

Л.М.Михайлов¹, А.И.Калиновский¹, Н.Л.Баранникова¹, В.И.Кузнецов¹, А.Г.Атлас¹, Н.М.Андреевская¹, В.А.Михайлова¹, О.Г.Татарникова¹, Л.Н.Гордиенко², Е.В.Куликова², С.В.Балахонов¹

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ БРУЦЕЛЛ В L-ФОРМЕ

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск; ²ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт бруцеллеза и туберкулеза животных Российской академии сельскохозяйственных наук», Омск

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что разработанные сухие питательные среды на основах печеночного настоя и гидролизата сороги обладают высокой чувствительностью, полностью ингибируют рост бруцелл в S-форме и могут быть использованы для выделения, культивирования и накопления бруцелл в L-форме при бактериологической диагностике бруцеллеза. Питательные среды не нуждаются в корректировке pH, не требуют фильтрации и автоклавирования, удобны при транспортировке, что позволяет использовать их для работы в стационарных и полевых условиях.

Ключевые слова: бруцеллы в S- и L-формах, питательные среды, чувствительность.

L.M.Mikhailov¹, A.I.Kalinovsky¹, N.L.Barannikova¹, V.I.Kuznetsov¹, A.G.Atlas¹, N.M.Andreevskaya¹, V.A.Mikhailova¹, O.G.Tatarnikova¹, L.N.Gordienko², E.V.Kulikova², S.V.Balakhonov¹

CONSTRUCTION OF NUTRIENT MEDIA FOR L-FORM BRUCELLA

¹Irkutsk Research Anti-Plague Institute, Irkutsk; ²Russian Research Institute of Animal Brucellosis and Tuberculosis of RAAS, Omsk

Dry nutrient media on the basis of hepatic infusion and Siberian roach hydrolyzate are constructed. Experimental data demonstrate that these media possess high sensitivity, completely inhibit growth of S-form *Brucella*, do not require pH adjustment, filtration and autoclaving. They can be used for isolation, cultivation and accumulation of L-form *Brucella* for bacteriological diagnostics of brucellosis. As these media are accessible for transportation, they are applicable for stationary and field conditions.

Key words: S- and L-form *Brucella*, nutrient media, sensitivity.

Одной из причин длительного существования неманифестных очагов бруцеллеза может быть циркуляция в них возбудителя в L-форме. Недостаточные знания об условиях образования L-форм бруцелл, методах их выделения и идентификации не позволяют в полной мере оценить их значение в эпизоотических и эпидемических проявлениях [6, 10].

До настоящего времени известны лишь единичные случаи заболевания людей бруцеллезом, которые подтвердились выделением культур бруцелл в L-форме [10, 11]. Известно, что для выделения и культивирования бруцелл в L-форме использовали питательные среды различного состава [5, 9, 11]. Согласно существующим методическим указаниям для выделения бруцелл в L-форме рекомендованы питательные среды на основе печеночного настоя или смеси мясной воды и пептона Мартена [8]. В настоящее время серийный выпуск этих сред отсутствует. Разработка питательных сред для бактериологической диагностики атипичного бруцеллеза, обусловленного возбудителем в L-форме, позволит более целенаправленно проводить диагностические, лечебные и профилактические мероприятия. Поэтому совершенствование существующих и разработка новых питательных сред для выделения бруцелл в L-форме необходимы и актуальны [2, 3, 7, 9].

Целью работы является разработка питательных сред для бруцелл в L-форме.

Материалы и методы

В качестве контрольных питательных сред применяли: эритроцит-агар (ТУ 9365-046-14237183-09), агары Хоттингера и мясопептонный, для приготовления экспериментальных серий питательных сред для бруцелл в L-форме – мясную воду, печеночный настой, триптический гидролизат сороги (*Rutilus rutilus lacustris*), гидролизат селезенки крупного рогатого скота (КРС), перевар сердечной мышцы. Добавками служили: пептон ферментативный сухой для бактериологических целей (ГОСТ 13805-76), автолизат пекарских дрожжей, аммоний молибденовокислый (ГОСТ 3765-78, ч.д.а.), глицерин (ГОСТ 6259-75, ч.д.а.), глюкоза (ГОСТ 6038-79, ч.д.а.), кристаллический фиолетовый (ТУ 6-09-4119-75), магний сернокислый (ГОСТ 4523-77, х.ч.), натрия гидроокись (ГОСТ 4328-77, х.ч.), натрий лимонно-кислый (ТУ 5-09-22-48-77), натрий хлористый (ГОСТ 4233-77, ч.д.а.), калий хлористый (ГОСТ 4234-77), сахароза (ГОСТ 5833-75, ч.д.а.), крахмал, линкомицин, витамин В₁, бициллин-3, налидиксовая кислота, нормальная лошадиная сыворотка (НЛС), агар микробиологический (ГОСТ 17206-84).

Питательную среду на основе гидролизата сороги для выделения и накопления L-форм бруцелл готовили смешиванием сухих компонентов [4]. Навеску сухой среды растворяли в дистиллирован-

ной воде, доводили до кипения при помешивании, кипятили в течение 2–3 мин, охлаждали до температуры (40±5) °С, добавляли НЛС (10–20 %), тщательно взбалтывали и разливали в стерильные чашки Петри или бактериологические пробирки.

Основу печеночной питательной среды для выделения и культивирования L-форм бруцелл готовили смешиванием в шаровой мельнице типа «Лабор»-2182 сухих компонентов: печеночного настоя, пептона ферментативного, сахарозы, магния сернокислого, натрия гидроксида, кристаллического фиолетового и агара микробиологического.

Для получения L-трансформантов использовали 18 штаммов бруцелл разных биоваров из коллекции музея живых культур Иркутского противочумного института; для определения скорости роста и показателя прорастания на питательных средах – 89 штаммов бруцелл в S- и L-формах и 24 экспериментальные культуры в L-форме, предоставленные Всероссийским научно-исследовательским институтом бруцеллеза и туберкулеза животных, а также штамм *Brucella abortus* И-206 в L-форме, полученный нами экспериментально, и два штамма в L-форме, изолированных от больных хроническим бруцеллезом людей.

Контролем ингибирующих свойств среды в отношении S-форм бруцелл служили: *B. melitensis* 16 М, *B. abortus* 544, *B. suis* 1330 (референтные) и *B. rangiferi* И-181, *B. abortus* И-206 в S-форме. Работу с микроорганизмами проводили согласно Санитарным правилам [1].

Интенсивность роста бруцелл на питательных средах оценивали по четырехкрестовой схеме: четыре – сплошной рост; три – более 30 колоний образующих единиц (КОЕ); два – от 10 до 30 КОЕ, один – до 10 КОЕ.

Для получения в лабораторных условиях бруцелл на различных стадиях L-трансформации использовали бициллин-3 в нарастающих концентрациях от 10 до 13000 ЕД/мл питательной среды.

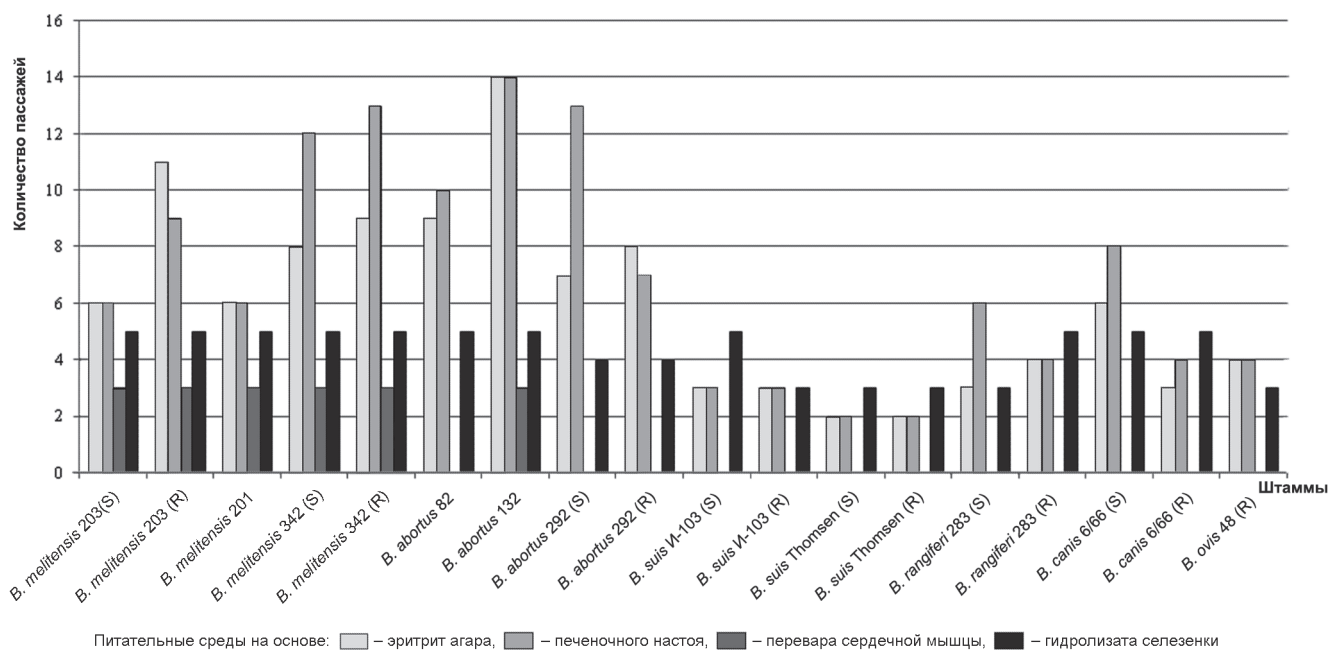
Результаты и обсуждение

При подборе оптимального состава компонентов питательных сред для получения бруцелл в L-форме приготовлены и испытаны среды на основах: печеночного настоя, рекомендуемого для выделения и культивирования L-форм бруцелл [8]; перевара сердечной мышцы; эритроцит-агара и ранее не апробированного гидролизата из непищевого сырья – селезенки КРС.

При пересевах 18 штаммов бруцелл разных видов наиболее глубокий и быстрый процесс L-трансформации отмечен на печеночном агаре, где количество пассажей составило 14 в течение 123 сут с интервалом от 8 до 13 сут. На эритроцит-агаре количество пассажей также составило 14, но в течение 176 сут с интервалом от 8 до 18 сут. Время появления видимого роста бруцелл в L-форме, по сравнению с S-формами, увеличивалось в зависимости от концентрации бициллина-3 и использованной питательной среды. При посевах всех штаммов бруцелл на среды с переваром сердечной мышцы и селезенки КРС после 5-го пассажа рост отсутствовал.

Зависимость образования L-трансформантов бруцелл с использованием различных питательных сред отражена на рисунке.

Результаты сравнительного изучения чувствительности опытной серии среды на основе гидролизата селезенки КРС и стандартных сред: агаров Хоттингера и мясопептонного (МПА) при посеве двух референтных штаммов *B. abortus* 544, *B. me-*



Количество пассажей при L-трансформации бруцелл на различных питательных средах

Сравнительная чувствительность питательных сред при культивировании бруцелл

Штаммы	Посевная доза, м.к.	Количество выросших колоний (КОЕ)											
		агар на основе гидролизата селезенки КРС				агар Хоттингера				МПА			
		1	2	3	среднее	1	2	3	среднее	1	2	3	среднее
<i>B. melitensis</i> 16 М (реф.)	20	27	25	26	26	31	31	27	29,7	7	7	4	6
<i>B. abortus</i> 544 (реф.)	20	19	30	27	25,3	34	31	30	31,7	7	5	6	6
<i>B. abortus</i> И-206 (S)	20	23	21	26	23,3	23	17	20	20	4	5	7	5,3

litensis 16 М и эпизоотического *B. abortus* И-206 в S-форме обобщены в таблице .

Чувствительность питательной среды на основе гидролизата селезенки КРС при посевной дозе 20 м.к. *B. melitensis* 16 М, *B. abortus* 544, *B. abortus* И-206 (S) составила от 23,3 до 26 КОЕ, на агаре Хоттингера – 20–31,7 КОЕ, а на МПА – 5,3–6 КОЕ.

Из результатов таблицы следует, что питательная среда, приготовленная на основе гидролизата селезенки КРС, менее чувствительна, чем агар Хоттингера, но значительно чувствительнее МПА, что свидетельствует о перспективности дальнейшей разработки среды для выделения бруцелл из непещевого сырья.

Изучение влияния на процесс L-трансформации кормовых и пекарских дрожжей, добавленных в питательные среды на основах печеночного настоя, гидролизата селезенки КРС и эритрит-агара проводили с использованием штаммов *B. abortus* И-206 и *B. melitensis* 342. В качестве контроля служили вышеназванные питательные среды без добавок.

Отмечено, что на опытной среде на основе печеночного настоя наибольшее количество проведенных пассажей штамма *B. abortus* И-206 составило 14 за 177 сут, *B. melitensis* 342 – 12 пассажей за 151 сут. На контрольной среде количество пассажей для обоих штаммов не превысило 9 за 102 сут. На питательной среде, приготовленной на основе гидролизата селезенки КРС с добавлением кормовых дрожжей, с обоими штаммами бруцелл количество пассажей составило 9 в течение 106 сут. Добавление в питательную среду пекарских дрожжей не привело к существенному увеличению пассажей по сравнению с контролем. При испытании эритрит-агара наибольшее количество пассажей проведено у *B. abortus* И-206 – 10 за 160 сут и *B. melitensis* 342 – 6 за 57 сут, а добавление в среду пекарских и кормовых дрожжей снизило их до 4–5 за 14–21 сут.

Изучено влияние различных концентраций пептона (0,5, 1, 2 %) на процесс L-трансформации, осмотических стабилизаторов: магния серноокислого (0,5, 1, 2 %), натрия хлористого (0,5, 1 %); глицерина (1 %) и сахарозы (10, 15 %). Наиболее оптимальным является содержание в питательной среде пептона – 1 %, магния серноокислого – 2 %, сахарозы – 10 %, глицерина – 1 %.

Добавление молибденово-кислого аммония и натрия лимонно-кислого в концентрациях 0,03, 0,05, 0,07, 0,1 % как стимуляторов роста бруцелл в

L-форме не привело к желаемому результату.

При конструировании сред для культивирования бруцелл в L-форме использовали агар микробиологический в концентрациях: 0,8, 0,9, 1 и 1,2 %. Оптимальная прочность агарового студня достигнута при добавлении 1 % агара.

Минимальную подавляющую концентрацию бициллина-3 на рост штаммов *B. melitensis* 16 М, *B. abortus* 544, *B. suis* 1330 (референтные), *B. abortus* И-206 в S- и L-формах определяли в повторных опытах при посеве петлей на питательную среду на основе печеночного настоя с добавлением 20 % НЛС. Было установлено, что добавление в питательные среды бициллина-3 в концентрациях 3000 ЕД/мл и выше ингибирует рост бруцелл в S-форме и не влияет на L-форму.

Таким образом, сконструированная сухая питательная среда на основе печеночного настоя представляет собой светло-коричневый аморфный порошок с физико-химическими показателями: рН 7,2±0,2, аминный азот – 0,7 %, потеря в массе при высушивании не более 7 %, прочность студня 505 г. Для приготовления питательной среды для бруцелл в L-форме навеску, указанную на этикетке, расплавляют в литре дистиллированной воды и после охлаждения до температуры (40±5) °С вносят стерильные глицерин (1 %), НЛС (20 %) и бициллин-3 (3·10⁷ ЕД). При посеве возбудителя бруцеллеза в L-форме в концентрации 5·10² м.к./мл появлялись мелкие колонии синего цвета (за счет содержания в среде кристаллического фиолетового) на 5-е сутки, а при посеве 10² м.к./мл на 7-е. Показатель прорастания L-форм бруцелл на среде составил 25,2–33,3 %. Роста бруцелл в S-форме не отмечено.

При разработке более дешевой питательной среды для выделения и накопления бруцелл в L-форме опытным путем подобран ее оптимальный состав, который содержит гидролизат сороги, глюкозу, цистеин, тиамин хлорид, крахмал, магния сульфат, налидиксовую кислоту, линкомицин, агар-агар, гидроокись натрия, НЛС, воду дистиллированную. Приготовлено 4 экспериментальных серии среды, в качестве контроля использовали коммерческую питательную среду для выделения и культивирования бруцелл сухую (эритрит-агар – ТУ 9365-046-14237183-09). Для улучшения результатов визуализации роста бруцелл в среду добавляли налидиксовую кислоту (0,04–0,05 г/л), которая оставляет ее прозрачной в отличие от бициллина-3. Рост бруцелл в L-форме на

плотной питательной среде составил 30–33 % КОЕ, на полужидкой – из пяти клеток, с полной ингибицией роста бруцелл в S-форме.

Изучение влияния сконструированных плотных питательных сред на стабильность свойств бруцелл в L-форме, полученных экспериментально и выделенных от больных людей, показало, что на сухой питательной среде на основе печеночного настоя экспериментальные L-трансформанты бруцелл сохраняли свои свойства при периодических пересевах без изменений в течение десяти лет (срок наблюдения), культуры, выделенные от людей, – трех лет (срок наблюдения), а на среде из основы гидролизата сороги – не более двух месяцев. Поэтому рекомендовано использовать среду на основе печеночного настоя для выделения и культивирования бруцелл, а среду на основе гидролизата сороги – для выделения и накопления.

Испытание интенсивности и скорости роста бруцелл на разработанных сухих питательных средах для выделения, накопления и культивирования бруцелл в L-форме провели с использованием 24 экспериментальных культур бруцелл в L-форме и 89 эпизоотических штаммов бруцелл в S- и L-формах, в том числе выделенных от северных оленей.

Результаты исследования показали, что на среде из основы гидролизата сороги у всех экспериментальных штаммов в L-форме отмечался интенсивный рост с оценкой на четыре креста через 24 ч, что составляло 100 %; на среде на основе печеночного настоя – на один-два креста – (95,8±4,1) % штаммов. Через 72 ч на среде из основы печеночного настоя интенсивность роста возросла и оценивалась на четыре креста у (54,2±10,2) %, на три – 37, (5±9,9) % и на два – у (8,3±5,6) % штаммов.

Штаммы бруцелл в L-формах, выделенные от северных оленей и агглютинирующиеся L-бруцеллезными сыворотками, росли на обеих средах, но значительно интенсивнее на питательной среде из основы гидролизата сороги, на которой рост штаммов бруцелл через 24 ч культивирования составлял (85,5±3,7) %, через 48 ч – (87,6±3,5) %, через 72 ч – (88,8±3,3) % и оценивался на четыре креста. Интенсивность роста штаммов на печеночной среде зависела от срока культивирования: через 24 ч – на один крест, что составляло (67,4±5,0) %, на два креста – (13,5±3,6) %, на три креста – (5,6±3,4) %, на четыре – (2,2±1,6) %. Через 48 ч у (34,8±5,0) % рост штаммов оценивался на один крест, на два креста – (41,6±5,2) %, на три креста – (7,9±2,9) %, на четыре – (9,0±3,0) %. Рост культур через 72 ч культивирования составил у (19,1±4,2) % на один крест, на два креста – (23,6±4,5) %, на три креста – (37,1±5,1) %, на четыре – (4,6±3,7) % штаммов. Отмечен рост у (2,24±1,6) % культур, взаимодействующих только с S-антисывороткой на один крест и при взаимодействии культур с S-, R- и L-сыворотками в (17,97±0,2) % случаях. Штаммы, взаимодействующие с S-бруцеллезной сывороткой на два и более

креста, на испытуемых средах не росли.

Таким образом, сконструированные питательные среды обеспечивают высокую скорость и интенсивный рост экспериментальных и эпизоотических L-трансформантов бруцелл, полностью препятствуют росту бруцелл в S-форме, при этом более интенсивный рост отмечен на питательной среде из основы гидролизата сороги.

Апробирование сконструированных питательных сред проводили при экспериментальном бруцеллезе у 60 морских свинок, которых заражали бруцеллами в S-, L-формах и их смесью в дозах: 10^9 , $2 \cdot 10^{10}$ и $4 \cdot 10^{10}$ м.к./мл. Животных хлороформировали на 1, 2, 7, 14 и 30-е сутки и проводили высеивание из лимфатических узлов, селезенки и крови. Наибольший индекс инфицированности (18) выделенных культур бруцелл в L-форме наблюдался на 14-е сутки после заражения. На среде из основы гидролизата сороги рост появился на 5-е, а на печеночной среде на 13-е сутки. S-варианты бруцелл изолированы через 30 сут после заражения S- и смесью S- и L-форм только на эритроцит-агаре (контроль), на сконструированных питательных средах роста не отмечено.

При бактериологической диагностике материала от больных хроническим бруцеллезом людей изолированы две гемокультуры, которые были аналогичны бруцеллам в L-форме по культурально-морфологическим, тинкториальным свойствам, результатам фазово-контрастного микрофотографирования, серологического исследования и ПЦР.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что предлагаемые питательные среды на основе гидролизата сороги [4] и печеночного настоя [5] для выделения, культивирования и накопления бруцелл в L-форме обладают более высокой чувствительностью и селективностью по сравнению со средой, рекомендуемой ранее [8].

Таким образом, питательные среды для выделения, культивирования и накопления бруцелл в L-форме, приготовленные на сухих основах печеночного настоя и гидролизата сороги, обладают высокой чувствительностью, полностью ингибируют рост бруцелл в S-форме и могут быть использованы для бактериологической диагностики бруцеллеза, обусловленного возбудителем в L-форме. Разработанные питательные среды не нуждаются в корректировке pH, не требуют фильтрации и автоклавирования, удобны при транспортировке, что позволяет использовать их как в стационарных, так и полевых условиях. Наиболее эффективной для культивирования L-форм бруцелл является питательная среда на основе печеночного настоя, а для выделения и накопления – на основе гидролизата сороги.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безопасность работ с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). СП 1.3.1285-03. М.; 2003. 82 с.
2. Зыкин Л.Ф., Васильев Д.А. L-формы возбудителей зооантропонозов. Ульяновск; 2000. 68 с.
3. Косилов И.А., Аракелян П.К., Димов С.К. и др. Бруцеллез сельскохозяйственных животных. Новосибирск; 1999. 343 с.

4. Михайлов Л.М., Маевский М.П., Кузнецов В.И., Калиновский А.И., Татарникова О.Г. Питательная среда для выделения и культивирования L-форм бруцелл. Патент 2415918 РФ, опубл. 10.04.2011. Бюл. № 10.

5. Михайлов Л.М., Калиновский А.И., Андреевская Н.М., Голубинский Е.П., Михайлова В.А., Репина Л.П. и др. Способ получения L-субкультур штамма *Brucella abortus* И-206. Патент 2263142 РФ, опубл. 27.10.2005. Бюл. № 30.

6. Михайлов Л.М., Калиновский А.И., Репина Л.П. и др. Эпидемиологическое и эпизоотологическое значение измененных форм бруцелл. Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2002; 3:49–53.

7. Ощепков В.Г., Копейкин И.Г., Степанов Е.М. и др. L-трансформация *B. ovis* на искусственных питательных средах и в организме овец. В кн.: Диагностика и профилактика инфекционных и инвазивных заболеваний сельскохозяйственных животных. Омск; 1986. С. 21–8.

8. Профилактика инфекционных болезней. Инфекции общие для человека и животных. Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза. МУ 3.1.7.1189-03. М.; 2003. 38 с.

9. Толмачева Т.А., Кац Л.Н. Биологические свойства и ультраструктура бруцелл в процессе L-трансформации и реверсии. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1977; 1:90–3.

10. Триленко П.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных. Л.; 1976. 279 с.

11. Nelson E.L., Pickett M.J. The cover of *Brucella* and their relation to *Brucella* phage. J. Infect. Disease. 1951; 8(3):226–32.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. [Safety of work with microorganisms of I–II pathogenicity (danger) groups. SR 1.3.1285-03]. М.; 2003. 82 p.

2. Zykin L.F., Vasil'ev D.A. [L-Forms of Zoonoses Agents]. Ul'yanovsk; 2000. 68 p.

3. Kosilov I.A., Arakelyan P.K., Dimov S.K. et al. [Brucellosis of Agricultural Animals]. Novosibirsk. 1999. 343 p.

4. Mikhailov L.M., Maevsky M.P., Kuznetsov V.I., Kalinovsky A.I., Tatarnikova O.G. [Nutrient media for L-form *Brucella* isolation and cultiva-

tion]. RF Patent 2263142.

5. Mikhailov L.M., Kalinovsky A.I., Andreevskaya N.M., Golubinsky E.P., Mikhailova V.A., Repina L.P. et al. [Method for obtaining *Brucella abortus* strain I-206 L-subcultures]. RF Patent 2263142.

6. Mikhailov L.M., Kalinovsky A.I., Repina L.P. et al. [Epidemiological and epizootiological significance of L-form *Brucella*]. Bul. RAMS. 2002; 3:49–53.

7. Oshchepkov V.G., Kopeikin I.G., Stepanov E.M. et al. [L-transformation of *B. ovis* on artificial nutrient media in the organism of sheep]. In: [Diagnostics and Prophylaxis of Infectious and Invasive Diseases of Agricultural Animals]. Omsk; 1986. P. 21–8.

8. [Infectious diseases prophylaxis. Infections common for both humans and animals. Brucellosis prophylaxis and bacteriological diagnostics. MR 3.1.7.1189-03]. М.; 2003. 38 p.

9. Tolmacheva T.A., Kats L.N. [Biological properties and ultrastructure of brucella in the process of L-transformation and reversion]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1977; 1:90–3.

10. Trilenko P.A. [Brucellosis of Agricultural Animals]. L.; 1976. 279.

Authors:

Mikhailov L.M., Kalinovsky A.I., Barannikova N.L., Kuznetsov V.I., Atlas A.G., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Tatarnikova O.G., Balakhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russia. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Gordienko L.N., Kulikova E.V. Russian Research Institute of Animal Brucellosis and Tuberculosis of RAAS, Omsk

Об авторах:

Михайлов Л.М., Калиновский А.И., Баранникова Н.Л., Кузнецов В.И., Атлас А.Г., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Татарникова О.Г., Балахонов С.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. 664047, Иркутск, ул. Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Гордиенко Л.Н., Куликова Е.В. Всероссийский научно-исследовательский институт бруцеллеза и туберкулеза животных Российской академии сельскохозяйственных наук. Омск.

Поступила 13.01.12.