

На правах рукописи

ЛОПАСТЕЙСКАЯ ЯНА АНАТОЛЬЕВНА

**СИСТЕМЫ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА В ЛАБОРАТОРНОЙ
ДИАГНОСТИКЕ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Волгоград – 2017

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора.

Научный руководитель:

Викторов Дмитрий Викторович доктор биологических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Ведущая организация:

Защита состоится «_____» _____ 2017 года в «_____» часов на заседании диссертационного совета Д 208.008.06 при ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1. E-mail: post@volgmed.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1 и с авторефератом на сайтах: www.volgmed.ru, www.vak2.ed.gov.ru.

Автореферат разослан «_____» _____ 2017 г.

Ученый секретарь

Диссертационного Совета

доктор социологических наук,

кандидат медицинских наук,

профессор

Ковалева Марина Дмитриевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Возбудители мелиоидоза и сапа, *Burkholderia pseudomallei* и *B. mallei*, в отличие от многих бактериальных патогенов, имеют ограниченное распространение в мире, тем не менее, интерес к их изучению поддерживается сведениями о высокой опасности микроорганизмов для человека и различных видов животных [Dance, 2000]. Возможность контактов граждан РФ с новыми, или «забытыми» для страны патогенами, к числу которых относятся возбудители мелиоидоза и сапа, возрастают в связи с развитием транспортного сообщения между странами, расширением туристических направлений, в том числе, охватывающих эндемичные по данным инфекционным заболеваниям территории, а также значительными миграционными потоками. В последние годы отношение к мелиоидозу стало более пристальным не только в эндемичных по данной инфекции регионах Юго-Восточной Азии и Северной Австралии, где улучшение диагностики привело к значительному росту числа подтвержденных случаев заболевания [Cheng, Currie, 2005; Limmathurotsakul, Peacock, 2011], но и в ряде стран Старого Света, Северной и Латинской Америки [Nasner-Posso, et al., 2015]. Что касается сапа, хотя заболеваемость им людей отмечается редко, в некоторых странах (Турция, Иран, Пакистан, Монголия, Бахрейн, Саудовская Аравия, Бразилия) продолжают регистрировать вспышки заболевания у животных [Al-Ani, Roberson, 2007; Dvorak, Spickler, 2008; Khan et al., 2013].

Своеобразие мелиоидоза и сапа определяется выраженным полиморфизмом клинических проявлений заболеваний, а также высокой степенью сходства микроорганизмов – возбудителей [Cheng, Currie, 2005; Dance, 2000; Anuntagool, Sirisinha, 2002, Chantratita et al., 2006; Harvey, Minter, 2005]. Быстрая и точная диагностика данных инфекций необходима для своевременного и адекватного лечения заболевания и организации соответствующих противоэпидемических мероприятий.

Развитие классического бактериологического метода идентификации возбудителей инфекционных болезней связано, прежде всего, с широким внедрением в лабораторную практику разнообразных микробиологических полуавтоматических и автоматических идентификационных систем. Вместе с тем, задача определения оптимального набора дифференцирующих тестов для патогенных буркхольдерий остается актуальной. Речь идет, прежде всего, о проблемах точной идентификации атипичных штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа, дифференциации изолятов патогенных буркхольдерий от близких им непатогенных сапрофитных представителей рода, широко распространенных в естественных биоценозах эндемичных регионов [Deepak et al, 2008;

Kiratisin et al, 2007; Podin et al, 2013; Zong et al, 2012]. Внедрение в практику лабораторных исследований новых автоматизированных методов идентификации также является важной задачей в аспектах совершенствования схемы лабораторной диагностики сапа и мелиоидоза и детальной паспортизации штаммов возбудителей. Учитывая довольно большое разнообразие доступных коммерческих систем биохимической идентификации, представлялось целесообразным проведение сравнительного анализа эффективности некоторых из них для установления видовой принадлежности и дифференциации штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа.

Цель работы - совершенствование алгоритмов идентификации *Burkholderia pseudomallei* и *B. mallei* с использованием систем автоматизированного микробиологического анализа.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ эффективности применения коммерческих полуавтоматических и автоматических биохимических идентификационных тестов для подтверждения видовой принадлежности и дифференциации штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа.

2. Выявить набор биохимических тестов, имеющих ключевое значение для точной идентификации видов патогенных буркхольдерий и их дифференциации от близкородственных микроорганизмов.

3. Разработать комплекс методических приемов пробоподготовки, обеспечивающий необходимый уровень биологической безопасности при масс-спектрометрическом профилировании культур *B. pseudomallei* и *B. mallei* методом MALDI-TOF MS.

4. Получить набор характеристических масс-спектров возбудителей мелиоидоза и сапа и разработать раздел электронной базы данных MALDI-TOF спектров S.A.R.A.M.I.S.TM для идентификации штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*.

5. Разработать дополнения к регламентированным схемам лабораторной диагностики мелиоидоза и сапа в части использования современных систем микробиологического анализа.

Научная новизна

С использованием различных биохимических идентификационных тестов исследованы и охарактеризованы фенотипические признаки, имеющие принципиальное значение для корректного установления видовой принадлежности культур *B. pseudomallei* и *B. mallei* и проведения внутривидовой дифференциации возбудителей.

Впервые установлено, что при проведении биохимической идентификации исследуемых культур возбудителя мелиоидоза, совокупность отрицательных результатов

тестов β -N-ацетилглюкозаминидазы (BNAG), β -N-ацетилгалактозоамидазы (NAGA), фосфатазы (PHOS), и наличии активности D-целлобиазы (dCEL), L-пролинариламидазы (ProA) и тирозинариламидазы (TyrA) приводит к идентификации штаммов *B. pseudomallei* с низкой дискриминацией, а сочетание положительного результата теста на активность D-целлобиазы и отрицательных тестов NAGA, TyrA и ProA ведет к ошибочной идентификации возбудителя мелиоидоза как *B. ceracia*.

Разработан комплекс методических приемов пробоподготовки, обеспечивающий эффективную белковую экстракцию, высокую воспроизводимость масс-спектрометрического анализа и необходимый уровень безопасности работ при MALDI-TOF масс-спектрометрии клеток *B. pseudomallei* и *B. mallei*.

Сформированы идентификационные масс-спектры патогенных видов *Burkholderia* spp. и разработан оригинальный раздел электронной базы данных MALDI-TOF спектров S.A.R.A.M.I.S.TM для идентификации и типирования изолятов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, позволяющие осуществлять видовую идентификацию штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа с приемлемой достоверностью.

Практическая значимость

Материалы исследований, выполненных в рамках диссертационной работы, использованы при разработке разделов проектов методических рекомендаций «Создание баз данных референсных масс-спектров возбудителей I-II групп патогенности для проведения автоматической идентификации микроорганизмов методом масс-спектрометрии», «Лабораторная диагностика возбудителей мелиоидоза и сапа», при формировании единой базы данных «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I-II групп патогенности для программы MALDI Biotyper», зарегистрированной Федеральной службой по интеллектуальной собственности (№ регистрации в Реестре баз данных 2016620345 от 15.03.2016), а также при составлении ряда нормативно-методических документов учрежденческого уровня внедрения.

Комплекс технологических приемов использования автоматизированных систем микробиологического анализа, апробированный в ходе выполнения работы, применяется для идентификации, типирования, сравнительного анализа штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei* в лабораториях Волгоградского НИПЧИ и в работе Референс-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза.

Разработанные в ходе выполнения диссертационного исследования методические приемы и аналитические алгоритмы используют для паспортизации и углубленного изучения коллекционных штаммов патогенных буркхольдерий, их свойств в лабораториях

Волгоградского научно-исследовательского противочумного института и работе Референс-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Некорректная идентификация ряда штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа при применении биохимических идентификационных наборов широкой специфичности (Micronault IDS и аналоги) обусловлена межштаммовой вариабельностью таких биохимических признаков, как активность ферментов фосфодиэстеразы (DIP), хитиназы (CHIT), пролинамидазы (PRO), ассимиляция мальтозы (MALA), ферментация глюкозы (GLUF).
2. В случае использования идентификационных наборов Vitek 2 GN, совокупность отрицательных результатов тестов NAGA, BNAG, PHOS и положительных dCEL, TugA и ProA приводит к идентификации штаммов *B. pseudomallei* с низкой дискриминацией, а сочетание положительного результата теста на активность D-целлобиазы и отрицательных тестов NAGA, TugA и ProA ведет к ошибочной идентификации возбудителя мелиоидоза как *B. ceracia*.
3. Оптимальной схемой культивирования *B. pseudomallei* и *B. mallei*, обеспечивающей достаточный уровень воспроизводимости и высокие качественные характеристики получаемых клеточных масс-спектров является выращивание клеток микроорганизмов в течение 18 - 24 ч при 37°C на агаре Luria.
4. Наиболее эффективным методом пробоподготовки культур патогенных буркхольдерий для масс-спектрометрического профилирования, обеспечивающим как обеззараживание, так и эффективную экстракцию белковых компонентов, является обработка муравьиной кислотой и ацетонитрилом.
5. Сформированные видовые референтные «суперспектры» обще клеточных белков *B. pseudomallei* и *B. mallei*, содержащие набор наиболее характерных и стабильно воспроизводимых спектральных пиков, и разработанный на их основе оригинальный раздел электронной базы данных референтных MALDI-TOF спектров S.A.R.A.M.I.S.TM позволяют проводить видовую идентификацию штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа с приемлемой достоверностью (показатель score ≥ 75 %).

Апробация работы

Результаты исследований по теме диссертационной работы были представлены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (23-24 мая 2012г., г.Ставрополь), Международной научно-практической конференции «Перспективы

сотрудничества государств - членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных заболеваний» (25-26 мая 2015г., г.Сочи), VII Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (г.Санкт-Петербург, 8-10 декабря 2015г.), научно-практической конференции молодых ученых и специалистов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, «Современное состояние и перспективные разработки в области диагностики, микробиологии и эпидемиологии мелиоидоза, сапа, глубоких микозов и лихорадки Западного Нила» (г.Волгоград, май 2015г.), научно-практической конференции молодых ученых и специалистов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора «Современное состояние и актуальные направления фундаментальных и прикладных исследований в отношении опасных инфекционных болезней» (г.Волгоград, май 2016г.), Всероссийском ежегодном конгрессе «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика» (13-15 октября 2016г., г.Санкт-Петербург), XIII Межгосударственной научно-практической конференции «Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005г.) до 2016 года» (25-26 октября 2016г., г.Саратов), VII Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (г. Москва, 1-3 ноября 2016г.) Основные положения диссертации были представлены и обсуждены расширенном заседании специалистов Федерального казенного учреждения здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 28 октября 2016 года.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 работ, из них 4 - в рецензируемых периодических изданиях, входящих в перечень ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 123 листах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, методической части, 2 глав экспериментальных исследований, заключения, выводов и списка литературы, включающего 214 источников, в том числе 30 отечественных и 184 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 12 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы 53 штамма *B. pseudomallei*, 14 штаммов *B. mallei*, 5 штаммов *B. thailandensis*, а также 9 штаммов микроорганизмов комплекса *Burkholderia cepacia* из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Все манипуляции с живыми культурами возбудителей проводились в соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

Для постановки тестов и учёта результатов с использованием идентификационных биохимических наборов Micronault IDS (SY-Lab) культуры штаммов *Burkholderia* spp. выращивали на Luria агаре (Himedia, Индия) при температуре 37°C в течение 18 - 24 ч. Оценку результатов биохимических реакций проводили с использованием микропланшетного ридера MT-1 (SyLAB, Австрия), либо визуально, с помощью оценочных таблиц SY-Lab Microtax, содержащих цветовые коды для положительных, отрицательных или промежуточных результатов теста активности в отношении того или иного биохимического субстрата.

Для постановки тестов и учета результатов с использованием микробиологического анализатора Vitek 2 (Biomereux), штаммы микроорганизмов *Burkholderia* spp. выращивали на Luria агаре (Himedia, Индия) или триптиказо-соевом агаре, ТСА (Himedia, Индия) при температуре 37°C. Биохимический профиль штамма оценивали на идентификационных картах Vitek GN (Biomereux), предназначенных для автоматической идентификации клинически значимых ферментирующих и неферментирующих грамотрицательных палочек.

Для масс-спектрометрического профилирования штаммов буркхольдерий выращивали на Luria агаре (Himedia, Индия) при температуре 37°C в течении 24 ч. Из клеток агаровой культуры буркхольдерий готовили взвеси в 300 мкл ультрачистой воды для ВЭЖХ (Pancreas, Испания), суспендировали, добавляли 900 мкл абсолютного этанола, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение получаса. После экспозиции пробы центрифугировали 2 мин при 13000 об/мин, удаляли супернатант, высушивали, добавляли по 50 мкл ацетонитрила и 70% раствора муравьиной кислоты, вновь перемешивали, и материал в объеме 1 мкл наносили на лунки металлической мишени (чипа). На каждую пробу наносили по 1 мкл матрицы для MALDI-ToF (α -циано-гидроксикоричная кислота в растворе 50% ацетонитрила и 2,5% трихлоруксусной кислоты, ТФК). После кристаллизации проб мишень с образцами помещали в камеру

масс-спектрометра Axima Confidence™ (Shimadzu). Клетки штамма *E. coli* CCUG 10797 использовали для калибровки масс-спектрометра. Для получения одиночного масс-спектра использовали 100 импульсов лазера (частота 60 Гц); диапазон регистрации составлял 1000-20000 m/z, фиксировались только положительные ионы, суммарный спектр каждого образца составлялся на основе 100 единичных выстрелов. С каждой лунки чипа снимался спектр, представляющий собой сумму 6 одиночных спектров (600 импульсов лазера). Все масс-спектры регистрировали в линейном режиме, без использования рефлектрона.

Для формирования референсных спектров использовали 5 штаммов *B. mallei* и 5 штаммов *B. pseudomallei*, с 10-кратной повторностью по каждому из штаммов. При анализе результатов учитывались следующие характеристики масс-спектра: количество пиков, их интенсивность, общая величина шумового компонента. Результирующий спектр каждого штамма экспортировали в базу данных S.A.R.A.M.I.S.™ (Anagnostec GmbH.) для последующего анализа.

Заключение о видовой, или родовой принадлежности исследуемой культуры делали на основе сопоставления индивидуальных масс-спектров в режиме «Идентификация» с базой данных S.A.R.A.M.I.S.™, дополненной полученными референсными спектрами. Корректная идентификация до вида достигалась при величинах показателя $score \geq 75\%$.

При сравнительном анализе профилей биохимической активности, данные формализовали в бинарном виде (0 – отсутствие признака, 1 – наличие признака) и анализировали с помощью пакета PRIMER v. 7.0.10 (Primer-E, Великобритания). Для группирования (кластеризации) исследуемых штаммов использовалась неметрическая многомерная градация (nonmetric multidimensional scaling, nMDS) евклидовых расстояний матрицы сходства биохимических профилей. Достоверность отличий биохимических профилей корректно и некорректно идентифицированных штаммов оценивалась методом непараметрического анализа сходства (analysis of similarities, ANOSIM). Для вычисления среднего вклада каждого биохимического теста в общий показатель различия между кластерами штаммов применялась процедура анализа процента подобия (similarity percentage, SIMPER).

Кластерный анализ масс-спектров общеклеточных белков коллекционных штаммов патогенных буркхольдерий проводили с использованием алгоритма Neighbor-Joining [Saitou N, Nei M., 1987].

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
НАБОРОВ MICRONAUT IDS (SY-LAB)

Наборы Micronaut IDS были использованы в качестве образца недорогих автоматизированных микробиологических тестов, рутинно применяемых в диагностических лабораториях. Использование наборов Micronaut IDS не позволило корректно идентифицировать до вида большую часть проанализированных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*. Более того, 3 штамма *B. mallei*, 2 штамма *B. pseudomallei* и 2 - *B. thailandensis* были отнесены к виду *B. ceracia*. Отдельные штаммы с низкой дискриминацией были отнесены к видам *Sphingomonas paucimobilis*, *Pantoea agglomerans*, *Ochrobactrum anthropi*. Видовая принадлежность была определена корректно лишь для 4 штаммов *B. ceracia* с вероятностью идентификации 80 % и выше. Ранжирование показателей сходства профилей биохимической активности разделило исследованные штаммы на 17 кластерных групп (рис. 1), при этом сформированные группы были гетерогенны в отношении реальной видовой принадлежности составляющих их штаммов, за исключением группы корректно идентифицированных штаммов *B. ceracia*. Степень достоверности отличий биохимических профилей, получаемых на наборах IDS, оказалась относительно невысокой ($R\ 0.763$, $p\ 0.001$) (рис. 2)

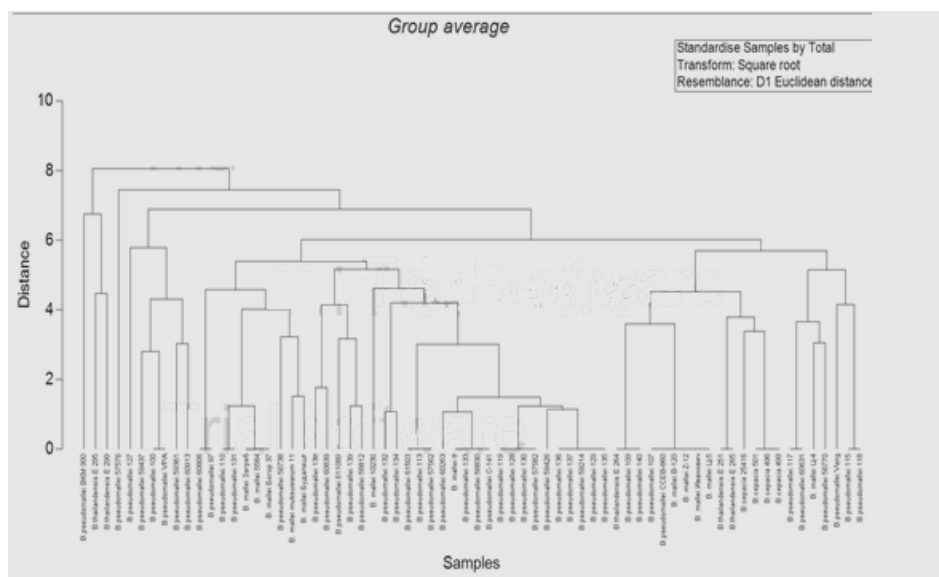


Рисунок 1. Группирование штаммов *Burkholderia* spp. на основе евклидова расстояния показателей сходства биохимических профилей методом UPGMA.

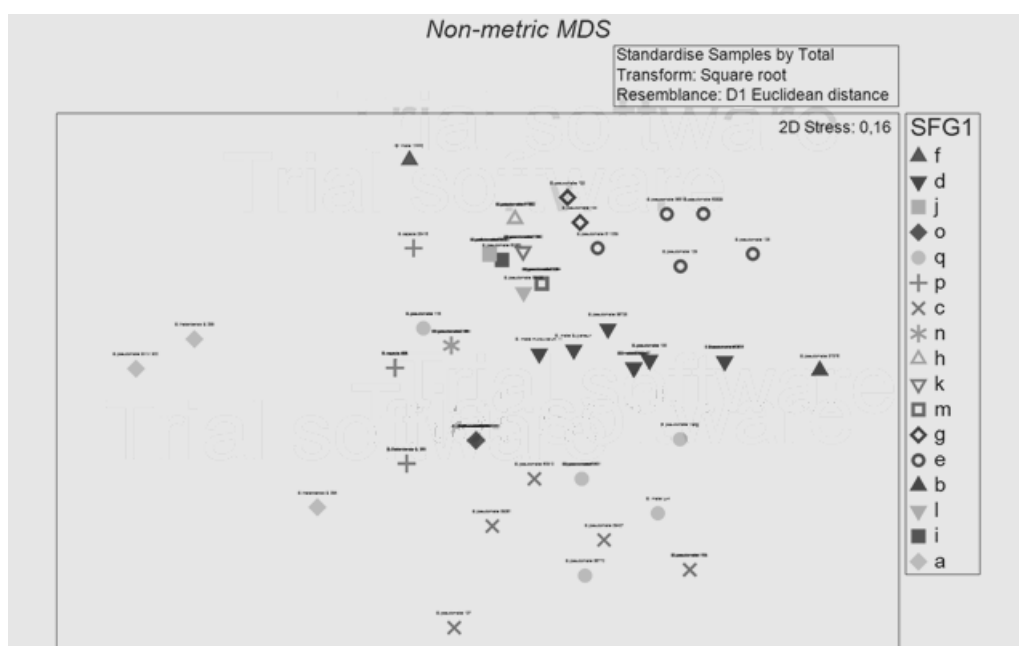


Рисунок 2. Распределение штаммов различных видов буркхольдерий методом неметрической многомерной градации показателей сходства их биохимических профилей (nMDS)

Анализ вклада индивидуальных тестов в общий показатель несходства между кластерами штаммов, идентифицированных корректно, некорректно, и вообще не идентифицированных продемонстрировал, что наибольший вклад в вариабельность биохимических профилей вносят признаки активности фосфодиэстеразы (DIP), хитиназы (CHIT), пролинамидазы (PRO), ассимиляции мальтозы (MALA), ферментации глюкозы (GLUF).

С учетом того, что среди обозначенных варьирующих фенотипических признаков присутствовали и родоспецифические биохимические признаки буркхольдерий (в частности, ферментация глюкозы, GLUF), становится очевидным неприменимость идентификационных наборов широкого спектра Micronaut IDS и их аналогов для определения видовой принадлежности микроорганизмов, подозрительных на принадлежность к роду *Burkholderia*.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА VITEK 2 (BIOMEREUX)

С применением идентификационных карт Vitek 2 GN, 66,7 % штаммов возбудителя сапа были идентифицированы как вид *B. mallei* с вероятностью 90 – 99%. Четыре штамма из-за нетипичных результатов пяти тестов были отнесены одновременно к двум микроорганизмам: *Sphingomonas paucimobilis* и *B. mallei*, – с предложением использования дополнительных тестов для их дифференциации (табл. 1).

Таблица 1

Результаты идентификации коллекционных штаммов *B. mallei*

Наименование, номер штамма	Система VITEK 2					
	Вероятность идентификации %, вид	Тесты с нетипичным результатом				
		SAC	dTRE	ProA	TyrA	GlyA
«Иванович», «Будапешт», P-1, 11, 8, Bogor-37, Muksuwar-11, 5584	90 - 99 <i>B. mallei</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Z-12, Ц-5, «Zagreb»	< 85 <i>S. paucimobilis</i> / <i>B. mallei</i>	+	+/-	+/-	+/-	+/-
B-120	< 85 <i>S. paucimobilis</i>	+	-	-	-	-

Примечание: SAC – сахароза, dTRE – D-трегалоза, ProA – L-пролинариламидаза, TyrA – тирозинариламидаза, GlyA – глицинариламидаза; серый цвет ячеек – нетипичный результат; отрицательная реакция – «-», положительная реакция – «+».

При исследовании штаммов возбудителя мелиоидоза, 77,5 % из них были определены с высокой вероятностью (90 - 99 %) как *B. pseudomallei*; 12,5 % штаммов были идентифицированы с низкой дискриминацией как виды комплекса *B. ceracia* и *B. pseudomallei* с возможностью их дифференциации с помощью дополнительных тестов, а 4 штамма (10 % от общего числа) были ошибочно определены как виды комплекса *B. ceracia* с формулировкой «очень хорошая» (1 штамм) и «отличная идентификация» (3 штамма) (табл. 2).

Таблица 2

Результаты идентификации коллекционных штаммов *B. pseudomallei*

Номер штамма	Система VITEK 2			
	Вероятность идентификации %, вид	Тесты с нетипичным результатом		
		dCEL	NAGA	BNAG
1, 2, 97, 98, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 128, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 139, C-141(CIP6068), 56770, 56812, 57582, 59437, 60631, 60806, 611083, 56830	90-99 <i>B.pseudomallei</i>	+/-	+/-	+
99, 100, 102, 103, 135	< 85 <i>B.ceracia</i> / <i>B.pseudomallei</i>	+	-	-
107, 130, 138, 60839	< 85 <i>B.ceracia</i>	+/-	-	-

Примечание: dCEL – D-целлобиоза, NAGA – β -N-ацетилгалактозоминадаза, BNAG – β -N-ацетилглюкозоминадаза; серый цвет ячеек – нетипичный результат теста; отрицательная реакция – «-», положительная реакция – «+».

Многомерная грация показателей сходства биохимических профилей (nMDS) распределила исследованные штаммы *B. pseudomallei* по 8 кластерам. В состав 4-х кластеров вошли по одному штамму. Отдельные кластеры составили штаммы с корректно определенной видовой принадлежностью (достоверность идентификации более 90 % и на уровне 75 %), штаммы с неверно определенной видовой принадлежностью, а также штаммы с низкой дискриминацией определения видовой принадлежности. Отличия биохимических профилей корректно и ошибочно идентифицированных штаммов были достоверны ($R\ 0.836$, $P\ 0.001$) (рис. 3).

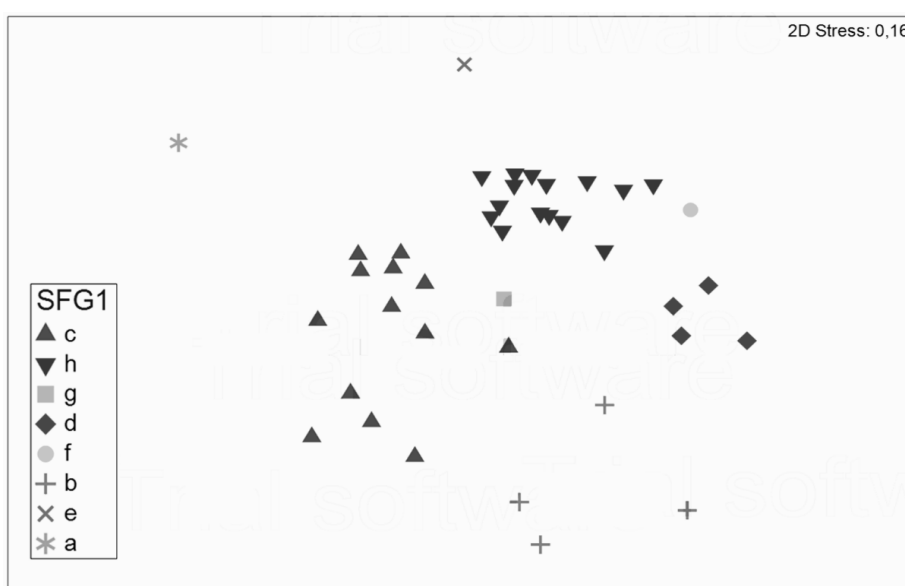


Рисунок 3. Распределение штаммов *B. pseudomallei* методом неметрической многомерной грации показателей сходства биохимических профилей (nMDS)

Анализ среднего вклада каждого биохимического теста в общий показатель несходства между кластерами биохимических профилей штаммов *B. pseudomallei*, идентифицированных с разным уровнем достоверности, показал, что достоверность идентификации резко снижается при отсутствии у штаммов признаков активности фосфатазы (PHOS), β -N-ацетилглюкозаминидазы (BNAG), β -N-ацетилгалактозаминидазы (NAGA) и наличии активности D-целлобиазы (dCEL), L-пролинариламидазы (ProA) и тирозинариламидазы (TyrA). У штаммов, идентифицированных с низкой дискриминацией, тесты dCEL, TyrA (в 100 % случаев) и ProA (в 80 % случаев) были положительными, а тесты NAGA (в 80% случаев), BNAG и PHOS (в 60% случаев) – отрицательными (табл. 3).

Таблица 3

Средний вклад различных биохимических тестов в общее несходство между кластерами штаммов *B. pseudomallei*

Тест*	Доля вклада признака в общее несходство между кластерами (%)					Число (%) штаммов, показавших «+» результат теста		
	С-Н	С-D	Н-D	С-В	Н-В	идентифицированные		
						корректно	с низкой дискриминацией	некорректно
PHOS	3,44	7,40	9,76	8,75	6,77	25 (80,6%)	2 (40%)	1 (25%)
dCEL	4,16	7,89	6,83	10,73	5,86	10 32,3(%)	5 (100%)	3 (75%)
NAGA	4,32	5,82	7,08	7,86	5,94	24 (77,4%)	1 (20%)	0 (0%)
BNAG	< 3	9,25	9,76	4,35	< 3	28 (90,3%)	2 (40%)	3 (75%)
ProA	7,94	8,49	< 5	< 4	5,44	18 (58%)	4 (80%)	0 (0%)
TyrA	7,42	7,84	< 5	< 4	5,44	20 (64,5%)	5 (100%)	0 (0%)

Анализ вариабельности биохимических признаков штаммов с высокой достоверностью идентификации и штаммов, ошибочно идентифицированных как *B. serasia*, показал, что ключевыми при корректной видовой идентификации являются тесты на наличие активности L-пролинариламидазы, тирозинариламидазы и ацетилгалактозаминидазы. Данные тесты были положительными у 58, 65 и 77 % корректно идентифицированных штаммов, соответственно, в то время как все ошибочно идентифицированные штаммы имели по этим тестам отрицательный результат, что, в сочетании с наличием активности D-целлобиазы, привело к идентификации возбудителя мелиоидоза как *B. serasia* (табл. 4 и 5).

Таблица 4

Сочетание биохимических признаков *B. pseudomallei*, приводящих к ошибочной видовой идентификации

Наличие признака	Отсутствие признака
dCEL - D-целлобиаза	ProA – L-пролинариламидаза
	TyrA – тирозинариламидаза
	NAGA – β-N-ацетилгалактозаминидаза

Частота проявления сочетаний биохимических признаков *B. pseudomallei*, приводящих к ошибочной видовой идентификации

Тест	% штаммов, показавших «+» результат теста среди идентифицированных	
	корректно	некорректно
dCEL	32,3%	75%
NAGA	77,4%	0%
ProA	58%	0%
TyrA	64,5%	0%

Таким образом, на исследованной выборке штаммов с высокой статистической достоверностью показано, что совокупность отрицательных результатов тестов NAGA, BNAG, PHOS и положительных dCEL, TyrA и ProA приводит к идентификации штаммов *B. pseudomallei* с низкой дискриминацией, а сочетание наличия активности D-целлобиазы и отрицательных тестов NAGA, TyrA и ProA ведет к ошибочной идентификации возбудителя мелиоидоза как *B. ceracia*.

Полученные результаты демонстрируют необходимость дальнейшего расширения базы идентификационных ключей платформы VITEK 2 в отношении штаммов *B. pseudomallei* с атипичными профилями биохимической активности. Кроме того, учитывая реальную возможность завоза в нашу страну данного опасного заболевания, очевидно, что инфекционисты и специалисты клинических диагностических лабораторий должны быть осведомлены о возможности ошибочной идентификации возбудителя мелиоидоза как *B. ceracia* с использованием микробиологических анализаторов, а также о необходимости направления клинических образцов от пациентов с неясным диагнозом, побывавших в эндемичных по мелиоидозу регионах, на исследование непосредственно в специализированные лаборатории, имеющие разрешение на работу с ПБА I-II групп патогенности (опасности).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БУРКХОЛЬДЕРИЙ ГРУППЫ «PSEUDOMALLEI» С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СРАВНИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗА МАСС-СПЕКТРОВ КОНСЕРВАТИВНЫХ КЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ

Оригинальным протоколом производителя масс-спектрометрического оборудования Axima Confidence, рассчитанным на анализ клеток бактерий и микромицетов III-IV групп патогенности, не предусмотрен этап предварительного обеззараживания проб, что неприемлемо при работе с микроорганизмами I-II групп патогенности. В связи с этим

нами были испытаны два метода пробоподготовки, включающие в себя как обеззараживание культуры, так и экстракцию белковых компонентов из клеток: обработка пробы 80 % ТФУ и экстракция смесью муравьиной кислоты и ацетонитрила после обработки этанолом. К оригинальному протоколу второго метода нами были добавлены этапы прогревания образцов и очистки центрифугированием. Контроль специфической стерильности белковых экстрактов в обоих случаях показал полное отсутствие жизнеспособных бактериальных клеток.

Тестирование качества и воспроизводимости клеточных масс-спектров показало, что оптимальным вариантом пробоподготовки для клеток патогенных бургхольдерий является экстракция смесью муравьиной кислоты и ацетонитрила после обработки этанолом (рис. 5, б).

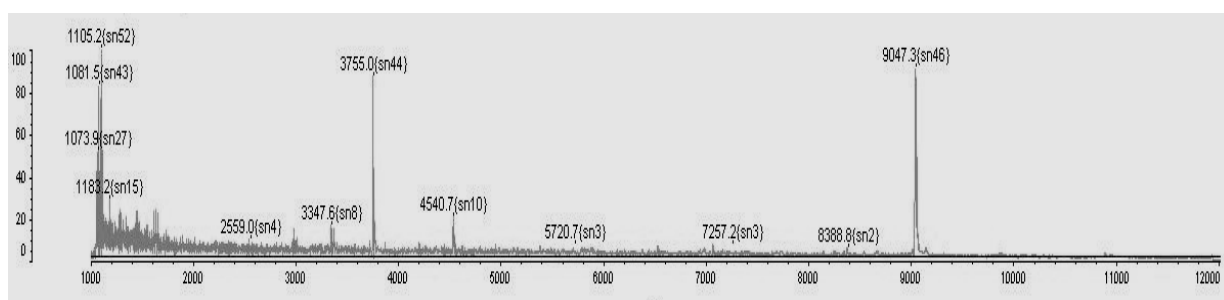


Рисунок 6. Масс-спектр клеток *B. pseudomallei* C-141 после пробоподготовки с применением экспозиции в 90%-м растворе трифторуксусной кислоты в течение 30 мин

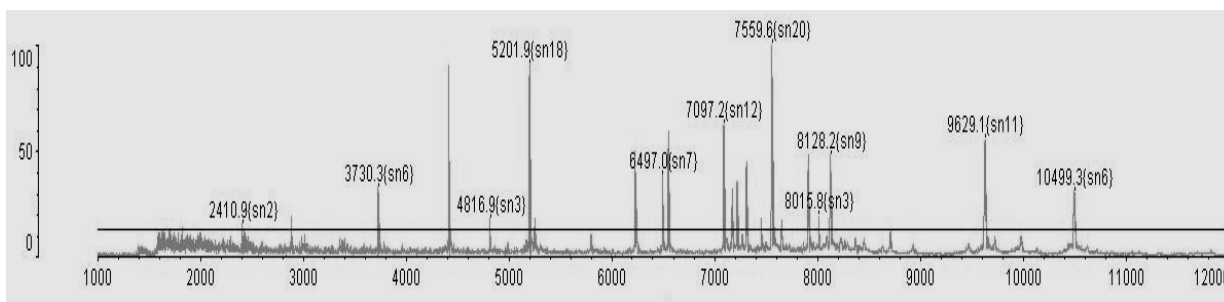


Рисунок 7. Масс-спектр клеток *B. pseudomallei* C-141 после пробоподготовки с применением муравьиной кислоты и ацетонитрила

При масс-спектрометрическом профилировании штаммов, выращенных на Luria - агаре и агаре на основе кислотного гидролизата казеина (АГК) выявлена зависимость качества получаемых белковых профилей от питательной среды, хотя при использовании любой из этих сред удалось идентифицировать микроорганизмы до вида. Однако, масс-спектры, полученные из культур, выращенных на АГК, характеризовались меньшим количеством и интенсивностью пиков, а также большим зашумлением (рис. 8).

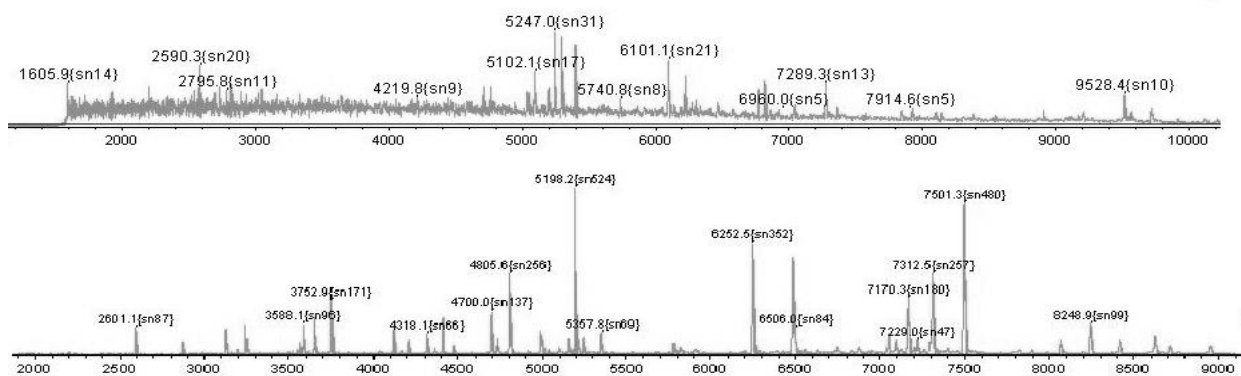


Рисунок 8. Масс-спектры общецелочных белков штамма *B. pseudomallei* 109, выращенного на АГК (вверху) и Luria-агаре (внизу).

Значимых различий в характеристиках белковых масс-спектров 18 или 24 ч агаровых культур выявлено не было. Также установлено, что при использовании клеток, культивируемых более суток, получение гомогенной суспензии было крайне затруднительным, что делало такую пробу непригодной для дальнейшего анализа. Таким образом, оптимальной схемой культивирования штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* для масс-спектрометрического профилирования является их выращивание на Luria -агаре не более 24 ч.

Референтные спектры для *B. pseudomallei* и *B. mallei* в коммерческой базе данных S.A.R.A.M.I.S. представлены масс-спектрами чистых препаратов рибосомальных протеинов, что в большинстве случаев позволяло провести идентификацию патогенных буркхольдерий. Вместе с тем, в отдельных случаях между масс-спектрами различных видов более высокие показатели сходства, чем между штаммами внутри вида, что говорит о необходимости формирования референтных масс-спектров полного набора клеточных белков с использованием большего числа штаммов каждого из исследуемых видов буркхольдерий.

Для формирования референсных масс-спектров использовали по 5 типичных штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei*; спектры генерировали с 10-кратной повторностью по каждому из штаммов. Всего в базу данных S.A.R.A.M.I.S.TM были импортированы 10 референсных спектров типичных штаммов патогенных буркхольдерий, дальнейшая идентификация штаммов проводилась с использованием уже дополненной базы данных, что обеспечило 100 % корректную идентификацию исследуемых изолятов.

Кластерный анализ масс-спектров демонстрирует четкое группирование исследованных штаммов в соответствии с их видовой принадлежностью на уровне,

соответствующем порогу валидной видовой идентификации (показатель score ≥ 75 %) (рис. 10).

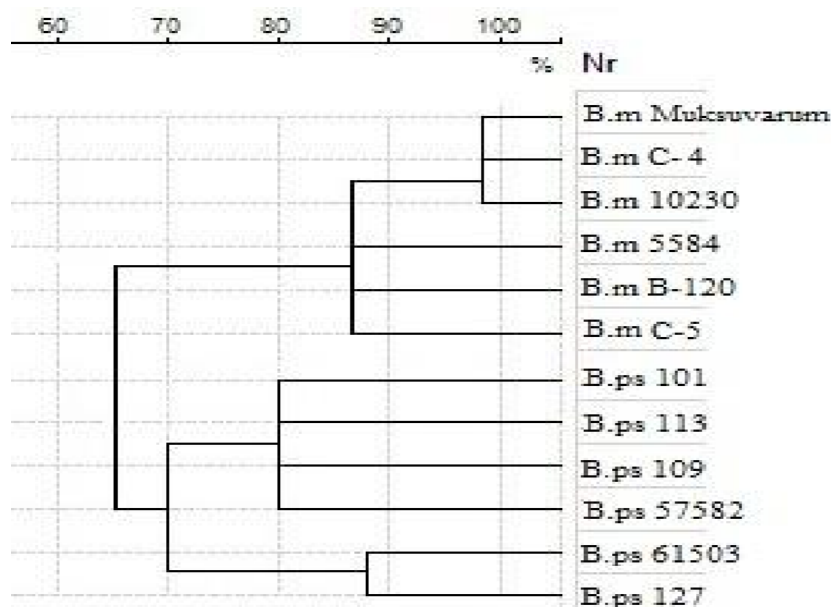


Рисунок 9. Кластерный анализ масс-спектров общеяклеточных белков коллекционных штаммов патогенных буркхольдерий (*B.m.* – *B. mallei*, *B.ps.* – *B. pseudomallei*).

Таким образом, итогом исследований данного раздела стала разработка методологического подхода к идентификации *B. pseudomallei* и *B. mallei* с использованием прямого масс-спектрометрического профилирования клеточных белков. В ходе работы был оптимизирован протокол пробоподготовки культур возбудителей в соответствии с требованиями биологической безопасности при манипуляциях с ПБА II группы патогенности, подобраны условия культивирования штаммов и сформирован набор референсных масс-спектров для идентификационной базы данных S.A.R.A.M.I.S.TM (Anagnostec GmbH). Анализ коллекционных штаммов патогенных буркхольдерий продемонстрировал возможность достоверного определения таксономической принадлежности исследуемых микроорганизмов до видового уровня. Пополненная база масс-спектральных характеристик в дальнейшем позволит проводить экспресс-идентификацию изолятов, подозрительных на принадлежность к возбудителям мелиоидоза и сапа, а также будет являться основой для разработки схем хемотипирования штаммов буркхольдерий методом масс-спектрометрии.

В целом, в результате выполнения диссертационной работы были предложены усовершенствованные алгоритмы идентификации и дифференциации штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа с применением современных систем автоматизированного микробиологического анализа, которые внедрены в практику работы Референс-центра по мониторингу за возбудителями мелиоидоза и сапа на базе

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора и могут быть использованы в работе диагностических лабораторий Региональных центров по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней I-II групп патогенности, Центров индикации и диагностики опасных инфекционных болезней (противочумные учреждения, курирующие прикрепленные субъекты Российской Федерации), а также Национальных центров по верификации диагностической деятельности с функцией Государственных коллекций микроорганизмов.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что при использовании биохимических наборов широкой специфичности (Micronault IDS и аналоги) ошибки идентификации *Burkholderia pseudomallei* и *B. mallei* связаны с вариабельностью биохимических признаков штаммов - активности фосфодиэстеразы (DIP), хитиназы (CHIT), пролинамидазы (PRO), ассимиляции мальтозы (MALA), ферментации глюкозы (GLUF).

2. Показано, что при использовании идентификационных наборов Vitek 2 GN, совокупность отрицательных результатов тестов NAGA, BNAG, PHOS и положительных dCEL, TugA и ProA приводит к идентификации штаммов

B. pseudomallei с низкой дискриминацией, а сочетание положительного результата теста на активность D-целлобиазы и отрицательных тестов NAGA, TugA и ProA ведет к ошибочной идентификации возбудителя мелиоидоза как *B. cepacia*.

3. Разработан комплекс методических приемов пробоподготовки клеток патогенных буркхольдерий для MALDI-TOF масс-спектрометрии. Установлено, что наиболее эффективным методом пробоподготовки, обеспечивающим как обеззараживание, так и эффективную экстракцию белковых компонентов, является обработка муравьиной кислотой и ацетонитрилом.

4. Определено, что оптимальной схемой культивирования *B. pseudomallei* и *B. mallei*, обеспечивающей достаточный уровень воспроизводимости и высокие качественные характеристики клеточного масс-спектра (отклонения координат наиболее интенсивных пиков не более 0.3 кДа, колебания соотношения s/n не более 20 единиц) является выращивание клеток микроорганизмов в течение 18 - 24 ч при 37°C на агаре Luria.

5. Сформированы видовые референтные «суперспектры» общеклеточных белков *B. pseudomallei* и *B. mallei*, содержащие набор наиболее характерных и стабильно воспроизводимых спектральных пиков в анализируемом диапазоне молекулярных масс.

6. Разработаны оригинальные разделы электронной базы данных референтных MALDI-TOF спектров S.A.R.A.M.I.S.TM (виды *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei*, в структуре домен *Bacteria*, царство *Proteobacteria*, класс *Betaproteobacteria*, порядок *Burkholderiales*, семейство *Burkholderiaceae*, род *Burkholderia*), позволяющий проводить видовую идентификацию штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа с приемлемой достоверностью $\geq 75\%$.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Прохвятилова Е.В. Сравнительная оценка информативности иммунологических и молекулярно-генетических методов и средств на этапах специфической индикации возбудителя мелиоидоза / В.А. Антонов, Д.В. Викторов, Н.П. Храпова, Г.А. Ткаченко, В.И. Илюхин, И.Б. Захарова, М.А. Гришина, Н.Г. Плеханова, И.В. Новицкая, М.Я. Кулаков, Т.В. Булатова, И.И. Корсакова, С.С. Савченко, О.С. Бондарева, Н.Н. Тетерятникова, Т.В. Сенина, **Я.А. Лопастейская**, А.А. Батурич, А.С. Куликова // Клиническая лабораторная диагностика. - 2014. - Т. 59, № 12. С. 55-59. **(журнал из перечня ВАК)**
2. **Лопастейская Я.А.** Применение времяпролетной масс-спектрометрии с матрично активированной лазерной десорбцией-ионизацией (maldi-tof) для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза / **Я.А. Лопастейская**, Т.Н. Шаров, Е.В. Молчанова, Ю.А. Кузютина, Д.В. Викторов, А.В. Топорков // Клиническая лабораторная диагностика. - 2016. - Т. 61, № 8. - С. 501-508. **(журнал из перечня ВАК)**
3. Молчанова Е.В. Особенности идентификации *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* с помощью микробиологического анализатора Vitek 2 compact 30 / Е.В. Молчанова, **Я.А. Лопастейская**, А.В. Незнамова, Ю.А. Кузютина, Н.П. Агеева, И.Б. Захарова, Д.В. Викторов, А.В. Топорков // Проблемы особо опасных инфекций. - 2016. - № 3. - С. 57-61. **(журнал из перечня ВАК)**
4. Незнамова А.В. Особенности идентификации микроорганизмов комплекса *Burkholderia cepacia* и рода *Pseudomonas* с помощью биохимического автоматического анализатора ВИТЕК 2 / **Я.А. Лопастейская**, Е.В. Молчанова, Н.П. Агеева, Д.В. Викторов // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. - 2016. - Т. 59, № 3. - С. 109-112. **(журнал из перечня ВАК)**
5. **Лопастейская Я.А.** Использование метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза / Т.Н. Шаров, Е.В. Молчанова, Д.В. Викторов, А.В. Топорков // Материалы международной научно-практической конференции «Перспективы сотрудничества государств-членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных заболеваний», г. Сочи. – 2015. - С. 266-269.
6. Молчанова Е.В. Паспортизация коллекционных штаммов патогенных буркхольдерий / **Я.А. Лопастейская**, Т.Н. Шаров, О.С. Бондарева, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, И.Б. Захарова, Н.П. Агеева // Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены», г. Санкт-Петербург. - 2015г. - С. 158-160.
7. Незнамова А.В. Использование автоматической системы ВИТЕК 2 при идентификации микроорганизмов комплекса *Burkholderia cepacia* / Е.В. Молчанова, **Я.А. Лопастейская**,

- Н.П. Агеева // Всероссийский ежегодный конгресс «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика» (Санкт – Петербург), Журнал инфектологии. – 2016. - Т. 8, № 3. - С. 96-97.
8. **Лопастейская Я.А.** Сравнение эффективности применения автоматических систем идентификации в лабораторной диагностике патогенных бургхольдерий / Е.В. Молчанова, И.Б. Захарова, Д.В. Викторов // Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены», г. Москва. – 2016. – С. 129-131.
9. Незнамова А.В. Применение микробиологического анализатора VITEK 2 для идентификации патогенных бургхольдерий / **Я.А. Лопастейская**, Ю.А. Кузютина, Е.В. Молчанова, Н.П. Агеева, И.Б. Захарова // Материалы XIII Межгосударственной научно-практической конференции «Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005г.) до 2016 года», г. Саратов. – 2016.