

Б.А.Шабалин², В.Ю.Охупкина¹, И.В.Дармов¹, С.Л.Кузнецов³

ИЗУЧЕНИЕ ПАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БРУЦЕЛЛЕЗА В УСЛОВИЯХ ИСКУССТВЕННОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ

¹Федеральное государственное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации», ²Учреждение Российской академии наук «Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук», Киров; ³Управление биологической защиты Управления начальника войск радиационной, химической и биологической защиты Вооруженных Сил Российской Федерации, Москва

На основании экспериментальных исследований изучено влияние на течение бруцеллеза искусственно вызванного иммунодефицитного состояния. В опытах на лабораторных животных показано значительно более быстрое и интенсивное развитие в данных условиях инфекционного процесса, а также повышение частоты летального исхода заболевания, вызываемого возбудителями бруцеллеза.

Ключевые слова: бруцеллез, иммуносупрессия, вирулентность, летальность.

В естественных условиях каждый вид, а отчасти, и биотип возбудителей бруцеллеза, имеет строго очерченный круг восприимчивых хозяев, что в достаточной степени усложняет выбор универсальной экспериментальной модели для воспроизведения данной инфекции [1, 2]. В частности, для этих целей предлагалось использовать морских свинок, белых мышей, белых крыс, кроликов, обезьян, овец, телят и коров [3, 11]. Несмотря на возможность воспроизведения бруцеллеза на большей части указанных животных, предпочтение отдается морским свинкам и белым мышам, как наиболее хорошо изученным, доступным и удобным моделям.

В настоящее время для сравнительной количественной характеристики патогенных свойств культур штаммов бруцелл традиционно используется методика определения ИД₅₀ в опытах на морских свинках. Результаты исследования в этом случае учитываются исходя из совокупности данных, полученных как при бактериологическом, так и серологическом обследовании животных, инфицированных различными дозами микробов. При этом в равной степени положительными результатами считаются получаемые в опыте генерализованные, регионарные и даже субклинические формы инфекции, сопровождающиеся лишь серологической перестройкой организма при отрицательных результатах бактериологического обследования. Указанное обстоятельство способно повлиять на конечные результаты испытаний, поскольку одинаковые величины показателя ИД₅₀ обнаруживаются для культур, обуславливающих развитие как острых диссеминированных форм инфекции, так и для вызывающих регионарные и стертые его варианты. Кроме того, высоковирулентные культуры различных видов бруцелл практически не отличаются и не могут быть дифференцированы по величине показателя ИД₅₀.

В то же время, по данным ряда авторов [5, 6, 9, 10], патогенность для лабораторных животных может во многом зависеть от вида бруцелл. Согласно

результатам бактериологического, серологического и аллергологического исследований, способность прижиться и вызвать генерализацию инфекции в организме животных у культур вирулентных штаммов *Brucella abortus* значительно ниже, чем *B. melitensis* и *B. suis*. Кроме того, они вызывают меньшие деструктивные изменения во внутренних органах, маскирующие патоморфологические проявления заболевания.

Следует учитывать, что белые мыши в отличие от морских свинок более резистентны к заражению возбудителями бруцеллеза и отличаются значительными колебаниями индивидуальной реактивности. Для них характерны высокие значения величины ИД₅₀ и низкий индекс высеваемости из органов. По данным литературы [7], парентеральное заражение белых мышей удается осуществить лишь при использовании дозы возбудителя не менее 100 живых микробов. При этом заболевание развивается, как правило, только у 80 % животных, а генерализованная форма – у 92 % из них.

Имеются указания [4], что вирулентные характеристики культур возбудителей бруцеллеза возможно также оценивать при внутрибрюшинном введении белым мышам высоких (свыше 100 млн) доз микробов с последующим наблюдением за животными в течение 7–14 сут. Подобный методический прием обеспечивает воспроизведение практически у всех взятых в опыт животных специфического острого септицемического процесса, позволяющего проследить у них гибель.

Исход заболевания в данном случае определяется сочетанным механизмом его развития. В первую очередь, гибель белых мышей наступает в результате прямого летального воздействия липополисахарида бруцелл, находящихся в инокуляте. В дальнейшем она является следствием нарастающей септицемии, возникающей в ходе массивного обсеменения внутренних органов и приводящей к их тяжелым деструктивным поражениям. Показателями вирулент-

ности служат величины летальных доз микробов, а также динамика гибели мышей.

С использованием указанного метода проведены исследования по сравнительному изучению летальных свойств основных патогенных для человека видов возбудителей бруцеллеза. При этом белых мышей заражали внутрибрюшинно двухсуточными агаровыми культурами вирулентных штаммов *B. melitensis* 16М, 565, *B. abortus* 544 и *B. suis* 1330 и вакцинных штаммов *B. melitensis* Rev-1 и *B. abortus* 19ВА в дозах от 100 млн до 10 млрд микробов. Гибель животных учитывали в течение 7 сут с момента заражения с подтверждением ее специфичности бактериологическим методом. Величины показателя ЛД₅₀ рассчитывали на 1-е и 7-е сутки наблюдения (табл. 1).

Как следует из данных табл. 1, на 1-е сутки наблюдения между культурами бруцелл отсутствуют значительные различия по величине показателя летальности для животных. Это, вероятно, связано с тем, что гибель животных в течение 1 сут после заражения обусловлена, в первую очередь, токсическим действием липополисахарида введенных бактерий, который по данным свойствам близок для бруцелл разных видов. Не случайно летальный эффект при введении животным убитой культуры возбудителя был сопоставим с таковым при введении живых микробов.

К 7-м суткам наблюдения обнаруживаются различия величин показателя ЛД₅₀ между исследуемыми штаммами бруцелл, обусловленные их способностью вызывать поражения органов и тканей. Закономерно, что меньшие значения получены для культур вакцинных штаммов *B. melitensis* Rev-1, *B. abortus* 19ВА, а также вирулентного штамма *B. abortus* 544, который, согласно данным литературы [9, 10], вследствие своей видовой принадлежности вызывает менее выраженные патоморфологические повреждения органов в ходе заболевания. Значение показателя ЛД₅₀ для убитой культуры к 7-м суткам осталось практически на исходном уровне.

Обращают на себя внимание результаты исследования авторов, указывающих на значительное возрастание летальности при бруцеллезе на фоне снижения защитных функций организма [4, 8]. В связи

с этим на следующем этапе исследований было оценено летальное действие культур возбудителя бруцеллеза при внутрибрюшинном заражении белых мышей на фоне блокады иммунной системы. В опытах использовали цитостатик из группы алкилирующих соединений циклофосфан, характеризующийся достаточно быстрым развитием эффекта даже при однократном введении. Так, показано, что введение данного препарата животным в дозе 200 мг·кг⁻¹ уже через 24–48 ч обеспечивает выраженную иммуносупрессию [4].

В ходе экспериментов белым мышам вводили антибиотик в дозе 4 мг парентерально. Через 24 ч животных заражали двухсуточными агаровыми культурами штаммов: типовых *B. melitensis* 16М, *B. abortus* 544, *B. suis* 1330; природных *B. melitensis* 565, 21, 145 и вакцинных *B. melitensis* Rev-1 и *B. abortus* 19ВА в нарастающих дозах от 100 тыс. до 1 млрд микробов. Гибель животных учитывали в течение 7 сут с момента заражения с подтверждением ее специфичности бактериологическим методом. Величины показателя ЛД₅₀ рассчитывали на 1-е и 7-е сутки наблюдения (табл. 2).

Анализ данных табл. 2 свидетельствует, что иммуносупрессия значительно усиливает летальный эффект культур возбудителя бруцеллеза как на 1-е, так и в значительной степени на 7-е сутки. При этом отчетливо проявляется разница в величинах показателя ЛД₅₀ для культур разных видов бруцелл. Более низкие значения показателя отмечались для культур видов *B. melitensis* и *B. suis*. Минимальной данная величина была для природного штамма *B. melitensis* 145. Среди прочих вирулентных культур сравнительно менее патогенной оказалась культура штамма *B. abortus* 544. В то же время по данным оценки ИД₅₀ традиционным методом при внутрибрюшинном заражении белых мышей и подкожном заражении морских свинок культуры всех вирулентных штаммов характеризовались близкими значениями показателя ИД₅₀, и различия между ними не выявлялись. Как и

Таблица 1

Вирулентность (ЛД₅₀) культур штаммов возбудителей бруцеллеза при внутрибрюшинном заражении белых мышей (X ± I₉₅, n=3)

Культура штамма	Величина показателя ЛД ₅₀ на ... сутки наблюдения, живые микробы	
	1	7
<i>B. melitensis</i> 16М	(2,6 ± 1,4)·10 ¹⁰	(0,9 ± 0,9)·10 ¹⁰
<i>B. melitensis</i> 565	(2,0 ± 1,1)·10 ¹⁰	(0,6 ± 1,5)·10 ¹⁰
<i>B. melitensis</i> Rev-1	(6,3 ± 1,4)·10 ¹⁰	(3,9 ± 1,5)·10 ¹⁰
<i>B. abortus</i> 544	(4,1 ± 1,8)·10 ¹⁰	(1,9 ± 1,3)·10 ¹⁰
<i>B. abortus</i> 19ВА	(4,2 ± 1,9)·10 ¹⁰	(3,0 ± 1,6)·10 ¹⁰
<i>B. suis</i> 1330	(3,9 ± 1,1)·10 ¹⁰	(0,1 ± 1,1)·10 ¹⁰
Инактивированная нагреванием культура штамма <i>B. melitensis</i> 16М (контроль)	(6,2 ± 1,3)·10 ¹⁰	(6,0 ± 1,6)·10 ¹⁰

Таблица 2

Вирулентность (ЛД₅₀) культур штаммов возбудителей бруцеллеза при внутрибрюшинном заражении белых мышей с блокированными циклофосфаном функциями (X ± I₉₅, n=3)

Культура штамма	Величина показателя ЛД ₅₀ на ... сутки наблюдения, живые микробы	
	1	7
<i>B. melitensis</i> 16М	(3,9 ± 1,2)·10 ⁹	(1,5 ± 1,1)·10 ⁸
<i>B. melitensis</i> 565	(1,6 ± 1,4)·10 ¹⁰	(1,6 ± 1,4)·10 ⁸
<i>B. melitensis</i> 145	(1,6 ± 1,2)·10 ⁹	(7,9 ± 1,1)·10 ⁷
<i>B. melitensis</i> 21	(7,9 ± 1,2)·10 ⁹	(3,2 ± 0,9)·10 ⁸
<i>B. melitensis</i> Rev-1	(1,6 ± 1,5)·10 ¹⁰	(3,2 ± 1,2)·10 ⁹
<i>B. abortus</i> 544	(6,6 ± 1,5)·10 ⁹	(6,9 ± 1,5)·10 ⁸
<i>B. abortus</i> 19ВА	(6,3 ± 1,7)·10 ¹⁰	(4,0 ± 1,1)·10 ⁸
<i>B. suis</i> 1330	(3,2 ± 1,5)·10 ⁹	(1,5 ± 1,5)·10 ⁸
Инактивированная нагреванием культура штамма <i>B. melitensis</i> 16М (контроль)	(3,9 ± 1,9)·10 ¹⁰	(3,8 ± 1,7)·10 ¹⁰

Таблица 3

Вирулентность (ИД₅₀) культур вакцинных штаммов *B. abortus* 19 VA и *B. melitensis* Rev-1 при внутрибрюшинном заражении белых мышей с блокированными циклофосфаном функциями ($X \pm I_{95}, n=3$)

Группа животных	Величина показателя ИД ₅₀ для культуры штамма ..., живые микробы	
	<i>B. abortus</i> 19 VA	<i>B. melitensis</i> Rev-1
Получивших циклофосфан	4720,2 ± 1,4	3388,4 ± 1,7
Контрольная	11200,0 ± 1,5	9025,6 ± 1,4

следовало ожидать, меньший летальный эффект был характерен для культур вакцинных штаммов.

На следующем этапе исследований представлялось целесообразным оценить влияние иммуносупрессии на характеристики показателя ИД₅₀. Поскольку величины данного показателя для вирулентных культур и в обычных условиях оказываются низкими, в опытах использовались культуры вакцинных штаммов *B. abortus* 19 VA и *B. melitensis* Rev-1, изменение величин ИД₅₀ у которых можно достоверно зарегистрировать в более широких пределах.

Белым мышам за сутки до заражения вводили циклофосфан в дозе 4 мг. Величины показателя ИД₅₀ определяли при внутрибрюшинном инфицировании животных по общепринятой методике. В качестве контроля служила группа мышей без введения цитостатика (табл. 3).

Согласно полученным данным (табл. 3) на фоне иммуносупрессии вирулентность культур вакцинных штаммов для белых мышей при внутрибрюшинном заражении увеличилась в несколько раз.

На основании вышеизложенного можно сделать заключение о значительном влиянии на течение бруцеллеза сопутствующего иммунодефицитного состояния. В данном случае отмечается не только более быстрое и интенсивное развитие инфекционного процесса, но также и вероятность повышения летальности вызываемого возбудителем бруцеллеза заболевания. Особо необходимо отметить отрицательное воздействие предшествующей иммуносупрессии на течение вакцинального процесса, так как при этом создаются благоприятные условия для реализации остаточной вирулентности культур вакцинных штаммов.

Полученные данные свидетельствуют о целесообразности использования методического приема, связанного с созданием искусственной иммуносупрессии, с целью первичной сравнительной оценки патогенных свойств различных штаммов бруцелл.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вершилова П.А., Голубева А.А. Бруцеллез в СССР. М.; 1970.
2. Вершилова П.А., редактор. Бруцеллез. М.; 1972
3. Вершилова П.А., Чернышева М.И., Князева Э.Н. Патогенез и иммунология бруцеллеза. М.: Медицина; 1974.
4. Гордиенко Л.Н., Булдыгин Д.В., Ощепков В.Г. и др. Способ оценки вирулентных свойств S-форм бруцелл. Патент на изобретение № 2209251. Бюл. «Изобретения, полезные модели». М., 2003; 17.
5. Кайтмазова Е.И., Островская Н.Н. К вопросу о характеристике бруцелл, выделенных на территории СССР. Сообщение I. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1967; 1: 12–6.
6. Кайтмазова Е.И., Островская Н.Н. К вопросу о характеристике бруцелл, выделенных на территории СССР. Сообщение II. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1967; 2: 66–70.
7. Корзенко В.Н. Бруцеллез человека. Минск; 1980.
8. Ременцова М.М., Грушина Т.А. Влияние гидрокортизона и методов заражения на высвасимость бруцелл из организма белых мышей. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1978; 1: 61–5.
9. Таран И.Ф. О некоторых особенностях патогенеза и иммуногенеза бруцеллезной инфекции. В кн.: Тез. докл. научной конференции по вопросам микробиологии, иммунологии и вакцинопрофилактики бруцеллеза; Москва, 9–10 февраля 1966 г. М.; 1966. С. 46–9.
10. Таран И.Ф., Мухамедьянов С.М., Галко И.К. Бруцеллез: Принципы эпидемиологического анализа, профилактики и борьбы. Ташкент: Медицина; 1983
11. Триленко П.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных. Ленинград; 1976.

B.A. Shabalin, V.Yu. Okhapkina, I.V. Darmov, S.L. Kuznetsov

Study of Pathogenic Properties of Brucellosis Agents under Artificial Immunosuppression Conditions

48 Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation; The Institute of Physiology, Komi Science Center; the Ural Division of the Russian Academy of Sciences; Biological Defense Division of the Administration of the Commander of the Forces of Radiation, Chemical and Biological Defense of the Russian Federation Armed Forces

The influence of artificial immunodeficiency state upon brucellosis course has been studied experimentally. Trials on laboratory animals demonstrated faster and more intensive progression of infectious process as well as increased frequency of the fatal cases of the disease caused by brucellosis agents.

Key words: brucellosis, immunosuppression, virulence, lethality.

Об авторах:

Охупкина В.Ю., Дармов И.В. 48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны РФ. Киров.

Шабалин Б.А. Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук. Киров.

Кузнецов С.Л. Управление биологической защиты Управления начальника войск радиационной, химической и биологической защиты вооруженных сил РФ.

Authors:

Okhapkina V.Yu., Darmov I.V. 48 Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Kirov.

Shabalin B.A. The Institute of Physiology, Komi Science Center, the Ural Division of the Russian Academy of Sciences. Kirov.

Kuznetsov S.L. Biological Defense Division of the Administration of the Commander of the Forces of Radiation, Chemical and Biological Defense of the Russian Federation Armed Forces.

Поступила 08.12.09.