

УДК 579.2:614.3

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ФОРМЫ CORYNEBACTERIM PSEUDOTUBERCULOSIS И ИХ ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА

Заболотных М. В., Колычев Н. М., Трофимов И. Г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Омский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина». Омск, Россия (644008 Омск, Институтская пл. 2), e-mail:omgauwse@gmail.com.

На основании собственных исследований определены основные фенотипические формы возбудителя казеозного лимфаденита овец и описаны их морфологические, тинкториальные, биохимические, патогенные и вирулентные свойства. При помощи световой и электронной микроскопии доказано разнообразие их клеточного состава, способов размножения и биохимической активности, что отражает структурную и функциональную вариабельность, свойственную коринебактериям. Полученные результаты исследований послужили основой для разработки бактериологической диагностики казеозного лимфаденита овец. Доказано, что *C. pseudotuberculosis* обладает не только вариабельностью фенотипических свойств, но имеет три и более морфологических варианта, адаптированных и циркулирующих среди овец на территории Западной Сибири.

Ключевые слова: коринебактерии, *C. pseudotuberculosis*, биологические свойства, фенотип, диссоциативные формы, питательные среды, тинкториальные свойства, генотипическая характеристика, казеозный лимфаденит овец, бактериологическая диагностика.

PHENOTYPIC FORMS OF CORYNEBACTERIM PSEUDOTUBERCULOSIS AND THEIR PRINCIPAL PROPERTIES

Zabolotnykh M. V., Kolytchev N. M., Trofimov I. G.

Omsk State Agrarian University. Institutskaya Sqr.,2, Omsk, 644008, Russia), e-mail:omgauwse@gmail.com.

On the basis of own researches the principal phenotypic forms of caseous lymphadenitis in sheep weredefined their morphological, biochemical, pathogenic and virulent properties weredefined. By means of light and electronic microscopy a variety of their cellular structure, ways of reproduction and biochemical activity was proved that reflects the structural and functional variability peculiar to Corynebacteria. The received results of researches have formed a basis for working out of bacteriological diagnostics of caseous lymphadenitis in sheep. It is proved that *C. pseudotuberculosis* possesses not only variability phenotypic in properties but also three and more morphological variants adapted and circulating in sheep on the territory of Western Siberia.

Keywords: Corynebacterim, *C. pseudotuberculosis*, biological properties, a phenotype, dyssociative forms, nutrient media, genotypic characteristic, caseous lymphadenitis in sheep, bacteriological diagnostics.

Введение

В настоящее время среди приоритетных программ ветеринарной науки и практики особое место занимает изучение возбудителей инфекционных болезней, общих для человека и животных, их биологической роли, циркуляции и адаптации в определенных эколого-географических зонах. Происходящая в последнее время трансформация возбудителей ряда инфекционных болезней, связанная с изменением основных морфологических, биохимических, антигенных, генетических свойств, усугубляется многообразием путей и способов их передачи, длительностью персистенции в зараженном организме, выживанием и накоплением микроорганизмов во внешней среде. Все вышеуказанное ставит на одно из первых мест проблемы, непосредственно связанные с бактериологической диагностикой редко встречающихся, трансформирующихся, атипичных форм во всем их

многообразии биологических свойств. Среди многочисленных заразных болезней имеются такие, биология возбудителя которых еще слабо изучена, а таксономическое положение постоянно изменяется. К подобному роду болезням относятся коринебактериозы и, в частности, казеозный лимфаденит (псевдотуберкулез) овец, этиологическим фактором, которого является *Corynebacterium pseudotuberculosis* [1–5]. Цель наших исследований: изучить основные свойства коринебактерий, выделенных от больных овец в Западной Сибири.

Материалы и методы. В лабораторных опытах использовали референтные штаммы *Corynebacterium pseudotuberculosis* № 146S; № 74R; № 209R; № 70R; депонирование в ВГНКИ в 1991 г. М. В. Заболотных, Н. М. Колычевым, И. Г. Трофимовым, а также культуры 37- I, 61-R, 69-S, 214-R, 220-R, 50-S, выделенные нами от больных овец в хозяйствах Омской области.

Выделение коринебактерий осуществляли путем прямых посевов на питательные среды: мясо-пептонный агар (МПА), сыворочно-теллуритовый агар (СТА), кровяной теллуритовый агар (КТА), рН сред 7,2-7,4. Морфологические тинкториальные и культуральные свойства выделенных культур изучали общепринятыми в микробиологии методами. Морфологию коринебактерий изучали при помощи светового, фазово-контрастного и электронного (ЭМ-125) микроскопов. Для выявления L-трансформации проводили посев культур на питательную среду Школьниковой в модификации Дорожковой (1984). Биохимические свойства коринебактерий изучали на жидких средах Гисса. Гемолитические свойства культур изучали на кровяном агаре по методу Н. Carne (1939) и МПБ с добавлением 5 % взвеси эритроцитов барана. Токсичные свойства коринебактерий изучали *in vitro* по методу М.М. Zaki (1965) и D.H. Burrell (1979). Патогенные и вирулентные свойства выделенных культур изучали на белых мышах, морских свинках и овцах породы советский меринос. Генотипические свойства изучали у 40 культур *C. pseudotuberculosis*, выделенных от овец Омской области. В качестве контроля использовали ДНК эталонных штаммов микобактерий (BCG) и бруцелл (шт. 19).

Результаты исследований и обсуждение. При бактериологическом исследовании патологического материала в 88 % случаях были выделены культуры в R- и S-формах, которые типировали как *C. pseudotuberculosis*. Кроме того, в органах и мышечной ткани в 46 % случаев обнаруживалась микрофлора из рода *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Escherichia* и сульфитредуцирующие кластридии.

Морфологические свойства. Коринебактерии представляли собой полиморфные неподвижные, не образующие спор и капсул палочки или овоиды, которые часто имели на концах клеток булабовидные утолщения и содержали неравномерно окрашивающиеся гранулы волютина. Чаще всего они располагались кучками, реже в виде китайских иероглифов, а иногда одиночно. Бактериальные клетки имели следующие размеры длины и ширины: палочковидные – 2,54-3,15 и 0,92-0,94, овоидные – 0,52-0,68 и 0,40-0,60, кокковые – 0,70-0,86 и 0,70-0,90 мкм соответственно. Электронно-микроскопические исследования *S. pseudotuberculosis* показали, что клетки имели округлую, овальную или слегка вытянутую формы. Микрокапсула была представлена тонким, осмиофильным мелкозернистым слоем, отделенным от клеточной стенки осмиофобным слоем шириной около 16,6 нм. В большинстве клеток выявлена пятислойная структура клеточной стенки 15–20 нм и трехслойная структура цитоплазматической мембраны. Цитоплазматическая мембрана асимметричная, переплазматическая зона расширена. Цитоплазма клеток коринебактерий была представлена мелко-гранулярным компонентом с зонами повышенной плотности размером 20–40 нм (рибосомы, полисомы). В различных частях клеток обнаруживали значительное количество внутрицитоплазматических мембранных структур, расположенных в непосредственной близости от плазмолеммы и сохраняющих с ней анатомическую связь. В ультратонких срезах коринебактерий нуклеоид был представлен небольшой, достаточно дифференцированной осмиофобной зоной, в которой располагались тяжи, образованные слипшимися нитями ДНК. На электронограммах коринебактерий выявлялись достаточно крупные и многочисленные включения – гранулы волютина, которые были представлены множеством зёрен различной величины 0,18–0,20 мкм, имели разрыхленную центральную часть и плотную осмиофильную периферию. Такие гранулы располагались вблизи от нуклеоида или на концах клеток. Деление коринебактерий происходило путем образования перетяжки с последующим ее расщеплением (рис. 1).

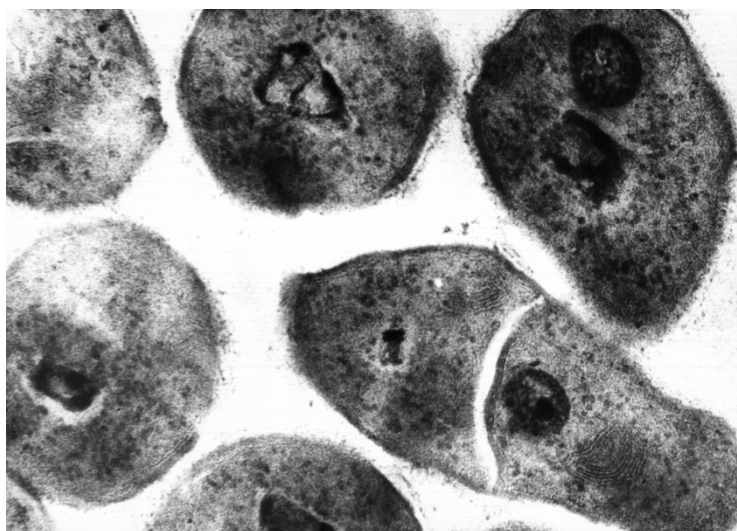


Рис. 1. *S. pseudotuberculosis* МК – микрокапсула, КС – клеточная стенка, ЦМ – цитоплазматическая мембрана, Н – нуклеоид, П – полисомы, Г – гранулы волютина, МС – мембранные структуры. Электронная микроскопия (x 60000)

R-формы коринебактерий отличались от S- и I-форм менее выраженным полиморфизмом, наличием мелкозернистой микрокапсулы, тонкой клеточной стенкой с более четким разделением на слои, трехслойной структурой цитоплазматической мембраны, образованием мембранных структур в цитоплазме. S-формы коринебактерий обладали достаточно выраженным полиморфизмом. Клеточная стенка четкого разделения на слои не имела и во многих клетках была представлена осмиофильной структурой с выделением более плотных наружного и внутреннего слоев, между которыми находился слой умеренной электронной плотности. Нуклеоид имел вид длинной узкой осмиофобной зоны, заполненной отдельными, собранными в пучки или слившимися нитями ДНК. В некоторых клетках нуклеоид представлен двумя фрагментами и смещен к периферии.

I-формы коринебактерий также имели выраженный полиморфизм. У двухсуточных агаровых культур преобладали округлые и овальные клетки, имеющие гомогенную клеточную стенку. Периплазматическое пространство и цитоплазматическая мембрана выражены четко. Цитоплазма большинства клеток мелкозернистая, рибосомы и полисомы расположены в ней равномерно. Нуклеоид имел неодинаковые размеры, ДНК располагалась чаще всего в виде рыхлого клубка. Деление таких клеток осуществлялось узкой светлой, слоистого строения перегородкой. Кроме типичных клеточных форм находили клетки с деструктивными изменениями клеточных стенок или совсем ее лишенных (L – формы). Редко встречались единичные лизированные светлые клетки.

Тинкториальные свойства. При окраске простым методом R, I, S-формы коринебактерий хорошо воспринимали фуксин Циля, генцианвиолет, бриллиантовый зеленый, метиловый синий, но окрашивались неравномерно, причем палочковидные формы окрашивались биполярно. Все бактерии позитивно окрашивались по методу Грама. Палочковидные формы и реже овоидные окрашивались интенсивнее по полюсам. При окраске по Нейссеру у всех культур выявляли метахроматические зерна (волютин), которые окрашивались в сине-фиолетовый цвет.

Культуральные свойства. При росте на твердых питательных средах при температуре +37 °C (pH 7,0-7,4) *S. pseudotuberculosis* образовывали колонии, характерные для R-, S- и I-форм. На мясо-пептонном агаре рост коринебактерий в 75 % случаев появлялся на первые сутки. Типичным для всех культур являлось образование мелких росинчатых

колоний. У культур R-форм эти колонии имели желто-серый цвет и матовую поверхность, у культур S-форм – серо-белый цвет и блестящую поверхность, у культур, отнесенных к переходным I-формам, колонии имели характеристики обеих форм. На вторые и третьи сутки культивирования размеры их увеличивались до 1,5–3,0 мм в диаметре и появлялись четко очерченные конфигурации. У колоний R-форм края были неравномерно зазубрены, центр слегка приподнят в виде купола, периферия радиально исчерчена, консистенция сухая, структура крупнозернистая. Эти фенотипические признаки (R-формы) были характерными для 201 культуры (37,7 %). Колонии S-форм *C. pseudotuberculosis* на вторые сутки культивирования достигали размеров от 1 до 4 мм в диаметре. Цвет их незначительно менялся от серо-белого к желтоватому. Поверхность колоний была блестящая, реже – матовая, куполообразная. Консистенция пастообразная, края ровные. Эти признаки были типичными для 301 культуры (56,4 %). Колонии I-форм имели характеристики обеих форм. Однако они были меньших размеров, от 1 до 2 мм. Такие формы колоний были характерными для 31 культуры (5,8 %). На МПБ рост культур появлялся через 24–30 часов. R-формы *C. pseudotuberculosis* на поверхности бульона образовывали нежную, ломкую, полупрозрачную серо-белую пленку и скудный, в виде манной крупы, осадок. Помутнения среды не отмечалось. При встряхивании пробирки пленка ломалась и быстро оседала на дно, при этом бульон оставался прозрачным. Культуры, отнесенные к S-формам, при росте на МПБ, в 93,1 % случаев образовывали нежную, еле заметную серовато-белую пленку на поверхности среды и осадок на дне в виде комочка ваты, в первые сутки культивирования. При этом среда была мутной. При встряхивании осадок и пленка легко разбивались и медленно оседали на дно пробирки. I-форма на поверхности мясо-пептонного бульона образовывала хорошо развитую пленку, скудный зернистый осадок и незначительное помутнение среды. Все культуры разных диссоциативных форм одинаково хорошо росли на твердых средах с добавлением 10 % дефибрированной крови крупного рогатого скота, лошадей и овец. На 10 % кровяном агаре через 24 часа наблюдали появление колоний серо-желтого цвета также R-, S-, I-формам. На месте появления колоний размерами 1–1,5 мм обнаруживали слаботемную зону β -гемолиза (83,6 %). На кровяном теллуритовом и сывороточном теллуритовом агаре (КТА, СТА и КТА с канамицином) через 24–48 часов обнаруживали колонии черного цвета в R-S-I-формам. При росте на среде Школьниковой у 28 культур коринебактерий (77,7 %) была выявлена L-трансформация в молодых, развивающихся и в стареющих культурах.

Биохимические свойства. Выделенные культуры *C. pseudotuberculosis* R-, S-, I-форм на 2–4 сутки ферментировали с образованием кислоты без газа глюкозу (93,2 %), галактозу

(69,5 %), мальтозу (71,7 %), сахарозу (73,2 %). Не ферментировали арабинозу, рамнозу и дульцит; не вызывали гидролиз крахмала, не восстанавливали лакмусовое молоко. Культуры R-формы, в отличие от S-, не ферментировали рафинозу. Сахаролитическая активность культур S-форм была разнообразна. Так, 97,2 % культур ферментировали глюкозу, 83,7 % – галактозу, 71,3 % – мальтозу, 76,9 % – сахарозу, 45,5 % – маннит. Протеолитические свойства культур R-, S-, I-форм были слабо выражены. Все исследованные культуры не образовывали индола, редко (5,1 %) образовывали сероводород и свертывали молоко (5,6 %), иногда на 5–6 сутки, вызывали гидролиз желатина (4,0 %). Образование каталазы отмечали у всех культур. Образование уреазы наблюдали только у R-форм в 4,4 % случаев. I- и S-формы были уреазоотрицательными. Культуры обладали слабыми редуцирующими свойствами. Не восстанавливали нитраты и лакмусовое молоко.

Токсигенные свойства. Наиболее выраженными токсигенными свойствами обладают S-формы *C. pseudotuberculosis*. R- и I-формы менее токсигенны. Понижение температуры культивирования на МПА до +2...+4 °С приводит к повышению токсикообразования всех форм культур. Заражение белых мышей фильтратом культур вызывало в 65 % случаев гибель на 3–8 сутки. При патологоанатомическом вскрытии у мышей обнаруживали отёки, кровоизлияния в брюшной и грудной полостях.

Вирулентные свойства. Расчётным путём были установлены заражающие и 50 % летальные дозы (LD 50) для мышей при заражении их культурами *C. pseudotuberculosis*. Для культур I-формы LD 50 составляла 112 тыс. м. т., для R-формы – 1,0 млн м. т., и S-формы – 21,8 млн м. т. Культуры коринебактерий в I-форме оказались более вирулентные, чем культуры в R- и S-формах. При вскрытии погибших мышей находили кровоизлияния в органах грудной и брюшной полостей и экссудат. На месте инъекции у шести мышей обнаруживали гнойные очаги размером с горошину, при бактериологическом исследовании были выделены ретрокультуры.

Патогенные свойства. Мыши, заражённые взвесью агаровых культур коринебактерий S-, R-, I-форм подкожно, в дозе $0,3 \times 10^6$ м. т. (по ОСМ), погибали на 3–15-е сутки. Культуры R-формы вызывали гибель животных в течение $7,63 \pm 0,46$, I-формы $7,17 \pm 0,63$, а S-формы – $9,33 \pm 0,93$ суток. Патологические изменения выявлены у 87,6 % исследуемых мышей. При этом в 100 % случаев изменения вызывали I-форма; в 97,3 % – R- и в 93,7 % – S-формы коринебактерий. При вскрытии обнаруживали серозно-геморрагическое воспаление в органах грудной и брюшной полостей. На месте введения культуры находили миллиарные узелки. Исходные культуры были выделены от 88,75 %

животных. При внутрибрюшинном заражении морских свинок в дозе $0,5 \times 10^6$ м. т. культурами различных форм гибель наступала в течение 5–20 суток. Характерные патологические изменения выявлены у 88,8 % исследуемых животных. При этом в 100 % случаев изменения вызывали R- и I-формы и в 91,6 % – S-формы коринебактерий. Для морских свинок более патогенной является R-форма микроба, I- и S-формы (при $p < 0,001$) – менее патогенны. Так, культуры R-формы вызывали гибель морских свинок на $9,7 \pm 1,39$, I-формы – на $14,6 \pm 1,8$ и S-формы – на $17,0 \pm 1,84$ суток. У погибших животных обнаруживали сильное истощение, при вскрытии – гнойно-фибринозный перитонит, гнойные очаги в печени, в брыжеечных лимфатических узлах на серозной оболочке брюшины, в паренхиме селезёнки, почках и семенниках. Из пораженных паренхиматозных органов выделяли исходную культуру.

Генотипическая характеристика коринебактерий. Исследованию подвергнуто 40 культур *C. pseudotuberculosis* в R-, S- и I-формах. Концентрация ДНК их варьировала в широких пределах от 140- до 700 мкг/мл. Средний показатель ГЦ ДНК 36 культур коринебактерий составил $54,2 \pm 1,9$ мол. % при минимальном значении 41,4, а максимальном – 76,7 мол. % ГЦ. По содержанию ГЦ штаммы были разбиты на три группы: для первой группы (R- формы) – $55,68 \pm 2,58$; для второй (S- формы) – $53,10 \pm 3,42$; для третьей (I-формы) – $50,72 \pm 5,17$ мол. %. По критерию Стьюдента не установлено достоверных различий данных этих групп по нуклеотидному составу. Результаты реакции ДНК-ДНК гибридизации коринебактерий показали, что тесную генетическую группу с репером 70R образуют два штамма: 70S и 37I с уровнем гомологии 94–100 %. Гомология нуклеотидных последовательностей ДНК, штамма 70R и его диссоцианта 70S, с большой степенью свидетельствуют об их принадлежности к одному и тому же виду микроба. Результаты исследования ГЦ и ДНК-ДНК гибридизации в полной мере подтверждают генетическое родство R-, S-, I-форм коринебактерий, циркулирующих в Западной Сибири.

Заключение. Возбудитель казеозного лимфаденита овец – *C. pseudotuberculosis* обладает не только вариабельностью фенотипических свойств, но имеет три и более морфологических варианта. Полученные данные свидетельствуют о биологической неоднородности популяций *C. pseudotuberculosis*, циркулирующих среди овец на территории Западной Сибири. Изменчивость данного возбудителя и высоко адаптивные механизмы в эволюционно сложившемся процессе жизнедеятельности позволяют сохранять его как биологический вид, и способствует изменению характера и проявления инфекционных болезней с возникновением новых, скрытых, нетипичных и недиагностируемых форм.

Список литературы

1. Колычев Н. М. Казеозный лимфаденит овец и биологические свойства возбудителя // Эпизоотология, диагностика, лечение и профилактика инфекционных и инвазионных болезней животных: Сб. науч. тр. / ОмСХИ/ Н. М. Колычев, М. В. Заболотных. – Омск, 1991. – С. 4-9.
2. Колычев Н. М. Казеозный лимфаденит (псевдотуберкулез) овец / Н. М. Колычев, И. Г. Трофимов. – Омск: Ом. обл. тип., 1993. – 214 с.
3. Колычев Н. М. Характеристика популяций возбудителя казеозного лимфаденита овец/ Н. М. Колычев, Л. В. Гежес, Е. В. Лебеденко, М. В. Заболотных // Ветеринария. – 2002. – № 9. – С. 20-23.
4. Колычев Н. М. Биология коринебактерий / Н. М. Колычев, М. В. Заболотных. – Омск: Изд-во ФГОУ ВПО ОмГАУ, 2008. – 100 с.
5. Колычев Н. М. Устойчивость возбудителя казеозного лимфаденита овец / Н. М. Колычев, А. В. Заболотных, М. В. Заболотных, В. И. Плешакова, К. П. Масловский, Н. Т. Понкратова, С. А. Понкратов, Д. Н. Пилюгин, М. Ю. Макарова // Ветеринария. – 2000. – № 3. – С. 21-23.

Рецензенты:

Рудаков Н. В., доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии с курсом иммунологии, Омская государственная медицинская академия, г. Омск.

Плешакова В. И., доктор ветеринарных наук, профессор, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, Омский государственный аграрный университет, г. Омск.