исследования эшерихиоза в первую очередь сосредоточены на двух основных аспектах: желудочно-кишечные проявления и внекишечное поражение. При желудочно-кишечных инфекциях гистопатологические данные обычно включают повреждение слизи-

стой оболочки, воспалительные инфильтраты, некроз эпителиальных клеток и иногда подслизистое или трансмуральное воспаление. Эти изменения могут варьироваться в зависимости от штамма кишечной палочки и локализации в желудочно-кишечном тракте [4].

В случаях внекишечного эшерихиоза могут поражаться различные системы органов, включая мочевыводящие пути, центральную нервную систему, дыхательную систему и кровоток. Гистопатологическое исследование этих пораженных органов выявляет целый ряд воспалительных реакций, некроз тканей и образование микротромбов. На степень и тяжесть этих изменений влияют факторы хозяина, бактериальной вирулентности и место заражения [5].

В связи с тем, что в настоящее время существует множество патотипов кишечной палочки, связанных со специфическими факторами, патогенностями, в том числе с продукцией экзотоксинов и других метаболитов, актуальность приобретает более детальное изучение механизмов развития эшерихиозной инфекции на

примере патогистологических изменений во внутренних тканях и органах. Распознавание специфических патологических паттернов помогает провести различие между подтипами кишечной палочки, понять их патогенные механизмы и определить соответствующие стратегии лечения [1].

Цель исследования – изучение гистопатологии при экспериментальном заражении кроликов эшерихиозной токсикоинфекцией, вызванной экзометаболитами кишечной палочки.

Материалы и методы. Работа выполнялась на базе лаборатории микробиологии Центра биотехнологий Кубанского госагроуниверситета. Отдельные исследования проводили в испытательном центре ФГБУ «Краснодарская межобластная ветеринарная лаборатория». Изоляты кишечных палочек были выделены из патологического материала телят и поросят, павших от эшерихиозной инфекции. Родовую идентификацию проводили с использованием бактериологического и серологического методов диагностики. Для выделения и изучения культуральных свойств использовали коммерческие питательные среды ГМФ-агар, ГМФ-бульон, бульон Хоттингера, агар Эндо (ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», г. Оболensk) путем посева на них биоматериала. Видовую идентификацию патогенных кишечных палочек проводили с использованием метода MALDI-TOF MS на спектрометре VastoSCREEN при помощи прилагающегося программного обеспечения (Литех, РФ). Серологический профиль выделенных *E. coli* устанавливали с помощью сывороток О-коли агглютинирующих (Армавирская биофабрика).

Для выявления наличия генов патогенности и определения патотипов эшерихий были использованы тест-системы АмплиСенс Эшерихиозы-FL диареегенные *E. coli* (Москва) и соответствующие праймеры, синтезированные компанией ЗАО «Евроген» (Москва).

Оценку патогистологических изменений проводили на 1,5–2-месячных кроликах путем экспериментального воспроизведения эшерихиозной инфекции. Для этого сформировали 2 группы животных по 5 животных в каждой, со средней живой массой 650 ± 30 г. Кроликам опытной группы ректально с помощью уретрального катетера в прямую кишку вводили токсинсодер-

жащие смеси, полученные от изолятов кишечных палочек, содержащих гены основных экзотоксинов и других метаболитов. Кролики 2-й группы являлись контролем, им вводили стерильный питательный бульон. Токсинсодержащие бульонные смеси, содержащие основные экзометаболиты патогенных *E. coli*, получали путем культивирования в течение 6–7 сут изолятов кишечной палочки со стабильным генетическим набором, отвечающих за продукцию соответствующих токсинов и других метаболитов, и их последующего центрифугирования. Контроль продукции экзометаболитов проводили биологическим методом на инфузориях-стилонихиях. Наблюдение за кроликами осуществляли в течение 7 дней с фиксации их состояния и клинического проявления токсикоинфекции. Погибших животных вскрывали и подвергали патолого-анатомическому осмотру на наличие характерных изменений. Для гистологических исследований у кроликов отбирали ткани сердца, легких, печени, селезенки, поджелудочной железы, желудка, тонкого и толстого отделов кишечника, почек, скелетных мышц, головного и спинного мозга. Затем пробы фиксировали в 10 %-м растворе нейтрального формалина, готовили гистосрезы и проводили их окрашивание гематоксилин-эозином для улучшения визуализации различных клеточных компонентов и структурных особенностей. Микроскопию гистосрезов осуществляли с помощью микроскопа фирмы Zeiss под увеличением $\times 2,5$; $\times 5$; $\times 10$ с фотофиксацией.

Результаты и их обсуждение. Клинически инфекция, вызванная введением смеси экзометаболитов *E. coli*, у кроликов проявлялась в виде вялости, сниженной активности, сгорбленности, вздутия живота, нежелания двигаться, а также отмечали скрежет зубов, водянистую и слизистую диарею с примесью крови. У отдельных животных наблюдали повышение температуры, обезвоживание и респираторные признаки, такие как кашель или чихание. В тяжелых случаях у кроликов проявлялись признаки неврологических нарушений, такие как атаксия, тремор, судороги или паралич. В опытной группе отмечали гибель 2 кроликов в течение нескольких часов без развития характерных клинических симптомов. Остальные животные пали в течение 2–3 сут после экспериментального

заражения. У животных контрольной группы случаев падежа и клинических симптомов не выявляли.

При патолого-анатомическом исследовании у павших кроликов обнаружены изменения в печени, почках и кишечнике. Печень была увеличена в размере, плотной консистенции, темно-вишневого цвета. Почки уменьшены в объеме, анемичные. Слизистая оболочка на отдельных участках тонкого и толстого кишечника набухшая, темно-красного цвета.

При проведении гистологических исследований тканей печени установили изменения, характерные для токсической дистрофии, что выразилось нарушением балочного строения, жировым перерождением гепатоцитов с развитием разной величины очагов коагуляционного некроза, расширением и переполнением кровью вен и капилляров, кровоизлияниями. Имелись участки в гепатоцитах с наличием гемосидерина. В отдельных образцах отмечали венозную гиперемия печени с характерным переполнением и расширением синусоидных капилляров (рис. 1).

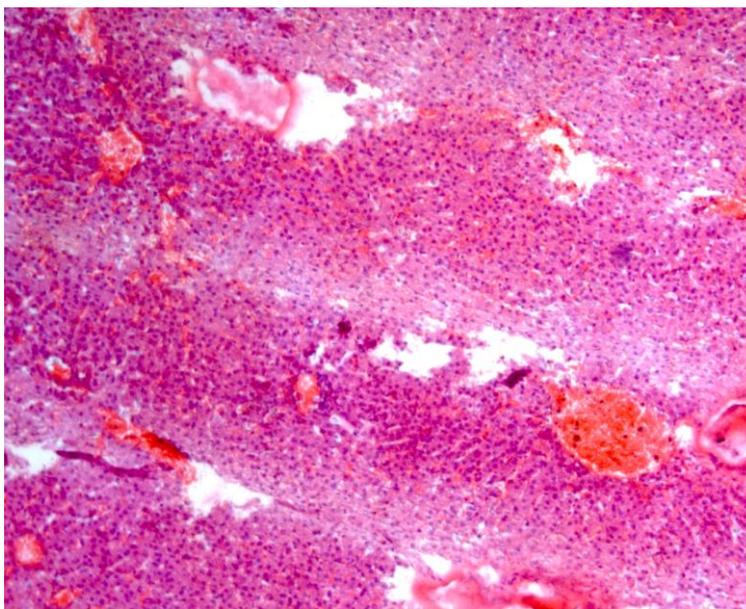


Рис. 1. Венозная гиперемия печени, ×10

Архитектоника органа была нарушена. Гепатоциты с признаками атрофии, ядра в состоянии пикноза, имелись небольшие очажки с жировым перерождением ткани. В сосудах междольковой соединительной ткани отмечали застой крови. Центральная вена и прилегающие капилляры полнокровны. Кроме этого выявляли нарушение балочного строения печеночной ткани. Изменения заключались в деформации балок, а в других случаях отмечали дисконкомплексанность на отдельные гепатоциты, в которых наблюдали дистрофию зернистого характера и очаги некроза с лизисом ядер.

Ткань легкого характеризовалась расширением альвеол, межальвеолярные перегородки местами разорваны, некоторые альвеолы сливались, образуя большие полости, что характер-

но для эмфиземы (рис. 2). Отмечали ателектаз в отдельных альвеолах, с утолщением межальвеолярных перегородок и сужением просвета. Воспалительной реакции в органе не наблюдали.

В сердечной мышце у двух кроликов опытной группы отмечали некротические изменения с выявлением небольших участков воспаления с пикнозом ядер и лизисом кардиомиоцитов. Отмечали кровоизлияния в отдельных периваскулярных пространствах со скоплением экстравазата.

В ткани селезенки, желудка и поджелудочной железы в большинстве случаев микроструктурных изменений в органе не выявлено. Однако у некоторых образцов отмечали венозную гиперемия в тканях селезенки и диффузное катаральное воспаление с гиперсекрецией слизи в клетках желудка.

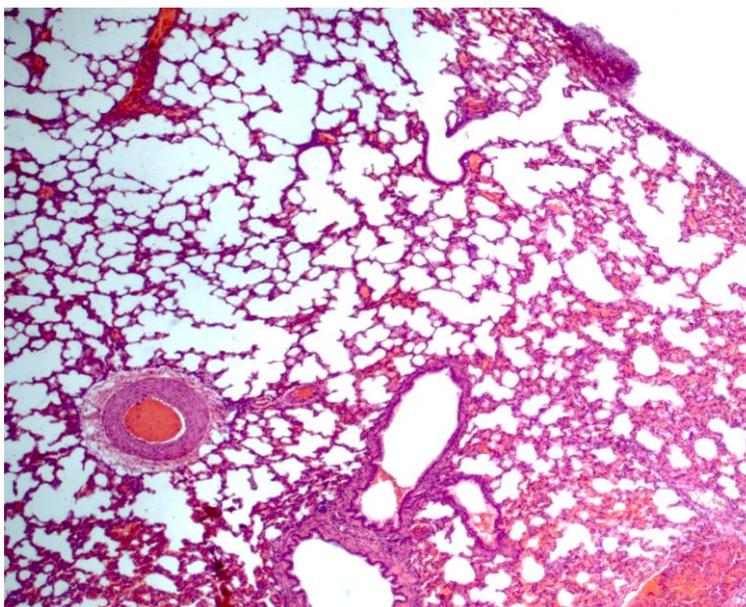


Рис. 2. Эмфизематозные участки в ткани легкого, $\times 2,5$

Патогистологические изменения в тканях почек заключались в нарушении нормальной архитектоники органа. Поражение было характер-

но для гломерулосклероза и первичного некротического гломерулонефрита с очагами некроза (рис. 3).

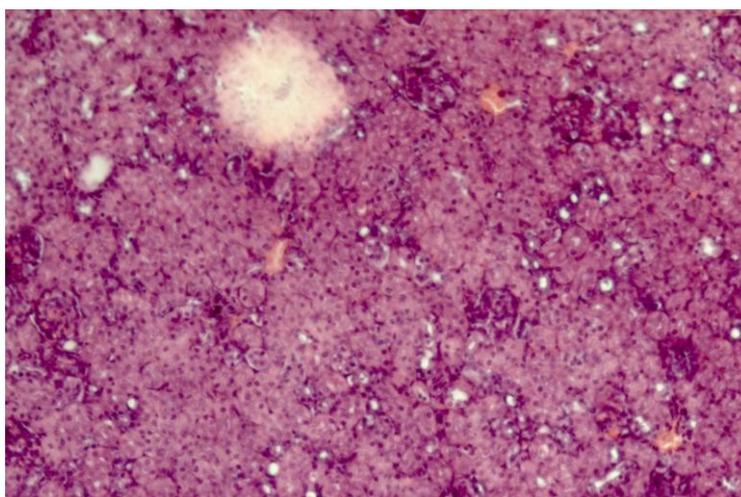


Рис. 3. Очаг некроза в почечных канальцах и гломерулосклероз почек, $\times 10$

Изменения касались преимущественно клубочкового аппарата, также наблюдали очаги поражения канальцев почки. При этом клубочки увеличены в размере, с повышенным в них числом клеток за счет инфильтрации нейтрофильными лейкоцитами, пролиферации эндотелиоцитов. У двух животных в почках выявляли полнокровные капилляры и венозные сосуды, зернистую и гидропическую дистрофию и некроз.

Некоторая часть канальцев и клубочков структурно были без изменений.

При гистологическом исследовании ткани спинного мозга микроструктурных изменений обнаружено не было, в отличие от головного мозга, где в большинстве срезов ткани органа структура была сохранена, но имелись небольшие очаги вакуолизации в виде начальной стадии энцефалопатии (рис. 4). Также присутствовали очаги некроза.

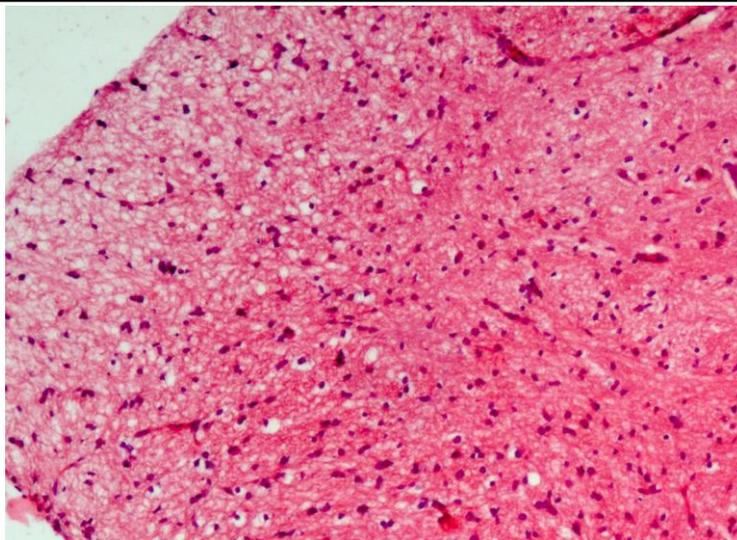


Рис. 4. Очаги вакуолизации в ткани головного мозга и начальная стадия энцефалопатии, $\times 5$

В некоторых срезах тканей мезентериальных желудочных и портальных лимфатических узлов выявляли увеличение размера первичных фолликулов за счет увеличения количества лимфатических клеток, а также увеличение числа вторичных фолликулов с реактивными центрами. Кровеносные сосуды трабекул были наполнены кровью.

Ткань тонкого и толстого отделов кишечника поражалась у всех животных. Чаще всего наблюдали характерное острое, диффузное катарально-геморрагическое воспаление с выпотом геморрагического экссудата в подслизистый слой.

Таким образом, гистопатологическое исследование играет решающую роль в понимании изменений на тканевом уровне при эшерихиозе. Стоит отметить, что основными экзотоксинами патогенных эшерихий, ответственных за кишечные и внекишечные гистологические изменения, являются шигаподобные, термолабильные и термостабильные энтеротоксины [6–8].

Гистологические эффекты термолабильного токсина со стороны желудочно-кишечного тракта проявлялись разрушением микроворсинок, повышением секреции, а также микрососудистыми изменениями, приводящими к отекам, кровоизлияниям и воспалительным инфильтратам в слизистой оболочке кишечника [9]. Термостабильные токсины могут вызывать морфологические изменения в слизистой оболочке кишечника, включая удлинение и дилатацию

крипт, изменения в бокаловидных клетках и легкие воспалительные инфильтраты [2, 7].

В свою очередь для инфекций, вызываемых шигаподобными токсинами, характерно, что они связываются с рецепторами на эндотелиальных клетках почек, что приводит к повреждению эндотелия и последующему тромбозу. Гистологически это характеризуется отеком эндотелия клубочков, мезангиолизом, отложением фибрина и тромботической микроангиопатией, что может привести к острому некрозу канальцев и почечной недостаточности [4, 5, 8]. Кроме того, наблюдали осложнения со стороны центральной нервной системы, поскольку шигаподобные экзотоксины могут проникать через гематоэнцефалический барьер и поражать нейроны, вызывая их некроз, глиоз и воспаление, что согласуется с результатами наших исследований.

Повреждение печени характерно для энтеротоксигенных патотипов кишечных палочек и включает дегенерацию гепатоцитов, вакуолизацию и перипортальное воспаление. При пневмонии кишечная палочка может вызывать повреждение альвеол, интерстициальное воспаление и бронхопневмонию [7, 9, 10].

Заключение. В результате проведенных исследований установлено, что используемые изоляты кишечной палочки и выделяемые ими метаболиты при экспериментальном заражении кроликов вызывает у них токсикоинфекции, характерные для энтеротоксигенных, энтеропатогенных и шигатоксинпродуцирующих патотипов *E. coli*, способных вырабатывать термолабиль-

ные, термостабильные и шигаподобные экзотоксины. При гистологическом исследовании срезов тканей внутренних органов в образцах основными являлись изменения, характерные для токсической дистрофии печени, гломеруллопатии, эмфиземы легких и энцефалопатии. Таким образом, гистопатологические исследования играют важную роль при диагностике эшерихиоза у животных. Выявление специфических патологических паттернов на тканевом уровне способствует лучшему пониманию патогенетических механизмов течения эшерихиозной токсикоинфекции и помогает разрабатывать эффективные лечебно-профилактические стратегии.

Список источников

1. Тищенко А.С., Степаненко А.В., Терехов В.И. Экзотоксины патогенных *Escherichia coli* // Ветеринария Кубани. 2020. № 5. С. 3–7. DOI: 10.33861/2071-8020-2020-5-3-7.
2. Dubreuil J.D., Isaacson R.E., Schifferli D.M. Animal enterotoxigenic *Escherichia coli* // EcoSal Plus. 2016. Vol. 7. № 1. P. 80. DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016.
3. Поздеев О.К. Молекулярно-генетические основы патогенности энтеробактерий // Практическая медицина. 2010. № 2 (41). С. 84–88.
4. Колесникова Н.В., Кравченко В.М., Терехов В.И. Клинико-морфологические изменения при экспериментальном токсикозе // Ветеринария. 2007. № 2. С. 21–23.
5. Survey and Experimental Infection of Enteropathogenic *Escherichia coli* in Common Marmosets (*Callithrix jacchus*) / N. Hayashimoto [et al.] // PLoS ONE, 2016. 11(8): e0160116. DOI: 10.1371/journal.pone.0160116.
6. Шантыз А., Мирошниченко П., Садикова Е. Патоморфологические изменения при экспериментальном эшерихиозе у лабораторных животных // Комбикорма. 2018. № 12. С. 74–75. DOI: 10.25741/2413-287X-2018-12-4-041.
7. Summary of methodology used in enterotoxigenic *Escherichia coli* (EPEC) challenge experiments in weanling pigs and quantitative assessment of observed variability / P.L. Dahmer [et al.] // Transl Anim Sci. 2023 Jul 20;7(1):txad083. DOI: 10.1093/tas/txad083.

8. Obata F., Obrig T. Role of Shiga/Vero toxins in pathogenesis // Microbiol Spectr. 2014 Jun; 2(3). DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0005-2013.
9. Relative importance of heat-labile enterotoxin in the causation of severe diarrheal disease in the gnotobiotic piglet model by a strain of enterotoxigenic *Escherichia coli* that produces multiple enterotoxins / E.M. Berberov [et al.] // Infect Immun. 2004 Jul;72(7):3914-3924. DOI: 10.1128/IAI.72.7.3914-3924.2004.
10. Effect of chronic and acute enterotoxigenic *E. coli* challenge on growth performance, intestinal inflammation, microbiome, and metabolome of weaned piglets / J.X. Boeckman [et al.] // Sci Rep. 2022 Mar 23;12(1):5024. DOI: 10.1038/s41598-022-08446-z.

References

1. Tischenko A.S., Stepanenko A.V., Terehov V.I. `Ekzotoksiny patogennyh *Escherichia coli* // Veterinariya Kubani. 2020. № 5. S. 3–7. DOI: 10.33861/2071-8020-2020-5-3-7.
2. Dubreuil J.D., Isaacson R.E., Schifferli D.M. Animal enterotoxigenic *Escherichia coli* // EcoSal Plus. 2016. Vol. 7. № 1. P. 80. DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016.
3. Pozdееv O.K. Molekulyarno-geneticheskie osnovy patogennosti `enterobakterij // Prakticheskaya medicina. 2010. № 2 (41). S. 84–88.
4. Kolesnikova N.V., Kravchenko V.M., Terehov V.I. Kliniko-morfologicheskie izmeneniya pri `eksperimental'nom toksikoze // Veterinariya. 2007. № 2. S. 21–23.
5. Survey and Experimental Infection of Enteropathogenic *Escherichia coli* in Common Marmosets (*Callithrix jacchus*) / N. Hayashimoto [et al.] // PLoS ONE, 2016. 11(8): e0160116. DOI: 10.1371/journal.pone.0160116.
6. Shantyz A., Miroshnichenko P., Sadikova E. Patomorfologicheskie izmeneniya pri `eksperimental'nom `esherihioze u laboratornyh zhiivotnyh // Kombikorma. 2018. № 12. S. 74–75. DOI: 10.25741/2413-287X-2018-12-4-041.
7. Summary of methodology used in enterotoxigenic *Escherichia coli* (EPEC) challenge experiments in weanling pigs and quantitative assessment of observed variability / P.L. Dahmer [et al.] // Transl Anim Sci. 2023 Jul 20;7(1):txad083. DOI: 10.1093/tas/txad083.

- mer* [et al.] // *Transl Anim Sci.* 2023 Jul 20;7(1):txad083. DOI: 10.1093/tas/txad083.
8. *Obata F., Obrig T.* Role of Shiga/Vero toxins in pathogenesis // *Microbiol Spectr.* 2014 Jun; 2(3). DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0005-2013.
9. Relative importance of heat-labile enterotoxin in the causation of severe diarrheal disease in the gnotobiotic piglet model by a strain of enterotoxigenic *Escherichia coli* that produces multiple enterotoxins / *E.M. Berberov* [et al.] // *Infect Immun.* 2004 Jul;72(7):3914-3924. DOI: 10.1128/IAI.72.7.3914-3924.2004.
10. Effect of chronic and acute enterotoxigenic *E. coli* challenge on growth performance, intestinal inflammation, microbiome, and metabolome of weaned piglets / *J.X. Boeckman* [et al.] // *Sci Rep.* 2022 Mar 23;12(1):5024. DOI: 10.1038/s41598-022-08446-z.

Статья принята к публикации 28.08.2023 / The article accepted for publication 28.08.2023.

Информация об авторах:

Александр Сергеевич Тищенко, заведующий лабораторией микробиологии центра биотехнологий, доцент кафедры микробиологии, эпизоотологии и вирусологии, кандидат ветеринарных наук, доцент

Information about the authors:

Alexander Sergeevich Tishchenko¹, Head of the Microbiology Laboratory of the Biotechnology Center, Associate Professor at the Department of Microbiology, Epizootology and Virology, Candidate of Veterinary Sciences, Docent

