

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 булавовидные 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 тяжёлые, 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).

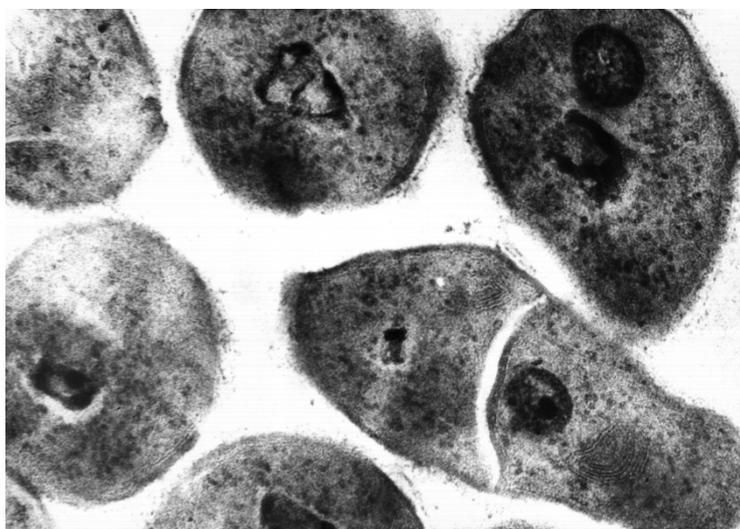


Рис. 1. *S. pseudotuberculosis* МК – микрокапсула, КС – клеточная стенка, ЦМ – цитоплазматическая мембрана, Н – нуклеоид, П – полисомы, Г – гранулы волютина, МС – мембранные структуры. Электронная микроскопия (x 60000)

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 (рН 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  $\beta$ -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.