



УДК 619:616.22/23-002

**А.Р. Сансызбай,
Б.А. Еспембетов,
В.Л. Зайцев,
Н.Н. Зинина,
Н.С. Сырым,
К.Т. Султанкулова,
М.К. Сармыкова,
Р.К. Нисанова**

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИЗОЛЯТОВ БРУЦЕЛЛ В S- И R-ФОРМАХ ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Ключевые слова: бруцеллез, *Br. melitensis*, *Br. abortus*, *Br. suis* диссоциация, R- и S-формы, электронная микроскопия.

Введение

Бруцеллез относится к наиболее распространенным заболеваниям, и полная его ликвидация является актуальной задачей, стоящей перед ветеринарной и медицинской наукой. Сложность этой проблемы обусловливается рядом особенностей биологии возбудителя этого заболевания.

Все виды возбудителей этой болезни – бактерии рода *Brucella* – по степени патогенности относятся к группе микробов особо опасных инфекций. Из 118 нозологических единиц, включенных в список МЭБ, три вида возбудителя бруцеллеза сельскохозяйственных животных представлены как отдельные нозологические единицы – *Br. abortus*, *Br. melitensis* и *B. suis*.

Морфологически все три вида бруцелл трудноотличимы друг от друга. Это мельчайшие бактерии шаровидной, овоидной или более удлинённой формы. Диаметр шаровидных форм достигает 0,3-0,4 ц, а бакте-

рии удлинённой формы имеют длину от 0,4-0,8 до 2,2-3,0, ширину – 0,4-0,8 ц. В электронном микроскопе они более крупные, палочковидные с закругленными концами, кокковые формы встречаются редко. Бруцеллы неподвижны, спор не образуют, при некоторых условиях приобретают разнообразные формы и размеры, а также способны образовывать капсулы.

У бруцелл описаны явления диссоциации с образованием R- и S-формы [1-3]. Также имеются сообщения о выделении из организма животных и человека диссоциированных форм бруцелл. Инагглютинабельные культуры бруцелл нередко выделяли из крови людей и органов животных, преимущественно при хроническом течении бруцеллеза [3, 4].

На основе вышеприведенных данных можно утверждать, что либо в инфицированном организме, на определенном этапе развития инфекционного процесса, либо при действии внешних факторов создаются условия для проявления лизогении бруцелл и превращения возбудителя болезни из S-форм в R-форму и обратно.

В хозяйствах с длительным неблагополучием по бруцеллезу наиболее сильно проявляется действие различных факторов (иммунное состояние, действие фагов и т.д.) при трансформации антигенной структуры бруцелл. Нарастает количество атипичных и диссоциированных биоваров микроба [5, 6].

Анализ данных по изучению культур бруцелл, изолированных от сельскохозяйственных животных, показывает, что диссоциированные варианты чаще встречаются в «старых» очагах, где практически не отмечались аборты бруцеллезной этиологии.

Важно отметить, что исследователи находят четыре варианта морфологических признаков у диссоциированных форм бруцелл [7, 8]. Клетки первого и второго вариантов по строению более резко отличаются от бруцелл в S-форме. Характерным для них признаком является наличие капсулоподобного вещества в виде рыхлого осмиофильного слоя. Бруцеллы третьего морфологического варианта имеют лишь фрагменты капсулоподобного вещества, а клетки четвертого варианта часто лишены его, т.е. становятся подобными микробным телам недиссоциированных форм.

При частичном сохранении S-компонентов культуры бруцелл имеют свои отличительные особенности. Так, при окраске колоний по Уайт-Вильсону можно найти большое множество разнообразий степени окрашивания их кристаллвиолетом. Отдельные виды бруцелл (*Br. ovisi* др.) находятся в стабильной R-форме и в организме животных вызывают выраженные патологические изменения.

Необходимо отметить, что при определении таксономических видов и изучении биологических свойств культур бруцелл в основе работ отечественных ученых по номенклатуре и классификации бруцелл, как правило, использовался микробиологический подход и в том числе электронно-микроскопический. Это объясняется тем, что различные виды бруцелл отличаются по морфологическим, биохимическим, культуральным свойствам и патогенности, формируя тем самым хорошо очерченные группы внутри рода, коррелирующие с паразитизмом на строго определенных видах хозяев. Электронная микроскопия – метод морфологического исследования бруцелл с помощью потока электронов, позволяющих изучить структуру культур на макромолекулярном и субклеточном уровнях.

Объективный характер электронно-микроскопических исследований подтверждается выявлением влияния микроорганизмов, вызывающих в процессе своей жизнедеятельности деструктивные измене-

ния как в окружающей среде, так и в организме животных.

В практике работы микроскопическое исследование в большинстве случаев имеет значение ускоренной ориентировочной диагностики. Основными задачами микроскопии служат выявление возбудителя в клиническом материале, ориентировочная идентификация на основании определения характерных морфологических и тинкториальных признаков бактерий.

Анализ данных литературы позволил предположить, что только при совместном исследовании морфобиологических особенностей бруцелл можно получить полную и углубленную информацию о функциональных характеристиках бруцелл.

Таким образом, определение таксономических видов популяций бруцелл, циркулирующих в различных по своей характеристике эпизоотических очагах бруцеллезной инфекции на основе изучения морфологических свойств электронно-микроскопическим методом позволит правильно оценить эпизоотическую ситуацию по бруцеллезу сельскохозяйственных животных.

Целью исследований является изучение морфологических свойств выделенных изолятов электронно-микроскопическим методом.

Материалы и методы

В опытах использовали 13 проббиоматериала, содержащего бактерии рода *Brucella*, полученного от крупного рогатого скота в ходе экспедиции по Южно-Казахстанской области.

В процессе бактериологических исследований использовали агар для бруцелл (*Brucella Agar Base M074*), 4-шаговый набор для окраски по Граму (*BD Gram Stain Kit*), нейтральный акрифлавин фирмы *Sigma* (*Sigma A-8126*), пипетки *Difco BD* с реактивом каталазы производства *BD 261203*, пипетки *Difco BD* с реактивом оксидазы производства *BD 261181*, сероводородные полоски (*Leadacetate test paper*), тионин, фуксин (*Basis Fuchsin special flagella*), моноспецифические сыворотки *antiabortus*, *antimelitensis*). В качестве контролей использовали коллекционные эталонные штаммы бруцелл.

Идентификацию и дифференциацию видов и биотипов бруцелл проводили по методике и схеме ФАО/ВОЗ, утвержденной подкомитетом по таксономии бруцелл Международного комитета экспертов [9].

Препараты для электронной микроскопии готовили методом ультратонких срезов и негативного контрастирования проб. Варианты бруцелл выделяли из среды культивирования с помощью низкоскоростного центрифугирования при 2000 об/мин. в течение 10 мин. и последующего центрифуги-

рования надосадочной жидкости при 15000 об/мин. в течение 20 мин.

Для негативного контрастирования бактерии адсорбировали на сетки с форм варовой подложкой, напыленный углем в электростатическом поле тефлоновой пластины. Время адсорбции составляло 10 мин. После адсорбции пробы контрастировали в течение 5 мин. 2%-ным водным раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты с pH 6,8-7,0.

Для приготовления тонких срезов осадок бактерий фиксировали 2%-ным раствором глутаральдегида на 0,2 М какодилатном буфере в течение 2 ч, с последующей фиксацией 2%-ным осмиевым фиксатором Шестранда. Фиксированные пробы обезвоживали в этиловом спирте возрастающей концентрации от 60% до абсолютного. 70%-ный спирт содержал 2%-ным уранилацетата. Обезвоженные образцы заливали в смесь эпоксисмолЭпон812-аралдит М (1:1). После полимеризации блоки с материалом использовали для ультратомии. Срезы готовили стеклянными ножами на ультратоме LKB 8800 (Швеция). Среды монтировали на сетки с подложкой и контрастировали 2%-ным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца по Рейнольдсу.

Готовые препараты исследовали в электронном микроскопе JEM 100 CX II фирмы JEOL (Япония) при ускоряющем напряжении 80 кV и увеличении 5-20 тыс. Измерения параметров бактериальных частиц проводили на фотонегативе измерительной лупой. Для обсчета использовали не менее 100 частиц каждого варианта.

Морфометрический анализ размеров бактерий проводили на полученных негативных фотопластинах с помощью увеличительной лупы со шкалой деления 0,1 мм. Для анализа использовали замеры не менее 100 бактерий.

Результаты исследований

При индикации золятов на первом этапе исследований провели по изучению культурально-морфологических свойств бактерий и постановку ориентировочной реакции агглютинации на стекле со специфической бруцеллезной сывороткой.

При просмотре пробирки с культурой отмечали, что изучаемые культуры микроорганизмов вегетировали в виде бледных полупрозрачных круглых колоний цвета меда с ровными краями, на пластинке скошенного агара они также представляли собой бесцветные колонии в виде холмиков (рис. 1).

Как видно на рисунке 1, рост культуры сухой, колонии круглые, плотные, гладкие, менее выпуклые с металлическим оттен-

ком. В проходящем свете янтарные, бактериальная масса с трудом снимается бактериологической петлей.

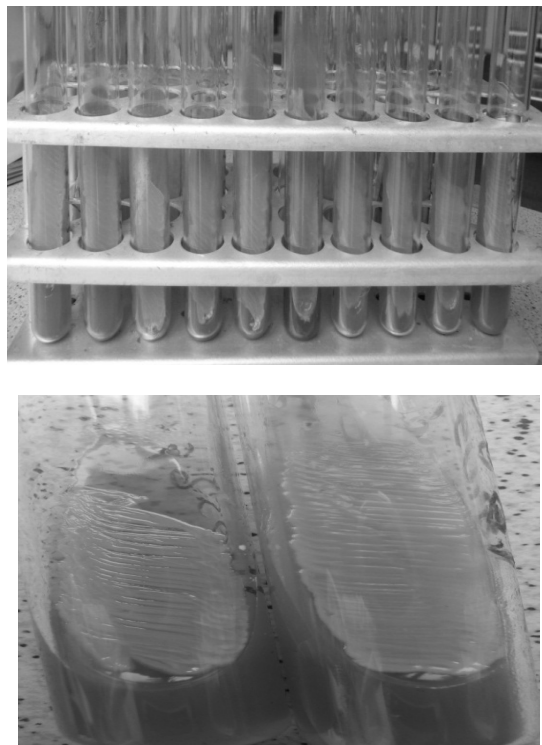


Рис. 1. Рост культуры

При микроскопии изучаемой культуры было установлено, что тестируемые микроорганизмы являются грамотрицательными коккобациллами, окрашиваются в розовый цвет.

С целью установления рода изучаемых культур, провели постановку ориентировочной реакции агглютинации на предметном стекле со специфической бруцеллезной сывороткой. В капле специфической бруцеллезной сыворотки отчетливо видна агглютинация частиц тестируемой культуры микроорганизма, выраженные хлопья образовались сразу на первой минуте проведения данного теста.

Редуцирующая активность тестируемой культуры бруцелл в отношении красок – основного фуксина и тионина в разведении 1:50000, 1:100000. При этом наблюдали сплошной рост изолята.

Наблюдали интенсивный рост изучаемой культуры на среде с содержанием 100 ЕД пенициллина.

Результаты изучения культуральных свойств изолированных микроорганизмов (особенностей вегетации на питательных средах), их морфологии (микроскопия мазков), а также РА на стекле дали нам основание утверждать, что изучаемые изоляты микроорганизмов являются бруцеллами.

Выделенные изоляты показали по чувствительности каталазы и оксидазы положительными.

Выявление наличия признаков диссоциации в культурах бруцелл проводили с помощью пробы с акрифлавином.

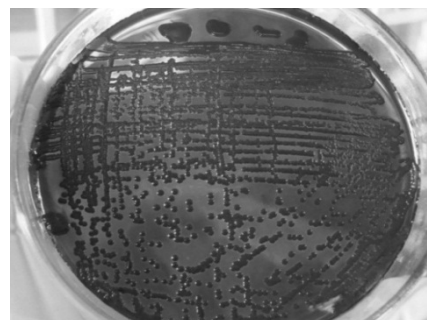
Результаты типирования культур бруцелл с помощью фагов

Результаты определения чувствительности к фагу штамма бруцелл, выделенного от крупного рогатого скота, показал, что на бактериальном газоне этой культуры виден лизис разведенным фагом агаровых культур бруцелл.

Гладкие колонии бруцелл (S-форма) остаются во взвеси, а шероховатые колонии сразу агглютинируют. Этот тест свидетельствует о том, что в культуральном материале присутствуют бруцеллы как в S-форме, так и R-диссоциированные клетки бруцелл. Для этой цели 2-суточные колонии бруцелл в чашках Петри подвергли окраске по методу Уайт-Вилсона. По результатам окрашивания колоний бруцелл кристаллвиолетом для дальнейшей дифференциации изолятов бруцелл нами были отобраны культуры в S-форме. Гладкие колонии выглядят белыми. Они не воспринимают эту краску, т.е. культуры находятся в S-форме. R-диссоциированные колонии окрашены различными оттенками лилового цвета (рис. 2).

При более детальном изучении культурально-морфологических и биологических свойств бактерий из 13 культур были отнесены: 7 культур к *B. abortus* 3 биовара,

3 культуры к *B. abortus* 6 биовара, а три оставшиеся культуры в R-форме – диссоциантам.



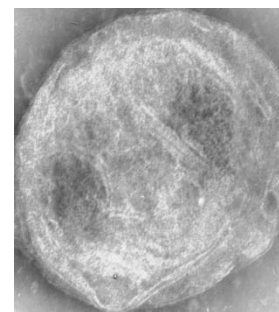
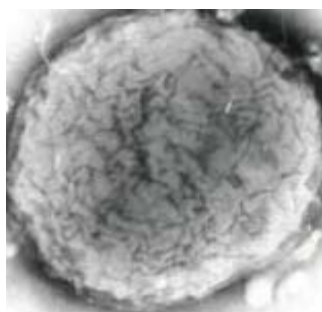
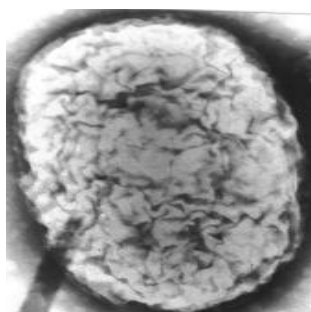
S-формы



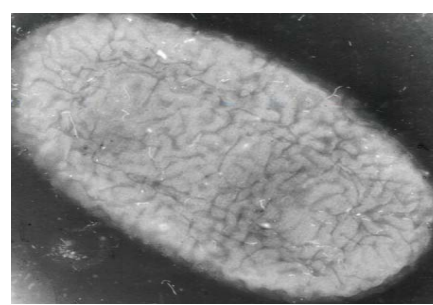
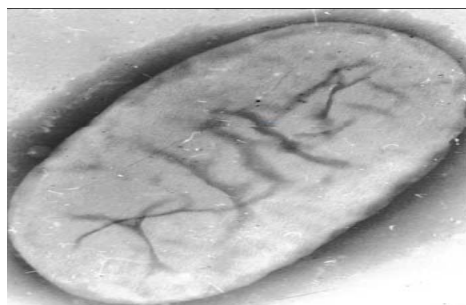
R-формы

Рис. 2. Окрашенные колонии по методу Уайт-Вилсона

Далее было проведено изучение морфологических свойств электронно-микроскопическим методом краевых культур бруцелл, выделенных от крупного рогатого скота из неблагополучных хозяйств Южно-Казахстанской области.



R-формы



S-формы

Рис. 3. Электронная микроскопия препаратов бактерий *Brucella*: негативное контрастирование 2%-ным раствором ФВК (рН 6,8). Ув. x 21000

Из рисунка 3 следует, что морфометрия клеток *Brucella* непосредственно на фотонегативах с помощью лупы с измерительной шкалой выявила существенные колебания размеров поперечника и длины бактерий. Размер поперечника овоидных форм составлял в поперечнике 0,3-0,6 и 0,4-0,7 мкм, длине 3,0-1,5, и 0,3-2,5 мкм соответственно, что присуще бактериям *Brucella abortus*.

В популяциях обоих вариантов преобладают овальные и палочковидные формы диаметром 400-550 нм и длиной 600-950 нм. В препаратах R-формы обнаружены как коккоподобные диаметром 350-400 нм. Наружная мембрана большей части имеет бугристо-складчатый или шероховато-зернистый рельеф. На поверхности клеточной стенки у R-формы присутствуют шипообразные структуры. В популяциях бактерий бруцелл в S-форме были выявлены бактериальные клетки с гладкозернистой структурной поверхностью и палочковидной формы. Во всех случаях представлены три слоя: наружный – клеточная стенка с пептидогликановым слоем, внутренний – цитоплазматическая мембрана и промежуточный – переплазматический слой.

Обсуждение

Некоторые виды бруцелл (*Br.melitensis*, *Br.abortus*, *Br.suis*) изначально находятся в S-форме, но при различных неблагоприятных условиях или при паразитировании в нетипичном хозяине могут легко диссоциировать в R-форму. В соответствующих благоприятных условиях они снова реверсируют в S-форму (переход бруцелл из S-формы в R носит название диссоциации, а из R- в S – реверсии).

Они различаются между собой по строению клеток и характеру метаболизма. Главным же антигенным отличием является отсутствие у R-вариантов полисахаридной цепи S-эндотоксина, где антигенными детерминантами, определяющими бруцеллезную специфичность, являются структуры альфа-2-маннопиранозы.

Внимание на антигенных особенностях возбудителя, связанных с диссоциацией, акцентировано неслучайно. В нашей стране диагностика бруцеллеза проводится только с диагностикомом, выявляющим заражение классическими S-вариантами бруцелл. Практически все R-варианты возбудителя не определяются, следовательно, и болезнь не диагностируется.

При глубокой диссоциации бруцелл происходят существенные изменения в генетическом аппарате бактериальной клетки. Белки и другие составные элементы микробного тела приобретают при этом новую

специфичность. В этом случае прижизненное диагностирование заболевания может быть достигнуто только при использовании соответствующих препаратов, изготовление которых требует установление локализации в бактериальной клетке биологически активных веществ, разработки способов их извлечения и дифференциации.

По данным литературы, строение бруцелл типично для большинства грамотрицательных бактерий. В полной мере это относится и к наиболее активной в иммунологическом отношении клеточной стенке. Стенка микробной клетки состоит из трех основных для этих бактерий слоев: цитоплазматической мембраны клетки, пептидогликанового слоя, создающего жесткий остов, и наружной мембраны.

При проведении электронно-микроскопического анализа данного препарата на электронном микроскопе JEM 100 CX, JEOL была определена морфология и тонкая структура бактерий. Размер бактериальных клеток варьировал в пределах 0,4 до 2,5 мк в длину и от 0,4 до 0,6 мк в ширину, что присуще бактериям вида *Brucella abortus*.

Таким образом, проведенная нами в сравнительном аспекте электронная микроскопия срезов генетически стойких R- и S- форм бруцелл показала, что они имеют одни и те же основные структурные элементы (клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, цитоплазма, нуклеоид). Однако наряду с этим нашими исследованиями обнаружена кокковидность формы диссоциированных R-форм бруцелл и имелись выраженные, чем у S-форм бруцелл, S-образные инвагинаты оболочки, и присутствует выраженный бугристо-складчатый рельеф, а у S-формы были выявлены бактериальные клетки палочковидной формы с гладкозернистой структурной поверхностью.

Библиографический список

1. Первушин Б.П. Вопросы микробиологической и иммунологической диагностики бруцеллеза у человека. – М.: Медгиз, 1962. – 246 с.
2. Косилов И.А. Изменчивость бруцелл и ее значение в проблеме бруцеллеза сельскохозяйственных животных: дис. ... докт. вет. наук. – Омск, 1974. – 382 с.
3. Потапов Н.М. Некоторые особенности бруцеллеза крупного рогатого скота в Приморье в связи с изменчивостью бруцелл: автореф. дис. ... канд. вет. наук. – Троицк, 1974. – 28 с.
4. Власов А.Г., Коновалов А.Н. О вакцинации коров и нетелей против бруцеллеза на благополучных фермах и особенности штаммов бруцелл, выделенных от привитых

животных // Ветеринария. – 1961. – № 11. – С. 49-50.

5. Тычина О.Ф. Изучение свойств культур бруцелл, выделенных в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах различных зон Казахстана: дис. ... канд. вет. наук. – Алма-Ата, 1966. – 191 с.

6. Сафронов Н.В., Студенцов К.П., Белобаб В.И. Изменчивость бруцелл в иммунном организме // Меры борьбы с туберкулезом и бруцеллезом в Казахстане: матер. республ. семинара-совещания вет.

специалистов. – Алма-Ата, 1973. – С. 71-73.

7. Высоцкий В.В. Ультраструктура бруцелл. Процесс диссоциации // ЖМЭИ. – 1968. – № 8. – С. 42-47.

8. Тетерина В.З. Изучение ультраструктуры бруцелл: автореф. дис. ... канд. вет. наук. – Фрунзе, 1971. – 19 с.

9 Techniques for the brucellosis laboratory. institut national de la recherche agronomique 147, rue de l'Universite, 75007, IJRA Paris J. – 1988. – ISB № – 2 – 7380 – 0042-8. – P. 145.



УДК 619:616.98:579

**О.Б. Бадмаева,
Базаррагчаа Баянжаргал,
В.Ц. Цыдыпов**

ЭПИЗОТОЛОГИЯ ЛИСТЕРИОЗА В МОНГОЛИИ

Ключевые слова: Монголия, листериоз, неблагополучный пункт, заболеваемость, летальность, удельный вес, коэффициент очаговости.

Введение

Листериоз регистрируется почти в 60 странах мира. Ареал листериоза значителен, спорадические случаи отмечаются и в нашей стране. Заболевание животных листериозом устанавливается в различных природно-климатических условиях на всех континентах Земного шара [1, 2].

Листериоз наносит большой экономический ущерб животноводству Монголии, складывающийся из потерь при гибели животных, затрат на проведение ветеринарно-санитарных мероприятий. Проявление листериоза имело наибольшую напряженность в 2001 г., характеризовавшееся высоким показателем заболеваемости (0,98) на 10000 поголовья животных [3].

Развитие инфекционного процесса связано с условиями содержания и кормления, во многом зависит от резистентности организма животных и факторов окружающей среды [4]. В связи с этим вопросы борьбы с листериозом, профилактики болезни остаются острой проблемой в животноводстве страны.

Цель работы – определение интенсивности проявления листериоза сельскохозяйственных животных на территории Монголии,

его удельного веса в инфекционной патологии животных.

Материал и методы

Работа выполнялась на кафедре микробиологии, вирусологии и ветсанэкспертизы ФГБОУ ВПО «Бурятская ГСХА им. В.Р. Филиппова», в Центральной ветеринарной лаборатории г. Улан-Батор Монголии. Были проанализированы и подвергнуты статистическим и линейно-графическим исследованиям данные, полученные в результате эпизоотологического мониторинга за течением эпизоотического процесса листериоза животных, данные отчетности Ветеринарного управления Монголии за 2003-2012 гг. Индекс заболеваемости исчисляли на 10000 среднегодового поголовья. Летальность, удельный вес болезни в общей заболеваемости животных определяли по общепринятым методикам [5].

Результаты исследований

В настоящее время темпы развития животноводства в Монголии во многом зависят от возникновения и характера проявления инфекционных болезней. Поголовье основных видов сельскохозяйственных животных в Монголии в 2012 г. составляло 40432,9 тыс. гол., что в 1,6 раза больше, чем в 2003 г. Для частных хозяйств, в которых, по данным 2010 г., находится 98,8% скота страны, заболевание и гибель животных от листериоза представляют одну из наиболее острых проблем (табл.).