

БРАТЦЕВ
Александр Юрьевич

**МЕТОДЫ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ БРУЦЕЛЛ
С УЧЕТОМ ИЗМЕНЧИВОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ**

**16.00.03—ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксинологией и иммунология**

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук**

Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском институте бруцеллеза и туберкулеза животных СО РАСХН

Научный руководитель: кандидат ветеринарных наук,
старший научный сотрудник
Гордиенко Любовь Николаевна

Научный консультант: доктор ветеринарных наук, профессор
Ощепков Владимир Григорьевич

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук
Никифоров Иван Парфирьевич

кандидат ветеринарных наук
Корж Галина Сергеевна

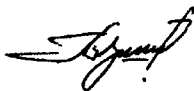
Ведущая организация: Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт, г. Казань

Защита состоится 10 декабря 2003 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 220.002.02 в Институте ветеринарной медицины Алтайского государственного аграрного университета (656922, г. Барнаул, ул. Попова, 276, тел/факс 8 3482 31-34-21).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института ветеринарной медицины АГАУ:

Автореферат разослан «__» _____ 2003 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



П.И. Барышников

2003-А
17930

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Бруцеллез животных до настоящего времени имеет широкое распространение во многих странах мира. Проблема бруцеллезной инфекции, наносящей большой экономический ущерб и имеющей социальное значение, весьма актуальна в связи с напряженной эпизоотической обстановкой в отдельных регионах страны.

При бруцеллезе успех ликвидации болезни и предупреждения распространения инфекции во многом зависит от своевременности и точности поставленного диагноза. Повышенную актуальность этой проблеме придает изменчивость возбудителя. Среди животных довольно часто циркулируют измененные формы возбудителя бруцеллеза.

По данным ВНИИБТЖ и ИЭВСиДВ (И.А. Косилов с соавт., 1976, 1992; В.Г. Ощепков с соавт., 1983, 1990; Л.Н. Гордиенко с соавт., 1989, 2001), за последние десятилетия процентная доля измененных форм выросла с 12,9% до 70-80%, от общего количества бруцелл, выделенных от животных в стадах с естественным течением эпизоотии. У полевых L-вариантов отмечались существенные изменения основных биологических свойств, определяющих характер специфических взаимоотношений макро- и микроорганизмов: трансформация антигенной структуры в сторону S – SR – RS – R – RL – LR – L и значительное понижение вирулентности.

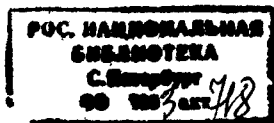
Основываясь на опубликованных данных (П.А. Вершилова, 1972; П.А. Триленко, 1976; И.А. Бакулов, 1980; В.Г. Ощепков, 1983 и др.), можно полагать, что одной из причин длительного сохранения очагов бруцеллеза и возникновения случаев повторных эпизоотических вспышек этой инфекции являются глубоко измененные (L-) формы бруцелл, которые по своим биологическим свойствам существенно отличаются от типичных культур возбудителя и не выявляются имеющимися в настоящее время средствами диагностики.

Сложность диагностирования бруцеллеза вызываемого L-формами бруцелл с помощью традиционных бактериологических и иммунологических методов, в свою очередь, определяет актуальность разработки способов быстрой и четкой идентификации и дифференциации измененных форм бруцелл, доступных как для научно-исследовательских, так и для производственных ветеринарных лабораторий.

Цель и задачи исследования. Целью исследований является разработка нового метода индикации и идентификации L-форм бруцелл, а также изучение условий и закономерностей образования L-вариантов бруцелл 4-го биотипа *B. suis* (*B. rangiferi*) и изучение биологических свойств полученных L-форм.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить *in vitro* L-варианты бруцелл различного происхождения.
2. Выделить L-варианты бруцелл из организма основных хозяев (крупный рогатый скот, северные олени).
3. Изучить условия образования и биологические свойства, полученных L-форм бруцелл видов *B. abortus* и 4 биотип *B. suis* (*B. rangiferi*).



4. Получить стабильную L-форму бруцелл, пригодную для изготовления L-диагностикумов.

5. Разработать эффективный метод индикации и идентификации бруцелл с учетом изменчивости возбудителя.

Научная новизна. Подана заявка на изобретение «Способ получения диагностической L-сыворотки», уведомление о положительном результате формальной экспертизы № 2003121773/13(023123) от 15.07.2003 г.

Получен стабильный L-вариант бруцелл, обладающий строгой специфичностью и широким диапазоном антигенной активности, пригодный для изготовления L-диагностикумов: L-антиген и L-антисыворотка.

Разработан, апробирован и предложен к применению метод «Комплексной идентификации L-форм бруцелл».

Изучены особенности L-трансформации и биологические свойства L-вариантов бруцелл 4-го биотипа *B. suis* (*B. rangiferi*), *in vitro* и выделенных из организма северных оленей.

Практическая значимость. Разработаны методические рекомендации «Методы индикации и идентификации L-форм бруцелл», утверждены методической комиссией ВНИИБТЖ, протокол № 3 от 26.09.2003 г.

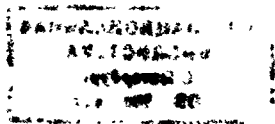
Предложенный метод комплексной идентификации L-форм бруцелл, позволяющий повысить достоверность лабораторной диагностики бруцеллеза, объективно оценивать эпизоотическое состояние по бруцеллезу стад и, следовательно, своевременно и обоснованно проводить противобруцеллезные мероприятия.

Полученные результаты исследований являются новыми научными сведениями, которые необходимо учитывать при работе в научно-исследовательских ветеринарных учреждениях, занимающихся проблемами бруцеллеза животных, а также можно использовать в учебном процессе при подготовке ветеринарных специалистов.

Апробация полученных материалов. Материалы диссертации доложены и обсуждены: на ученых советах ВНИИБТЖ, г. Омск, 1999, 2000, 2001, 2002 гг.; на научных конференциях профессорско-преподавательского состава и аспирантов института ветеринарной медицины ОмГАУ, 2000, 2001 гг.; на конференции молодых ученых, ВНИИБТЖ, г. Омск, 2000 г.; на Всероссийской научной конференции по проблемам хронических инфекций, ВНИИБТЖ, г. Омск, 2001 г.; на научно-практической конференции факультета ветеринарной медицины НГАУ, г. Новосибирск, 2001 г.; на международном конгрессе по проблемам инфекционной патологии, г. Новосибирск, 2002 г.

Публикация материалов исследований. По материалам диссертации опубликовано 7 научных статей.

Внедрение результатов исследований. Результаты научных исследований вошли составной частью в методические рекомендации «Методы индикации и идентификации L-форм бруцелл», утверждены методической комиссией ВНИИБТЖ, протокол № 3 от 26.09.2003 г.



Получено уведомление о положительном результате формальной экспертизы на изобретение « Способ получения диагностической L-сыворотки» (№2003121773/13(023123) от 15.07.2003 г.).

Основные теоретические положения и экспериментальные данные, изложенные в диссертационной работе, используются в научно-исследовательских лабораториях ИЭВСидВ, ЯНИИСХ, НИИВВС, ИркНИВС, ВНИВИ, ВНИИБТЖ; в учебном процессе на кафедрах микробиологии и эпизоотологии ОмГАУ, НГАУ, АГАУ, КГАУ, ДонГАУ и ТСХА.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 156 страницах компьютерного текста и включает: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение полученных результатов, выводы, практические предложения, список литературы, включающий 239 источника, в том числе 70 - иностранных и приложение.

Материалы диссертации иллюстрированы 34 таблицами, 15 рисунками, 2 диаграммами.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Метод комплексной идентификации L-форм бруцелл, его разработка и апробация диагностической эффективности.

2. Получение стабильной L-формы бруцелл, пригодной для изготовления L-диагностикумов.

3. L-трансформация *in vitro* и *in vivo* бруцелл 4-го биотипа *B. suis* (*B. rangiferi*), и биологические свойства полученных L-вариантов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований

Работа выполнена в лаборатории экологии и идентификации L-форм бактерий Всероссийского научно-исследовательского института бруцеллеза и туберкулеза животных (ВНИИБТЖ, г. Омск) СО РАСХН, в опытном хозяйстве ВНИИБТЖ и в хозяйствах Пуровское и Верхне-Пуровское Ямало-Ненецкого автономного округа в период 1999-2002 гг.

Для получения L-форм бруцелл *in vitro* были взяты полевой (4-й биотип *B. suis* – *B. rangiferi* 181), референтный (*B. abortus* 544) и вакцинный (*B. abortus*19) штаммы.

Изучаемые L-варианты также были выделены из лимфатических узлов и внутренних органов коров, экспериментально зараженных вирулентным штаммом *B. abortus* 54 и из пантов, плодов, лимфатических узлов и органов северных оленей, находящихся в стадах с различной эпизоотической обстановкой.

В работе использовали жидкие, полужидкие и плотные питательные среды (МПТБ, МППТГА), МППА с добавлением осмотических стабилизаторов (сахароза, сернокислая магнезия, хлорид натрия) и 20% нормальной лошадиной сыворотки. В качестве индуцирующего фактора применяли натриевую соль бензилпенициллина, дозу и кратность которого устанавливали по методике ИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (Н.Н. Островская с соавт., 1972), по данным В.Г. Ощепкова и

З.С. Калининой (1976, 1977), а также с учетом результатов собственных исследований.

Биологические свойства исходных бактериальных культур, полученных L-форм и культур-ревертангов изучали общепринятыми для бруцелл методами, рекомендованными Объединенным Комитетом экспертов ФАО/ВОЗ по бруцеллезу (6-й доклад, 1986 г.).

Изучение свойств бактериальных культур бруцелл, L-форм бруцелл различной этиологии и культур-ревертангов полученных от них проводили в сравнительном аспекте. Исследования проводили по следующей схеме: изучение морфологии и ультраструктуры, тинкториальных, культуральных, биохимических, агглютинабельных, антигенных и вирулентных свойств.

Морфологические свойства бруцелл изучали на препаратах окрашенных по методам Козловского и Грама. Культуральные свойства определяли по характеру роста микробов на МПБ и МППГА. Электронно-микроскопические исследования проводили методом позитивного сканирования.

При изучении биохимических свойств учитывали способность бруцелл продуцировать сероводород, потребность в углекислом газе, чувствительность к анилиновым красителям, пробу с трипафлавином, реакцию термоагглютинации, каталазную активность.

Агглютинабельные свойства исходных культур, полученных L-вариантов и культур-ревертангов изучали в пластинчатой реакции агглютинации с использованием бруцеллезных сывороток.

В качестве диагностических бруцеллезных S- и R-антисывороток использовали стандартные сыворотки из наборов.

Диагностическая L-бруцеллезная антисыворотка была изготовлена из стабильной L-формы штамма B. abortus 19, полученного *in vitro* под действием пенициллина. L-культура состояла из клеток гигантской эллипсоидной формы длиной 5,0-6,0 мкм и шириной 2,0-3,0 мкм. У полученной L-формы были утеряны S- и отсутствовали R-антигенные детерминанты клеточной стенки, но при этом проявлял активность цитоплазматический L-антигенный комплекс.

L-сыворотку получали путем гипериммунизации кроликов. Для этого из двухсуточной агаровой L-культуры готовили взвесь, которую инактивировали теплом на водяной бане при температуре 85-90°C. Готовую взвесь вводили кроликам внутривенно трехкратно в дозах 60, 90, 120 млрд. м.к. с интервалом 72 часа. Забор крови с целью получения сыворотки производили на 4, 7, 14, 28 и 40 суток.

Специфичность полученных L-сывороток определяли в пластинчатой РА. При постановке реакции использовали корпускулярные антигены приготовленные из культур бруцелл, йерсиний, ешерихий, стафилококков, стрептококков и клебсиелл собственного изготовления. Для определения активности L-сывороток, в пластинчатой РА, в качестве антигенов использовали L-варианты различных гетерологичных штаммов бруцелл.

При изучении вирулентных свойств исходных бактериальных культур бруцелл, полученных L-вариантов и культур-ревертангов морским свинкам вводили испытуемые культуры подкожно в паховую область в дозе 100 м.к. Через

30-35 суток животных подвергали диагностическому убою. При оценке вирулентности исследуемых культур бруцелл учитывали результаты бактериологических (индекс инфицированности) и гистологических (морфометрическая оценка) исследований.

В качестве биоматериала от лабораторных животных для бактериологического исследования использовали лимфатические узлы (паховый, заглоточный, подчелюстной), селезенку, печень; мочу, семенники, костный мозг. Для гистологического исследования от опытных и контрольных животных отбирали регионарные (паховые) лимфатические узлы и паренхиматозные органы (печень, селезенка).

Индекс инфицированности определяли по формуле: $ИИ = A/B \times 100\%$, где А-количество выделенных культур бруцелл, В-количество исследованных объектов.

Индикацию и идентификацию L-форм бруцелл проводили с использованием метода последовательных пересевов на искусственных питательных средах, пассирования через организм лабораторных животных, с использованием L-диагностической сыворотки, а также разработанного нами метода комплексной идентификации L-форм бруцелл.

Многочисленные пересевы L-форм на искусственных питательных средах проводили с целью их реверсии в типичную бактериальную форму. Для этого использовали питательные среды без индуцирующего фактора, богатые белково-содержащими компонентами (20% нормальной лошадиной сыворотки).

Возможность реверсии L-вариантов бруцелл *in vivo* устанавливали путем пассирования L-вариантов через организм морских свинок.

Для идентификации выделенных культур к L-формам бруцелл с использованием L-антисыворотки производили постановку пластинчатой реакции агглютинации.

Комплексную идентификацию L-форм бруцелл проводили с учетом морфологических, культуральных, тинкториальных, биохимических и агглютинабельных свойств изучаемых культур бруцелл. При этом учитывали следующие признаки: форма и размер клеток, их окраска, характер роста на питательных средах, образование сероводорода, редукция тионина и фуксина, проба с трипафлавином, реакция термоагглютинации, агглютинабельность в гомологичных (S-; R-; L-) антисыворотках.

За период проведения работы бактериологическому исследованию было подвергнуто 1090 объектов от 109 морских свинок, 370 объектов от 20 голов крупного рогатого скота, 2725 объектов от 756 северных оленей и соответственно выделено 69, 47 и 237 культур бруцелл.

Всего за рабочий период было изучено 425 субкультур бруцелл, из которых 48 субкультур составляли экспериментально полученные *in vitro* L-варианты и 203 субкультуры L-вариантов бруцелл, выделенных от животных.

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1. Условия и закономерности образования L-форм бруцелл видов *B. abortus* и 4-го биотипа *B. suis* (*B. gangiferi*) *in vitro*

При первичном посеве на чашке Петри адаптированных культур бруцелл, когда концентрация антибиотика в среде составляла 1; 2,5; 5 ЕД/мл, рост у всех трех изучаемых штаммов бруцелл появлялся при концентрации пенициллина 5 ЕД/мл. Отобранные колонии ресуспендировали в физиологическом растворе, доводили концентрацию до 1 млрд. микробных клеток в 1 мл и засеивали по 0,5 мл на чашки Петри со средой с тремя взаимоувеличивающимися дозами антибиотика: 5; 10; 20 ЕД/мл.

Концентрация бензилпенициллина натриевой соли для индукции L-форм бруцелл зависела от индивидуальных особенностей штамма. Так, вакцинный штамм *B. abortus* 19 сравнительно легко и с большим постоянством образовывал L- варианты. Культуры полевого *B. gangiferi* 181 (4-й биотип *B. suis*) и референтного *B. abortus* 544 штаммов проявляли значительную чувствительность к увеличению дозы антибиотика, при этом наблюдали замедление их роста или гибель.

Так, 4-й пассаж изучаемых культур проводили на средах, содержащих 20; 40; 80 ЕД/мл антибиотика. Рост культуры вакцинного штамма *B. abortus* 19 появлялся уже на вторые сутки на питательной среде, содержащей 20 ЕД/мл пенициллина. Полученные культуры на скошенном агаре образовывали выпуклые, округлые, матовые, правильно контурированные формы колоний. Они хорошо эмульгировались в физиологическом растворе, по Граму и Козловскому окрашивались в розово-красный цвет и были представлены клетками овоидно – кокковидной формы размером 0,9 – 1,6 мкм. На питательной среде, содержащей 40 ЕД/мл антибиотика, рост культур проявлялся на 4-5 день. В нативных мазках, наряду с коккоподобными клетками отмечались удлиненные палочки размером до 1,5 – 2,0 мкм, шаровидные клетки с различной плотностью цитоплазмы.

С повышением дозы добавляемого в питательную среду антибиотика (80 ЕД/мл) рост культур становился скудным и появлялся в более поздние сроки культивирования 7-10 суток. Изменялась и форма колоний: они становились уплощенными, округлыми, часто с неровными краями, приобретали слизистую консистенцию, плохо эмульгировались в физиологическом растворе и состояли из полиморфных клеток разной величины и формы. При пересевах такие колонии давали рост только на питательных средах с той же или меньшей концентрацией антибиотика. Культуры референтного *B. abortus* 544 и полевого *B. gangiferi* 181 (4-й биотип *B. suis*) штаммов на средах с концентрацией антибиотика 80 ЕД/мл погибали. Рост их в виде нежных, мелких, прозрачно-маслянистых колоний на 5-7 сутки появлялся на питательных средах, содержащих 40 ЕД/мл пенициллина.

На 4-5 пассаже, когда доза антибиотика составляла 40; 80; 160 ЕД/мл, гетероморфизм изучаемых культур становился более выраженным. В мазках препаратов преобладали шаровидные клетки размером 0,9-1,5 мкм различной оптической плотности, удлиненные палочки размером 1,5-2,0 мкм с четкими или расплывчатыми контурами и гранулярными включениями.

При пересевах L-культур иногда вырастали два типа колоний: крупные – 0,5-1,0 мм (тип В) и более мелкие – менее 0,5 мм (тип А). при микроскопическом исследовании оба типа колоний имели идентичную морфологию структурных элементов, однако колонии типа В оказались более жизнеспособными, а колонии типа А росли только группами, а одиночные колонии при пересевах погибали.

С целью получения наиболее стабилизированных L-культур нами проводилась селекционная работа по отбору различного типа колонии. При проведении данной работы предпочтение отдавали отбору и последующему культивированию колоний типа В, а также единичных L-колоний, выросших на средах с максимальной для изучаемой культуры и данного пассажа бактериостатической дозой антибиотика.

В результате, нам удалось получить стабильную L-форму вакцинного штамма В. abortus 19, полученную после 18-20 пассажей, на питательной среде с концентрацией антибиотика 15-20 тыс. ЕД/мл. Полученная L-форма представлена гигантскими вакуолизированными или с мелкой зернистостью клетками. Она успешно закрепила свои свойства, полученные в процессе L-трансформации и при длительном культивировании на питательных средах без индуцирующего фактора сохраняла хорошую энергию роста и не реверсировала в бактериальную форму.

В заключении, анализируя все выше перечисленное, можно утверждать, что процесс трансформации бруцелл происходит однотипно не зависимо от видовой принадлежности.

2.2.2. L-трансформация бруцелл видов *B. abortus* и 4-го биотипа *B. suis* (*B. rangiferi*) in vivo

2.2.2.1. Образование L-форм *B. abortus*

L-трансформация *B. abortus* была прослежена в опыте на крупном рогатом скоте. Из опытных животных были сформированы по принципу аналогов четыре группы по пять голов в каждой.

Животных первой группы в 6-ти месячном возрасте вакцинировали живой вакциной из штамма В. abortus 82 с последующей ревакцинацией через год. Через 12 месяцев животных этой группы вакцинировали химической вакциной НАК-1. Животных второй группы не вакцинировали, они служили контролем (интактные). Животных третьей группы вакцинировали, трехкратно начиная с 6-ти месячного возраста с интервалом 12 месяцев живой вакциной из штамма В. abortus 82. Животных четвертой группы вакцинировали трижды в том же возрасте химической вакциной НАК-1.

Живую вакцину из штамма В. abortus 82 вводили подкожно в дозе 100 млрд. м.к. Химическую вакцину НАК-1 вводили подкожно в дозе 5 мл. По истечении 10-ти месяцев после вакцинации всем коровам конъюнктивально вводили взвесь клеток культуры вирулентного штамма В. abortus 54. Животных заражали в дозе 200 млн. м.к. По истечении срока наблюдения (35 суток) опытных животных подвергали контрольному убою с последующим бактериологическим

исследованием общепринятыми методами и индикацией изолированных культур с учетом измененных форм бруцелл.

В результате бактериологического исследования лимфатических узлов и внутренних органов опытных коров, у 55% из них были выделены культуры с признаками, характерными для типичных бруцелл и дополнительно у 25% коров было установлено бруцеллоносительство с персистенцией глубоко измененных форм бруцелл. Следует также отметить, что у 15% исследованных животных наблюдали персистенцию одновременно типичных и измененных форм бруцелл (диагр. 1).

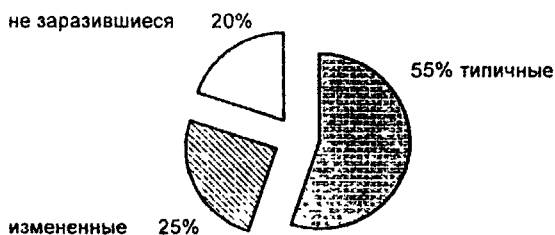


Диаграмма 1.

Выявление животных-бруцеллоносителей
с персистенцией типичных и измененных форм бруцелл

При индикации 138 культур, изолированных от опытных коров, бруцеллы составили 34% (47 культур). При этом из 47 выделенных культур бруцелл 37 имели признаки типичных бруцелл и 10 измененных форм бруцелл.

Морфологически выделенные L-культуры были представлены преимущественно клетками сферопластного типа размером от 0,8 до 1,2 мкм. Две культуры были представлены крупными палочками 0,4-0,6 x 1,5-4,0 мкм. При окраске по Граму только одна, а по Козловскому три культуры имели окраску, характерную для типичных бруцелл (розово-красную), в то время как клетки остальных культур воспринимали окраску, окрашиваясь в сиреневый и фиолетовый цвет по Граму, а по Козловскому в серый, коричневый и бордовый.

Таким образом, в иммунном организме крепкого рогатого скота бруцеллы способны трансформироваться и в измененном состоянии персистировать в органах и тканях, не выявляясь стандартными методами диагностики.

Использование методов индикации и идентификации L-форм бруцелл, позволило дополнительно выявить 25% животных-бруцеллоносителей и 21% культур бруцелл, находящихся в измененном состоянии.

2.2.2.2. Образование L-форм 4 биотипа *B. suis* – *B. rangiferi*

В результате бактериологических исследований биоматериала от северных оленей на бруцеллез из 756 голов 199 были бруцеллоносителями, что составляет

27%. От 199 оленей бруцеллоносителей было выделено 237 культур бруцелл, что составляет 21% от числа исследованных проб (табл. 1).

Изолированные культуры бруцелл характеризовались широкой вариабельностью морфологических, агглютинабельных и тинкториальных свойств. По морфологии культуры бруцелл в большинстве своем (из 237) были представлены клетками сферического типа (116) и овоидной формы (45), превышающие размеры типичных бруцелл в 3-5 и более раз. Из 237 выделенных культур бруцелл 110 проявляли L-антигенную активность в различном сочетании. Лишь половина культур бруцелл сохраняли способность окрашиваться в розово-красный цвет по Граму и Козловскому, в то время как остальные культуры воспринимали окраску не характерную для типичных бруцелл, окрашиваясь в сиреневый, бордовый и фиолетовый цвета по Граму и в серый, коричневый и зеленый – по Козловскому.

Таблица 1

Результаты бактериологических исследований биоматериала
от северных оленей на бруцеллез

Дата иссле- дова- ния	Выделено культур бруцелл ВСЕГО	Агглютинабельность							Морфология				Специфич- ность окраски	
		S	SR	R	SL	RL	SRL	L	тип	Гм	Сп	Го		
1998	34	15	2	3	0	2	3	9	4	0	28	2	6	9
1999	47	5	9	6	1	6	16	4	8	0	30	9	18	21
2000	57	0	0	1	0	4	1	51	0	0	25	32	5	7
2001	99	34	25	28	1	4	4	3	23	41	33	2	93	63
итого	237	54	36	38	2	16	24	67	35	41	116	45	122	100

В результате из всех выделенных культур бруцелл бруцеллы с признаками L-трансформации в среднем составили 86%.

Анализируя результаты экспериментов по изучению L-трансформации бруцелл *in vivo*, а также по исследованию культур, выделенных в производственных условиях, мы пришли к убеждению, что это очень широко распространенное закономерное явление. И происходит оно во всех без исключения популяциях бруцелл (*B. abortus*, 4-й биотип *B. suis* – *B. rangiferi*).

2.2.3. Морфологические, культуральные, тинкториальные, биохимические, агглютинабельные и вирулентные свойства L-фенотипов бруцелл, полученных *in vitro*

В результате воздействия различных концентраций пенициллина получены L-варианты из трех штаммов (*B. abortus* 19 и 544; *B. rangiferi* 181), первоначально состоящих из S-форм бруцелл.

Полученные L-варианты заметно отличались от исходных культур по культуральным свойствам. L-варианты референтного (*B. abortus* 544) и полевого (*B. rangiferi* 181) штаммов отличались слабым ростом. Лишь на 14-е сутки отмечался их слабый рост. Колонии становились плоскими, мелкими (размером менее 1,0 мм), со значительным матовым оттенком.

Относительно энергии и характера роста исключение составлял L-вариант, полученный из вакцинного штамма *B. abortus* 19. Он проявлял хорошие ростовые свойства уже на 2-4 сутки. Колонии его были крупными (3,0-4,0), уплотненными, бело-матового цвета.

Все полученные L-варианты, культивируемые на мясо-пептонном бульоне, также не образовывали характерного для типичных бруцелл пристеночного кольца, образуя рыхлый осадок на дне пробирки матового и матово-белого цвета, при этом просветление среды происходило не всегда.

Представленные L-варианты по морфологии значительно отличались от исходных штаммов бруцелл. В их культурах преобладали шаровидные клетки диаметром 1,0-1,5 мкм и более. Крупные сферопласты (2,0-4,0 мкм) и гигантские эллипсоидные клетки (3,0 x 6,0 мкм) неравномерно окрашивались. Почти треть популяции L-варианта, полевого штамма *B. rangiferi* 181, представляла собой округлившиеся клетки диаметром 0,7-0,8 мкм близкие по размерам с типичными бруцеллами.

Так при окраске по Граму и Козловскому сохраняли характерный для типичных бруцелл розово-красный цвет лишь мелкие сферопласты размером 0,7-1,2 мкм. Более крупные клетки, такие как сферопласты 1,5-4,0 мкм и гигантские овоиды 3,0 x 6,0 мкм при окраске по Граму приобретали соответственно сиреневый и фиолетовый цвета, а при окраске по Козловскому серый, коричневый и зеленый.

У L-варианта референтного штамма *B. abortus* 544 значительно уменьшилась способность образования сероводорода, а у вакцинного штамма *B. abortus* 19 вообще исчезла. Все полученные *in vitro* L-фенотипы бруцелл стали менее восприимчивы к действию анилиновых красителей при посевах на среды с их содержанием. О глубоких изменениях в клетках L-вариантов, произошедших в процессе L-трансформации, свидетельствуют и положительные результаты реакции термоагглютинации и пробы с трипафлавином.

L-варианты штаммов *B. abortus* 544 и *B. rangiferi* 181 в значительной степени сохраняли исходные антигенные структуры. Вместе с этим было отмечено, что L-варианты проявляли L-антигенную активность. У всех L-вариантов не отмечалось антигенного родства с R-антисывороткой, как и у исходных штаммов. Отдельно стоит подчеркнуть агглютинабельные свойства L-варианта вакцинного штамма *B. abortus* 19. Полученный L-вариант полностью утратил S-детерминанты исходного штамма, давал отрицательные результаты с R-антисывороткой и при этом проявлял достаточно высокую активность с L-антисывороткой (диагностический титр 1:320).

Результаты серологических исследований показали, что данный L-вариант вызывал образование только гомологичных (L-) антител, которые в пластинчатой реакции агглютинации можно было выявить в диагностических титрах уже на 10-е сутки.

Экспериментально полученный L-вариант имел несколько меньшую степень патогенности, чем исходный S-штамм. Об этом свидетельствуют данные индекса инфицированности. Так, в группе морских свинок зараженных исходным штаммом *B. abortus* 19 индекс инфицированности составил 10%, а в группе

опытных животных зараженных его L-формой 8%. Вместе с тем, полученная L-форма обладала довольно высокой заразительностью, она способна была длительное время персистировать у 80% морских свинок и при этом у 56% заразившихся животных вызывать генерализованную форму инфекции. При этом исходный S-штамм вызывал заражение у 85% морских свинок и менее чем у половины генерализованную форму инфекции.

Таким образом, результаты изучения биологических свойств L-вариантов, полученных *in vitro* из бруцелл видов *B. abortus* и *B. rangiferi* (4-й биотип *B. suis*), показали, что L-формы обладают в значительной степени отличительными свойствами относительно типичных бруцелл. Однако, относительно друг друга L-фенотипы *B. abortus* и 4-го биотипа *B. suis* (*B. rangiferi*) принципиальных различий не имеют. Они сходны по культурально-морфологическим и биологическим свойствам.

L-формы бруцелл способны приживаться и длительное время персистировать в организме лабораторных животных, вызывая синтез гомологичных L-антител, улавливаемых в диагностических титрах серологическими реакциями.

2.2.4. Морфологические, культуральные, тинкториальные, биохимические, агглютинабельные и вирулентные свойства L-фенотипов бруцелл, выделенных от животных

Для изучения фенотипических и биологических свойств L-форм бруцелл видов *B. abortus* и *B. rangiferi*, изолированных от животных, были отобраны несколько культур. При выборе L-культур предпочтение отдавали относительно стабильным L-формам бруцелл. С этой целью были выбраны пять субкультур.

L-вариант *B. abortus* 54 (1313), изолированный из селезенки опытной ковы был представлен мелкими колониями (1,0-1,5 мм) матового цвета, округлой формы, с уплощенной поверхностью и ровными краями. При посеве на бульон давал рост с образованием рыхлого осадка матового цвета с одновременным просветлением среды. Изолированные от северных оленей субкультуры L-вариантов № 834 и 853 на агаре росли в виде крупных (3,0-4,0 мм) колоний беломатового цвета, округлой уплощенной формы с ровными краями. На бульоне эти L-варианты образовывали обильный рыхлый осадок белого цвета. L-варианты № 1715 и 1726, также выделенные от оленей образовывали на агаре колонии серовато-белого цвета со слизистым налетом по периферии, неправильно контурированные, размером 2,0-3,0 мм. На бульоне они росли с образованием серо-белого осадка.

Морфологически изучаемые L-варианты бруцелл были представлены коккоподобными клетками, клетками сферопластного типа и гигантскими эллипсоидными клетками, рамеры которых варьировали от 1,0 до 4,0 мкм.

Относительно тинкториальных свойств изучаемые L-варианты бруцелл окрашивались в цвета не характерные для типичных форм бруцелл. Так по Граму они окрашивались в сиреневый и фиолетовый цвет, а по Козловскому в коричневый и зеленый.

При изучении биохимических свойств выделенных L-вариантов было установлено, что они хорошо растут на средах с анилиновыми красками, не продуцируют сероводород, менее чувствительны к действию антибиотиков. Также получены положительные результаты в пробе с триафлавином и в реакции термоагглютинации.

В результаты серологических исследований проб сывороток крови, полученных от морских свинок, зараженных изучаемыми L-вариантами бруцелл, установлено, что изучаемые L-варианты вызывали образование гомологичных иммуноглобулинов, которые улавливались в реакции агглютинации и реакции связывания комплемента

Индекс инфицированности в группе морских свинок зараженных L-вариантом № 1313, референтного штамма *B. abortus* 54 составил 17%. В группах морских свинок зараженных L-формами, выделенными от северных оленей индекс инфицированности был значительно ниже, варьировал от 4% до 10% и в среднем составил 7%. L-варианты бруцелл способны длительное время персистировать в органах и тканях лабораторных животных и в большинстве случаев (75%) вызывать генерализованную форму инфекции.

Таким образом, при сравнительном изучении биологических свойств L-вариантов бруцелл видов *B. abortus* и *B. gangiferi* (4-й биотип *B. suis*), выделенных от основных хозяев, существенных их отличий не отмечалось. Вместе с тем выделенные L-варианты принципиально отличались от типичных бактериальных форм бруцелл по комплексу основных признаков.

В заключении следует отметить, что при взаимодействии бруцелл с факторами иммунного организма основного хозяина происходила регуляция паразитохозяинных отношений.

Полые L-варианты бруцелл проявляли относительно стабильные свойства и были способны в измененном состоянии персистировать в иммунном организме животного в течение длительного времени.

L-варианты бруцелл, выделенные от животных, проявляли способность адаптироваться к условиям искусственных питательных сред и при многократных перeseвах сохранять основные признаки.

2.2.5. Электронно-микроскопическое исследование L-вариантов бруцелл

Для изучения были отобраны два L-варианта бруцелл: L-вариант, полученный *in vitro* под действием антибиотиков из вакцинного штамма *B. abortus* 19 и L-вариант, выделенный из селезенки коровы, экспериментально зараженной вирулентным штаммом *B. abortus* 54.

При электронно-микроскопическом исследовании L-варианта штамма *B. abortus* 54 был представлен шаровидными клетками, рисунок цитоплазмы которых на ультратонких срезах был несколько сглажен. Клетки этого L-варианта имели растянутую клеточную стенку. Цитоплазматическая мембрана по сравнению с таковой у бактериальных форм бруцелл была истончена. У L-варианта *B. abortus* 54 отмечали также интенсивный рост клеток. Так нередко можно было наблюдать их бинарное равновеликое и неравновеликое деление или

почкование. На более крупных шаровидных клетках можно было увидеть впадины-лунки. У более мелких элементов отмечалось слипание в конгломераты.

L-вариант вакцинного штамма *B. abortus* 19 под электронным микроскопом просматривался в виде гигантских клеток шаровидной и неправильной формы. Гигантские клетки имели различную оптическую плотность, часто содержали гранулы и вакуоли. Гигантские клетки неправильной формы в большинстве случаев на поверхности имели глубокие разрывы. В таких разрывах иногда были видны мелкие шаровидные элементы. Последние могли также возникать на поверхности клеток путем почкования. Мелкие шаровидные клетки, возникшие внутри гигантских клеток или на их поверхности, соответствовали так называемым элементарным телам, то есть минимальным репродуктивным элементам L-форм.

На ультратонких срезах клеточная стенка исходного штамма была представлена трехслойной мембраной и пептидогликаном, которые обеспечивают ригидную форму бактериальной клетки. Цитоплазма бактериальной клетки содержит включения.

Таким образом, ультраструктура клеток изучаемых L-вариантов и исходных бактериальных штаммов бруцелл отличаются тем, что у L-вариантов отсутствует ригидный слой клеточной стенки, имеется более развитая система внутрицитоплазматических мембран и имеются более разнообразные способы репродукции. L-вариант *B. abortus* 54 имеет изменения, характерные для среднего этапа L-трансформации, а L-вариант *B. abortus* 19 – для позднего этапа L-трансформации.

L-вариант *B. abortus* 54 (№ 1313) имеющий цельную клеточную стенку сохранял в своем составе поверхностный S-антиген, а также в результате ее растяжения и истончения проявлял L-антигенную активность. L-вариант *B. abortus* 19 (19L₁-58) лишенный в значительной степени клеточной стенки утерял S-антигенные детерминанты и проявлял лишь L-антигенную активность.

В заключении, следует отметить, что на различных этапах L-трансформации культуры бруцелл характеризовались высокой репродуктивной способностью, о чем свидетельствовали бинарное деление, образование элементарных тел внутри и на поверхности L-клеток путем почкования.

Разнообразие способов размножения может служить объяснением способности L-форм бруцелл к длительному персистированию в организме восприимчивых животных.

2.2.6. Морфометрический метод оценки патогенности L-вариантов бруцелл различного происхождения и культур-ревертантов, полученных от них

В результате гистологического исследования проб селезенки установлено, что у опытных животных, зараженных минимальной дозой (100 м.к.) L-формами бруцелл и S-ревертантами, полученными от них, патологических макро- и микроскопических изменений не было выявлено.

Результаты количественной оценки строма-паренхимального отношения (СПО) и линейных размеров фолликулов в селезенке показали, что введение в

организм морских свинок минимальной дозы (100 м.к.) L-форм бруцелл различной этиологии, а также S-ревертантов, полученных от них вызывало различную реакцию морфологических структур. Отмечалось увеличение размеров лимфатических фолликулов селезенки и их светлых центров, а также изменение строено-паренхимального отношения за счет увеличения паренхимы селезенки.

В результате гистологического исследования проб печени опытных животных было отмечено, что реакция со стороны печени проявлялась в виде скопления микро- и макрофагальных клеток вокруг центральных вен и сосудистых триад. У контрольных животных каких-либо скоплений клеток отмечено не было.

При гистологическом исследовании лимфатических узлов морских свинок, зараженных L-формами бруцелл, установлено, что они характеризовались умеренным раздражением отдельных фолликулов вследствие их гиперплазии. Также отмечалась гиперемия капилляров в корковом слое и переполнение лимфатических сосудов в капсуле.

В результате гистологического исследования лимфатических узлов морских свинок, зараженных полевым S-ревертантом, установлено, что они находились в состоянии сильного раздражения, либо в пост реактивном состоянии. Сильное раздражение просматривалось в отсутствии выраженных лимфатических фолликулов. Коровый и мозговой слои были едва различимы, т.к. почти по всему периметру плотность расположения и окраска лимфоцитов коркового и мозгового слоев были не различимы. Пост реактивное состояние характеризовалось отсутствием выраженных мягкотных тяжей в мозговом слое лимфатического узла и резким выделением фолликулов на фоне лимфатической ткани. Внутри фолликулы имели большое количество хорошо выраженных синусов. Также отмечалась индукция лимфатического узла. Разрастанию соединительной ткани способствовала длительная гиперемия.

При морфометрическом исследовании лимфатических узлов установлено, что наиболее ярко выраженную реакцию отмечали в регионарных лимфатических узлах, которая выражалась в увеличении светлых центров и размеров фолликулов.

Степень увеличения размеров фолликулов и их светлых центров зависела от изучаемой культуры. Так при морфометрическом исследовании лимфатических узлов морских свинок, зараженных L-формой вакцинного штамма В. abortus 19 в минимальной дозе (100 м.к.), средний размер фолликула составлял 96 мкм с размером его светлого центра 72 мкм. При заражении опытных животных полевой L-формой бруцелл (853L), выделенной от северного оленя, размер лимфатических фолликулов составил 106 мкм с размером светлого центра 79 мкм.

Размер лимфатических фолликулов и светлых центров лимфатических узлов морских свинок, зараженных S-ревертантом вакцинного штамма В. abortus 19L, соответственно составили 105 и 79 мкм. Размеры же фолликулов и светлых центров регионарных лимфатических узлов морских свинок, зараженных S-ревертантом полевого L-варианта 853L, соответственно составляли 134 и 104 мкм.

Достоверность морфометрического метода оценки патогенности бруцелл различной этиологии и форм существования, подтверждается его сравнительной

оценкой с общепринятыми методами (индекс инфицированности), результаты которой представлены в таблице 2.

Таблица 2

Соотношение показателей индекса инфицированности и линейных размеров фолликулов регионарных лимфатических узлов морских свинок, зараженных L-вариантами бруцелл различного происхождения и S-ревертантами, полученными от них в дозе 100 м.к.

№ п/п	Наименование штамма	Индекс инфицированности	Размер фолликулов (мкм)
1	B. abortus 19	10	108
2	B. abortus 19L	7	96
3	B. abortus 19 S-ревертант	10	105
4	853L	10	106
5	853 S-ревертант	17	134

Таким образом, с помощью морфометрического метода оценки патогенности установлено, что эпизоотические L-формы бруцелл характеризующиеся слабой степенью патогенности, вызвали умеренное раздражение отдельных лимфатических фолликулов, в результате реверсии восстанавливали свойства бактериальных форм и способны были вызывать сильное раздражение фолликулов лимфатических узлов, что свидетельствовало об их патогенности.

2.2.7. Сравнительная оценка методов индикации и идентификации бруцелл с учетом изменчивости возбудителя

2.2.7.1. Последовательные пересевы на искусственных питательных средах

При последовательных перeseвах на искусственных питательных средах изучаемые L-варианты бруцелл реверсировали в типичную бактериальную форму неодинаково.

У большинства L-культур (пять из восьми) реверсия происходила в результате 5-20 пересевов с полным восстановлением фенотипических и биологических свойств. Клетки ревертанты приобретали кокковидную форму, их размеры составляли 0,3 – 0,5 мкм, грамнегативность и характерную (красную) окраску по Козловскому, а также S-агглютинабельность. Однако у остальных трех L-культур отмечали частичную реверсию с незначительным изменением исходных свойств. Их клетки сохраняли сферическую и эллипсоидную форму, цитоплазматический L-антиген и лишь в некоторых случаях приобретали характерную для типичных бруцелл окраску по Козловскому.

В процессе изучения реверсильных свойств L-вариантов установлено, что в условиях искусственной питательной среды при многократных перeseвах в течение длительного времени (около 1-2 лет) полное восстановление всех признаков, характерных для типичных (S-) форм бруцелл, наблюдали у 63% изучаемых культур.

В заключении можно сделать вывод, что идентификацию с использованием метода последовательных пересевов на искусственных питательных средах, целесообразно проводить у L-форм бруцелл начального и среднего этапов L-трансформации.

2.2.7.2. Пассирование через организм лабораторных животных

Полное или значительное восстановление у L-вариантов свойств, характерных для типичных бруцелл наступало обычно при одном-трех пассажах.

Так при однократном пассировании через организм лабораторных животных полное восстановление свойств, характерных для типичных бактериальных форм произошло у одной культуры под № 1726L, выделенной от северного оленя.

После двукратного пассирования через организм морских свинок восстановление биологических свойств отмечали у четырех культур под № 834, 853, 1313 и 1715, выделенных от крупного рогатого скота и северного оленя.

От *B. abortus* 19L, полученной *in vitro* под действием антибиотиков, культура ревертант была получена после трехкратного пассирования через организм морских свинок.

В итоге от всех шести изучаемых L-вариантов бруцелл различной этиологии путем пассирования через организм лабораторных животных, были получены культуры ревертанты, имеющие признаки характерные для типичных (S-) форм бруцелл.

Таким образом, при пассировании через организм лабораторных животных, реверсия L-форм бруцелл происходит более интенсивно чем на искусственных питательных средах. При этом удается получить культуры ревертанты от L-форм, находящихся на любой стадии изменчивости. Однако культуры ревертанты плохо адаптировались к условиям искусственных питательных сред и при длительном культивировании нередко погибали. Следует также отметить, что при введении в организм морских свинок, культуры-ревертанты были не стабильными и могли переходить обратно в L-форму, что усложняло их идентификацию.

2.8.3. Индикация L-форм бруцелл с применением L-антисыворотки

В результате проведенных исследований было установлено, что L-антисыворотка, полученная к стабильной L-форме *B. abortus* 19 имеет строгую специфичность, обладает диагностической активностью и в разведениях 1:10 – 1:40 может быть использована в пластинчатой реакции агглютинации с диагностической целью.

При идентификации выделенных от северных оленей 1135 культур, 237 из них (20,8%) агглютинировались набором бруцеллезных диагностических (S-, R-, L-) антисывороток в различных вариациях. Из 237 культур бруцелл с помощью диагностической L-антисыворотки было выделено 110 культур, что составило почти половину (46,4%). Причем 67 (28,3%) культур бруцелл агглютинировались только L-антисывороткой.

Таким образом, использование L-антисыворотки в наборе со стандартными (S- и R-) бруцеллезными сыворотками позволило выделить дополнительно 46,4% культур бруцелл. Применение L-антисыворотки позволило дополнительно выявить 98 животных бруцеллоносителей, что составило 77,2% от общего числа животных бруцеллоносителей и 13% от общего числа исследованных.

2.8.4. Идентификация L-форм бруцелл комплексным методом

При индикации L-форм бруцелл комплексным методом учитывали следующие критерии: характер роста на искусственных питательных средах, условия культивирования, морфологию и размер клеток, окраску анилиновыми красителями, агглютинабельность специфическими S-; R-; L-бруцеллезными антисыворотками.

L-формы бруцелл начального этапа трансформации культивируются на питательных средах, как и типичные формы бруцелл. Относительно стабильные L-формы лучше растут на полужидком (0,3%) или полутвердом (1,5%) печеночном глюкозо-глицериновом агаре с добавлением нормальной сыворотки лошади (20%), сахарозы (15-20%), 10-15% сернокислой магнезии (из 2% раствора) и поваренной соли (1%).

На искусственных питательных средах L-формы бруцелл, в зависимости от стадии изменчивости, дают различный рост. На этапах начальной трансформации они сохраняют свои основные культуральные свойства характерные для типичных бруцелл, но колонии их становятся более мелкими и матовыми. На более поздних стадиях трансформации L-формы приобретают свойства отличные от исходных S- или R-культур. На полужидкой среде растут в форме мелких крупинок и полосчатых образований. На поверхности плотных агаровых сред формируют плоские круглые или с неровными краями пигментированные крупные колонии, чаще белого, сероватого цвета.

Популяции L-форм бруцелл отличаются полиморфизмом. Клетки могут иметь форму шара различной величины и оптической плотности, крупных (гигантских) вакуолизированных эллипсоидов (овоидов), элементарных тел, бесструктурных диффузных масс и т.д. Размеры их варьируют от 0,2 до 5,0-6,0 мкм и более.

Гетероморфные формы бруцелл с цельной клеточной стенкой при окраске анилиновыми красителями сохраняют цвет, характерный для типичных форм бруцелл (красный или розовый). Бруцеллы с частичной или полностью утраченной клеточной стенкой изменяют характер окраски анилиновыми красителями. На ранней стадии трансформации часть L-вариантов (10-25% и более) сохраняют розовый цвет при окраске по Граму и красный — по Козловскому. На более глубоких стадиях изменчивости L-клетки приобретают различную окраску, окрашиваясь при этом по Граму в темно-красный, сиреневый и бурый, а по Козловскому в коричневый, серый и бордовый цвета. С полной утратой клеточной стенки L-формы бруцелл приобретают синий и темно-фиолетовый цвета при окраске по Граму и темно-зеленый — по Козловскому.

Для определения агглютинабельных свойств измененных форм бруцелл использовали пластинчатую реакцию агглютинации изучаемых культур со специфическими (S-; R-; L-) гипериммунными бруцеллезными антисыворотками. L-варианты бруцелл на ранних стадиях трансформации частично сохраняют клеточную стенку и антигенные S- или R-детерминанты, которые выявляются в реакции агглютинации S- и R-гипериммунными сыворотками. Глубокоизмененные L-формы, лишенные в значительной части или полностью

клеточной стенки и специфических S-, R-антигенов, проявляют активность только с L-бруцеллезными сыворотками.

Если исследуемые гетероморфные культуры имеют указанные особенности роста, формы и окраски клеток и хорошо агглютинируются S-; R- или L-антисыворотками, то их относят к L-формам бруцелл.

При бактериологическом исследовании пантов и внутренних органов от 756 северных оленей было выделено 237 культур бруцелл.

Общепринятым методом было идентифицировано 34 культуры (14,3%), а комплексным методом еще дополнительно 203 (85,7%) культуры бруцелл.

Культуры бруцелл, выделенные дополнительно комплексным методом находились в измененной (L-) форме. При этом из этих 203 L-культур бруцелл с использованием только L-бруцеллезной антисыворотки было выделено лишь 110 (табл. 3).

С помощью комплексного метода дополнительно к общепринятому и L-антисыворотке было выявлено 39,3% (93 культуры) культур бруцелл.

Таблица 3

**Диагностическая эффективность комплексного метода
при бактериологическом исследовании на бруцеллез северных оленей**

Год исследования	Исследовано животных (голов)	Исследовано культур	Выделено культур бруцелл					
			Всего	в том числе методами:				
				общепринятым		комплексным		в том числе только L-антисывороткой
				кол-во	%	кол-во	%	
1998	151	284	34	4	11,8	30	88,2	14
1999	161	207	47	7	14,9	40	85,1	27
2000	124	234	57	0	0	57	100	57
2001	320	412	99	23	23,2	76	76,8	12
Итого	756	1135	237	34	14,3	203	85,7	110

Таблица 4

**Выявление бруцеллоносительства у северных оленей с использованием
комплексного метода**

Год исследования	Исследовано животных	Выявлено животных бруцеллоносителей							
		Всего		в том числе методами:					
				общепринятым		комплексным		в том числе только L-антисывороткой	
		голов	%	голов	%	голов	%	голов	%
1998	151	27	17,9	3	11,1	24	88,9	11	40,7
1999	161	40	24,8	5	12,5	35	87,5	18	45,0
2000	124	49	39,5	0	0	49	100	49	100
2001	320	81	25,3	21	26,0	60	74,0	12	14,8
Итого	756	197	26,0	29	14,7	168	85,3	90	45,7

В результате идентификации 237 культур бруцелл бруцеллоносительством было установлено у 197 (26,0%) северных оленей. Из общего числа оленей-бруцеллоносителей общепринятым методом диагноз был установлен у 14,7% (29

голов) животных. Использование L-антисыворотки позволило дополнительно выявить 45,7% (90 голов), а с помощью комплексного метода 85,3% (168 голов) оленей-бруцеллоносителей (табл. 4).

Таким образом, использование комплексного метода позволило дополнительно к общепринятому методу и L-антисыворотке установить бруцеллоносительство у 39,6% (78 голов) северных оленей.

В целом дополнительно к общепринятому методу с помощью комплексного метода удалось выявить 22,2% животных-бруцеллоносителей от числа исследованных животных.

ВЫВОДЫ

1. Установлена возможность L-трансформации бруцелл *in vitro* из штаммов *B. abortus* различного происхождения и получены жизнеспособные штаммы этих видов. Определены условия образования L-форм из штамма *B. suis* – 4 биотип (*B. rangiferi*) *in vitro* под действием антибиотиков.

2. В организме основного хозяина: крупный рогатый скот и северные олени бруцеллы способны трансформироваться в L-формы с полной или частичной утратой клеточной стенки, изменяя фенотипические и дифференциальные признаки, и в таком состоянии длительно персистировать в органах и тканях.

3. L-варианты бруцелл сферопластного типа, видов *B. rangiferi* и *B. abortus*, полученные *in vitro* и выделенные из организма основных хозяев, имели сходные морфологические, культуральные, тинкториальные, антигенные, агглютинабельные и вирулентные свойства.

4. Под действием антибиотиков *in vitro* получена стабильная L-форма штамма *B. abortus* 19, популяция которой состоит из клеток шаровидной и овоидной формы, не агглютинируется S- и R-сыворотками, но имеет в своей структуре активный L-антиген. Полученный штамм пригоден для изготовления L-диагностикумов.

5. Бруцеллы незавершенного L-цикла могут реверсировать в типичную бактериальную форму *in vitro* в результате 5-20 генераций и *in vivo* при 1-2 кратном пассировании через организм лабораторных животных.

6. L-варианты бруцелл, трансформированные *in vitro* и выделенные из организма основного хозяина, в опытах на лабораторных животных проявляли способность заражать 80% морских свинок, но обладали в меньшей степени, чем типичные формы бруцелл вирулентными свойствами с индексом инфицированности 4-17%. При количественной оценке вирулентных свойств установлено, что культуры-ревертаны, в минимальной дозе заражения, в региональных лимфатических узлах морских свинок способны вызывать выраженное раздражение фолликулов (до 134 мкм). L-формы бруцелл, в той же дозе заражения, вызывают умеренные раздражение фолликулов регионарных лимфатических узлов (до 106 мкм).

7. L-антисыворотка, полученная путем гипериммунизации кроликов штаммом *B. abortus* 19L, обладает строгой специфичностью и диагностической активностью (1:320). Ее применение в комплексе с S- и R-сыворотками позволило выявить и

идентифицировать антигенную специфичность у 110 (46,4%) из 237 полевых культур бруцелл, из которых 67 (61%) агглютинировались только L-антисывороткой.

8. Использование метода комплексной идентификации L-форм бруцелл, при бактериологической диагностике бруцеллеза позволило дополнительно выявить 85% культур бруцелл.

9. Комплексный метод позволил дополнительно установить бруцеллоносительство у 22,2% северных оленей в стадах с различной эпизоотической обстановкой по бруцеллезу.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Методические рекомендации «Методы индикации и идентификации L-форм бруцелл». Утверждены методической комиссией ВНИИБТЖ, протокол № 3 от 26.09.2003г.

2. Оформлена заявка на патент «Способ получения диагностической L-антисыворотки» (уведомление о положительном результате формальной экспертизы № 2003121773/13(023123) от 15.07.2003 г.).

3. Бактериологическую диагностику бруцеллеза животных проводить с обязательным учетом измененных бруцелл. С этой целью рекомендовано дополнительно к общепринятым бактериологическим методам использовать «Метод комплексной идентификации L-форм бруцелл», который позволяет идентифицировать бруцеллы на разных стадиях их изменчивости и объективно оценивать процесс изменчивости и стадию трансформации выделенных культур бруцелл.

4. Прижизненную бактериологическую диагностику северных оленей на бруцеллез, проводить путем исследования кусочков пантов, осуществляя их отбор в период промышленной срезки.

СПИСОК

опубликованных работ по теме диссертации

1. Персистенция и трансформация бруцелл в иммунном организме крупного рогатого скота / Соавт.: Л.Н. Гордиенко, В.С. Бронников, Т.Г. Попова // Матер. Всерос. науч. конф. по проблемам хронических инфекций: Сб. науч. тр. ВНИИБТЖ. – Омск, 2001. – С. 51-57.

2. Степень выраженности реакции организма лабораторных животных в зависимости от введенной дозы L-культуры бруцелл / Соавт.: Д.В. Булдыгин, Л.Н. Гордиенко, В.А. Шестаков // Там же. – Омск, 2001. – С. 86-93.

3. Персистенция L-форм бруцелл в организме лабораторных животных / Соавт.: Л.Н. Гордиенко // Там же. – С. 96-98.

4. Морфологическая и антигенная вариабельность культур бруцелл, изолированных из пантов северных оленей / Соавт.: Л.Н. Гордиенко, В.Г. Толстиков // Инфекционная патология животных: Сб. науч. тр. ВНИИБТЖ. – Омск, 2001. – С. 133-137.

5. Характеристика морфологических и тинкториальных признаков культур-ревертантов, изолированных от морских свинок при однократном пассировании штамма *B. abortus* 19L₃ // Там же – С. 154-156.

6. Свойства культур-ревертантов штамма *B. abortus* 19L₃ в опыте на лабораторных животных / Соавт.: Л.Н. Гордиенко // Проблемы и перспективы развития науки в ветеринарной медицины: Сб. науч. тр. ИВМ ОмГАУ. – Омск, 2002. – С. 34-36.

7. Вариабельность культур бруцелл, изолированных от северных оленей в очагах бруцеллезной инфекции / Соавт.: В.Г. Ощепков, Л.Н. Гордиенко // Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера: Матер. 2й науч.-практ. конф. с Международным участием. – г. Новосибирск, 2002. – С. 141.



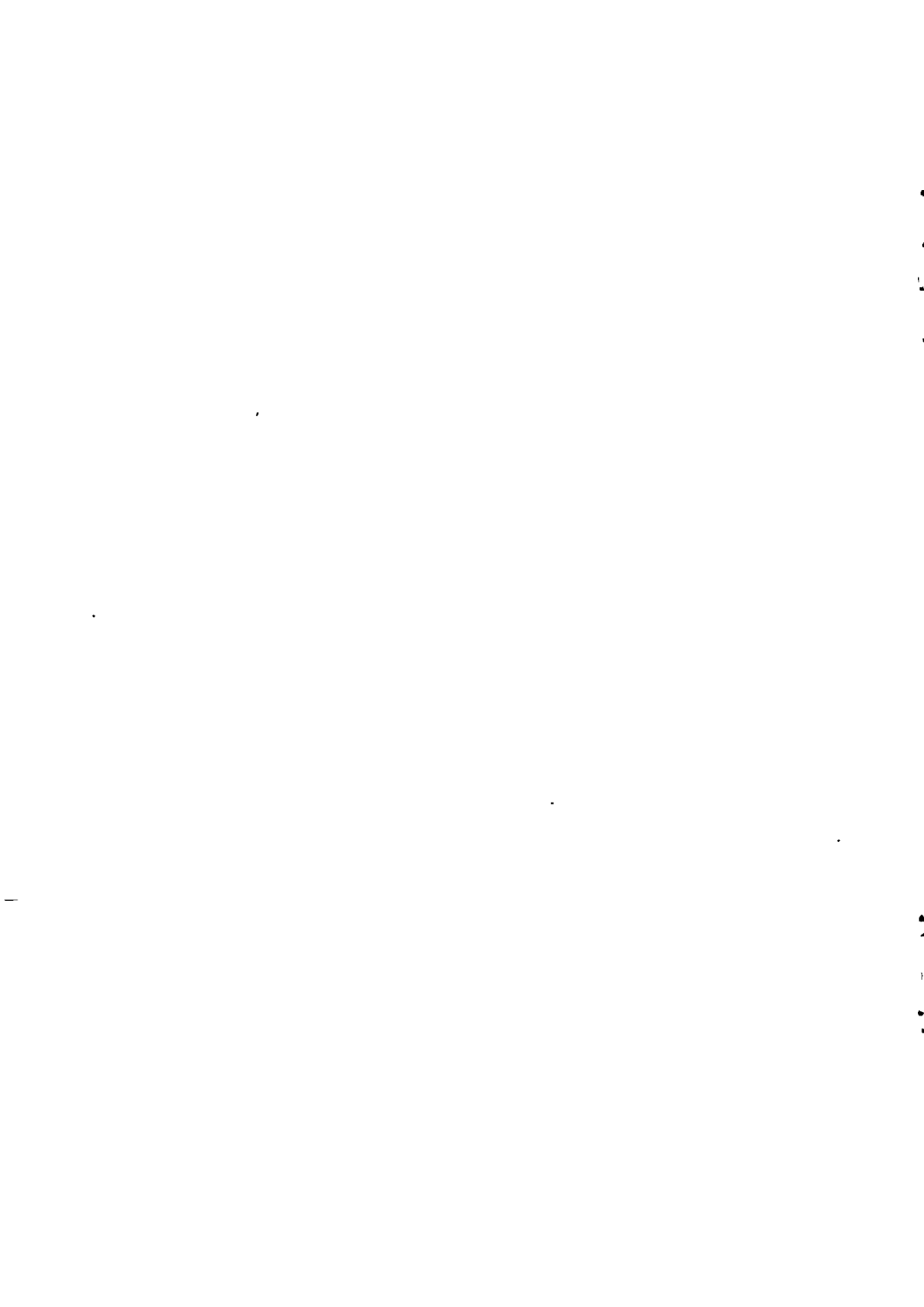
Типография ОмГУПСа.
644046, г. Омск, пр. Маркса, 35.
Тираж 100 экз. Заказ 861.

6
7
8
9
10

11

12
13
14
15
16

17
18
19



2003-A

17930

17930