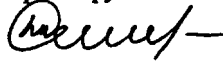


*На правах рукописи*



**СЕНИНА Татьяна Васильевна**

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И  
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА  
БУРКХОЛЬДЕРИЙ, ИМЕЮЩИХ ЗНАЧЕНИЕ  
В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ**

**03.00.07 - микробиология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Волгоград - 2004**

Работа выполнена в Волгоградском научно-исследовательском противочумном институте Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:** доктор медицинских наук,  
**профессор Илюхин В.И.**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук  
профессор *Попов Ю. А.*

доктор медицинских наук,  
**профессор Швиденко И.Г.**

**Ведущая организация:** Государственный научный центр  
прикладной микробиологии  
(п. Оболенск).

Защита диссертации состоится *6 октября* 2004 года в 10<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 208.078.01 по присуждению ученой степени доктора (кандидата) наук при Российском научно-исследовательском противочумном институте «Микроб» Минздрава России (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке РосНИПЧИ «Микроб».

Автореферат разослан *28 августа* 2004 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук

*Слудский А.А.*

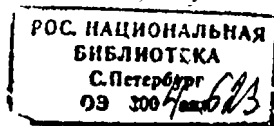
## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

В настоящее время борьба с инфекциями во всем мире приобретает особый характер, так как расширение международных контактов создает большие возможности для распространения из эндемичных природных очагов даже редко обнаруживаемых патогенных видов микроорганизмов, в том числе возбудителей сапа и мелиоидоза, относящихся к роду *Burkholderia* (В.И.Илюхин, 1985, 1999; Yang S, 2000; Leelarasamee A, 2004).

Большинство бактерий рода *Burkholderia* относятся к сапрофитам, для медицинской практики определенное значение имеют четыре вида - *Burkholderia mallei*, *B.pseudomallei*, *B.cepacia*, *B.thailandensis*. Два из них являются патогенными и их обычно выделяют в самостоятельную группу. Это *B.mallei* и *B.pseudomallei* - возбудители сапа и мелиоидоза опасных инфекционных заболеваний, эндемичные очаги которых имеются на сопредельных с Российской Федерацией территориях (Монголия, Иран, Китай, Турция) (Howe C, Sampath A, Spotnitz M, 1971; Magge H.R. et al 1967). Оба вида обладают выраженными патогенными свойствами для человека и животных.

Патогенные буркхольдерии (возбудители сапа и мелиоидоза), вызывают тяжелые инфекционные заболевания человека и многих видов животных и относятся к потенциальным агентам биотерроризма, как возбудители особо опасных инфекций. Плановых лабораторных исследований, направленных на выявление данных возбудителей в нашей стране практически не проводится. Диагностические препараты (как иммунологические, так и генетические) имеются на разных фазах разработок только в специализированных научно-исследовательских учреждениях и фактически не доступны для практических медицинских и ветеринарных лабораторий, в которых автоматические системы идентификации из-за своей дороговизны также отсутствуют. Учитывая высокую патогенность данных микроорганизмов для человека и многих видов животных, многообразие клинических форм заболеваний, отсутствие средств



специфической профилактики и недостаточную эффективность химиотерапии, очевидна актуальность разработки и совершенствования схем идентификации **возбудителей мелиоидоза и сапа - *Burkholderia pseudomallei* и *B.mallei*.**

Представленные в диссертации материалы получены в ходе выполнения в ВолгНИПЧИ плановой государственной тематики по лабораторной диагностике и идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза, в частности тем № 2-027 - 98 и №084 - 3 - 01.

Цель работы - изучение культуральных, биохимических и патогенных **свойств культур *B.pseudomallei*, *B.mallei*, *B.cepacia* и *B.thailandensis*** для выявления набора тестов имеющих значение в разработке дифференциальных схем идентификации.

#### **Задачи исследования**

1. Оценить значимость различных идентификационных тестов, применяемых при дифференциальной диагностике буркхольдерий.
2. Изучить вирулентность штаммов буркхольдерий, филогенетически расположенных в системе сапрофит (*B.cepacia*, *B.thailandensis*), **незавершенный паразит (*B.pseudomallei*), паразит (*B.mallei*).**
3. Сопоставить резистентность буркхольдерий к антибактериальным препаратам, красителям и детергентам.
4. Изучить различия по отдельным углеводородам, используемым различными видами буркхольдерий в качестве источника углерода и энергии.
5. Разработать схемы идентификации буркхольдерий, имеющих медицинское значение на различных таксономических уровнях (род, вид, биовар).

#### **Научная новизна**

Охарактеризованы гено — и фенотипические свойства буркхольдерий, необходимые для разработки диагностических и профилактических средств, а

также для расшифровки механизмов реализации патогенности возбудителей сапа и мелиоидоза

Впервые в основу разработки схемы идентификации патогенных буркхольдерий заложены принципы полифазной. таксономии, предусматривающие сочетанное применение генетических, биохимических, иммунологических методик при окончательном определении таксономической позиции изучаемого штамма.

Выявлены наборы основных дифференциальных тестов фенотипических свойств буркхольдерий, позволившие составить диагностические ключи для определения рода, вида и биоваров идентифицируемых культур возбудителей сапа мелиоидоза и близкородственных им буркхольдерий.

Впервые в качестве имитатора возбудителя мелиоидоза для учебных целей (курсы бактериологов, учения по индикации возбудителей ООИ) вместо убитых клеток *B.pseudomallei* предложена живая культура гетерологичного непатогенного вида *B.thailandensis*, имеющего высокую степень идентичности биохимических культуральных и антигенных свойств с возбудителем мелиоидоза.

### Практическая значимость

Определены наборы идентификационных признаков различных видов буркхольдерий, позволяющие создать практические схемы их дифференциальной диагностики, пригодные для микробиологических лабораторий.

Написаны "Методические рекомендации по постановке диагностических тестов, необходимых для внутривидовой дифференциации штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза (индивидуальная карта штамма)", утвержденные директором института д.м.н. Алексеевым В.В. 25. 06. 2003 г, протокол № 6.

Материалы настоящего исследования использованы при написании глав "Практического пособия для подготовки врачей-бактериологов и эпидемиологов по вопросам противодействия биотерроризму", утвержденного Руководителем Департамента Госсанэпиднадзора РФ С.И.Ивановым 06.11.03.

Штамм *Burkholderia thailandensis* В-9 депонирован в Саратовском научно-исследовательском противочумном институте «Микроб» в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб», как *B.thailandensis* КМ 161 с формулировкой: перспективный в качестве учебного штамма-имитатора возбудителя мелиоидоза. Документация на оформление патента на этот штамм отправлена в Российское агентство по патентам и товарным знакам. «Штамм бактерий *Burkholderia thailandensis* КМ - 161 авирулентный имитатор возбудителя мелиоидоза»: заявка № 2004112706 от 26.04.04.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Предложенная схема идентификации буркхольдерий, имеющих значение в медицинской практике, позволяет на основе известных лабораторных тестов определить принадлежность культур к видам, входящим в группы *pseudomallei* и *cepacia*.
2. Степень идентичности' *B.pseudomallei*, *B.mallei* и *B.thailandensis* в биохимических, иммунологических и генетических диагностических тестах позволяет считать их биоварами одного вида, целесообразность сохранения их видового статуса в медицинской микробиологии определяется практическими (эпидемиологическими) задачами.
3. Идентификацию буркхольдерий с помощью автоматических тест- систем и упрощенных диагностических ключей на заключительном этапе необходимо дополнять набором специфических для каждого вида тестов, включающих определение вирулентности, антибиотикограмму, постановку

иммунологических и генотипических тестов, чтобы соответствовать основным положениям полифазной таксономии.

4. Принадлежность к особо опасным видам (*B.mallei* и *B.pseudomallei*), предопределяет целесообразность на ранних этапах проведение ускоренных идентификационных иммунологических и генетических методик (РА, МФА, ПЦР) с последующим подтверждением диагноза стандартными бактериологическими методами.
5. Штаммы *B.thailandensis* по своим биохимическим и антигенным свойствам, учитывая их непатогенность, могут быть рекомендованы как имитаторы возбудителя мелиоидоза при проведении учений и занятий по диагностике и индикации ООИ.

### **Апробация работы**

Основные материалы диссертации доложены на научных институтских конференциях ВолгНИПЧИ в 2001 и 2002 гг., а также представлены на 4-ой интернациональной конференции по "Emerging zoonoses" (Ames, Iowa, USA, September 18-21,2003).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 7 научных работ.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 124 листах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, двух глав собственных исследований, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 188 источников, в том числе 66 отечественных и 122 иностранных авторов. Работа иллюстрирована 18 таблицами и 10 рисунками.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы

В опытах исследованы следующие культуры буркхольдерий: 61 штамм *B.pseudomallei*, выделенных в различных географических регионах (Юго Восточной и Передней Азии, Западной Африке, Северной Австралии), 16 штаммов - *B.mallei* европейского и азиатского происхождения, 10 штаммов - *B.cepacia*, 5 штаммов *B.thailandensis*, 1 штамм - *Pseudomonas aeruginosa* 4000, 1 штамм - *Escherichia coli* K-12, 1 штамм - *Yersinia pestis* EV, 1 штамм - *Stenotrophomonas maltophilia* 4131, все из коллекции ВолгНИПЧИ.

Культуры буркхольдерий и других гетерологичных видов выращивали на стандартных средах - Nutrient agar (МПА) и Tryptic soy agar (ТСА) ("Difco" USA) с добавлением 4% глицерина.

Оценку спектра усвоения различных органических соединений в качестве источника углерода и энергии проводили на минимальной среде Gilardi.

При определении активности антибактериальных препаратов методом кратных разведений в жидкой питательной среде использовали бульон Antibiotic medium 3 ("Difco", USA), а для сульфаниламидов - Mueller Hinton broth ("Difco", USA).

При определении активности антибактериальных препаратов методом дисков использовали агар Antibiotic medium 2 ("Difco", USA).

В работе использовались селективные среды:

для выделения *B.pseudomallei* (LAshdown, 1979) - ТСА ("Difco" USA) с добавлением 5 мг/л кристалл виолетта 50 мг/л нейтрального красного, 4 мг/л гентамицина;

для выделения *B.cepacia* (Henry D., Campbell M., McGimpsey C et al. 1999) BCSM - ТСА (Difco USA) с добавлением 600000 ЕД/л полимиксина, 10 мг/л гентамицина 2,5 мг/л ванкомицина



для выделения *B.mallei* (Жога Л.К., Илюхин В.И., Самыгин В.М. 1995): ТСА ("Difco"USA) с добавлением 10 мг/л ампициллина, 2,5 мг/л полимиксина, 2,5 мг/л гениана фиолетового-

В исследованиях использовали температуру выращивания *БТС*, кроме реакций, методика постановки которых требует иную величину температуры. Учет результатов осуществляли через 24 ч, для возбудителя сапа через 48 ч.

Все биохимические реакции проводились по общепринятым методикам (Gilardi.G.L., 1976; Palleroni,N.L., 1984; Илюхин'В.И. с соавт., 1998) При постановке пробы на луке наносили каплю культуры  $10^7$  -  $10^8$  м.к. на интактные изолированные чешуйки лука или же на срез луковицы. Учет результатов проводился по методике, описанной Wigley P. и Burton N.E. (1999).

Иммунологические диагностические исследования проведены по стандартным методам, адаптированным к условиям работы с патогенными буркхольдериями (Храпова Н.П. с соавт., 1995).

Активность антибактериальных препаратов определяли двумя способами — методом кратных разведений. в жидкой питательной среде и методом диффузии в агар (метод дисков).

Антибактериальную активность препаратов, не относящихся к химиотерапевтическим средствам (красители, спирты, детергенты и т.п.), оценивали только первым методом (кратных разведений).

Инфицирование и иммунизация животных. Бактериальную суспензию суточной культуры исследуемых штаммов вводили в объеме 0,5 мл 0,85% NaCl подкожно в паховую зону бедра. Вирулентность культур изучали на золотистых хомячках и морских свинках.  $LD_{50}$  рассчитывали по Керберу. Заражающую дозу вводили через 28 дней после иммунизации. Доза заражения 200  $LD_{50}$  культуры вирулентного штамма *B.pseudomallei* 100. Результаты опыта оценивали через 60 дней. с учетом, данных аутопсии выживших лабораторных, животных. Оценка достоверности различий выживаемости

между иммунизированными и контрольными группами животных проведена по методу Фишера

При идентификации штаммов буркхольдерий по системе Nefermtest 24 исследование проводили согласно инструкции, прилагаемой к набору.

Для трансформации использовали хлороформные лизаты клеток штаммов *B.pseudomallei* С 141, *B.mallei*- Ц 4, а также лизаты всех- пяти- штаммов *B.thailandensis* и *B.cepacia* 25416. В качестве реципиента был взят ауксотрофный мутант *B.pseudomallei* С 141 pur 90 his 107. Трансформацию проводили на плотной минимальной среде с гистидином. В качестве донора использовали испытываемые штаммы. Для постановки теста к 5 мл суточной бульонной культуры изучаемого штамма добавляли 1,5 мл хлороформа, хорошо перемешивали до образования молочной взвеси, оставляли при 37°C 2 часа, а затем на сутки оставляли при 4°C. Через сутки 0,1 мл лизата из верхней части содержимого пробирки смешивали с 0,1 мл взвеси суточной агаровой культуры реципиента в 0,85% NaCl, содержащей 1 млрд. м.к.мл и высевали на минимальную среду. В качестве контроля на ту же среду высевали отдельно лизат и взвесь реципиента. Учет результатов проводили через 48 - 72 ч. Появление колоний прототрофов на опытной чашке при отсутствии их в контроле, свидетельствует о хромосомной трансформации.

Полимеразную цепную реакцию проводили в объеме 25 мкл в микроцентрифужных пробирках (500 мкл). Реакционная смесь содержала: ДНК, специфические олигонуклеотидные прямые и обратные праймеры для идентификации *B.pseudomallei* и *B.mallei*, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, буфер и фермент Taq-полимеразу. Амплификацию ДНК проводили на программируемом термоциклере "Терцик" (НПФ "ДНК-технология", Москва) с использованием "горячего старта".

Анализ продуктов ПЦР осуществляли методом гель-электрофореза в 1,5 % агарозном геле согласно рекомендациям, изложенным в руководстве Т.Маниатиса с соавт. (1984).

## Результаты исследований и их обсуждение

При росте на среде Ashdown мелиоидозные колонии приобретают темно-красный цвет за счет сорбции из среды нейтрального красного, вокруг колоний наблюдается просветление среды.

У *B.thailandensis* в отличие от *B.pseudomallei* нет морфологической диссоциации, а на селективной среде интенсивность сорбции нейтрального красного существенно слабее.

Все штаммы буркхольдерий были изучены в бактериологических тестах используемых в дифференциальных схемах- и автоматических системах для идентификации глюкозу неферментирующих грамотрицательных бактерий. Приведены результаты основных тестов, изученных нами на наборе штаммов буркхольдерий, имеющихся в нашем распоряжении в таблице 1.

При постановке пробы на луке из 10 штаммов *B.cepacia* изменения в луковичной пластине были у 7 штаммов. При положительной реакции, особенно выраженной- у штамма *B.cepacia* -25416, по ходу мацерации отмечалась коричневая пигментация зоны поражения. Слабо выраженная реакция была у штаммов 3181,3189, 8235.

При проведении серологических исследований в диагностических иммунологических реакциях (РА, РДД, МФА) с использованием сывороток как к *B.pseudomallei*, так и к *B.thailandensis* выявлен высокий уровень родства антигенных структур этих микроорганизмов. Все культуры *B.pseudomallei*, *B.mallei* и *B.thailandensis* агглютинировались мелиоидозной сывороткой в диагностических титрах (1:200), из 10 штаммов *B.cepacia* только культура 8235 в РА имела титр 1:40, остальные давали отрицательный результат. Серологические методы в идентификации буркхольдерий имеют безусловное значение в общем комплексе дифференциальных признаков. К сожалению, в РФ не выпускаются стандартные (производственные) видоспецифические сыворотки ни для одного вида буркхольдерий.

Таблица 1. Дифференциальные признаки буркхольдерий

Тесты	<i>pseudomallei</i>	<i>thailandensis</i>	<i>mallei</i>	<i>cepacia</i>
Окисление: глюкозы	+	+	+	+
фруктозы	+	+	+	+
ксилозы	+	+	+	+
лактозы	+	+	+	+
мальтозы	+	+	+	+
Аргининдигидролаза	+	+	+	-
Лизиндекарбоксилаза	-	-	-	+
Орнитиндекарбоксилаза	-	-	-	+/-
ONPG	-	-	-	+
Желатиназа	+	+	+	+/-
Денитрификация	+	+	+	-
ДНКаза	-	-	-	-
Гидролиз эскулина	+/-	+/-	-	-
Число жгутиков	>1	>1	-	>1
Рост при 42 <sup>0</sup> С	+	+	-	+/-
Полимиксин	R	R	R	R
Гентамицин	R	R	S	R
Рост при 2,5% NaCl	-	-	-	+
Ассимиляция L-арабинозы	-	+	-	+
Наличие пигмента	-	-	-	+/-
R-колонии на агаре	+	-	-	-
Вирулентность для з/х	+	-	+	-
Ауксотрофность	-	-	-	-

Примечание: (+) и (-) обозначают наличие или отсутствие признака у 90% и более штаммов данного вида R - устойчивость; S - чувствительность к антибиотикам

Высокая степень родства изученных буркхольдерий подчеркивается наличием множественных общих линий в РДД, проявляющихся при использовании сывороток, полученных к ультразвуковым лизатам ацетоновых клеток как *B.pseudomallei* так и *B.cepacia*. С одной стороны это свидетельствует о высокой степени родства видов семейства *Buracaceae* являющихся в отличие от псевдомонад монофилетической таксономической

группой, с другой стороны это предопределяет сложности разработки видоспецифических диагностикумов. Особенно это проявляется внутри групп близкородственных видов.

При использовании в опытах мелиоидозных диагностических флуоресцентных иммуноглобулинов, все исследуемые штаммы *B.pseudomallei* и *B.mallei* выявлялись в МФА при использовании препарата в рабочих титрах (1:256), штаммы *B.thailandensis* выявлялись только при использовании иммуноглобулинов в разведении в 3-4 раза меньшем (1:32 - 1:64), штаммы гетерологичных культур, в том числе и *B.cepacia*, этим препаратом не выявлялись.

В случае использования МФА для выявления культур *B.cepacia* видно, что уровень свечения различных штаммов в непрямом методе варьирует в широком диапазоне. Причем, если принять за рабочий титр разведение 1:800, то выпадают 2 штамма *B.cepacia* > а титр сыворотки, дающий положительную реакцию с гетерологичными культурами, отличается всего на 1-2 разведения. Более ценные диагностические результаты получаются в прямом методе, в котором отчетливо отсекаются гетерологичные виды.

При сопоставлении резистентности буркхольдерий к красителям, детергентам и антисептикам, применяемым в микробиологии, обращает на себя внимание, что в большинстве случаев наименьший уровень МПК среди буркхольдерий отмечается для культур *B.mallei*, а наивысший - для *B.cepacia*.

Вирулентность культур *B.mallei*, *B.pseudomallei* и *B.cepacia* проверяли на золотистых хомячках и морских свинках. Животные погибали только в случае их заражения возбудителями сапа и мелиоидоза, LD<sub>50</sub> штаммов этих микроорганизмов для золотистых хомячков составила 10<sup>1</sup> - 10<sup>2</sup> м.к. LD<sub>50</sub> штаммов *B.pseudomallei* для морских свинок широко варьировала в пределах от 10<sup>2</sup> до 10<sup>5</sup> м.к. Штаммы *B.mallei* для морских свинок оказались маловирулентными, за исключением *B.mallei* Ц-4, у которого LD<sub>50</sub> воспроизводимо повторялась в пределах 10<sup>6</sup> м.к., у остальных сапных культур

LD<sub>50</sub> была в пределах 10<sup>8</sup> м.к., причем у животных формировались затяжные формы заболевания. *B.cepacia* оказалась непатогенной для золотистых хомячков и морских свинок (ЛД<sub>50</sub> > 10<sup>8</sup> м.к.).

Вирулентность культур *B.thailandensis* проверяли на двух видах животных: золотистых хомячках и морских свинках. LD<sub>50</sub> для золотистых хомячков составила в среднем 10<sup>6</sup> м.к. Гибель морских свинок при введении 10<sup>8</sup> м.к. не отмечалась.

При идентификации буркхольдерий по системе Nefermtest 24 было исследовано 28 штаммов. Учет проводился по цветным реакциям, характер которых определен стандартами в соответствии с рисунками, прилагаемыми фирмой к набору те,ст-системы.

При идентификации буркхольдерий по этой системе была установлена принадлежность *B.pseudomallei* Vang к виду *B.cepacia*, что в принципе подтверждается и другими нашими исследованиями (vir LDCADH, ONPG, aga\*). К тому же он давал отрицательную реакцию в ПЦР с мелиоидозными праймерами, а в РДД формировал многочисленные идентичные преципитаты с референтным штаммом *B.cepacia*. Также была установлена принадлежность ***B.mallei* Олоф и *B.mallei* Конный к видам *Alcaligenes* и *Oligella uretralis***. Правомерность включения этих культур в коллекцию вида *B.mallei* ставилась под сомнение в нашей лаборатории и ранее. При постановке всех тестов, включенных в схему идентификации буркхольдерий, видна отчетливая очевидность несоответствия по видовым признакам. Оба штамма отличались от типичных культур *B.mallei* по росту на селективных средах (резистентность не только к гентамицину, но и к рифампицину, тетрациклину, сульфаниламидам), антигенному набору (отрицательные результаты в РДД, РА с мелиоидозной сывороткой), вирулентности для золотистых хомячков (ЛД<sub>50</sub> > 10<sup>9</sup> м.к.).

Однако в данной тест-системе получены переменные результаты на тестах, которые при стандартных исследованиях были стабильными. Особенно принципиальными были расхождения в оценке декарбоксилаз и денитрифика-

ции. В итоге отмечено, что штаммы, видовая принадлежность которых обычными лабораторными методами, включая пробы на животных, не вызывает сомнений, по этой системе может правильно не дифференцироваться, причем % ошибок достаточно высок, а вероятность точности диагностики даже для референтных штаммов, в свою очередь, низкая.

При проведении генетической трансформации реципиент *B.pseudomallei* C 141 rig 90 his 107 трансформировался по хромосомному маркеру ДНК гомологичного вида, а также *B.mallei* и *B.thailandensis*, но не *B.cepacia*. Донорская активность *B.thailandensis* не имела существенных штаммовых различий и по частоте приближалась к трансформирующей способности *B.mallei* (табл. 2).

Таблица 2. Показатели трансформирующей активности различных видов буркхольдерий

Реципиент	Штаммы доноры	Частота образования Rig <sup>+</sup> трансформантов
<i>B.pseudomallei</i> C 141 rig 90 his 107	<i>B.pseudomallei</i> C 141	$>1,0 \times 10^{-4}$
	<i>B.mallei</i> Ц 4	$3,0 \times 10^{-5}$
	<i>B.thailandensis</i> 251	$0,8 \times 10^{-5}$
	<i>B.thailandensis</i> 264	$0,9 \times 10^{-5}$
	<i>B.thailandensis</i> 265	$0,8 \times 10^{-5}$
	<i>B.thailandensis</i> 295	$1,0 \times 10^{-5}$
	<i>B.thailandensis</i> 299	$1, \times 10^{-5}$
	<i>B.cepacia</i> 25416	0

Примечание: частота реверсий по маркеру Rig<sup>+</sup>  $< 1,0 \times 10^{-8}$

При постановке ПЦР для идентификации буркхольдерий, с помощью сконструированной амплификационной тест-системы детектировались все штаммы возбудителей сапа и мелиоидоза, хранящиеся в коллекционном центре ВолгНИПЧИ, за исключением *B.pseudomallei* Vang, *B.mallei* Олоф и *B.mallei* Конный.

С ДНК гетерологичных микроорганизмов, в том числе с *B.thailandensis* и *B.cepacia* амплификатов ожидаемых размеров в ПЦР не было выявлено (рис 1).

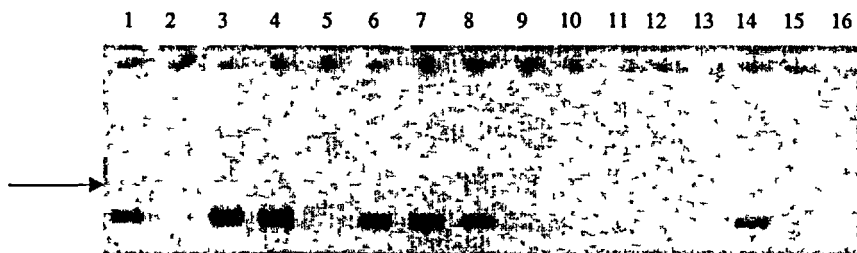


Рис. 1. Электрофореграмма результатов ПЦР с праймерами b23s7-b23a8 при исследовании различных гетерологичных микроорганизмов

- 1 - *B.pseudomallei* C 141
- 2 - *B.thailandensis* 264
- 3 - *B.pseudomallei* 100
- 4 - *B.pseudomallei* 56812
- 5 - *B.pseudomallei* Vang
- 6 - *B.pseudomallei* 57576
- 7 - *B.mallei* Z-12
- 8 - *B.pseudomallei* 107
- 9 - *B.cepacia* 25416
- 10- *P.aeruginosa* 4000
- 11- *E.coli* HB101
- 12- *B.mallei* Конный
- 13- *B.mallei* Олоф
- 14- Положительный контроль - ДНК  
*B.mallei* 10230
- 15- Отрицательный контроль - H<sub>2</sub>O
- 16- *B.cepacia* 8236



Идентификация буркхольдерий в клинической практике в зависимости от условий выделения культуры бывает в двух вариантах - ускоренная (индикация), в случае подозрения на заболевание сапом или мелиоидозом и стандартная, предусмотренная различными инструкциями и рекомендациями по выделению и идентификации грамотрицательных, не ферментирующих глюкозу, оксидазоположительных бактерий.

В первом варианте культура или материал, подозрительный на зараженность *B.mallei* или *B.pseudomallei*, исследуются иммунологическими методами и в ПЦР. В этом случае ответ выдается уже в первые часы после получения материала, однако чувствительность и специфичность этих методов даже в руках опытных специалистов колеблется от 60 до 95%. Основная опасность, понятно; кроется в случае гиподиагностики.

При отсутствии эпидемиологической настороженности выделение культур буркхольдерий происходит в ходе выполнения обычных стандартных исследований по известным схемам или с применением наборов для систем типа API.

Все культуры буркхольдерий характеризуются рядом общих-свойств, позволяющих их объединить в один род. Этими облигатными признаками являются помимо общих свойств, для так называемой группы глюкозу не ферментирующих бактерий, еще несколько объединяющих характеристик (прототрофность, устойчивость к полимиксину отсутствие ДНК-азы. и диффундирующих в среду пигментов).

Дальнейшая идентификация выделенной культуры, обладающая выше перечисленными родовыми свойствами, требует постановки дополнительных тестов, позволяющих с определенной вероятностью отнести ее к отдельному виду буркхольдерий. Решающими тестами в дифференциации буркхольдерий группы *pseudomallei* от *cepacia* являются проверка декарбоксилазной активности с аргинином и лизином и тест на  $\beta$  - галактозидазу (табл. 3).

Таблица 3. Дифференциальные (видовые) признаки буркхольдерий

Тест	<i>cepacia</i>	<i>pseudomallei</i>	<i>thailandensis</i>	<i>mallei</i>
ONPG	+	-	-	-
Аргининдигидролаза	-	+	+	+
Лизиндекарбоксилаза	+	-	-	-
Рост при 42°C	±	+	+	-
Усвоение L – арабинозы	+	-	+	-
Чувствительность к гентамицину	-	-	-	+

Примечание: (+) или (-) — наличие или отсутствие признака у 90% штаммов данного вида, (±) - тест вариабельный

Дифференциация видов внутри группы *pseudomallei* базируется как на основе фенотипических свойств- (усвоение L-арабинозы, подвижность, чувствительность к аминогликозидам, рост при 42°C), так и на базе ПЦР с применением праймеров, позволяющих дифференцировать все 3 вида группы *pseudomallei*. При окончательном оформлении документации на выделенные штаммы патогенных буркхольдерий обязательным элементом является проверка вирулентности штаммов для золотистых хомячков и морских свинок.

Ряд тестов,- стандартно используемых- в бактериологических исследованиях, проявляется при исследовании буркхольдерий в качестве вариабельных, учитывая, что эта изменчивость сохраняется при пассировании культур на животных и питательных средах есть основание считать эти признаки диагностическими при разграничении культур на биовары (эпидемиологические маркеры)

Суммируя все проведенные исследования, можно представить себе ход последовательной дифференциации культур буркхольдерий по этапам, представленным на предлагаемой нами схеме, которые включают в себя все диагностически значимые культурально морфологические, биохимические, иммунологические и генетические методы (рис.2).

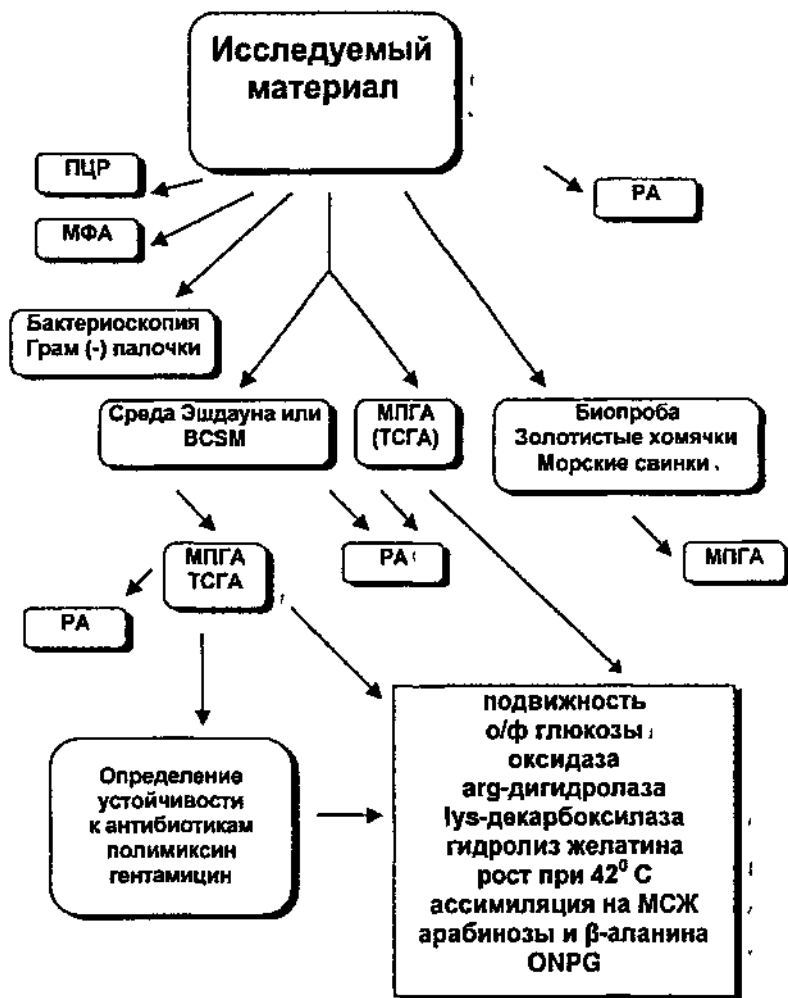


Рисунок 2. Схема лабораторной диагностики буркхольдерий

Это обеспечивает основной на сегодняшний день принцип полифазности дифференциальной диагностики буркхольдерий. Предлагаемая схема позволяет давать, как предварительный ответ за счет постановки в течение нескольких часов иммунологических реакций и ПЦР, так и окончательный - через 2-7 сут, когда будут поставлены с выделенной «чистой» культурой основные тесты, значимые для определения родовой и видовой принадлежности изучаемых штаммов, включая переменные индивидуальные характеристики каждой культуры.

## ВЫВОДЫ

1. На основании изучения основных фенотипических свойств, рекомендуемых при идентификации не ферментирующих глюкозу грамтрицательных бактерий, выявлен набор стабильных и переменных диагностических признаков для каждого вида буркхольдерий, имеющих значение в медицинской практике.
2. Определен уровень резистентности буркхольдерий к антибактериальным средствам, показано принципиальное значение показателя чувствительности к полимиксину и гентамицину, что может быть, использовано и для разработки селективных сред и как самостоятельный показатель при дифференциации изучаемых культур, подозрительных на принадлежность к роду *Burkholdena*.
3. Изучение свойств селективных сред для буркхольдерий (среда Эшдауна и BCSM) показало их высокую степень избирательности и чувствительности, обусловленную не только активностью селективных факторов, но и характером морфологии колоний и сорбцией красителей из сред.
4. Отобран комплекс биохимических, иммунологических и генетических методов, обеспечивающий на основе принципа полифазной таксономии установление вида идентифицируемых культур буркхольдерий.

5. Выявлен набор диагностических тестов, обеспечивших создание ключей для установления рода вида и биовара идентифицируемых штаммов патогенных буркхольдерий.
6. Комплексное изучение различными методами набора штаммов *B.mallei*, *B.pseudomallei* и *B.thailandensis* дает основание предположить, что степень их родства позволяет объединить их в одну таксономическую суправидовую единицу - группу *pseudomallei*, а разделение на виды по единичным диагностическим признакам имеет не столько таксономическую ценность, сколько эпидемиологическую.
7. Штаммы *B.thailandensis*, учитывая их авирулентность при высокой степени сходства биохимических и антигенных свойств с *B.pseudomallei*, могут быть использованы в качестве имитатора возбудителя мелиоидоза при проведении учений, по идентификации возбудителей особо опасных инфекций.

**Список работ,  
опубликованных по теме диссертации**

1. Будченко А.А., Илюхин В.И., Антонов В.А., Сеимова И.К., Трушкина М.Н., Меринова Л.К., Замараев В.С., Сенина Т.В. Изучение стабильности признаков, используемых для внутривидового типирования патогенных буркхольдерий // Природно-очаговые особо опасные инфекции на юге России, их профилактика и лабораторная диагностика. - Сб.науч.тр.- Астрахань, 2001. - С.276 - 278.
2. Dyukhin V.I., Senina T.V., Plekhanova N.G., Antonov V.A., Merinova L.K., Tkatchenko G.A., Zamaraeva S.V., Alekseeva V.V. Biological properties and differentiation of pathogenic species of genus burkholderia // Natural infectious diseases. Abstracts of scientific conference. - Ulaanbaatar, 6 december 2001. - P.33 - 35.

3. Илюхин В.И., Сенина Т.В., Плеханова Н.Г., Антонов В.А., Меринова Л.К., Сеимова И.К. *Burkholderia thailandensis*: биологические свойства, идентификация и таксономическая позиция // Мол. генет., микробиол. и вирусол. - 2002. - N 1. - С. 7 - 11.
4. Сенина Т.В. Факторы резистентно патогенных буркхольдерий, обеспечивающие их экологическую нишу в условиях естественного обитания // Поволжский экологический вестник. - Волгоград. - 2002. - С.245-247.
5. Ilyukhin V.I., Alekseev V.V., Batmanov V.P., Perepelitsyna S.V., Senina T.V., Kislichkin N.N. Some aspects of treatment and prophylaxis of experimental airborne melioidosis // 4<sup>th</sup> International conference on emerging zoonoses. - Ames, Iowa. - 2003. - С. 70.
6. Илюхин В.И., Плеханова Н.Г., Сенина Т.В., Становая О.В., Кисличкин Н.Н. Экспериментальное обоснование возможности применения туляремийной живой вакцины для повышения резистентности к гетерологичным инфекционным заболеваниям- // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. — 2004.- №2. - С.38 - 42.
7. Практическое пособие для подготовки врачей-бактериологов и эпидемиологов по вопросам противодействия биотерроризму / Онищенко Г.Г., Федоров Ю.М., Жилина Н.Я., Субботин В.Г., Алексеев В.В. Сенина Т.В. и др. - Волгоград - 2004. - 126с.

Биологические свойства и дифференциальная диагностика буркхолдерий,  
имеющих значение в медицинской практике.

Формат 60x84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub> Бумага офсетная №1-65 гр.  
Печать офсетная. Гарнитура Тайме  
Тираж 100 экз. Заказ № 1625

Отпечатано ООО «Бланк». Лиц. № 3550  
г. Волгоград, ул. Скосырева, 2а

**# 15566**