

© Л.Г.Баженов, М.А.Рузимуродов, Е.В.Артемова, Р.М.Тен, 2008

Л.Г.Баженов, М.А.Рузимуродов, Е.В.Артемова, Р.М.Тен ИЗУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КРИСТАЛЛОГЕННЫХ СВОЙСТВ БРУЦЕЛЛ ДЛЯ ИХ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ

Республиканский специализированный центр хирургии им. ак. В.Вахидова,
НИИ эпидемиологии, микробиологии и инфекционных заболеваний МЗ РУз,
Ташкент, Республика Узбекистан

Аннотация:

Изучены 3 вакцинных штамма *Brucella*: *B. abortus* 19, *B. abortus* 104 и *B. militensis* Rev-1. Установлено, что кристаллограммы изученных культур *Brucella* spp. характеризуются специфическими особенностями, что позволяет использовать кристаллографический метод для их идентификации и дифференциации. Применение этого метода дает возможность существенно ускорить и упростить микробиологическое определение этих микроорганизмов. Важным является также и экономический аспект, постановка кристаллографического теста существенно дешевле общепринятых методов.

Ключевые слова:

бруцеллы, кристаллографический метод, кристаллогенные свойства, идентификация, дифференциация

Бруцеллез, или мальтийская лихорадка, вызывается особым видом бактерий – бруцеллами и широко распространен во многих странах мира, особенно в тех, в которых развито животноводство, включая Россию, Казахстан и республики Средней Азии. При этом бруцеллез стоит на первом месте среди причин профессиональных заболеваний. Кроме того, данная инфекция приводит к значительному уменьшению продуктов питания, особенно полноценных белков животного происхождения необходимых для здоровья и благополучия человека. Потери поголовья скота и, следовательно, животного белка происходят вследствие абортос, преждевременных отелов, бесплодия и уменьшения лактации (3, 4).

В РФ и странах СНГ достигнуты значительные успехи в борьбе с бруцеллезом животных, однако последние годы характеризуются тенденцией к росту заболеваемости людей. Наиболее высокая заболеваемость населения регистрируется в Казахстане и республиках Средней Азии, а на территории РФ - в Северо-Кавказском, Западно- и Восточно-Сибирском регионах республики (3).

Бруцеллы относятся к биохимически слабоактивным микроорганизмам. Они не образуют протеолитических ферментов и обладают слабой сахаролитической способностью, поэтому не разжижают желатина и не свертывают молоко, но иногда расщепляют ксилосу, левулезу, декстрозу, галактозу и сбраживают арабинозу. Вызывают гидролиз аминокислот, белков и пептонов с образованием аммиака и сероводорода (5).

Для дифференциации разных видов бруцелл используют и монорцепторные сыворотки. Однако, исследование бруцелл лишь одним из названных методов, не может служить основанием для определения вида.

Существующие в настоящее время лабораторные методы идентификации *Brucella* spp. достаточно трудоемки, продолжительны, требуют значительного расхода питательных сред и реактивов, необходимых для постановки дифференцирующих биохимических и серологических тестов. Весьма важным является также своевременное и достоверное тестирование вирулентности этих микроорганизмов. Поэтому до сих пор не прекращаются поиски новых более эффективных подходов к распознаванию данных патогенов и определению их биологических свойств. В этом аспекте весьма перспективным представляется использование кристаллографического метода идентификации микроорганизмов.

Кристаллографический метод является принципиаль-

но новым методом идентификации микроорганизмов, отличающимся доступностью и высокой воспроизводимостью. Ранее работами Л.Г. Баженова установлено наличие специфических особенностей у кристаллограмм *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida* spp., *Bacillus subtilis*, *Helicobacter pylori* и других микроорганизмов (1, 2). Использование данного метода позволяет практически с помощью одного только теста достоверно идентифицировать перечисленные микроорганизмы, тогда как при традиционной идентификации необходима постановка от 5 до 20 и более тестов. Однако ранее исследований по изучению кристаллогенных свойств *Brucella* spp. и использованию этих свойств при идентификации и дифференциации этих микроорганизмов не проводилось, что и явилось задачей настоящего исследования.

Материал и методы исследования

Материалом для исследований послужили 3 вакцинных штамма *Brucella*: *B. abortus* № 19, *B. abortus* № 104 и *B. militensis* Rev-1, находящиеся на депонировании в коллекции НИИЭМИЗ МЗ РУз. Определение их биологических свойств и идентификацию проводили с помощью общепринятых методов.

Изучение кристаллогенных свойств культур *Brucella* spp. выполняли следующим образом: из суточной культуры, выращенной на скошенном эритрог-агаре, готовили густую микробную взвесь в стерильном физиологическом растворе (10-25 млрд. микробных тел/мл). Затем на дно пластиковой чашки Петри помещали каплю микробной взвеси и равномерно распределяли ее кончиком пипетки в виде овала размером примерно 1,5x1,0 см. Чашку помещали в эксикатор с силикагелем, закрывали эксикатор и инкубировали его в термостате при 37 °С в течение 18-24 часов до полного высыхания капель и образования на их месте кристаллического налета (кристаллограмма). Полученные кристаллограммы изучали визуально и с помощью стереоскопического микроскопа, затем фотографировали и переносили в банк кристаллограмм в компьютере. Все исследования повторяли с разными концентрациями микробной взвеси в трех сериях. Для контроля использовали кристаллограммы условно патогенных микроорганизмов (*E. coli* R, *Ps. aeruginosa* 68, *B. subtilis* 01, *S. albicans* 723), хранящихся в коллекции бактериологической лаборатории РСЦХ им. ак. В. Вахидова и физиологического раствора.

Результаты и обсуждение

Анализ кристаллограмм изученных штаммов *Brucella* показал, что они обладают общими характерными признаками. Они содержали множество разнонаправленных дендритов в виде хвойных веточек с короткими дендри-

Contact Information:

Проф. Баженов Леонид Григорьевич
E-Mail: leobaj@tps.uz

тами 2-го порядка. На этом фоне четко определялись центры кристаллизации в виде правильных прозрачных четырехгранных кристаллов с уплощенной верхней гранью, на которой наблюдались изображения квадратов (один в другом).

При сравнении кристаллограмм бруцелл с кристаллограммами других микроорганизмов достаточно четко выявляются существенные различия первых от вторых, которые касаются как дендритов, так и центров кристаллизации. Эти данные свидетельствуют о наличии специфических особенностей кристаллограмм *Brucella* spp., которые можно использовать при решении таксономических вопросов.

При отработке методики в отношении *Brucella* spp. важным было изучение влияния концентрации микробной взвеси на характер образующихся кристаллограмм. Установлено, что концентрация взвеси играет существенную роль. В частности, можно отметить, что при высоких концентрациях (20-25 млрд. микробных тел/мл) наблюдается преимущественно образование дендритов, а при меньших концентрациях (10-15 млрд. микробных тел/мл), наряду с дендритами, формируются и характерные центры кристаллизации, что существенно повышает информативность кристаллограмм. Поэтому оптимальной концентрацией микробной взвеси при кристаллографическом изучении *Brucella* spp. следует считать концентрацию 10 млрд. микробных тел/мл.

Кристаллограммы изученных культур бруцелл, при точном соблюдении методики, отличались высокой воспроизводимостью. Так, нами получены и изучены кристаллограммы в 3 повторностях, при этом все кристаллограммы каждого штамма были практически идентичны.

Сказанное свидетельствует о том, что кристаллограммы бруцелл характеризуются высокой информативностью и достоверностью. На получение кристаллограмм затрачивается не более 18-24 часов. Реактивы, применяемые при рутинных методах идентификации дорогостоящи и дефицитны, тогда как используемый при кристаллографическом методе физиологический раствор доступен и дешев.

Таким образом, установлена принципиальная возможность использования кристаллографического метода для идентификации *Brucella* spp. Важным является также и экономический аспект, постановка кристаллографического теста несравнимо дешевле общепринятых методов.

Дальнейшее совершенствование метода, изучение механизмов формирования кристаллов и влияния на этот процесс различных физических и химических факторов, составление баз данных кристаллограмм типичных и диких культур *Brucella* spp. и различных их вариантов, создание экспертной системы их распознавания значительно расширят возможности в деле систематизации и идентификации этих микроорганизмов.

Выводы

Brucella spp. характеризуются специфическими кристаллогенными свойствами, что позволяет использовать кристаллографический метод для их идентификации и дифференциации.

Применение кристаллографического метода дает возможность существенно ускорить и упростить идентификацию и дифференциацию бруцелл.

Литература

1. Баженов Л.Г. Кристаллографический метод изучения микроорганизмов и его использование при идентификации грибов рода *Candida*. В кн.: "Новые технологии в медицине - 2004". Санкт-Петербург, 2004. - С.12-13.
2. Баженов Л.Г. Способ идентификации *Serratia marcescens*. Патент №1231 Республики Узбекистан, 1994. - Расмий ахборотнома. - 1994. - №3. - С.135.
3. Буткин Е.И. Бруцеллез. В кн. Эпизоотология с микробиологией под ред. Бакулова И.А. // М., "Колос", 1981. - С. 145-152.
4. Косилов И.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных // Новосибирск, 1992. - 260 с.
5. Медицинская микробиология /Под ред. В.И. Покровского, О.К. Поздеева. - Москва: Медицина, 1999. - 765 с.

L.G.Bajenov, M.A.Ruzimurodov, E.V.Artyomova, R.M.Ten STUDY AND APPLICATION OF CRYSTALLOGENIC PROPERTIES OF BRUCELLA FOR THEIR IDENTIFICATION AND DIFFERENTIATION

*Republican specialised centre of surgery named after Academician V. Vahidov,
Research institute of epidemiology, microbiology and infectious diseases of Ministry of Health Care of Republic of
Uzbekistan, Tashkent, Republic Uzbekistan*

Abstract:

Three vaccinal strains of Brucella were studied: B. abortus 19, B. abortus 104 and B. melitensis Rev-1. It was established, that crystallograms of the studied Brucella spp. cultures were characterized by specific features that allows using the crystallographic method for their identification and differentiation. The application of this method enables essentially to accelerate and simplify the microbiological identification of these microorganisms. The economic aspect is as well important; the crystallographic test is essentially less expensive than the standard methods.

Key words:

Brucella, crystallographic method, crystallogenic properties, identification, differentiation