

УДК 619 : 615.371 / 372 : 616.986.7

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ПАТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ЛЕПТОСПИРОЗНЫХ БАКТЕРИЙ

Зайцев В.В.

УП «Витебская биофабрика», г. Витебск

Автором установлена корреляция между сроками выживания лептоспир в организме лабораторных животных в зависимости от среды их культивирования.

The author has established a correlation between the life period of leptospirae in laboratory animals and the medium content.

Введение. Известно, что патогенные свойства микроорганизмов обуславливают их способность проникать, приживаться и размножаться в макроорганизме. Именно эти свойства позволяют дифференцировать их на патогенные и сапрофитные виды. В отношении лептоспир это положение было убедительно подтверждено экспериментами, проведенными Киктенко В.С., Волиной Е.Г., Левиной Л.Ф. и др. (1987). Некоторые авторы изучали выживаемость патогенных и сапрофитных лептоспир в организме морских свинок и золотистых хомячков. Работами Киктенко В.С. с соавторами (1979), установлено более длительное сохранение патогенных лептоспир в перитонеальном экссудате инфицированных морских свинок.

Лептоспиры обладают сложной, мозаичной антигенной структурой, что послужило основанием для выделения большого количества их серовариантов. Многочисленными исследованиями у лептоспир выявлено наличие нескольких антигенных детерминант: родоспецифических, групповых и серовароспецифических.

Такая сложная антигенная структура безусловно затрудняет диагностику и профилактику лептоспироза.

В настоящее время отсутствуют данные о влиянии состава среды на вирулентность лептоспирозных бактерий.

Цель настоящей работы – установить влияние состава питательной среды на патогенные свойства лептоспирозных бактерий.

Материал и методы исследований. В работе использовали 6 патогенных штаммов: *Leptospira pomona* ВГНКИ-6; *Leptospira tarassovi* ВГНКИ-4; *Leptospira grippothyphosa* ВГНКИ-1; *Leptospira icterohaemorrhagia* ВГНКИ-2; *Leptospira conicola* ВГНКИ-3; *Leptospira hardjo* ВГНКИ-5.

Для выращивания лептоспир в опытах использовали следующие питательные среды:

- сывороточная витаминизированная среда на основе сыворотки барана (СВСБ);
- сывороточная среда с фактором роста (ССФР);
- сывороточная среда витаминизированная с фактором биосинтеза антител (СВФБ);
- полусинтетическая среда Рассела (ПСР).

Сроки выживаемости лептоспирозных штаммов, выращенных на средах разного состава, изучали в организме инфицированных морских свинок 8-10 недельного возраста.

Для этой цели животным вводили внутрибрюшинно по 1 см³ 5-дневной культуры лептоспир, выращенной на средах разного состава и содержащей 80 клеток в поле зрения (увеличение микроскопа x400).

У зараженных животных брали перитонеальную жидкость с помощью стерильного шприца для микроскопического исследования через 6, 8, 16, 24 и 36 часов. В темном поле зрения микроскопа при увеличении x 400 определяли наличие лептоспир, их морфологию и подвижность, просматривая не менее 20 полей зрения в каждой из 5 проб.

У животных, убитых эфиром, через 8, 24, 36, 48 и 60 часов брали кровь из кусочков печени, почек и засеивали на среду ССЗ в 3 пробирки.

Посевы инкубировали в течение 14 суток при температуре 28⁰С. Учет результатов эксперимента проводили методом темнопольной микроскопии.

Для заражения использовали 840 морских свинок

Изучено 1260 проб перитонеальной жидкости и 630 посевов крови, кусочков органов от инфицированных морских свинок.

Количество лептоспир определяли методом подсчета в темном поле микроскопа и выражали числом клеток в поле зрения. Кроме того, концентрацию лептоспир, культивируемых в жидкой среде, определяли методом фотометрии и выражали количеством микробов в 1 см³ культуры. Для этого строили калибровочную кривую. С этой целью из концентрированной суспензии клеток готовили ряд разведений и на ФЭК-56М измеряли поглощение света образцами с различным содержанием лептоспир против бесклеточной культуральной жидкости. Количество клеток в образцах определяли путем прямого подсчета лептоспир (в окрашенных препаратах). В этих целях в работе использовали метод Виноградского. На обезжиренное предметное стекло пипеткой наносили 0,05 см³ суспензии и каплю распределяли на площади 6 см². Мазок высушивали, фиксировали над пламенем, обрабатывали 1-2 мин раствором Руге (ледяная уксусная кислота – 1 см³, формалин 40%-ный – 2 см³, дистиллированная вода – 100 см³) и промывали водой. Клетки окрашивали по методу Киктенко: мазок в течение 1 мин обрабатывали протравой (формалин – 2 см³, танин – 0,2 г, 4% спиртовой раствор йода – 5 см³, дистиллированная вода – 100 см³), слегка подогревали и окрашивали 1%-ным раствором генцианового фиолетового в 25%-ном спирте. Лептоспиры в препаратах считали в больших квадратах окулярной сетки микроскопа при увеличении в 400 раз. Из каждого разведения суспензии готовили по 8-10 мазков и просчитывали в них 25 квадратов.

Количество клеток в 1 см³ суспензии определяли по формуле:

$$K = \frac{X \times 6 \times 10^8}{S \times 0,05}, \text{ где}$$

X – среднее число лептоспир в квадрате сетки;
 6×10^8 – площадь мазка (в $\mu\text{м}^2$);
 S – площадь квадрата сетки (в $\mu\text{м}^2$);
 0,05 – объем взятой суспензии (в см^3).

Параллельно подсчитывали число лептоспир в темном поле зрения микроскопа.

Результаты исследований обработаны статистически.

Однако метод подсчета спирохет в камерах довольно трудоемок и требует специального оборудования, а исследование в темном поле не всегда позволяет получить объективную количественную характеристику изучаемой культуры. Такая характеристика необходима при изучении утилизации клетками источников углерода, азота, других пищевых факторов, а также биохимических и метаболических особенностей сапрофитных и патогенных лептоспир.

При разработке фотометрического метода определения концентрации клеток существенным является установление области спектра света, в которой оптическая плотность (E) суспензии изучаемого вида микробов максимальна и не зависит от длины волны. С этой целью нами были сняты спектры поглощения света суспензией лептоспир и бараньей сывороткой (основным ингредиентом среды) на спектрофотометре и ФЭК-56М.

Результаты исследований. Показатели учета спектров поглощения света суспензией лептоспир и бараньей сывороткой на спектрофотометре и ФЭК-56М представлены на рис. 1.

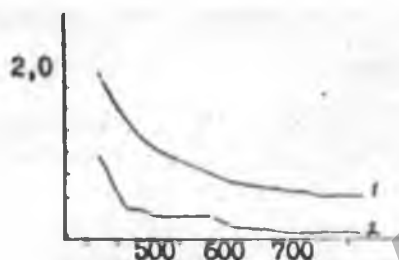


Рисунок 1 - Спектр поглощения света суспензией лептоспир и сывороткой крови барана

По оси абсцисс – длина волны света (в нм); по оси ординат – поглощение (E, в отн. ед.).

Из рис. 1 видно, что оптическая плотность концентрированной суспензии (43,8 млн/мл) в области длин волн 500-600 нм равна 0,75-1,17 E, а поглощение исходной сывороточной средой – 0,20-0,27 E.

При измерении оптической плотности культуры на спектрофотометре в области спектра 575-600 нм также выявлена линейная зависимость от числа клеток при величинах поглощения $< 0,40$ E.

На следующем этапе работы определяли количество лептоспир в расчете на см^3 суспензии методом прямого подсчета в окрашенных препаратах (табл. 2). В препаратах суспензии с нулевым разведением среднее число клеток в квадрате равно 36,5, что соответствует концентрации 43,8 млн/мл. Среднее число лептоспир в разведении 1:9 равно 5,16 млн/мл.

Коэффициент корреляции $< 9\%$. Установлена корреляция этого метода с методом подсчета лептоспир в темном поле зрения.

Таблица 1 – Концентрация лептоспир в суспензиях

Разведение	Среднее число лептоспир в квадрате сетки (X)	Количество лептоспир ($X \pm m$), млн.к. в 1 мл
0	36,50	43,80 \pm 2,18
1:1,5	28,41	34,10 \pm 1,51
1:3,0	22,32	26,78 \pm 1,87
1:4,5	16,19	19,43 \pm 1,44
1:6,0	11,21	13,46 \pm 0,94
1:7,5	7,91	9,50 \pm 0,83
1:9,0	4,30	5,16 \pm 0,51

При подсчете количества клеток в нулевом разведении по методу, описанному Н.П. Власовой и А.С. Фоменко, получено 38,10 млн/мл, а в разведении 1:9 – 4,46 млн/мл.

На основании полученных результатов построена калибровочная кривая зависимости оптической плотности суспензии лептоспир от концентрации клеток в них (рис. 2). Видно, что имеется четкая линейная зависимость E суспензий от концентрации лептоспир.

Анализ экспериментального материала дает основание заключить, что метод фотометрии можно использовать для определения концентрации лептоспир в жидких питательных средах.

При определении сроков выживания лептоспир в организме морской свинки установили, что состав питательной среды оказывает существенное влияние на время их выживания в перитонеальном экссудате.

Так, лептоспиры, выращенные на средах ССФР и ССФБ не выявлялись при микроскопии в перитонеальной жидкости соответственно через 8-16 часов и 8 часов.

При включении в состав сывороточной среды витаминов группы В (среда СВСБ) лептоспиры не выявлялись в перитонеальной жидкости через 16-24 часа.

Лептоспиры, выращенные на среде ПСР, более длительно определялись в перитонеальной жидкости через 36 часов.

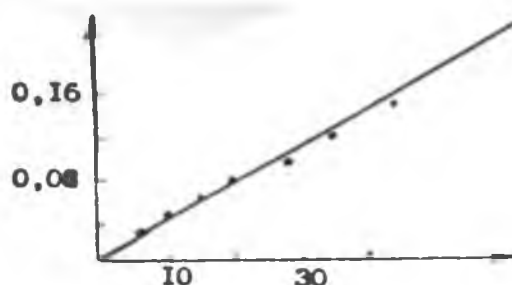


Рисунок 2 - Зависимость величины поглощения света (E) от концентрации лептоспир в суспензиях. По оси абсцисс – концентрация лептоспир (в млн.клеток – в 1 мл); по оси ординат – поглощение (в отн. ед.)

Следует указать, что более вирулентные штаммы лептоспир довольно быстро проникают из брюшной полости в кровь и диссеминируют во внутренние органы. Это является причиной того, что выявлять их в экссудате из брюшной полости удается лишь в первые часы после инфицирования.

Уже через 8-16 часов обнаружить культуры лептоспир с высокой вирулентностью микроскопически невозможно.

В это же время наблюдается значительное уменьшение числа фагоцитов и количество самого экссудата.

Вместе с тем отмечаем, что абсолютной зависимости между степенью вирулентности и временем выживаемости лептоспир в перитонеальном экссудате не выявлено. Тем не менее, можно отметить, что культуры лептоспир, выращенные на средах ПСР и СВСБ, имеют наименьшую вирулентность, персистировали в брюшной полости наиболее долгое время.

При исследовании результатов посевов крови, кусочков печени и почек установлено, что культуры лептоспир, выращенные на средах ССФР и ССФБ (табл. 2, 3), персистировали в организме инфицированных животных в течение 60 часов (срок наблюдения).

Таблица 2 – Сроки персистирования лептоспир в организме морских свинок, выращенных до их инфицирования на среде ССФР

Сроки посева крови из органов после инфицирования, часов	Результаты исследования посевов в темном поле микроскопа					
	L. pomona	L. tarassovi	L. grippothyphosa	L. icterohaemorrhagia	L. conicola	L. sejroe
8	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+
36	+	+	+	+	+	+
48	+	+	+	+	+	+
60	+	+	+	+	+	+

Примечание: "+" - лептоспиры, выявленные микроскопически;
 "-" - лептоспиры, не выявленные микроскопически.

Таблица 3 – Сроки персистирования лептоспир в организме морских свинок, выращенных до их инфицирования на среде ССФБ

Сроки посева крови из органов после инфицирования, часов	Результаты исследования посевов в темном поле микроскопа					
	L. pomona	L. tarassovi	L. grippothyphosa	L. icterohaemorrhagia	L. conicola	L. sejroe
8	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+
36	+	+	+	+	+	+
48	+	+	+	+	+	+
60	+	+	+	+	+	+

Примечание: "+" - лептоспиры, выявленные микроскопически;
 "-" - лептоспиры, не выявленные микроскопически.

Культуры лептоспир, выращенные на среде СВСБ, обнаруживались через 36-48 часов (табл. 4).

Таблица 4 – Сроки персистирования лептоспир в организме морских свинок, выращенных до их инфицирования на среде СВСБ

Сроки посева крови из органов после инфицирования, часов	Результаты исследования посевов в темном поле микроскопа					
	L. pomona	L. tarassovi	L. grippothyphosa	L. icterohaemorrhagia	L. conicola	L. sejroe
8	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+
36	+	+	+	+	+	+
48	+	+	-	+	-	+
60	-	-	-	-	-	-

Примечание: "+" - лептоспиры, выявленные микроскопически;
 "-" - лептоспиры, не выявленные микроскопически.

Лептоспиры, выращенные на среде ПСР, сохранялись наиболее короткое время – 24 часа (табл. 5).

Таблица 5 – Сроки персистенции лептоспир в организме морских свинок, выращенных до их инфицирования на среде ПСР

Сроки посева крови из органов после инфицирования, часов	Результаты исследования посевов в темном поле микроскопа					
	L. pomona	L. tarassovi	L. grippothyphosa	L. icterohaemorrhagiae	L. conicola	L. sejroe
8	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+
36	–	–	–	–	–	–
48	–	–	–	–	–	–
60	–	–	–	–	–	–

Примечание: "+" - лептоспиры, выявленные микроскопически;
"–" - лептоспиры, не выявленные микроскопически.

Различия в сроках персистенции указанных групп лептоспир в организме инфицированных животных статистически значимы.

Определение выживаемости лептоспир в перитонеальном экссудате морских свинок, является простым, легко выполнимым и быстрым тестом при оценке патогенности лептоспир в зависимости от состава питательной среды.

Определение сроков персистенции в организме морских свинок на основе посевов крови и кусочков внутренних органов в жидкую питательную среду, являющееся более трудоемким, кропотливым, тем не менее является более надежным и позволяет установить влияние свойств питательной среды на патогенность лептоспир и четко дифференцировать их по данному признаку.

В результате проведенной работы с помощью тестов микроскопического исследования перитонеальной жидкости и определения сроков персистенции микроорганизмов нами установлено, что среды ССФР и ССФБ обеспечивают сохранение и поддержание высокой вирулентности лептоспир и могут использоваться в производстве противолептоспирозных препаратов.

Закключение. По результатам проведенной работы нами установлена корреляция между сроками выживания лептоспир в организме лабораторных животных в зависимости от среды их культивирования.

Статья поступила 5.05.2009 г.

УДК 619 : 615.371 / 372 : 616.986.7

ОЦЕНКА РОСТОВОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТОЧНЫХ И АЛЬБУМИНОВЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Зайцев В.В.

УП «Витебская биофабрика», г. Витебск

Установлено, что альбуминовая питательная среда пригодна только для однократного посева из-за дальнейшего снижения антигенной активности лептоспир. Предложены модифицированные сывороточные среды, содержащие 2–5% фактор биосинтеза, которые обеспечивают накопление лептоспир с высокой антигенной активностью.

It has been established that albumin growth medium is useful for single recovery due to antigenic decline of leptospirae. Modified serum media containing the biosynthesis factor (2–5%) have been proposed allowing accumulation of leptospirae with high antigenic activity.

Введение. Лептоспиры были выделены в чистой культуре значительно позже (1917), чем многие другие патогенные микроорганизмы. Это связано с их повышенной требовательностью к составу питательной среды. Первые культуры были выращены на среде из сыворотки крови кролика, в последующих работах использовали разведенную сыворотку.

Простейшая сывороточная среда представляет собой смесь стерилизованной воды с асептически полученной сывороткой крови кролика или овцы в разных количествах.

Известно значительное количество сывороточных сред различного состава [6]. Это среды Уленгута (1917), полужидкая среда Флетчера (1928), Кортгафа (1932), Ферворт-Вольфа в модификации Тарассова (1937). Каждая из этих сред содержит 5–10% сыворотки крови кролика или барана, фосфатный буфер или дистиллированную воду, витамины группы В и некоторые другие добавки. Сывороточные среды используют для поддержания производственных штаммов лептоспир и получения матровых и производственных расплодов [2].

Для культивирования лептоспирозных бактерий в настоящее время используют сывороточные среды: Любашенко [8], среда, предложенная сотрудниками УО ВГАВМ А.В. Зайцевой, Г.Э. Дремачем [3]. Применяется также жидкая питательная среда для лабораторного выращивания патогенных лептоспир на основе белков лизированной крови кролика [1].

Вторая группа сред – это полусинтетические и синтетические белковые и безбелковые питательные среды. Основное внимание уделяется работе с этими питательными средами, т.к. накопление лептоспир на них значительно выше, чем на сывороточных средах [8].

Приоритет в создании синтетических и полусинтетических сред принадлежит зарубежным исследователям. Наиболее широкое распространение получили следующие среды: синтетическая безбелковая среда Шенберга (1967), твин (полисорбат) – альбуминовая среда Элленгаузена в модификации Джонсона (1967), синтетическая