

охарактеризованные с помощью новой геоинформационной системы. Здоровье населения и среда обитания. 2014, 9: 32 —34.

2. Зубкова Д.А., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б., Шестиалтынова И.С., Архангельская И.В., Ежова М.И., Ускова Н.Н. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2014621055. Геоинформационная система. Холера 1989-2014, 2014.
3. Монахова Е.В. Факторы патогенности нехолерогенных штаммов холерных вибрионов. Автореф. дис. д-ра биол. наук. Ростов-на-Дону, 2012.
4. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Кутырев В.В., Смирнова Н.И., Щербакова С.А., Москвитина Э.А., Титова С.В. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации. Журн. микробиол. 2016, 1: 89-101.
5. Осина Н.А., Каляева Т.Б., Бугоркова Т.В., Касьян И.А., Оброткина Н.Ф. Результаты мониторинга холерных вибрионов в водных экосистемах на территории Республики Калмыкия. Здоровье населения и среда обитания. 2013, 2 (239): 28-30.
6. Титова С.В., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Самородова А.В., Тюленева Е.Г., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Иванова С.М., Ковалева Т.В., Водопьянов С.О. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2006-2015 гг. Прогноз на 2016 г. Пробл. особо опасных инф. 2016, 1: 20-27.

Поступила 10.05.16

Контактная информация: Левченко Дарья Александровна,
344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40, р.т. (863)240-91-33

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*И.И.Корсакова, В.А.Антонов, Н.П.Храпова,
Т.В.Замарина, Е.В.Пименова, Е.Э.Ким, Л.К.Меринова,
Т.В.Сенина, Г.А.Ткаченко, С.С.Савченко, Н.П.Агеева,
Е.В.Молчанова, Я.А.Лопастейская, Е.В.Прохватилова*

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САПА И МЕЛИОИДОЗА НА ОСНОВЕ ПРИНЦИПОВ ПОЛИФАЗНОГО ТАКСОНОМИЧЕСКОГО ПОДХОДА

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Определить оптимальный набор наиболее эффективных методов идентификации и внутривидового типирования возбудителей сапа и мелиоидоза. *Материалы и методы.* Использованы бактериологические, иммунохимические, молекулярно-генетические методы. *Результаты.* Изучена возможность идентификации коллекционных штаммов патогенных и близкородственных буркхольдерий в полуавтоматических системах. Разработаны способы выявления информативных переменных участков геномов указанных микроорганизмов, выбраны методы их генетического типирования. Установлена эффективность применения преципитирующих МКА для дифференциации буркхольдерий. Обобщены данные о диагностических возможностях иммуноглобулинов, флуоресцирующих на основе моноклональных антител различной эпитопной направленности, для обнаружения и идентификации *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Созданы экспериментальные серии амплификационных тест-систем для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза в формате ПЦР в режиме реального времени. *Заключение.* Предложен ряд методов идентификации и типирования возбудителей сапа и мелиоидоза.

Журн. микробиол., 2016, № 6, С. 25—34

Ключевые слова: возбудители сапа и мелиоидоза, геномы патогенных буркхольдерий, моноклональные антитела, внутривидовое типирование

I.I.Korsakova, V.A.Antonov, N.P.Khrapova,
T.V.Zamarina, E.V.Pimenova, E.E.Kim, L.K.Merinova,
T.V.Senina, G.A.Tkachenko, S.S.Savchenko, N.P.Ageeva,
E.V.Molchanova, Ya.A.Lopasteiskaya, E.V.Prokhvatilova

IDENTIFICATION OF CAUSATIVE AGENTS OF GLANDERS AND MELIOIDOSIS BASED ON PRINCIPLES OF POLYPHASE TAXONOMIC APPROACH

Volgograd Research Institute for Plague Control, Russia

Aim. Determine an optimal set of the most effective methods of identification and intra-species typing of causative agents of glanders and melioidosis. **Materials and methods.** Bacteriologic, immunochemical, molecular-genetic methods were used. **Results.** A possibility to identify collection strains of pathogenic and closely related *Burkholderia* in semiautomatic systems is studied. Means of detection of informative variable genome segments of the specified microorganisms were developed, methods of their genetic typing were selected. Effectiveness of application of precipitating mAbs for differentiation of *Burkholderia* was established. Data on diagnostic possibilities of immunoglobulins fluorescing based on monoclonal antibodies of various etiotropic directionality for detection and identification of *B. mallei* and *B. pseudomallei* are generalized. Experimental series of amplification test-systems for identification of glanders and melioidosis causative agents in real-time PCR format are created. **Conclusion.** A number of methods for identification and typing of glanders and melioidosis causative agents is proposed.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 6, P. 25–34

Key words: glanders and melioidosis causative agents, pathogenic *Burkholderia* genomes, monoclonal antibodies, intra-species typing

ВВЕДЕНИЕ

Полифазная таксономия объединяет и использует всю имеющуюся многоуровневую информацию (от молекулярной до экологической) для выделения консенсусных таксономических групп. На сегодняшний день такой подход широко применяется при идентификации бактерий рода *Burkholderia* [15]. Для установления видовой принадлежности культур *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei*, а также их дифференциации от других близкородственных буркхольдерий, имеющих с ними высокий уровень гомологии, используют изучение культурально-морфологических и биохимических свойств микроорганизмов [5], постановку иммунодиагностических [7] и молекулярно-генетических тестов [13]. Особенности клинического течения мелиоидоза, в том числе и развитие у пациентов септицемии в первые двое суток от начала заболевания, принадлежность *B. pseudomallei* и *B. mallei* к микроорганизмам I — II группы патогенности требуют наиболее раннего определения вида возбудителя.

Цель работы — определить оптимальный набор наиболее эффективных методов идентификации и внутривидового типирования возбудителей сапа и мелиоидоза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Идентификационные коды и варьируемые фенотипические признаки коллекционных штаммов патогенных и близкородственных буркхольдерий определяли в полуавтоматических системах идентификации NEFERMtest 24 и API 20NE. Для опытов по генетической трансформации использовали ауксотрофные мутанты, индуцированные методом химического НГ-мутационеза

[6]. Методики тиражирования антителопродуцирующих гибридом *in vitro* и *in vivo*, накопления, очистки и контроля моноклональных антител (МКА) представлены ранее [10]. Температуры плавления и отжига олигонуклеотидных праймеров для ПЦР рассчитывались по [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Коллекционные штаммы патогенных и близкородственных буркхольдерий были исследованы в полуавтоматических системах идентификации.

Результаты идентификации по системе Nefermtest 24 оказались вариабельными. Четыре из пяти исследованных штаммов возбудителя мелиоидоза определялись как *B. pseudomallei* с вероятностью 77,3%, а один — 99,9%. Уровень определения *B. mallei* оказался выше (вероятность 94,89 — 100% для двух третей штаммов), однако штаммы Олоф и Конный были отнесены к другим видам. Отмечен высокий процент ошибок при установлении видовой принадлежности *Burkholderia thailandensis*: три из пяти исследованных штаммов определены как *B. pseudomallei* (вероятность 98,99 — 99,9%), а два не были идентифицированы. Точность определения *Burkholderia ceracia* варьировала в пределах от 16,14 до 99,69%.

Использование системы API 20NE оказалось более информативным: 12 из 15 исследованных штаммов *B. ceracia* с вероятностью от 95,2 до 99,9% по определителю были отнесены к виду *B. ceracia*, три штамма (320, 5809 и 5812) как представители этого вида не определены. Для штаммов *B. pseudomallei* точность определения составила 99,9%, *B. thailandensis* ошибочно идентифицированы как *B. pseudomallei* с вероятностью 82,6%.

Проведена сравнительная оценка эффективности селективных сред для различных видов буркхольдерий. Основой для всех сред служил триптиказосоевый агар (ТСА, «Difco», США), а селективными факторами выступали кристалл виолетт и антибиотики.

Для выделения *B. ceracia* применялась селективная среда ВСМ следующего состава: ТСА («Difco», США) с добавлением 600 000 ЕД/л полимиксина, 10 мг/л гентамицина, 2,5 мг/л ванкомицина. Рост культур других видов микроорганизмов, часто встречающихся в медицинской практике, таких как *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, на этой среде практически полностью подавлялся.

B. pseudomallei выделяли на среде L. Ashdown с добавлением 5 мг/л кристалл виолетта, 50 мг/л нейтрального красного, 4 мг/л гентамицина, при росте на которой мелиоидозные колонии приобретали темно-красный цвет за счет сорбции из среды нейтрального красного, вокруг них наблюдалось просветление среды. При культивировании *B. thailandensis* на селективной среде L. Ashdown наблюдали колонии розового цвета без выраженного просветления среды вокруг них, что позволяло отличать эти виды буркхольдерий.

B. ceracia, *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* устойчивы к гентамицину, на отобранных нами селективных средах (ВСМ и среде L. Ashdown) проявляли способность к росту, практически не отличающуюся от стандартной питательной среды (ТСА). Штаммы *B. mallei* к гентамицину чувствительны, характеризовались отсутствием роста на вышеуказанных селективных средах.

Для выделения *B. mallei* была взята транспортная среда для патогенных буркхольдерий [1], состоящая из ТСА («Difco», США) с добавлением 10 мг/л ампициллина, 2,5 мг/л полимиксина, 2,5 мг/л генцианового фиолетового.

Возможность применения генетической трансформации для идентификации культур *B. pseudomallei* основывается на естественной способности

этого микроорганизма воспринимать с определенной частотой гомологичную хромосомную ДНК и ДНК близкородственного вида *V. mallei*. В качестве реципиента был отобран двумаркерный мутант *V. pseudomallei* C-141 pur90his107, который по обоим селектируемым признакам трансформировался с частотой $n \cdot 10^{-6}$, а также 60806pur90met48 с более низкой трансформационной активностью.

В процессе работы исследована и трансформирующая активность *V. thailandensis*. С этой целью были получены индуцированные нитрозогуанидином мутанты *V. thailandensis* 264 с различными маркерами ауксотрофности, использованные далее как реципиенты.

Установлено, что в качестве доноров дикие штаммы *V. thailandensis* могут трансформировать ауксотрофные реципиенты *V. pseudomallei* с частотой, не превышающей $1,3-2,8 \cdot 10^{-8}$. При этом собственная реципиентная активность мутантов *V. thailandensis* в гомологичных скрещиваниях находилась в пределах $4,2 \cdot 10^{-7}-2,6 \cdot 10^{-6}$.

В общей идентификационной схеме в скрещиваниях между *V. pseudomallei*, *V. mallei*, *V. thailandensis* и филогенетически более отдаленным видом *V. ceracia* возбудитель мелиоидоза выявлялся с наибольшей частотой при передаче хромосомного материала от гомологичного донора ($n \cdot 10^{-7}-n \cdot 10^{-6}$) и далее от доноров *V. mallei* ($n \cdot 10^{-7}$) и *V. thailandensis* ($n \cdot 10^{-8}$ и менее). Донорная активность *V. ceracia* по отношению к *V. pseudomallei* не обнаружена.

В свою очередь, штаммы *V. pseudomallei* участвовали в трансформации реципиентов *V. thailandensis*, но не трансформировали штаммы *V. mallei*. В пределах использованного набора штаммов не наблюдалось трансформационной передачи от *V. mallei* к *V. thailandensis*, тогда как *V. pseudomallei* эффективно трансформировался ДНК возбудителя сапа.

Одним из направлений совершенствования методов идентификации возбудителя мелиоидоза признано получение МКА к гликопротеину капсулы 200 kDa *V. pseudomallei* [8], наличие которого на поверхности микробной клетки является характерным фенотипическим признаком вирулентных, не способных ассимилировать арабинозу Aga^- клинических изолятов и Aga^- изолятов из внешней среды. Данный антиген отсутствует у ассимилирующих арабинозу Aga^+ авирулентных изолятов из внешней среды [8], поэтому диагностические препараты, разработанные на его основе, лишены перекрестной активности в отношении *V. thailandensis*, близкородственной буркхольдериям III группы патогенности.

В работе использованы экспериментальные образцы препаратов для метода флуоресцирующих антител на основе семи вариантов МКА различной эпиптопной направленности к антигену 200 kDa *V. pseudomallei*. Значения аффинности различных вариантов МКА колебались в диапазоне от $9 \cdot 10^5$ до $8 \cdot 10^7 M^{-1}$. Рабочие разведения экспериментальных препаратов были равны 1:8 — 1:16.

Иммунофлуоресцентный анализ изучаемых культур буркхольдерий показал, что экспериментальный препарат на основе МКА 6A₁₁ в рабочем разведении специфически взаимодействовал с микробными клетками 100% музейных штаммов *V. mallei* и 70% *V. pseudomallei*, но не окрашивал клетки близкородственных буркхольдерий и других видов бактерий. Экспериментальные иммуноглобулины на основе МКА 5H₁₁ в рабочем разведении специфически окрашивали микробные клетки 80% музейных штаммов *V. pseudomallei* и одного из 13 музейных штаммов *V. mallei*. При этом данный препарат не взаимодействовал с клетками *V. thailandensis*, *V. ceracia*, *Burkholderia gladioli* и гетерологичных микроорганизмов.

Реакция иммунодиффузии (РИД) с применением преципитирующих МКА, узнающих гликопротеин капсулы возбудителя мелиоидоза 200 kDa, направлена на идентификацию чистых культур микроорганизмов, предположительно относящихся к группе патогенных буркхольдерий. Она позволяет получить информацию как о наличии, так и об относительном количестве этого маркера вирулентности возбудителя мелиоидоза в образце испытуемого материала. При постановке РИД с водно-солевыми экстрактами (ВСЭ) возбудителей мелиоидоза, сапа, близкородственных буркхольдерий и ряда гетерологичных микроорганизмов установлено, что все 10 типов испытанных МКА к антигену 200 kDa *B. pseudomallei* обладали преципитирующей активностью, но в разной степени: они позволяли выявлять от 9 до 81% типичных штаммов возбудителя мелиоидоза. Наилучшими в этом отношении были МКА 3С₆, 6А₁₁ (81%) и 4А₁₀, 6Е₇ (72%), 7 вариантов моноклональных антител образовывали преципитаты только с ВСЭ *B. pseudomallei* и не обнаруживали антиген 200 kDa в ВСЭ возбудителей сапа и гетерологичных микроорганизмов.

Олигонуклеотидные ДНК-зонды для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза выбраны в результате анализа секвенированных нуклеотидных последовательностей геномов *B. mallei* ATCC 23344 (<http://www.tigr.org>) и *B. pseudomallei* K96243 (<http://www.sanger.ac.uk>), а также различных нуклеотидных последовательностей буркхольдерий, представленных в GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Так, на основе консервативных последовательностей участка гена 23S рибосомальной РНК, фрагмента гена *orf13* из кластера генов III типа секреции и флагеллярного гена *fliC* были выбраны олигонуклеотидные последовательности праймеров и гибридизационных зондов, которые по результатам компьютерного анализа специфически детектировали фрагменты указанных генов возбудителей сапа и мелиоидоза.

Определена оптимальная концентрация флуоресцентных зондов, составившая 6 пМ на одну реакцию, а также температура отжига в зависимости от ДНК-мишени. Опытным путем установлено время каждого этапа реакции, которое варьировало в зависимости от технической характеристики амплификатора. Условия полимеразной цепной реакции адаптированы для проведения амплификации ДНК на термоциклере «Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-технология», Москва) с последующей детекцией по конечной точке на детекторе флуоресценции «Gene» (ЗАО «НПФ ДНК-технология», Москва) и для амплификации в режиме реального времени на приборах «Rotor-Gene 6000» («Corbett Research», Австралия) и «SmartCycler» («Cepheid», США). При детекции в режиме реального времени наблюдали повышение чувствительности ПЦР на один — два порядка в сравнении с детекцией по конечной точке.

ПЦР с олигонуклеотидными праймерами и зондами, направленными на обнаружение генов 23S рНК, *orf13* и флагеллярного гена *B. mallei* и *B. pseudomallei*, позволила выявить $1 \cdot 10^3$ — $1 \cdot 10^4$ м.к./мл возбудителей сапа и мелиоидоза в 100% проб чистых культур, а $1 \cdot 10^2$ м.к./мл — в 60–66,6% случаев. В контрольных пробах, содержащих лишь ДНК гетерологичных микроорганизмов в концентрации $1 \cdot 10^7$ м.к./мл, получены отрицательные результаты. ДНК возбудителя мелиоидоза удалось обнаружить и в составе смеси с ДНК микробов-контаминантов с помощью реакции амплификации с указанными праймерами и зондами. Следовательно, избыток гетерологичной ДНК в пробе, содержащей ДНК возбудителя мелиоидоза, не оказывал ингибирующего влияния на ПЦР и не вызывал появления ложноположительных фрагментов амплификации.

Кроме того, изучена возможность использования нескольких генетических методов (мультилокусный анализ числа вариабельных тандемных повторов — MLVA, DFR-анализ) для проведения внутривидовой дифференциации патогенных буркхольдерий.

Поиск простых повторяющихся последовательностей аннотированных геномов возбудителя сапа на уже известных локусах в составе генома *B. pseudomallei* позволил сконструировать тест-систему для генотипирования *B. mallei* методом VNTR, которая была апробирована на 14 штаммах возбудителя сапа из лаборатории коллекционных штаммов Волгоградского научно-исследовательского противочумного института. Наиболее эффективными для проведения внутривидового типирования штаммов возбудителя сапа оказались локусы VNTR 5 и VNTR 9: с их помощью выявлено 13 генотипов в коллекции музейных штаммов *B. mallei*, 12 из которых являлись уникальными, т. е. обнаружены только у одного штамма. Сопоставление MLVA-профилей 14 коллекционных штаммов *B. mallei* с профилями 4 полученных из GenBank штаммов показало, что разработанная схема генотипирования на основе анализа числа тандемных повторов пяти локусов позволяет разделить указанные 18 штаммов на 17 типов.

На наборе коллекционных штаммов *B. pseudomallei* была апробирована предложенная K. Duangsonk et al. [9] схема внутривидового DFR-типирования, в результате чего 18 исследованных штаммов возбудителя мелиоидоза удалось разделить на 13 VAT-типов.

В процессе разработки схемы VAT-анализа возбудителя сапа и поиска ДНК-мишеней проведен сравнительный анализ 4 аннотированных геномов штаммов *B. mallei* ATCC 23344, *B. mallei* NCTC 10247, *B. mallei* NCTC 10229 и *B. mallei* SAVP1, доступных в генетических базах данных (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.insdc.org/>, www.ebi.ac.uk/), и составлена полная библиотека вариабельных фрагментов генома возбудителя сапа. В итоге определено 9 пар олигонуклеотидных затравок, способных обеспечить дифференциацию аннотированных геномов возбудителя сапа *in silico*, из которых 4 пары фланкировали различающиеся последовательности на I хромосоме и 5 пар на II хромосоме.

Разработанная нами схема генотипирования возбудителя сапа состоит из 9 реакций амплификации. При исследовании данным методом 18 штаммов *B. mallei* (4 из которых — геномы штаммов из GenBank, анализированные *in silico*) по предложенной схеме внутривидовой дифференциации было выделено 15 типов. Из 9 сконструированных праймеров только праймеры VAT2-Ch1 и VAT6-Ch2 не позволяли различать исследуемые музейные штаммы *B. mallei*, но дифференцировали штаммы возбудителя сапа, представленные в генетических базах данных, что свидетельствовало о возможности их использования для генотипирования *B. mallei*.

В целом, для внутривидовой дифференциации возбудителя сапа на основе дифференцирующих регионов генома (DFR) разработано 9 олигонуклеотидных флуоресцентно-меченных зондов, позволяющих проводить детекцию наличия дифференцирующих последовательностей ДНК по конечной точке и в режиме реального времени. Апробация схемы DFR-типирования на наборе коллекционных штаммов возбудителя сапа показала ее высокую информативность и дискриминирующую силу.

С целью оценки диагностических возможностей экспериментальных наборов реагентов по выявлению и идентификации близкородственных видов буркхольдерий проведена апробация многоуровневой системы идентифика-

ции и типирования возбудителей сапа и мелиоидоза в контаминированных (зашифрованных) пробах [4]. Для проведения исследований с помощью ПЦР использовали 1 коммерческий набор реагентов «Burk23S — Epr» и 5 экспериментальных генодиагностических средств. По результатам испытаний методом ПЦР в короткие сроки были правильно идентифицированы все возбудители в зашифрованных пробах (обнаружена ДНК *B. pseudomallei*, *B. ceracia*, *B. thailandensis*).

В рамках указанного комплексного исследования [4] апробированы 7 типов экспериментальных моноклональных флуоресцирующих мелиоидозных иммуноглобулинов, приготовленных на основе моноклональных антител из панели, полученной к различным эпитопам антигена 200 kDa *B. pseudomallei*. Для постановки ТИФМ использовали 2 варианта экспериментального набора реагентов «Тест-система иммуноферментная моноклональная для выявления водорастворимых антигенов возбудителя мелиоидоза», показавших недостаточную чувствительность. На сегодняшний день эти тест-системы могут быть рекомендованы в качестве средства обнаружения растворимых антигенов возбудителя мелиоидоза на этапе идентификации и дифференциации буркхольдерий II и III-IV групп патогенности. Традиционное бактериологическое исследование позволило идентифицировать *B. ceracia*, *B. thailandensis*, *B. pseudomallei* в пробах через 72 ч. После идентификации выделенных культур и повторного исследования проб с помощью перечисленных выше методов был выдан окончательный ответ с указанием вида буркхольдерий [4].

ОБСУЖДЕНИЕ

Последовательное комплексное применение методов и средств диагностики, позволяющих проводить специфическую индикацию, идентификацию патогена и типирование выявленного микроорганизма, является основой для детекции и анализа возбудителей инфекционных заболеваний. Полифазный таксономический подход сочетает в себе методы определения фенотипических и генотипических признаков бактерий. В последние годы он широко применяется для идентификации буркхольдерий [15].

B. mallei, *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*, которая может выделяться вместе с возбудителем мелиоидоза из объектов внешней среды, характеризуются чрезвычайно высоким уровнем гомологии между собой, что обуславливает присутствие лишь незначительных отличий в составе антигенов данных видов буркхольдерий [11]. Поэтому большой интерес представляет выбор оптимального сочетания наиболее эффективных методов идентификации и внутривидовой дифференциации штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei*.

При работе с указанными микроорганизмами II группы патогенности полуавтоматическая система API 20 NE безусловно имеет ценность для предварительной идентификации культур. Однако следует помнить, что при анализе данных по использованию API 20 NE и проверке точности определения видовой принадлежности культур генотипическими методами в референтных лабораториях выявлено, что в 10% случаев отмечаются ложноположительные, а в 5% ложноотрицательные результаты [12]. Система Nefermtest 24 существенно уступает по своей диагностической ценности API 20 NE. Принципиальным является также тот момент, что для окончательной идентификации культур, предположительно относящихся к патогенным буркхольдериям, требуется постановка дополнительных тестов, таких как подвижность бактерий, рост при 42 °С, устойчивость к гентамицину, вирулентность для золотистых хомячков. Таким образом, полуавтоматические системы могут быть использованы

для идентификации патогенных буркхольдерий при соблюдении требований безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности и проведения ряда дополнительных тестов при паспортизации культур.

Анализ данных по эффективности селективных сред показал, что для выделения *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* следует использовать среду L. Ashdown, *B. ceracia* — среду BCSM, *B. mallei* — среду для патогенных буркхольдерий [1].

Приведенные данные подтверждают возможность использования в качестве дополнительного теста, наряду с регламентированными методами идентификации, генетической трансформации как специфичного и достаточно простого метода определения видовой принадлежности патогенных буркхольдерий, основанного на их природной компетентности. В качестве реципиентов и доноров при этом могут быть применены как штаммы *B. pseudomallei*, так и *B. thailandensis*. Очевидно, что достоверность результата определяется, в первую очередь, состоянием природной трансформабельности реципиента.

Достигнутые в последние десятилетия значительные успехи в совершенствовании методов и средств обнаружения возбудителей сапа и мелиоидоза в немалой степени обусловлены внедрением гибридной технологии в практику получения высокоактивных иммуноглобулиновых ингредиентов заданной специфичности. При использовании МКА для изготовления диагностических препаратов и тест-систем различного целевого назначения становится возможным выявлять один из двух или оба вида буркхольдерий II группы патогенности при отсутствии взаимодействия с антигенами других видов микроорганизмов. Близкое антигенное родство возбудителей мелиоидоза, сапа с условно патогенной *B. thailandensis* и другими непатогенными видами буркхольдерий затрудняет возможность получения отдельного моноклонального антитела, способного узнавать только *B. pseudomallei*, все различные клинические изоляты этого микроорганизма и одновременно дифференцировать их от *B. mallei* и остальных близкородственных микроорганизмов [11]. Известно, что по способности ассимилировать L-арабинозу и наличию на поверхности клетки антигена 200 kDa, являющегося маркером вирулентности, можно дифференцировать вирулентные и авирулентные штаммы возбудителя мелиоидоза, выделяемые из проб клинического материала и объектов внешней среды [8]. В целях совершенствования лабораторной диагностики мелиоидоза ведется разработка препаратов и тест-систем на основе МКА к антигену 200 kDa *B. pseudomallei*.

Одним из регламентированных методов экспресс-обнаружения микроорганизмов в различных объектах исследования является метод флуоресцирующих антител, позволяющий получать предварительный ответ в течение 2 — 3 ч от момента начала исследования, а также идентифицировать искомые виды микроорганизмов на этапах ускоренного лабораторного анализа [3, 7].

Производимые Волгоградским научно-исследовательским противочумным институтом иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сапные моноклональные (№ ФСР 2011/11614) и мелиоидозные моноклональные (№ ФСР 2011/11615) позволяют специфически выявлять соответственно возбудителей сапа и мелиоидоза. Последние обладают перекрестной активностью в отношении *B. thailandensis*. Разработанный экспериментальный препарат на основе МКА 6A₁₁ в рабочем разведении с указанным микроорганизмом не взаимодействует.

Проведенные исследования показали, что олигонуклеотидные флуоресцентные зонды, являющиеся фрагментами генов *orf13*, *fliC*, а также консер-

вативных последовательностей участка гена 23S рРНК, могут быть использованы для конструирования диагностических амплификационных тест-систем в связи с их высокой специфичностью, чувствительностью и возможностью идентифицировать патогенные буркхольдерии в выделенных культурах, биологическом материале и объектах окружающей среды методом ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке и в режиме реального времени.

В качестве маркеров при дифференциации или паспортизации штаммов многих видов микроорганизмов, имеющих медицинское значение, служат вариабельные нуклеотидные последовательности, такие как одонуклеотидные замены, тандемные повторы и протяженные дифференцирующие регионы — фрагменты ДНК, присутствующие в геноме не у всех штаммов определенного вида. В качестве скринингового исследования штаммов патогенных буркхольдерий предлагается метод RAPD [14]. Для развернутого исследования штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei* рекомендуется мультилокусный анализ числа вариабельных тандемных повторов (MLVA) и анализ дифференцирующих регионов ДНК (DFR). Благодаря использованию высоко вариабельных ДНК-мишеней, данные методы характеризуются высокой дискриминирующей способностью даже при исследовании клональных микроорганизмов с очень консервативным геномом (*B. mallei* относится к числу таких микроорганизмов) [14].

По результатам DFR-типирования 18 исследованных штаммов возбудителя мелиоидоза удалось разделить на 13 VAT типов. Метод DFR можно рекомендовать для быстрого генетического типирования штаммов *B. pseudomallei*.

В геномах секвенированных штаммов *B. mallei* отсутствует большинство вариабельных локусов, выявленных с помощью субтрактивной гибридизации у *B. pseudomallei* и на основе которых проводится типирование штаммов возбудителя мелиоидоза [9]. Поэтому появилась необходимость найти новые локусы для типирования штаммов возбудителя сапа. Созданные в ходе исследования 9 олигонуклеотидных флуоресцентно-меченных зондов дали возможность определять наличие дифференцирующих последовательностей ДНК как по конечной точке, так и в режиме реального времени. Результаты DFR-типирования возбудителя сапа с флуоресцентной детекцией позволили дополнить электронный каталог геномных портретов бактерий.

Таким образом, анализ результатов исследования позволил предложить для Референс-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза ряд методов их идентификации и типирования. На этапах индикации нативного материала, подозрительного на контаминацию бактериями рода *Burkholderia*, можно использовать, наряду с регламентированными, экспериментальные диагностические препараты для ПЦР и МФА, способные в короткие сроки предварительно идентифицировать близкородственные буркхольдерии до вида. Для дополнительной характеристики чистой культуры возбудителя и выдачи окончательного ответа возможно применение экспериментальных иммуноферментных тест-систем и метода генетической трансформации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жога Л.К., Илюхин В.И., Самыгин В.М. Транспортная среда для патогенных псевдомонад. Клиническая лабораторная диагностика. 1995, 1: 38-40.
2. Мазин А.В., Кузнецов К.Д., Краев А.С., Холодилов Н.Г. Методы молекулярной генетики и геномной инженерии. Новосибирск, Наука, Сиб. отделение, 1990.
3. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М., Шико, 2013.
4. Прохвятилова Е.В., Антонов В.А., Викторов Д.В., Храпова Н.П., Ткаченко Г.А., Илюхин

- В.И., Захарова И.Б., Гришина М.А., Плеханова Н.Г., Новицкая И.В., Кулаков М.Я., Булатова Т.В., Корсакова И.И., Савченко С.С., Бондарева О.С., Тетерятникова Н.Н., Сенина Т.В., Лопастейская Я.А., Батулин А.А., Куликова А.С. Сравнительная оценка информативности иммунологических и молекулярно-генетических методов и средств на этапах специфической индикации возбудителя мелиоидоза. Клиническая лабораторная диагностика. 2014, 12: 55-59.
5. Ряпис Л.А., Илюхин В.И., Вострова Е.И., Джуженов А. А. Лабораторная диагностика клинически значимых видов псевдомонад. Лаб. дело. 1988, 12: 66-71.
 6. Ряпис Л.А., Тарасова Т.Д. Перспективы применения хромосомной трансформации для идентификации возбудителей мелиоидоза. Журн. микробиол. 1988, 8: 16-19.
 7. Храпова Н.П., Алексеев В.В., Корсакова И.И., Дрефс Н.М., Ломова Л.В., Булатова Т.В., Напалкова Г.М. Применение сапных и мелиоидозных моноклональных антител различной эпитопной направленности для обнаружения и идентификации патогенных буркхольдери. Проблемы особо опасных инфекций. 2011, 107: 66-69.
 8. Anuntagool N., Panichakul T., Aramsri P. et al. Shedding of lipopolysaccharide and 200-kDa surface antigen during the in vitro growth of virulent Ara- and avirulent Ara+ Burkholderia pseudomallei. Acta tropica. 2000, 74: 221-228.
 9. Duangsonk K., Gal D., Mayo M. et al. Use of a variable amplicon typing scheme reveals considerable variation in the accessory genomes of isolates of Burkholderia pseudomallei. J. Clin. Microbiol. 2006, 44: 1323-1334.
 10. Goding J.W. Monoclonal antibodies: principles and practice. Acad. Press, 1986.
 11. Kim H.Y., Tsai S., Lo S.C. et al. Production and characterization of chimeric monoclonal antibodies against Burkholderia pseudomallei and B. mallei using the DHFR expression system. PLoS one. 2011, 5: e19867.
 12. Shelly D.B., Spilker T., Gracely E.J. Utility of commercial systems for identification of Burkholderia cepacia complex from cystic fibrosis sputum culture. J. Clin. Microbiol. 2000, 38: 3112-3115.
 13. Tomaso H., Scholz H.C., Al Dahouk S. et al. Development of 5-nuclease real-time PCR assays for the rapid identification of the Burkholderia mallei/Burkholderia pseudomallei complex. Diagn. Mol. Pathol. 2004, 13: 247-253.
 14. U'Ren J.M., Schupp J.M., Pearson T. et al. Tandem repeat regions within the Burkholderia pseudomallei genome and their application for high resolution genotyping. BMC Microbiol. 2007, 1: 7-23.
 15. Vandamme P. Polyphasic taxonomy in practice: the Burkholderia cepacia challenge. WFCC Newsletter. 2002, 34: 17-24.

Поступила 10.05.16

Контактная информация: Корсакова Ирина Игоревна, к.м.н.,
400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7, р.т. (8442)37-37-74

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

А.Я.Никитин¹, А.К.Носков¹, Т.П.Баландина²

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ НАСЕЛЕНИЯ ИНФЕКЦИЯМИ, ПЕРЕДАЮЩИМИСЯ IXODES PERSULCATUS, НА СЕВЕРЕ И ЮГЕ ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

¹Иркутский научно-исследовательский противочумный институт; ²Управление федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Иркутской области, Иркутск

Цель. Оценить степень эпидемического риска проявления клещевого энцефалита (КЭ) и иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ) в муниципальных образованиях (МО) Иркутской области с различными природно-климатическими условиями. *Материалы и методы.* Сравнивали заболеваемость КЭ и ИКБ за 2001 — 2015 гг. в МО Иркутской области, расположенных севернее или южнее 55 параллели, то есть находящихся в условиях разной суровости резко континентального климата. Анализировали данные усредненные по пятилетиям. *Результаты.* Во все пятилетия на севере области заболеваемость ИКБ в