

Л.М. Михайлов, А.И. Калиновский, Н.Л. Баранникова, М.Ю. Шестопалов, Н.М. Андреевская,
В.А. Михайлова, В.И. Кузнецов, А.Г. Атлас, С.В. Балахонов

ОСОБЕННОСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО БРУЦЕЛЛЕЗА, ВЫЗВАННОГО S- И L-ФОРМАМИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ИНФЕКЦИИ

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»
Роспотребнадзора (Иркутск)

В работе приведены результаты сравнительной оценки бактериологического, серологического и ПЦР-методов диагностики при экспериментальном бруцеллезе у морских свинок, зараженных S- и L-формами возбудителя в разные сроки инфекционного процесса. Показано, что бактериологическим методом бруцеллы в S-форме выделялись до шести месяцев, в L-форме — до одного месяца. В ПЦР положительные результаты регистрировались до шести месяцев после заражения животных S- и L-формами возбудителя.

Положительные результаты слайд-агглютинации сывороток крови морских свинок с S- и L-бруцеллезными корпускулярными диагностикумами наблюдали до 12 месяцев. Комплексное использование бактериологического, ПЦР и серологического методов для лабораторной диагностики атипичного бруцеллеза, обусловленного возбудителем в L-форме, позволяет получать более достоверную информацию об эпизоотолого-эпидемиологической ситуации в неманифестных очагах инфекции.

Ключевые слова: бруцеллез, лабораторная диагностика, S-, L-формы бруцелл

PECULIARITIES OF LABORATORY DIAGNOSTICS OF EXPERIMENTAL BRUCELLOSIS CAUSED BY S- AND L-FORMS OF CAUSATIVE AGENT

L.M. Mikhailov, A.I. Kalinovskiy, N.L. Barannikova, M.Yu. Shestopalov, N.M. Andreevskaya,
V.A. Mikhailova, V.I. Kuznetsov, A.G. Atlas, S.V. Balakhonov

Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk

Comparative evaluation of bacteriological, serological and PCR diagnostic methods was resulted at experimental brucellosis in guinea pigs infected with S- and L-forms of the causative agent in different periods of the infection. It was shown that *Brucella* S-forms were isolated during six months, L-forms - about one month by a bacteriological method. Positive PCR results were observed about six months after S- and L-form infection in animals. Positive slide agglutination of guinea pig blood sera was revealed till 12 months by a corpuscular diagnosticum with S- and L-forms of *Brucella*. Complex use of bacteriological, PCR and serological methods for laboratory diagnostics of atypical brucellosis caused by *Brucella* L-form allows to obtain more reliable information about epizootological-epidemiological situation in non-manifested (non-clinical) infection foci.

Key words: brucellosis, laboratory diagnostics, *Brucella* S- and L-forms

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что интенсивность эпидемиологических проявлений в очагах бруцеллеза обусловлена, прежде всего, активностью эпизоотий среди сельскохозяйственных животных. Персистенция L-форм бруцелл в организме человека и животных с периодической реверсией в типичную S-форму может быть одной из причин непрогнозируемых эпизоотолого-эпидемиологических осложнений. При выявлении неманифестных очагов бруцеллеза и расшифровки атипичного течения заболевания у людей большое значение имеет информативность и результативность применяемых лабораторных методов диагностики. Несмотря на многолетнее изучение роли измененных форм возбудителя в эпизоотическом и эпидемическом процессах, проблема лабораторной диагностики бруцеллеза, обусловленного возбудителем в L-форме, далека от завершения. Бруцеллы в L-форме в сравнении с типичными формами обладают пониженной вирулентностью, но способны вызывать развитие инфекционного процесса у лабораторных и сельскохозяйственных животных — основного

источника инфекции [1, 4, 6, 7, 11]. Ранее показано, что индекс инфицирования (ИИ) при заражении морских свинок бруцеллами в L-форме колебался в значительных пределах (5,5 — 28 %). Для бруцелл в S-форме ИИ был значительно выше и составлял 73,7 — 79 % [1, 11]. Отмечено также, что наиболее интенсивное развитие бруцеллезной инфекции, обусловленной возбудителем в L-форме, авторы наблюдали через 15 суток после заражения (ИИ — 22,2 %, через 30 и 45 суток — 11,1 и 7,4 % соответственно) [6], результаты бактериологического исследования через 4, 6, 8 и 10 месяцев были отрицательными, при этом титры специфических антител в сыворотках крови сохранялись до 10 месяцев [3].

Цель работы — оценка результативности бактериологического, серологического методов и ПЦР при экспериментальном бруцеллезе, вызванном S- и L-формами возбудителя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для заражения животных использовали штамм *Brucella abortus* И-206 в S- и L-форме (5-й и 12-й пас-

саж) [9]. Доза заражения составляла 10^8 микробных клеток (м.к.). Морских свинок для эксперимента (84 головы весом по 250 – 300 г) получали из лаборатории подопытных животных (ФКУЗ Иркутский НИПЧИ Роспотребнадзора). Материал для исследования животных (по 5 голов в группе) отбирали в ранние сроки после заражения (1-е, 2-е, 3-и и 7-е сутки) и отдаленные сроки (1, 2, 3, 6, 12 месяцев). Идентификацию культур бруцелл, выделенных из организма экспериментальных животных, проводили в реакции слайд-агглютинации и объемной РА с поливалентными бруцеллезными сыворотками против S- (ФКУЗ Ставропольский НИПЧИ) и L-форм бруцелл [10]. В ПЦР использовали коммерческую тест-систему для детекции *Brucella spp.* (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб») в соответствии с инструкцией изготовителя и действующими методическими указаниями [5]. Серологические исследования проводили с диагностиком бруцеллезным для РА (ФКУЗ Ставропольский НИПЧИ) и корпускулярным L-антигеном из *B. abortus* И-206 в L-форме (ФКУЗ Иркутский НИПЧИ Роспотребнадзора). Все манипуляции с патогенными микроорганизмами выполняли с соблюдением соответствующих мер безопасности [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Бактериологическим методом исследовали экспериментальных животных, зараженных S- и L-культурами *B. abortus* И-206 в дозе 10^8 м.к. В ранние сроки после заражения S-формой возбудителя положительные результаты составляли: через сутки – 66,6 %, через двое – 83 %, через трое – 75 %, через семь – 75 %. В среднем в ранние сроки S-формы бруцелл выделяли в 74,9 % случаев, в том числе из лимфатических узлов и паренхиматозных органов (генерализованная форма инфекции). После инфицирования L-формой (5-й и 12-й пассажи) бруцеллы выделяли через сутки в 8,3 % случаев, через двое – 4,15 %, через трое – 20,8 %, через семь – 12,5 %. На отдаленных сроках после инфицирования бактериологические находки

S-форм заражающего штамма регистрировались лишь в лимфатических узлах (регионарная форма инфекции) через 1 месяц в 66,6 % случаев и через 6 месяцев – в 8,3 %, через 2, 3, 12 месяцев результаты бактериологического исследования были отрицательными. L-формы выделены только через месяц после заражения в 8,3 % случаев (рис. 1).

При исследовании органов экспериментальных животных с помощью ПЦР положительные результаты при заражении S-формой бруцелл получены через сутки в 25 % случаев, через двое – 16,6 %, через трое – 16,6 %, через семь – 25 %. При исследовании проб органов от животных, зараженных L-субкультурами бруцелл, положительные результаты составили через сутки 25 %, через двое – 29,2 %, через трое – 20,8 %, через семь – 12,5 %, что сопоставимо с результатами при инфицировании S-формой возбудителя, вызывающего инфекционный процесс.

На отдаленных сроках после заражения результаты ПЦР у животных, зараженных S-формой бруцелл, через месяц были отрицательными, через два месяца – положительные в 33,3 % случаев, через три – в 77,7 %, через шесть – в 22,2 %, в том числе при исследовании паренхиматозных органов (генерализованная форма инфекции). Для L-форм эти показатели составили через месяц 11,1 %, через два – 11,1 %, через три – 22,2 %, через шесть – 22,6 % с положительными находками в паренхиматозных органах (рис. 2). Полученные данные позволяют рекомендовать ПЦР как сигнальный ускоренный метод лабораторной диагностики как типичного, так и атипичного бруцеллеза, дополняя результаты тестирования общепринятыми методами.

Положительные серологические реакции отмечали до 12 месяцев после заражения S- и L-формами бруцелл, при этом перекрестных реакций не отмечено. Через 7 суток после заражения положительные результаты серологического исследования сывороток крови животных, зараженных S-формой бруцелл, составили 100 % случаев, а L-форм – 83,3 %. В отдаленные после заражения

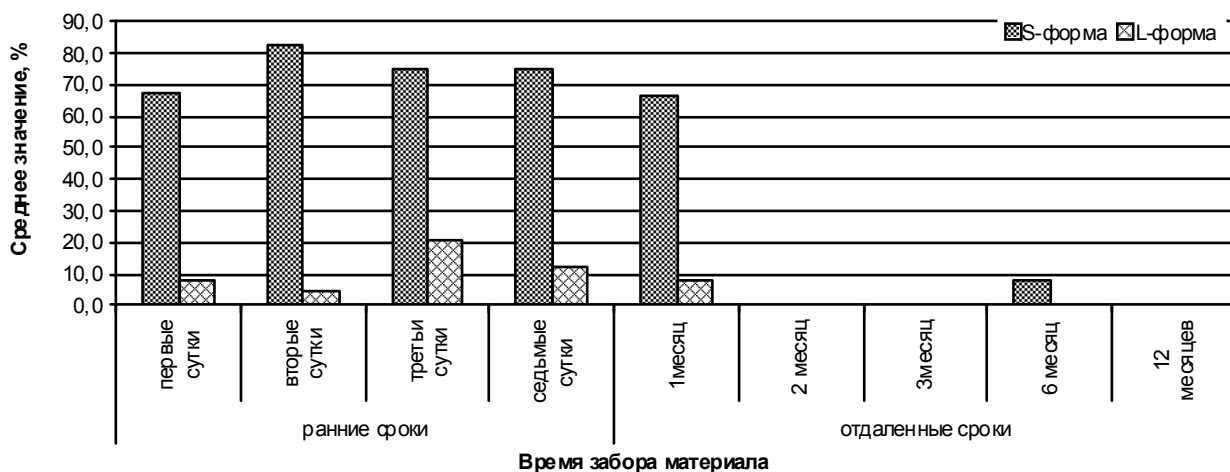


Рис. 1. Результаты бактериологического исследования при экспериментальном бруцеллезе обусловленном возбудителем в S- и L-формах.

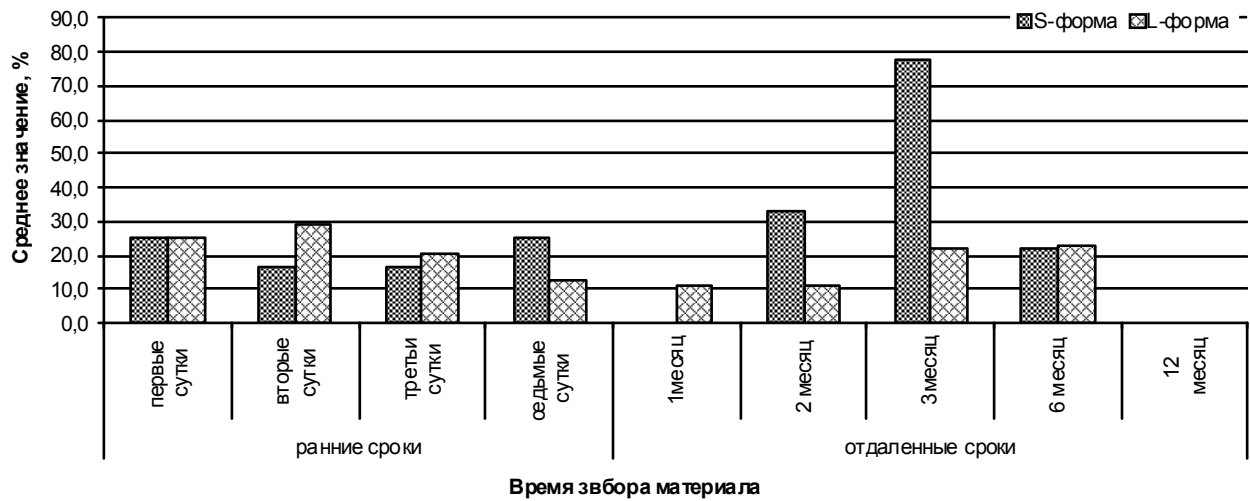


Рис. 2. Результаты ПЦР при экспериментальном бруцеллезе обусловленном возбудителем в S- и L-формах.

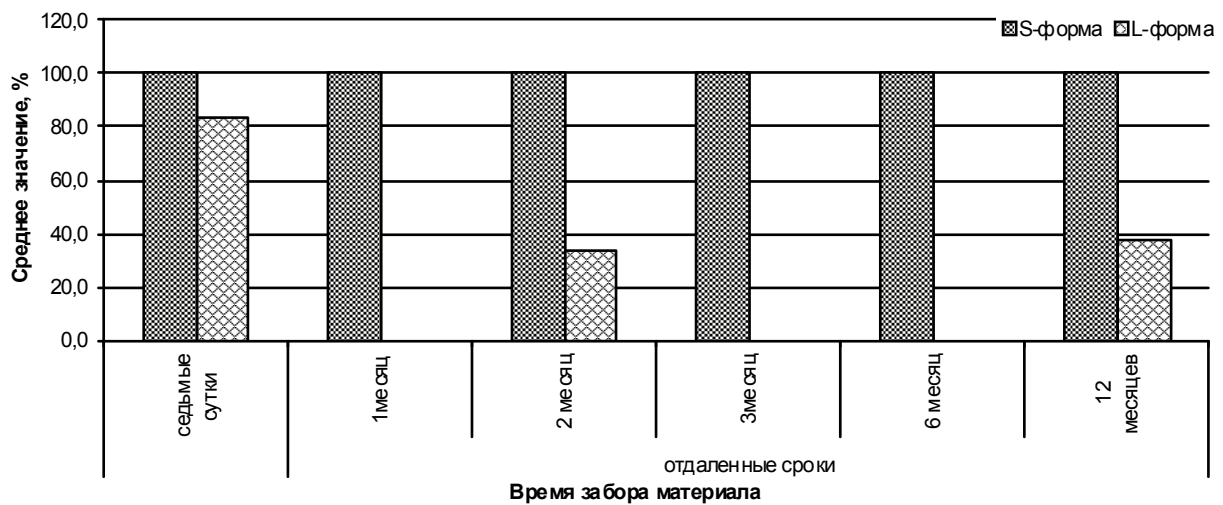


Рис. 3. Результаты слайд-агглютинации сывороток крови морских свинок при экспериментальном бруцеллезе обусловленном возбудителем в S- и L-формах.

сроки серопозитивные результаты получены через 1, 2, 3, 6 и 12 месяцев в 100 % случаев (S-форма). У животных, зараженных L-формами бруцелл, специфические антитела выявлены через 2 и 12 месяцев — 33,3 % и 37,5 % соответственно (рис. 3).

Показано, что бруцеллы в L-форме, хоть и в меньшей степени, чем бруцеллы в S-форме, способны вызывать инфекционный процесс у экспериментальных животных с длительной персистенцией, что подтверждается положительными результатами бактериологического исследования (через месяц после заражения) и согласуется с литературными данными [1, 2, 4, 6, 11]. Большинство культур бруцелл в L-форме выделялись в ранние сроки после заражения, что также отмечено другими авторами [6]. Через трое суток количество изолированных культур составляло 20,8 %, через семь — 12,5 %, что важно учитывать при изоляции атипичных культур от больных людей и животных. Результаты выделения бруцелл в S-форме в ранние сроки после заражения составили 75—83 %, в том числе через месяц — 66,6 %, что также согласуется с данными других

авторов [1, 11]. Количество бактериологических находок к 6 месяцам снизилось до 8,3 %.

Положительные в ПЦР результаты проб от зараженных возбудителем в L-форме экспериментальных животных, позволяют считать ПЦР перспективным ускоренным методом лабораторной диагностики атипичного бруцеллеза, дополняя результаты тестирования общепринятыми методами. Положительные результаты слайд-агглютинации сывороток крови морских свинок с S- и L-диагностикумами регистрировали до 12 месяцев после заражения (срок наблюдения), при этом не отмечено перекрестных реакций, что свидетельствует об их высокой специфичности и возможности использования в комплексе диагностических тестов при совершенствовании системы эпидемиологического надзора за бруцеллезом.

Полученные результаты, свидетельствуют о возможности дальнейшего совершенствования системы эпидемиологического надзора за бруцеллезом с использованием комплекса методов лабораторной диагностики, что позволит более

объективно оценивать эпизоотолого-эпидемиологическую ситуацию в очагах инфекции, в том числе обусловленную L-формами возбудителя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Базилов И.А. L-трансформация бруцелл // Эпидемиол., микробиол. и иммунол. бактериальных и вирусных инфекций: Тез докл. обл. науч. конф. молодых ученых. — Ростов-на-Дону, 1989. — С. 5—8.
2. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности): Санитарные правила. СП 1.3.1285 — 03. — М., 2003. — 85 с.
3. Вершилова П.А., Грекова Н.А., Толмачева Т.А. Персистенция бруцеллезных L-культур в организме экспериментального животного и длительность иммунитета // Вестн. АМН СССР. — 1985. — № 3. — С. 10—13.
4. Изучение роли L-форм бруцелл, их ревертантов и исходных культур / И.Ф. Таран, Б.П. Цыбин, А.А. Крылова [и др.] // Ж. микробиол. — 1986. — № 6. — С. 39—43.
5. Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I — II групп патогенности: Метод. указ., МУ 1.3.1794-03. — М., 2003. — 39 с.
6. Островская Н.Н., Толмачева Т.А. Вирулентность для морских свинок L-форм бруцелл вида *Abortus* // Ж. микробиол. — 1974. — № 6. — С. 146—147.
7. Ощепков В.Г., Гордиенко Л.Н. L-трансформация бруцелл — значение в эпизоотическом процессе и эволюции рода *Brucellae* // Вет. патология. — 2004. — № 4. — С. 36—46.
8. Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей. Профилактика инфекционных болезней. Инфекции общие для человека и животных: Метод. указ., МУ 3.1.7.1189-03. — М., 2003. — 38 с.
9. Способ получения L-субкультур штамма *Brucella abortus* И-206: пат. 2263142 Рос. Федерация / Михайлов Л.М., Калиновский А.И., Андреевская Н.М. и др. — 2005. — Бюл. № 30.
10. Способ получения диагностической агглютинирующей сыворотки против бруцелл в L-форме: пат. 2242765 Рос. Федерация / Михайлов Л.М., Калиновский А.И., Андреевская Н.М. и др. — 2004. — Бюл. № 35.
11. Толмачева Т.А. Судьба L-форм бруцелл в организме (экспериментальные данные) // Матер. Всесоюз. науч.-практ. конф. по бруцеллезу: Тез. докл. — М. — 1978. — С. 58—60.

Сведения об авторах

Михайлов Леонид Михайлович — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела зоонозных инфекций ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора (6664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; тел.: 8 (3952) 22-01-35; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru)

Калиновский Александр Иннокентьевич — доктор медицинских наук, заведующий отделом зоонозных инфекций, старший научный сотрудник ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора

Баранникова Наталья Леонидовна — врач-бактериолог отдела зоонозных инфекций ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора

Шестопапов Михаил Юрьевич — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела микробиологии чумы ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора

Андреевская Нина Михайлова — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-производственного отдела ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора

Михайлова Вера Александровна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-производственного отдела ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора

Кузнецов Владимир Ильич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-производственного отдела ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора

Атлас Александр Гилельевич — заведующий научно-производственным отделом ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора

Балахонов Сергей Владимирович — доктор медицинских наук, профессор, директор ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора