

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ВЕТЕРИНАРИИ

УДК; 619.576.8.:616.98.42

А.Л. Воробьев

(ДГП «Научно-исследовательский ветеринарный институт», РГП «Научно-производственный центр животноводства и ветеринарии» Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан)

ЛИЗОГЕНИЯ И L-ФОРМЫ БРУЦЕЛЛ

Вопреки наличию твердо установленных данных об универсальности персистенции патогенных возбудителей, многие из которых находятся в организме природных хозяев пожизненно, не причиняя популяции существенного вреда, продолжает действовать доктрина о необходимости изоляции и обязательной санации выявленных заразоносителей. Не правомерно ли допустить, что персистентные формы инфекции могут существовать не вопреки, а благодаря наличию иммунитета, являясь одновременно его стимулятором. Ведь если бы заразоносительство, а тем более персистенцию и интеграцию паразитических видов считать патологическим состоянием, требующим лечения, то это требование по крайней мере для доброй сотни инфекционных агентов (вирусов, риккетсий и других микроорганизмов), необходимо будет распространить на все человечество. Весьма характерно, что реакция со стороны возбудителя в большинстве случаев направлена не на уничтожение хозяина, а на стабилизацию и длительное сохранение паразитарной системы. Так, в процессе инфекции может происходить постепенное накопление маловирулентных штаммов паразита, синтезирующих слабоантигенные поверхностные структуры, не стимулирующие выработку стерилизующего иммунитета [1].

Представление о «нормальном» строении микробных клеток становится в значительной степени условным: его следует рассматривать лишь в связи с конкретными условиями культивирования (онтогенеза) популяции и наличия эффектогенных факторов положительного или отри-

цательного (по отношению к микроорганизмам) свойства [2].

Под действием индуцирующих факторов бруцеллы диссоциируют в R-форму или трансформируются в L-формы, утрачивая поверхностные антигенные комплексы и изменяя основные морфологические и биохимические свойства. Измененные формы бруцелл могут длительное время персистировать в организме основного хозяина, вызывать инфекционный процесс с необычным течением и не выявляются стандартными методами диагностики. Особую опасность представляют реверсидельные штаммы R- и L-форм, которые способны в отсутствии индуцирующих агентов восстанавливать свойства материнских клеток и при пассировании через организм восприимчивых животных усиливать патогенные свойства [3].

Фагоустойчивые варианты бактерий с нарушенной рецепторной способностью обычно характеризуются значительной изменчивостью, что уменьшает вероятность их выделения. Широкое распространение фагоустойчивых вариантов среди диких и лабораторных штаммов бактерий на фоне высокой частоты встречаемости во внешней среде соответствующих активных бактериофагов свидетельствует об актуальности этой проблемы. Детальное изучение фагоустойчивых вариантов позволит не только разобраться в механизме данной изменчивости, индуцирующих ее факторов, роли мигрирующих генетических элементов. Фагоустойчивость бактерий с измененным фенотипом свойственна L-формам, а также некультивируемым и нетипируемым формам. Можно

предположить общность некоторых механизмов их образования и оценить фагоустойчивость возбудителя, связанных с отбором фагорезистентных вариантов с измененной клеточной стенкой как один из этапов в общей цепи приспособительных модификаций [4].

По мнению E. Nelson, M. Pickett [5], в крови человека только тогда появляются условия для развития L-форм, когда в ней одновременно присутствуют и бруцеллы, и бруцеллезный бактериофаг. Добавление к среде акрифлавина (ингибитор фага) препятствует развитию L-форм. Случаи, когда у лиц, инфицированных бруцеллами, отсутствует клиника заболевания, авторы объясняют подавлением вирулентной формы возбудителя присутствием бруцеллезного бактериофага, который обуславливает появление авирулентных вариантов бруцелл, в том числе L-форм, как остаточных форм возбудителя в организме. При этом они предполагают, что указанные варианты при соответствующих условиях могут дать начало гладким вирулентным бруцеллам, а следовательно, и генерализации инфекции.

Лизис клеток, кроме появления фага, сопровождается образованием и фильтрующихся форм, о чем свидетельствовали положительные результаты опытов по выделению из фильтратов индуцированных культур, кроме фага, штаммов вторичных культур, которые устойчивы к фагу, и быть может являлись L-формами [6].

В результате влияния фага на бруцеллы происходят морфологические изменения клеток бактерий - появляются крупные зернистые формы и цепочки [7]. Подобные морфологические изменения присущи и L-формам бруцелл [8].

При воздействии фага ТБ на бруцеллы получены формы, по морфологии колоний и клеток сходные с L-формами бактерий. Эти варианты оказались нестойкими (после одного пассажа через организм морских свинок) и реверсировали в нормальные высоковирулентные культуры [9].

Формирование фагорезистентных вариантов есть результат сочетания двух процессов индукции и селекции, осуществляющихся при пассировании культур на антибиотике. Фагорезистентность и устойчивость к антибиотику, возникающие при пассажах культуры, - наследственно закрепленные признаки, но не взаимосвязанные в наследственном аппа-

рате бактериальной клетки, т.к. возможна их диссоциация. Индукция фагорезистентности под влиянием фага может сопровождаться формированием повышенной устойчивости к антибиотику. Возникновения фагорезистентных вариантов у изученных штаммов не связано с селекцией предшествующих мутантов, а обусловлена индуцирующим действием антибиотика или фага. Формирование фагорезистентности под влиянием антибиотика или фага сопровождается близкими изменениями свойства бактерий [10].

Предполагают, что L-формы происходят из типичных бактериальных форм, когда те находятся в условиях, неподходящих для нормального развития. Эти условия включают воздействие антибиотиков, таких как пенициллин, защитные механизмы хозяина, такие как антитела и система комплемента, температура, неадекватные среды и воздействие бактериофага. Бактериофаг, возможно, является наиболее важным условием в развитии L-форм. Многие ситуации подходящие для развития L-форм (аутолизующие культуры, антагонизм штаммов, присутствие определенных ингредиентов и т.п.) служат условиями, обычно наблюдаемыми в результате или как необходимость проявления действия фага. Обнаружено еще одно доказательство в поддержку «фаговой гипотезы» относительно развития L-форм, оно заключается в том, что на газоне сплошного роста L-форм бруцелл наблюдается образование негативных колоний. Развитие негативных колоний замедляется или полностью прекращается при внесении в среду акрифлавина (ингибитора фага). Если негативные колонии внести в бульон с культурами *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*, то после инкубации (37 °C) и фильтрации в фильтрате регистрировали наличие фага в высоких титрах против одного или нескольких штаммов обогащения [5].

Использование в эксперименте индуктора L-трансформации бактерий пенициллина позволило установить, что этому явлению подвержены не только типичные S-формы бруцелл, но и в равной или даже в большей степени SR-, RS- и R-формы бруцелл. Более того, было установлено, что образование истинных L-форм и их начальных стадий может протекать спонтанно, без добавления в питательные среды каких-либо индуцирующих агентов [11].

В настоящее время убедительно доказано, что L-трансформация бактерий

представляет собой не только феномен, воспроизводимый в опытах *in vivo* и *in vitro*, но и является частной формой существования бактерий в природе. Изучения биологических особенностей L-форм бруцелл представляет несомненный интерес ввиду их возможного участия в формировании инфекционного процесса. С потерей вирулентности у L-трансформированных бруцелл, вызванной многократным пассированием на средах с возрастающими концентрациями пенициллина, утрачивается способность к активной репродукции в культуре перитонеальных макрофагов и сохраняется возможность лишь персистенции [13].

С общемикробиологической точки зрения L-формы бактерий представляют собой измененные варианты микроорганизмов, утративших почти полностью или частично клеточную оболочку. В отличие от сферопластов, дефектных по клеточной стенке, и протопластов, не содержащих ее и не размножающихся в условиях питательных сред, L-формы сохраняют способность к росту и размножению [12].

L-формы и их многочисленные варианты широко распространены в организме животных и во внешней среде. Наиболее часто встречаются клетки, утратившие полностью или частично клеточную стенку и имеющие сферическую форму (сферопласты, протопласты). Относительно стабильные L-формы бруцелл в организме животных способны проявлять достаточно активные антигенные свойства, вызывать генерализованный процесс и персистировать в течение длительного времени [14].

В современных экологических условиях возникающие L-формы и множественные их варианты представляют, по всей вероятности, регрессивные элементы функционирующей паразитарной системы и в то же время являются, как показали эксперименты, базой для формирования новых био-, сероваров и видов. При этом образование ранее не существовавших микро- и макроэволюционных форм бруцелл может происходить как путем мутаций и длительных модификаций морфологически типичных бруцелл, так и L-трансформации. Это может осуществляться не только в организме основного (видового), но и не основного (дополнительного) хозяина [11].

При приобретении патогенными микроорганизмами резистентности к антибиотикам изменяются самые различные биологиче-

ские свойства, причем изменения идут в основном в направлении сапрофитизации, т.е. вирулентность микробов чаще всего снижается, устойчивость к самым различным воздействиям возрастает. Во внеэпидемическое время возбудители различных заболеваний сохраняются в виде мало-вирулентных форм в организме достаточно стойких людей и животных. Под влиянием разных факторов, ослабляющих сопротивляемость организма, мало-вирулентные микробы получают возможность размножаться в уже более благоприятных условиях и усиливают свою вирулентность. В дальнейших пассажах через восприимчивые макроорганизмы вирулентность их все более возрастает [15].

Если в период обычного (интактного) состояния механизм существования бруцелл направлен на активное освоение экологических ниш (новых хозяев) путем использования высокой вирулентности, позволяющей индуцировать аборты, мертворождения и другие пути выхода во внешнюю среду и проникновения в новый восприимчивый макроорганизм, то в период L-трансформации снижение вирулентности бактерий и, следовательно, степени раздражения и воздействия защитных факторов хозяина дает возможность паразиту остаться в организме хозяина на более длительный срок, и только в дальнейшем, если будут соответствующие условия (снижение резистентности организма хозяина и др.), реверсировать, продолжить циркуляцию в популяции основного или второстепенного хозяина [11].

Интересно отметить, что при реверсии L-форм бруцелл все свойства, за исключением способности лизироваться специфическим фагом, частично восстанавливаются [16].

Характерно, что в половине случаев от людей выделялись культуры в состоянии диссоциации, причем степень диссоциации у большинства штаммов была хорошо выражена. Это явления связано с широким применением антибиотиков в лечебной практике, а также с действием фагов [17].

Длительное культивирование бактерий на агаре с антибиотиком сопровождается тем, что часть клеток не возвращается к исходному типу даже при выращивании на среде без пенициллина и становятся L-формами [8].

Несбалансированный рост можно охарактеризовать как одну из форм биологической реакции бактерий, способству-

ющей выживанию и сохранению вида в условиях кратковременного действия различных химических, физических и биологических факторов, при устраниении которых они реверсируют. Формы несбалансированного роста, протопласты и сферопласты первого типа являются потенциальными предшественниками L-форм, т.е. начальным этапом L-трансформации. L-формы частично или полностью утрачивают клеточную стенку, и поэтому могут иметь самую разнообразную морфологию: от огромных шаров, достигающих в диаметре 10-50 мкм, до элементарных тел и мельчайших грануловидных образований размером 0,2-0,3 мкм. Между этими крайними вариантами есть множество других, представляющих собой различные этапы единой лабильной системы. [18].

Основой морфогенеза L-форм является нарушение синтеза мукопептидного слоя клеточной стенки и угнетение деления. Вследствие этого происходит накопление клеточного вещества, растяжение клеточной стенки и образование эластичных шаровидных тел. Разрыв клеточной стенки ведет к освобождению цитоплазмы в виде не имеющей определенной формы массы клеточного вещества и зерен. Все это и обуславливает широкий полиморфизм микробной клетки, подвергнутой L-трансформации [12].

При изучении L-форм выявлены следующие закономерности: изменяются формы колоний, консистенция, оттенки. Необычным для ряда микробов были слизистые варианты тягучей консистенции с ярко выраженными капсулами вокруг микробных клеток. Изменялась биохимическая активность, что проявлялось в основном в ослаблении или потере способности разлагать азотистые вещества и углеводы. Весьма существенные изменения, которые претерпевают под влиянием антибиотиков патогенные микробы, не могут не отразиться на течении инфекционного процесса, на характере иммунологической перестройки, а также на результатах специфической диагностики инфекционных заболеваний [19].

Результаты исследований показали, что в организме привитых морских свинок в конце фазы нестерильного и стерильного иммунитета происходит интенсивная L-трансформация бруцелл, которые играют существенную роль в поддержании определенной степени напряженности иммунитета в его «стерильной» фа-

зе [20].

Персистенцию измененных L-форм бруцелл и процессы, вызываемые ими, невозможно выявить при помощи стандартных S-диагностикумов т.к. каждая форма имеет специфические детерминанты и не дает перекрестных реакций с гетерологичными бруцеллезными антигенами и антисыворотками [21].

L-трансформация - перманентное биоявление, постоянно сопутствующее паразито-хозяйным отношениям бруцелл и их основных или второстепенных (дополнительных) хозяев. Механизм этого явления реализуется, видимо, с того момента, как только паразит вступает во взаимодействие с защитными гуморальными и клеточными факторами хозяина. Анализ популяций более 3 тысяч культур, выделенных от разных видов животных свидетельствует, что число морфологически измененных бруцелл составляет более 50%. В некоторых стадах крупного рогатого скота и северных оленей число гетероморфных культур видов *B.abortus* *B.suis* (*B.rangiferi*) достигает 60-80%. Большинство измененных популяций паразита представлено мелкими сферопластами, протопластами и крупными палочковидными формами несбалансированного роста [11].

Наиболее древними и наиболее простыми паразитарными системами являются вирусные инфекции бактерий, вызываемые соответствующими фагами. В длительно существующих системах подобного типа происходит постепенный отбор и накопление нечувствительных к фагу мутантов бактерий. В свою очередь это ведет к селективному распространению в данной микробной популяции фагов-мутантов со структурными изменениями органа адсорбции, позволяющими им связываться с рецепторами клетки, резистентной к «дикому» фагу. В ответ на это бактериальный штамм образует сверхустойчивый мутант к «дикому» и измененному фагам. Размножающийся в клетке «дикой» фаг обычно лизирует ее, чем обеспечивает выход потомства фаговых частиц. Однако эта форма инфекции оказывается несостоятельной, так как высокая восприимчивость популяций к литическому действию фагов ведет в конечном итоге к гибели обеих взаимодействующих сторон. Указанное противоречие преодолевается образованием умеренных фагов, которые длительно колонизируют популяцию бактерий и могут воспроизводиться как часть

их наследственного аппарата, не подавляя жизненных функций и способность к размножению клеток [22].

Примером реализации молекулярно-генетических механизмов изменчивости популяций патогенных микроорганизмов может служить диссоциация. При диссоциации могут одновременно изменяться два важнейших признака - антигенная структура и вирулентность. Кроме того, меняются и другие свойства, в том числе устойчивость во внешней среде, биохимическая активность, способность воспринимать поток генов, протекающих через микробную популяцию, и некоторые другие. К настоящему времени накопилось большое количество данных, которые позволяют рассматривать диссоциацию как один из общих и универсальных механизмов, присущих популяциям микроорганизмов и обеспечивающий поддержку их соответствия меняющимся условиям внешней среды. Полученные данные свидетельствуют об участии в процессе диссоциации внехромосомных факторов наследственности, а именно бактериофагов, плазмид и, вероятно, мигрирующих генетических элементов, обуславливающих высокую частоту диссоциативного процесса. Например, при обработке микобактерий некоторыми бактериофагами частота S-R-перехода увеличивается в несколько раз. Большинство образовавшихся при этом R-форм были лизогенными. Делизогенизация сопровождается R-S-переходом [23].

Г.Ю. Пак с соавт. [24] при изучении роли бактериофагов в саморегулирующей системе эпизоотии чумы пришли к выводу, что мы не должны рассматривать бактериофаг только как литический фактор, необходимый для диагностики различных видов бактерий; феномены лизогении, фаговой конверсии, трансдукции и другие вопросы, связанные с взаимодействием бактериальных культур с фагами, служат удобным объектом для исследования узловых вопросов общепатологической науки. Бактериофаг, являющийся наряду с другими внешними воздействиями мощным фактором изменчивости возбудителя чумы, обуславливает появление и накопление измененных форм, которые отбираются изменяющимися в ходе развития эпизоотии популяциями носителя и переносчика. Возможно, что в период депрессии уменьшается численность носителей и переносчиков, когда обычная трансмиссия бактерий затруднена, преи-

мущество получают слабовирулентные фагоустойчивые формы, которые могут длительно сохраняться в организме хозяина, не вызывая его заболевания и гибели. Изучение роли бактериофагов в изменчивости возбудителя чумы необходимо как в теоретическом плане для расшифровки системы эпизоотического процесса, так и в прикладном аспекте для уточнения значения различных культур (от лизогенных до фагоустойчивых) в эпизоотии, что особенно важно в изучении проблемы сохранения бактерий в межэпизоотические периоды (в периоды резервации возбудителя).

В последние годы интенсивно ведется экспериментальное изучение эпизомальных элементов (плазмид) и детерминированных ими явлений. Большой интерес в этом плане представляет явление трансдукции. Показана возможность трансдукции одного и того же признака различными фагами. С другой стороны одним фагом удалось формировать рекомбинанты с различными типами лекарственной устойчивости: к тетрациклину, стрептомицину, пенициллину. Полученные данные свидетельствуют о существовании в генетической структуре плазмиды как единого для всех генетического материала, так и локусов различных в функциональном отношении. На результаты трансдукции влияют с одной стороны свойства фага, а с другой стороны свойства донорских и реципиентных культур, причем последних в большей степени. Так, в опытах по трансдукции пенициллинорезистентности установлено, что независимо от типа используемых фагов, патогенной реципиентной активностью обладают строго определенные структуры. Существенный интерес представляет вопрос о судьбе трансдуцированной ДНК. При изучении свойств детерминант лекарственной устойчивости, введенных в бактериальную клетку фагом, отметили формирование рекомбинантов как с хромосомной, так и с цитоплазматической локализацией трансдуцированных фрагментов. Таким образом способность фагов существовать в форме эписом, делает их существенным фактором изменчивости бактерий и позволяет по новому осветить их роль в процессах эволюционной генетики микроорганизмов [25].

Для микробов, постоянно сосуществующих в организме в условиях паразитизации, делают их механизмы, которые реализуются с

помощью эписом, имеют первостепенное значение. Лизогения - чрезвычайно широко распространенное явление, встречающееся у штаммов самых различных видов бактерий, возникающее в процессе эволюции и способствующее сохранению данного вида. Умеренные фаги, как эписомные элементы, принимают участие в генетическом обмене микроорганизмов перенося самые различные признаки: способность сбраживать различные углеводы, резистентность к антибиотикам, способность к спорообразованию и т.п., наконец, сама лизогенность является признаком, который может быть передан от донора к реципиенту [26].

Изменение свойств бактерий, в том числе способности к передаче генов, тесно связана с фаговой конверсией. При этом типе взаимодействия свой фенотип изменяют инфицированные фагом бактерии. Многие свойства конвертирующих фагов, связанные с их влиянием на изменчивость бактерий, стали понятны после открытия мигрирующих и встраивающихся элементов. В составе фагов обнаружены транспозоны, определяющие устойчивость к различным антибиотикам, способность утилизировать углеводы, синтезировать термостабильный эндотоксин и др. Кроме того транспозоны, переносимые фагами могут обеспечивать процесс интеграции последних в хромосому клетки. Сам фаг в лизогенном состоянии может индуцировать изменение поверхностных структур бактериальных клеток, что предотвращает адсорбцию и инфекцию другими фагами [23].

В настоящее время наличие бруцеллезного бактериофага как в культурах бруцелл, так и в организме больных бруцеллезом является уже неоспоримым фактом. В случае восстановления вирулентности и других свойств реверсировавшие варианты оставались резистентными к фагу. Это обстоятельство указывает на то, что нельзя ставить знак равенства между исходной культурой до воздействия на нее фага и ее реверсировавшими вариантами. Рассмотренные данные показывают, что бактерии и умеренные фаги выступают как единая генетическая система, так как при лизогении и конверсии фаговый геном составляет часть бактериального генома, а при трансдукции фрагмент бактериального генома встраивается в геном фага. И в этой генетической системе возможен генетический обмен как внутривидовой, так и между различными

видами [22].

Известно, что плазмиды микроорганизмов кодируют такие свойства микробной клетки как устойчивость к антибиотикам и тяжелым металлам, формирование антигенов адгезии, продукцию бактериоцинов и др. Для элиминации R-плазмид из клеток сальмонелл использовали антибиотик новобиоцин и акридиновый оранжевый. После воздействия на бульонные культуры сальмонелл новобиоцином и акридиновым оранжевым изолировали устойчивые культуры, утратившие плазмиды и приобретшие чувствительность по всем антибиотикам [27].

С эволюционной точки зрения бактериофаги можно рассматривать как особый класс плазмид, накопивших наследственную информацию, необходимую для синтеза белковой головки фага, в которую заключается генетический материал. Таким образом, эволюция фаговой ДНК привела к образованию инфекционных плазмид, которые в одеянии фаговых частиц способны существовать вне протоплазмы и в таком виде переходить от одного хозяина к другому. Плазмиды R сами по себе не включаются в хромосому бактерии, но входящие в них гены устойчивости легко переносятся в виде единого блока и в хромосому клетки-хозяина, и в другие, присутствующие в этой клетке плазмиды. Например, если в бактериальной клетке окажутся и ДНК плазмиды R, и ДНК какого-либо фага, то в потомстве фага, высвобождающегося из такой клетки-хозяина, могут находиться фаговые частицы, несущие в своей ДНК в виде вставки гены устойчивости к лекарственным препаратам [22].

Приведенные литературные данные свидетельствуют о возможной связи между L-формами и лизогенными бруцеллами. Однако этот вопрос еще не получил достаточного освещения. Поэтому дальнейшее изучение L-трансформации и лизогении бруцелл достаточно актуально.

Цель нашей работы - селекционирование лизогенных вариантов и L-форм бруцелл воздействием индуцирующих факторов и сравнительное изучение биологических свойств полученных культур микроорганизмов.

Материалы и методы

В опытах, использовали: вакцинные штаммы *Brucella abortus* 19, 82 и 16/4; референтные штаммы *B. abortus* 544, *B. suis* 1330, *B. melitensis* 16M и *B. ovis* 63/290. Штаммы 19, 544, 1330 и 16M являются

S-формой, 82-SR, 16/4 и 63/290-R.

Индукционными факторами служили:

1. Бруцеллезные фаги ТБ и АВ (R-бруцеллезный фаг), селекционированный нами [28]. Лизогенизацию осуществляли следующим образом: 1 см³ 2 млрд взвеси бруцелл смешивали с одним из фагов из расчета 0,1-1 фаговую корпускулу на 1 микробную клетку. Систему фга-бактерия вносили в пробирки с питательным бульоном, инкубировали 72 час при 37 °С и пересевали на плотную среду.

2. Пенициллин. L-трансформацию проводили путем воздействия на бруцеллы возрастающих доз пенициллина. С этой целью приготовленную взвесь бруцелл (30-50 млрд м.к.) засевали в пробирки с бульоном, содержащим 50 ЕД/см³ и т.д. до 5000 ЕД/см³. Иногда пассаж на средах с пенициллином продолжали до 10000 ЕД/см³ и более. Пересевы делали через 7-10 суток.

Лизогенизацию бруцелл выполняли по разработанному нами способу [29], выращивая бруцеллы в жидкой питательной среде с последовательно увеличиваемыми концентрациями пенициллина до перехода бактерий в лизогенное состояние с последующей фильтрацией культуральной жидкости через керамический фильтр с диаметром пор 120 нм и определением наличия фага путем нанесения 1 капли фильтрата на газон с индикаторными культурами.

Определение активности уреазы, оксидазы бруцелл проводили по методу Б.Ф.Резникова [30].

Биологические свойства измененных культур бруцелл изучали по методам, рекомендованным ФАО/ВОЗ [31].

Результаты и обсуждение

В результате взаимодействия бруцелл со специфическими фагами получили 6 популяций измененных культур бактерий. Из них 2 лизогенизированы R-фагом АВ и 4 - фагом ТБ. На штаммы в R-форме -V.abortus 16/4 и V.ovis 63/290, а также V.melitensis 16M, фаг ТБ не оказывал видимого влияния. У штамма V.suis 1330 изменения выражены незначительно.

Все культуры бруцелл, диссоциированные после взаимодействия с фагами были слизистыми, тягучей консистенции и вращались в агар. В питательном бульоне росли в виде плотной массы, прикрепленной к дну пробирки, при встряхивании поднимающейся вверх в виде косячки. При длительном хранении с пересевами через 2-3 месяца стойко сохраняли это

свойство.

В микробной популяции, полученной под влиянием фагов, наблюдали клоны различной степени диссоциации: SR-, RS- и R-форма (окраска по Уайт-Вильсону) встречалась и S-форма, но в незначительном количестве (1-2%). На питательном агаре вырастали матовые шероховатые колонии диаметром 1-3 мм, слизистой консистенции. Бруцеллы диссоциированных штаммов стали лизогенными и приобрели способность к спонтанной продукции фага. При выращивании в питательном бульоне с последующей фильтрацией через керамический фильтр в фильтрате обнаружили специфические фаги по своему литическому спектру аналогичные фагам, которые использовали в опыте - ТБ (S-фаг) и АВ (R-). Бруцеллы этих штаммов стали иммунными как к лизогенизирующему фагу, так и к фагам, 1Z, BK и другим, селекционированным нами.

В мазках, окрашенных по Козловскому, наблюдали полиморфные клетки - кокки, овоиды, короткие палочки, различной степени окраски, несколько увеличенные по сравнению с исходными бруцеллами.

Ферментативная активность бруцелл в отношении сероводорода уменьшилась, в сравнении с исходными культурами. Продукция уреазы и оксидазы повысилась у всех лизогенных (диссоциированных) штаммов. Редуцирующая способность к анилиновым краскам (тионину и фуксину) не изменилась. У диссоциированных культур более выражена потенция к репродукции на средах с пенициллином (1000-5000 ЕД/см³).

Изменения произошли и в антигенной структуре, о чем свидетельствуют результаты пластинчатой РА с бруцеллезными иммунными сыворотками. Бруцеллы, после взаимодействия с фагом, перестали агглютинироваться S-бруцеллезной биофабричной сывороткой, сомнительная реакция зарегистрирована только с диссоциантом штамма V.suis 1330. С L-сывороткой, полученной от кроликов, иммунизированных L-культурой бруцелл (штамм 544 L), измененной под влиянием пенициллина, вступают в реакцию все измененные культуры, что доказывает соответствие антигенной структуры бруцелл, измененных воздействием фага и L-трансформированных пенициллином. R-иммунная сыворотка, полученная на штамм V.abortus 16/4, не агглютинировала измененные бруцеллы за исключением штаммов 16/4

и 63/290. Гомологичной сывороткой, полученной на лизогенный штамм 544 Ф, позитивные результаты наблюдались со всеми диссоциированными культурами.

Для L-трансформации применяли пенициллин и те же штаммы, которыми пользовались в опыте по лизогенизации, а также полученные нами лизогенные культуры. Рост отдельных культур бруцелл в питательном бульоне с пенициллином даже в начальных концентрациях (50, 100 ЕД/см³) был скудным или вообще отсутствовал, даже при посеве 30-50 млрд м.к. Через 10-15 дней наблюдали репродукцию бактерий, что выражалось в помутнении бульона и образовании пристеночного кольца. Отмечено, что *V.melitensis* и *V.suis* хуже размножаются на средах с антибиотиком, чем *V.abortus*. Диссоциированные культуры (*V.ovis* 63/290 и *V.abortus* 16/4), адаптировались к пенициллину быстрее, особенно штаммы, полученные в результате взаимодействия бруцелл с бактериофагом, в сравнении с типичными бруцеллами. Первые генерации L-трансформированных бруцелл были слизистыми и вращались в среду (сохраняя это свойство на средах с антибиотиком и на обычных средах). Они очень плохо, также как и лизогенные культуры, эмульгировались в физиологическом растворе. L-формы бруцелл перестали образовывать серо-водород, но увеличили активность ферментов-токсинов: уреазы и оксидазы. В отличие от исходных штаммов росли на всех используемых в опыте концентрациях тионина и фуксина. Данные РА свидетельствовали о полной или частичной редукции клеточных стенок L-форм. Несмотря на наличие у некоторых штаммов S-клеток (результат окраски колоний по Уайт-Вильсону), они не агглютинировались S-бруцеллезной сывороткой. R-иммунная сыворотка не вступала в реакцию с L-формами, за исключением культуры, полученной из *V.abortus* 16/4. Гомологичная L-сыворотка и полученная на лизогенную культуру бруцелл (штамм *V.abortus* 544Ф) агглютинировали все L-трансформированные штаммы бруцелл. По-видимому вместе с оболочкой L-клетки утрачивали специфические антигены, характерные для типичных бруцелл.

Лизис L-культур бруцелл фагами ТБ и АБ не наблюдался.

Колонии L-форм мелкие, диаметром от 1 до 2 мм, матовые, плоские с неровными краями, шероховатые, с выпуклым

центром, растущие в среду. Раствором кристаллвиолета (1:2000) окрашивались в синий или фиолетовый цвет. Неокрашенных колоний наблюдали не более 1%. Реакция с трипафлавином - положительная, термоагглютинация - отрицательная.

Морфология клеток почти всех субкультур варьировала (кокки, овоиды, короткие палочки), однако отдельные из них состояли из относительно однородных вариантов - сферопласты и овальные клетки различной величины, размером 1-5 мкм.

Сравнительное изучение культуральных свойств лизогенных и L-трансформированных бруцелл показало, что они практически не отличаются.

Бруцеллы, измененные специфическими фагами, или трансформированные пенициллином росли на питательном агаре в виде мелких колоний, слизистой консистенции, растущие в агар. В жидкой питательной среде рост характеризовался плотной массой, прикрепленной к дну пробирки, не разбивающейся при встряхивании и поднимающейся вверх в виде косячки. Это дало нам основание предполагать, что L-формы являются лизогенными. Для подтверждения лизогенности L-формы выращивали в бульоне, фильтровали через керамический фильтр и в фильтрате определяли наличие фага путем нанесения 1 капли фильтрата на газон с индикаторными культурами. В результате установили, что все используемые в опыте L-формы бруцелл являются лизогенными и продуцируют специфические фаги, различного литического спектра.

Ранее нами было показано, что лизогенизация бруцелл может происходить как *in vivo* (пассаж через организм нетипичных хозяев), так и *in vitro* (ультрафиолетовое облучение, антибиотики) [32]. Исследования, проведенные В.Г. Ощепковым и Л.Н.Гордиенко [11] свидетельствуют о том, что L-трансформация активно протекает под действием биологических (специфические иммуноглобулины, фибробласты куриных эмбрионов и др.) и абийотических (ультрафиолетовое облучение, антибиотики, повышенная температура и др.) факторов. Данное обстоятельство может служить доказательством, что лизогенизация и L-трансформация происходят под влиянием аналогичных индуцирующих агентов. Для лизогенизации бактерий мы разработали способ [29], где в качестве лизоген-

низирующего фактора использовали традиционный индуктор L-трансформации - пенициллин [29], что также является подтверждением тесной связи L-форм и лизогенных бруцелл.

Сыворотки крови животных, вступающие в реакцию (РДСК) с L-антигеном, ведут себя аналогично с бруцеллезным антигеном, содержащим специфический фаг, отличаясь лишь по высоте титров. Антигены, полученные из бруцелл разной степени изменчивости (SR-, R-форма), а также био-фабричный бруцеллезный антиген не дают позитивных показаний с указанными сыворотками, что является свидетельством о присутствии в популяции бруцелл (L-трансформацию осуществляли пенициллином), из которой готовили L-антиген специфического фага бруцелл, т.е. фаг является именно тем компонентом, который присутствует как в L-формах, так и в лизогенных культурах бруцелл и вступает в реакцию с антифаговыми антигенами сыворотки крови. Все вышеизложенное ставит на одно из первых мест проблему непосредственно связанную с диагностикой и идентификацией атипичных форм возбудителя бруцеллеза. Использование в таких случаях диагностикомов, содержащих фаговые антигенные детерминанты позволит решить эту проблему.

Нами разработан способ получения бруцеллезного антигена, содержащего специфический фаг [33.] Применение указанного антигена позволило Б.Ф. Галичу [34] значительно улучшить диагностику бруцеллеза у людей. Автор отмечает, что введение в состав диагностикума для постановки серологических реакций антигенов специфического бактериофага позволяет повысить качество диагностики у людей со стертой клиникой болезни на 11,8% - при остром бруцеллезе, на 10,6% - при подостром, на 14,5% - при хроническом субкомпенсированном, на 23,3% - при хроническом декомпенсированном бруцеллезе в сравнении с биофабричным бруцеллезным антигеном. Установлено, что по мере увеличения длительности острого бруцеллеза фаговая антигенемия возрастает.

В результате исследований нами было определено, что адаптированные свежeweделенные культуры бруцелл не отличаются от старых лабораторных штаммов ни по культуральным, ни по биохимическим свойствам, но отличаются одной важной особенностью — старые лабора-

торные штаммы не лизогенны и не способны продуцировать фаг. Следовательно лизогенность бруцелл является тем механизмом, который управляет токсичностью и инвазивностью в макроорганизме на искусственных питательных средах и предопределяет инфективные свойства бруцелл. О значительном распространении лизогении у бруцелл свидетельствуют данные И.А. Косилова [35], который в своих работах показал, что лизогенные штаммы среди первых генераций эпизоотических культур бруцелл достигают 70-80%. В этой связи можно сделать предположение о том, что видовая специфичность бруцелл целиком определяется специфическими фагами, находящимися в составе профага (эписомы), а бактериальная клетка служит лишь местом и средством для фенотипического выражения генетической информации, заложенной в фаговом геноме, т.е. литические в отношении возбудителя бруцеллеза фаги следует рассматривать как один из компонентов саморегулирующей паразитарной системы в ходе развития бруцеллезной эпизоотии. Данное положение подтверждает теорию, предложенную В.В. Макаровым, А.А. Гусевым и др. [36] о трансмиссивных генетических детерминантах патогенности (ТГД-П) к которым относятся и фаги. ТГД-П ведут себя как генетические симбиоты и даже паразиты, сами обуславливают инфекционный процесс при заражении бактериальных клеток как хозяин первого порядка. Первичный эпидемический процесс при распространении в бактериальных популяциях подчиняется закономерностям саморегулирующихся паразитарных систем. Генетическая и фенотипическая неоднородность популяций паразита и хозяина - результат и причина их постоянной изменчивости.

В связи с изложенным включение специфического фага в состав диагностикомов позволит выявлять атипичные бруцеллы - диссоцианты и L-формы. Это связано с тем, что S-R переход проявляется лизогенизацией бактерий, в процессе L-трансформации также происходит лизогенизация бруцелл. Продуцируемый лизогенными бактериями в окружающую среду (макроорганизм) фаг вызывает выработку специфических антифаговых антител и так как различные бруцеллезные фаги имеют идентичные антигенные детерминанты, обнаружение антител к бруцеллезным фагам позволит распознать бру-

целлезную инфекцию, вызываемую атипичными вариантами бруцелл [23, 5, 33].

Выводы

1. L-формы лизогенны и способны спонтанно продуцировать фаг.
2. Лизогенные варианты и L-трансформированные бруцеллы обладают сходной биологической характеристикой.
3. Для индикации атипичных бруцелл

(L-формы и диссоцианты) следует использовать диагностикумы, содержащие бруцеллезный фаг, так как применение набора антигенов, обладающих специфичностью к множеству атипичных популяций бруцелл (SR-, RS-, R-, L-форма и их промежуточные варианты), отличающихся друг от друга по антигенной структуре, - нереально.

Литература

1. Сокин А.А. Парадокс инфекционного иммунитета // ЖМЭИ. - 1988. - №1. - С. 73-80.
2. Высоцкий В.В., Котлярова Г.А. Поли (гетероморфные) формы патогенных бактерий в инфекционной патологии //ЖМЭИ. - 1999. - №2. - С. 100-104.
3. Гордиенко Л.Н. Свойства измененных форм бруцелл, изолированных от северных оленей в очагах «оленьего бруцеллеза» //Эпизоотология, диагностика и профилактика хронических инфекционных болезней животных/ Мат. междунар. науч. конф. Омск, 24-26 июня 2003 /Сб. науч. тр. - Омск, 2003. - С. 222-224.
4. Лебедева С.А. Устойчивые к диагностическому бактериофагу варианты *Yersinia pestis* и проблемы связанные с ними //ЖМЭИ. - 2000. - №3. - С. 99-104.
5. Nelson E., Pickett M. The recovery of L-formes of *Brucella* and their relation to *Brucella* phage //J. Int. Dis. - 1951. - V. 89. - P. 1-4.
6. Пехов А.П. Об изменчивости микробов под влиянием фага //Изменчивость микробов и бактериофагия. - М.: Медгиз, 1960. - С. 360-363.
7. Дрожжевкина М.С. Изменчивость бруцеллезных культур под влиянием бактериофага //Тр. ин-та / Ростов-на-Дону противочумн. ин-т. - 1956. -Т. 10.- С. 269-316.
8. Тимаков В.Д., Каган Г.Я. Биология L-форм бактерий М.: Медгиз, 1961. -234 с.
9. Островская Н.Н. Бруцеллезные бактериофаги и их значения в изменчивости бруцелл: Автореф. дис. - д-ра мед. наук. - М., 1969. - 32 с.
10. Гольдфарб Д.М., Кузнецова В.Н. Роль антибиотиков в формировании фаго-резистентных вариантов бактерий кишечной группы //Изменчивость микроорганизмов и бактериофагия. -М.: Медицина, 1960. - С. 72-85.
11. Ощепков В.Г., Гордиенко Л.Н. L-трансформация бруцелл - значение в эпизоотическом процессе и эволюции рода *Brucella*// Ветеринарная патология. - 2004. - № 4. - С. 36-46.
12. Косилов И.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных. Новосибирск, 1992. - 260 с.
13. Шувалов Л.П., Толмачева Т. А. Изучение взаимодействия L-трансформированных бруцелл с культурой перитонеальных макрофагов //ЖМЭИ.-1974.-№.-С. 15-19.
14. Братцев А.Ю., Гордиенко Л.Н. Персистенция L-форм бруцелл в организме лабораторных животных //Мат. Всерос. научн. конф. по проблемам хрон. инф. (бруцеллез, туберкулез) (16-17 мая 2001) /Сб. науч. тр. - Омск, 2001. - С. 96-98.
15. Перетц Л.Г. Значение изменчивости микробов для эпидемиологии и клиники инфекционных заболеваний //Изменчивость микроорганизмов и бактериофагия. - М: Медгиз, 1960. - С. 237-245.
16. Ищанова Р.Ж., Семенова В.М. и др. Свойства L-культур бруцелл// Ветеринария. - 1986. - № 9. - С. 30-32.
17. Ременцова М.М., Коломакин Г.А., Иванова К.В. Краевые культуры бруцелл и их биотипы. Сообщение 1 //Бруцеллез в Казахстане/Тр. ин-та краевой патологии. Алма-Ата: Наука, 1965. - С. 9-16.
18. Тимаков В.Д., Каган Г.Я. L-формы бактерий и семейства *Mycoplasmataceae* в патологии. М.: Медгиз, 1973. - 392 с.
19. Калихин П.Н. О закономерностях адаптивной изменчивости патогенных микробов под влиянием антибиотиков //Изменчивость микробов и бактериофагия. - М.: Медицина, 1960. - С. 67-72.
20. Хузин Д.А. Роль L-форм в иммунитете при бруцеллезе: Автореф. дис. ... канд. вет. наук. - Казань, 1988. - 16 с.
21. Ощепков В.Г., Гордиенко Л.Н., Верховцева О.И. Диагностика качества L-антигенов бруцелл, применяемых в РА, РСК, РДСК и ИФА //Сб. науч. тр.ОГАУ - Омск, 1994. - С. 54-61.
22. Стент Г., Кэлиндар Р. Молекулярная генетика: Пер. с англ. - М.: Мир, 1981.-646 с.
23. Беляков В.Д., Голубев Д.Б., Калинин Г.Д. и др. Саморегуляция паразитарных систем. - М.: Медицина, 1987. - 240 с.
24. Пак Г.Ю., Степанов В.М., Сатыбалдиев Н.А. и др. К роли бактериофагов в саморегулирующей системе эпизоотии чумы //ЖМЭИ. - 1990. - №9. - С. 97-100.
25. Терехова Т.К. О трансдуцирующих свойствах стафилококковых фагов //Сб. лет. юбилейного симпозиума, посвященного 50-летию Тбилисского НИИВС. - Тбилиси, 1974. С. - 177-178.
26. Бакулина Э.В., Олейник И.И. Теория паразитозов и генетический обмен у бактерий. - М.: Медицина, 1970. - 216 с.
27. Иренков И.П. Плазмиды *S. abortus ovis* //Ветеринария. - 2002. - №2. - С. 25-27.
28. Патент 14814 РК, МПК7 А61 В 10/00. Штамм специфического бактериофага АВ, используемый для идентификации измененных форм бруцелл/ А.Л.Воробьев, В.Б.Тен, С.Е.Алпысбаева (РК). - 4 с.
29. Патент 14203 РК. МПК7 А 61 К 39/10. Способ лизогенизации бактерий/А.Л. Воробьев, В.Б. Тен, М.Ш. Искаков и др. (РК). - 4 с.
30. Студенцов К.П. Бруцеллез животных. - Алма-Ата: Кайнар, 1975. - 238 с. 31.Альтон Д., Джонс Л. Методы лабораторных исследований по бруцеллезу: Перев. с англ. - Женева, 1968. - 84 с.
32. Воробьев А.Л. Диагностическое значение антигенов измененных форм бруцелл: Дис. ... канд. вет. наук. -Казань, 1988. - 188 с.
33. Патент 162 МПК7 А61 К 39/10 РК. Способ получения антигена для серологической диагностики бруцеллеза/ А.Л.Воробьев, В.И.Белобаба, Н.П.Иванов и др. (РК). - 4 с.
34. Галич Б.Ф. Динамика изменений гуморального антифагового и противобруцеллезного иммунитета у больных бруцеллезом: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Алма-Ата, 1990. - 20 с.
35. Косилов И.А. Изменчивость бруцелл и ее значение в проблеме бруцеллеза сельскохозяйственных животных: Автореф. дис. ... д-ра вет. наук. - Омск, 1975.-40 с.
36. Макаров В.В., Гусев А.А. и др. Трансмиссивные детерминанты патогенности// Ветеринария. — 2000. - № 3. — С. 16-21.