

ВЕТЕРИНАРНАЯ МЕДИЦИНА



УДК 619:579:579.841.93

Л.Н. Гордиенко

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ БРУЦЕЛЛ В ПРОЦЕССЕ L-ТРАНСФОРМАЦИИ IN VITRO

Ключевые слова: бруцеллы, морфология, трансформация, свойства, питательные среды, L-варианты, условия культивирования, идентификация.

Введение

Бруцеллы, как многие другие виды микроорганизмов, способны трансформироваться в L-формы, изменяя морфологические и биологические признаки исходного штамма [1-3].

В таком состоянии они длительное время персистируют в организме животных, вызывая инфекционный процесс с необычной патологией, и не выявляются стандартными методами диагностики [4-6].

С явлением изменчивости возбудителя бруцеллёза связана тенденция хронизации инфекционного процесса и наличие латентных форм у животных, которые представляют потенциальную опасность для восприимчивого поголовья. При определённых условиях изменённые формы бруцелл могут реверсировать и играть роль в появлении рецидивов в оздоровленных стадах и поддержании очагов инфекции [7, 8].

В связи с этим при диагностике бруцеллёза необходимо учитывать не только типичные формы бруцелл, но также L-формы и различные их варианты, что позволит выявить хронически больных животных, бруцеллоносителей, прогнозировать проявление эпизоотического процесса, правильно и своевременно проводить противобруцеллёзные мероприятия.

Для этого необходимо расширить возможность диагностического диапазона при бруцеллёзе за счёт бактериологической и серологической идентификации L-форм возбудителя.

В связи с этим мы посчитали **целесообразным** в экспериментальных условиях трансформировать бруцеллы в L-форму, изучить их свойства на разных стадиях трансформации и использовать полученные данные при усовершенствовании лабораторной диагностики бруцеллёза.

Материалы и методы

Работу проводили в лабораториях научно-исследовательских учреждений Россельхозакадемии в соответствии с требованиями санитарных правил [9].

L-трансформацию осуществляли при высеве культур бруцелл вакцинного штамма *B. abortus* 19 (S-форма) и референтного *B. abortus* 544 (S-форма) на элективные плотные питательные среды, содержащие соль бензилпенициллина в различных концентрациях. Посевы инкубировали в термостате при температуре +37...+38°C.

Посевы просматривали через 48 ч, оценивая наличие появления колоний, их энергию и характер роста. При каждом пересеве увеличивали концентрацию антибиотика. Через пять пересевов из нативных культур готовили мазки, окрашивали стандартными методами и изучали их тинкториальные и морфологические признаки при помощи световых микроскопов (МБИ-6 и Axioskop 40).

Результаты исследований

При воздействии на клетки бруцелл соли пенициллина в концентрации 5-10 ЕД/мл среды культуральные свойства штаммов существенно не изменялись. При высеве 1 млрд взвеси L-культур на скошенный агар рост отмечали через 36-72 ч. На поверхности плотной среды колонии были правильно контурированные, круглые, гомогенные, бесцветные с масляным оттенком, размером от 1 до 3-4 мм.

В полужидком агаре наблюдали наличие роста в виде голубовато-белого столбика шириной 0,5-1,0 см в верхней части среды. Взвесь культуры была соединена с плотными частицами среды и не отделялась от них бактериологической петлёй.

В бульоне отмечали помутнение и выпадение белого осадка. При длительном культивировании в жидкой среде по периферии наблюдали кольцевидный рост серовато-голубого цвета, слегка поднимающийся над уровнем бульона.

С постепенным повышением концентрации антибиотика в питательной среде до 300-1000 ЕД/мл культуральные свойства изучаемых субкультур заметно изменялись. Их видимый рост замедлялся до 7-14 суток. Колонии становились более мелкими (до 1-2 мм), уплощёнными и приобретали матовый оттенок. На поверхности полужидкой питательной среды появлялся слабый рост в виде сероголубого столбика.

В бульоне образовывался осадок, который при встряхивании поднимался плотной косичкой или хлопьями. Пристеночного кольца, характерного для типичных S-форм бруцелл, не возникало.

При воздействии более высоких концентраций пенициллина до 5-20 тыс. ЕД/мл в процессе L-трансформации на 14-18 генерации были получены L-варианты бруцелл с относительно стабильными признаками сферопластного типа, которые были условно обозначены «Сп». Полученные варианты заметно отличались от исходной культуры скоростью и энергией роста. Наличие слабого роста отмечали на поверхности плотных питательных сред лишь на 14-20-е сутки. Колонии становились плоскими, мелкими (размером менее 1 мм), со значительным матовым оттенком. На полужидкой среде образовывались серые матовые плоские налёты роста культуры разной конфигурации и размера.

При пересеве на мясо-пептонном бульоне L-варианты бруцелл также не

образовывали характерного для типичных форм пристеночного кольца.

В последующем при длительном культивировании L-вариантов сферопластного типа в присутствии индуцирующего фактора отмечали стабилизацию культуральных свойств. При выборе оптимальных условий адаптации в условиях обычных питательных сред удалось на протяжении длительного времени сохранять полученные L-варианты и использовать их в качестве модели при изучении процессов трансформации и реверсии возбудителя бруцеллёза.

В результате изучения фенотипических признаков L-вариантов бруцелл на разных стадиях трансформации отмечали постепенное изменение размеров микробных клеток, состава популяции, специфичности окраски.

В начальной стадии трансформации при действии минимальных концентраций пенициллина 5-10 ЕД/мл среды клетки бруцелл сохраняли специфичность окраски анилиновыми красителями (по Граму и по Козловскому). Как и типичные бруцеллы, они окрашивались в розовый и красный цвета. Морфологически популяция L-вариантов на этом этапе состояла из микрококков диаметром 0,3-0,4 мкм и овоидов 0,5-0,8 мкм. В таком состоянии бруцеллы полностью сохраняли агглютинабельные свойства и только единичные культуры проявляли слабую положительную реакцию в растворе трипафлавина.

При увеличении концентрации антибиотика до 300-1000 ЕД/мл клетки L-вариантов бруцелл оставались грамотрицательными, но утрачивали специфичность окраски по Козловскому: окрашивались в темно-коричневый и серо-сиреневый цвет. Популяция культур при данной концентрации пенициллина оставалась полиморфной: половина клеток (до 50%) были еще мелкими, а остальные увеличивали свои размеры до 0,8-1,0 мкм и становились похожими на кокки, расположенные беспорядочно. Культура становилась слизистой или крошковатой и не эмульгировалась в сыворотках и физиологическом растворе. При посеве на элективные питательные среды в отсутствие индуцирующего фактора при последующих двух пересевах культуры реверсировали в исходную бактериальную форму бруцелл.

Воздействие высоких концентраций антибиотика до 20 тыс. ЕД/мл вызывало изменение их фенотипических признаков. На 14-18 генерации культуры оставались

полиморфными, в их популяциях преобладали шаровидные клетки до 1,5–2,0 мкм и более. Крупные сферопласты были деформированы и неравномерно окрашивались по Козловскому в бурый, коричневый и серый цвет, по Граму – в сиреневый и фиолетовый. До 10% от общего количества составляли мелкие округлившиеся клетки, по размерам близкие к типичным бруцеллам, но имеющие темно-красную или коричневую окраску.

На более поздних стадиях трансформации L-варианты бруцелл полностью утрачивали ригидную клеточную стенку.

Размеры L-клеток увеличивались в несколько раз и достигали от 2,0 до 4,0 мкм. Популяция состояла из клеток разного размера, расположенных в мазках беспорядочно, окрашивающихся по Козловскому в темно-коричневый, по Граму – в бордовый и фиолетовый цвета. Часть клеток в популяции имела эллипсоидную форму и гигантские размеры 3,0–8,0 мкм. При микроскопии были видны элементарные тела, интенсивно окрашенные в темно-коричневый или фиолетовый цвет.

Полученные культуры бруцелл в L-форме, адаптированные к условиям искусственных питательных сред с добавлением белковых компонентов (нормальная сыворотка крови лошади или околоплодная жидкость), были способны в нативном состоянии сохранять при температуре +4...+12°C стабильные свойства в течение нескольких лет. В дальнейшем L-культуры, полученные *in vitro*, использовали для изготовления диагностических препаратов: L-бруцеллезных сывороток и L-антигенов.

Экспериментально полученные L-культуры бруцелл со стабильно закреплёнными свойствами использовали в качестве эталонных при идентификации L-вариантов, изолированных от лабораторных и сельскохозяйственных животных.

Новые научные данные о свойствах бруцелл в L-форме необходимы при изучении закономерностей и особенностей персистенции L-форм бруцелл в организме животных, инфекционного процесса у животных, инфицированных изменёнными формами, усовершенствования диагностики бруцеллёза, оценки эпизоотического состояния стад, прогнозировании проявления эпизоотий, своевременного и правильного проведения профилактических мероприятий.

Выводы

В процессе L-трансформации *in vitro* бруцеллы изменяют культуральные, тинкториальные и морфологические признаки. Трансформации подвержены как вакцинные, так и референтные штаммы бруцелл, находящиеся в S-форме.

Степень изменчивости бруцелл зависит от концентрации воздействия индуцирующего фактора.

Библиографический список

1. Бакулов И.А. Проблема L-форм бактерий в ветеринарии / И.А. Бакулов, Т.Я. Зеленцова // Ветеринария. – 1980. – № 10. – С. 23.
2. Гордиенко Л.Н. L-трансформация бруцелл и её значение при бруцеллёзе северных оленей / Л.Н. Гордиенко, В.Г. Ощепков // Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных: матер. Междунар. науч.-практ. конф. (16-17 мая 2005 г.). – М., 2006. – С. 327-333.
3. Зыкин Л.Ф. L-формы возбудителей зооантропонозов / Л.Ф. Зыкин, Д.А. Васильев. – Ульяновск, 2000. – 68 с.
4. Кошкин Е.Н. Изменчивость бруцелл в организме свиней / Е.Н. Кошкин // Инфекционные и незаразные болезни сельскохозяйственных животных в Казахстане. – Алма-Аты, 1993. – С. 63-67.
5. Ременцова М.М. Значение L-форм бруцелл в эпизоотическом процессе / М.М. Ременцова, В.М. Семенцова, В.М. Нифантьев и др. // Актуальные вопросы профилактики бруцеллёза и организация мед. помощи больным: тез. докл. Всесоюз. конф. (г. Новосибирск, 24-25 окт. 1989 г.). – М., 1989. – С. 93-94.
6. Триленко П.А. МВБ и L-формы бруцелл / П.А. Триленко // ЛВИ. – 1971. – Вып. 32. – С. 35.
7. Толмачёва Т.А. Реверсия L-форм бруцелл *in vitro* и *in vivo* и свойства полученных ревертантов / Т.А. Толмачёва // ЖМЭИ. – 1975. – № 1. – С. 145.
8. Гордиенко Л.Н. L-формы бруцелл и их роль в инфекционном процессе и иммунодиагностике бруцеллёза у людей и животных / Л.Н. Гордиенко, В.Г. Ощепков, Л.М. Михайлов, А.И. Калиновский // Матер. Межрегион. науч.-практ. конф. – Омск, 2007. – № 3 (61).
9. Санитарные правила СП 1.2.011-94. Безопасность работы с микроорганизмами 1-2 групп патогенности. – М., 1994. – 152 с.