

13. Di Pinto A., Ciccicarese G., Tantillo G. A collagenase-targeted multiplex PCR assay for identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Food Protection*. 2005; 68 (1): 150–3.
14. Nishibuchi M., Kaper J.B. Thermostable direct hemolysin gene and of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect. Immun.* 1995; 63: 2093–9.
15. Park K.S., Ono T., Rokuda M. et al. Cytotoxicity and enterotoxicity of the thermostable direct hemolysin – deletion mutants of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol. Immunol.* 2004; 48 (4): 313.
16. Gonzales-Escalona N., Blackstone G.M., DePaola A. Characterization of a *Vibrio alginolyticus* strain, isolated from Alaskan oysters, carrying a hemolysin gene similar to the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (trh) of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72 (12): 7925–9.
17. Монахова Е. В. *Факторы патогенности нехолерогенных штаммов *Vibrio cholerae**: автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. Ростов-на-Дону; 2012.
18. Подойницына О. А. *Генотипическая характеристика штаммов *V. parahaemolyticus*, циркулирующих на территориях России и сопредельных государств*: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Ростов-на-Дону; 2013.
19. Anhalt J. P., Fenselau C. Identification of bacteria using mass-spectrometry. *Analyt. Chem.* 1975; 47: 219–25.
20. Кубанова А.А., Говорун В.М., Ильина В.А. и др. Первый опыт применения метода прямого белкового профилирования для идентификации и типирования *N. Gonorrhoeae*. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2006; 5: 25–9.
21. Hazen H., Martinez J., Chen Y. et al. Rapid Identification of *Vibrio parahaemolyticus* by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75 (21): 6745–56.
22. Dieckmann R., Strauch E., Alter T. Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using MALDI-ToF mass-spectrometry. *J. Appl. Microbiol.* 2010; 109 (1): 199–211.
23. Рыковская О.А., Шалу О.А., Монахова Е.В. и др. Комплексный метод оценки вирулентности парагемолитических вибрионов. *Клиническая и лабораторная диагностика*. 2013; 2: 38–41.

REFERENCES

4. Hoult Dzh., Krig N., Snit P., Stejli Dzh., Uill'jamsa S., eds. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. vol. 1: Translation from English. Moscow; 1997. (in Russian)
8. Shalu O.A., Nepomnjashhaja N.B., Monakhova E.V. et al. PCR genotypes strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the people on the territories of CIS countries. In: *Cholerae and others human pathogenic vibrios*. Mat. Meeting of specialists of Rospotrebnadzor and the problem Commission. Rostov-na-Donu; 2010: 99–105. (in Russian)
17. Monakhova E.V. Pathogenicity factors of nontoxigenic *Vibrio cholerae* strains. Diss. Rostov-na-Donu; 2012. (in Russian)
18. Podoinitsyna O.A. *Genotypic characterization of *V. parahaemolyticus* strains, circulating on the territories of Russia and the adjacent States*. Diss. Rostov-na-Donu; 2013. (in Russian)
20. Kubanova A.A., Govorun V.M., Il'ina V.A. et al. The first experience with the use of the direct protein profiling method to identify and type *N. gonorrhoeae*. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2006; 5: 25–9. (in Russian)
23. Rykovskaya O.A., Shalu O. A., Monakhova E.V. et al. The development of complex technique of evaluation of virulence of para-haemolytic vibrio. *Klinicheskaya i laboratornaya diagnostika*. 2013; 2: 38–41. (in Russian)

Поступила 21.02.14

Received 21.02.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.98:579.841.111-078.33:577.21.083

Прохватилова 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., Батурин А.А., Куликова А.С.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИНФОРМАТИВНОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ И СРЕДСТВ НА ЭТАПАХ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИНДИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора России

Референс-центром по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза проведены испытания наборов реагентов для диагностики *in vitro* возбудителя мелиоидоза и других близкородственных видов буркхолдерий. На этапах специфической индикации (СИ) патогенных буркхолдерий оценены диагностические возможности коммерческих и экспериментальных наборов реагентов для методов экспресс- и ускоренного анализа. Критериями оценки диагностической ценности наборов реагентов являлись чувствительность, специфичность, а также время проведения исследований. Анализ с использованием моно- и мультилокусных амплификационных систем, в том числе ПЦР в реальном времени, позволил в течение 5–6 ч осуществить идентификацию и дифференциацию *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis* и *B. ceracia*.

Ключевые слова: мелиоидоз; буркхолдерии; полимеразная цепная реакция; иммунологические методы; бактериологическое исследование.

Автор для корреспонденции:

Прохватилова Елена Валерьевна, канд. мед. наук, доц., зам. директора
Адрес: 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7
E-mail: mari2@sprint-v.com.ru

E.V. Prokhvatilova, V.A. Antonov, D.V. Viktorov, N.P. Khrapova, G.A. Tkachenko, V.I. Iliukhin, I.B. Zakharova, M.A. Grishina, N.G. Plekhanova, I.V. Novitskaia, M.Ya. Kulakov, T.V. Bulatova, I.I. Korsakova, S.S. Savtchenko, O.S. Bondareva, N.N. teteriatnikova, T.V. Senina, Ya.A. Lopasteiskaia, A.A. Baturin, A.S. Kulikova

THE COMPARATIVE EVALUATION OF INFORMATIVENESS OF IMMUNOLOGIC AND MOLECULAR GENETIC METHODS AND MEANS DURING STAGES OF SPECIFIC INDICATION OF MELIOIDOSIS AGENT

The Volgograd anti-plague research institute of Rospotrebnadzor of Russia, Volgograd, Russia

The reference-center of monitoring of agents of glanders and melioidosis carried out testing of reagents kits for diagnostic of agent of melioidosis and other close-related species of *Burkholderia* in vitro. At the stage of specific identification of pathogenic *Burkholderia* the diagnostic possibilities of commercial and experimental kits of reagents for express- and rapid analysis were evaluated. The criteria of evaluation of diagnostic value of kits of reagents were sensitivity, specificity and time of implementation of studies. The analysis with application of mono- and multi-locus amplification systems, including real-time polymerase chain reaction permitted during 5-6 hours to implement identification and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis* and *B. cepacia*.

Key words: melioidosis; *Burkholderia*; polymerase chain reaction; immunologic methods; bacteriological analysis.

Введение. Одной из основных задач лабораторной диагностики является установление видовой принадлежности возбудителя инфекционного заболевания в кратчайшие сроки. Время, затраченное на идентификацию патогена, имеет чрезвычайно важное значение в случае особо опасных инфекций. Мелиоидоз – особо опасное инфекционное заболевание, вызываемое аэробными грамотрицательными неферментирующими бактериями вида *Burkholderia pseudomallei*, относящегося к микроорганизмам II группы патогенности и рассматривающегося как один из наиболее реальных агентов биологического оружия и биотеррористических атак. Клиническая диагностика мелиоидоза затруднена, поскольку инфекционный процесс в организме больных людей и животных протекает с многообразием клинических симптомов, в форме сепсиса с образованием множественных абсцессов в лимфатических узлах, печени, селезенке, легких. Решающее значение для постановки клинического диагноза имеет лабораторное исследование, от результатов и времени проведения которого во многом зависит своевременная реализация лечебных, противозидемических и профилактических мероприятий [4, 8].

В стандартной схеме лабораторной диагностики мелиоидоза первичное выделение культуры бактериологическим методом возможно не ранее чем через 48–72 ч. В единой схеме специфической индикации патогенных биологических агентов (СИ ПБА) для быстрого обнаружения возбудителя мелиоидоза и его дифференцирования от филогенетически близких видов буркхольдерий используют регламентированные методы экспресс- и ускоренного анализа: метод флюоресцирующих антител (МФА), полимеразную цепную реакцию (ПЦР), твердофазный иммуноферментный метод (ТИФМ), реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА), которые позволяют получить предварительный результат через 4–6 ч от начала исследования и своевременно верифицировать диагноз [7].

Целью настоящего исследования были испытание и сравнительная оценка информативности диагностических коммерческих (зарегистрированных в Российской Федерации) и экспериментальных наборов реагентов для обнаружения возбудителей мелиоидоза и других близкородственных видов буркхольдерий, встречающихся в практике клинических исследований. Испытания наборов реагентов проводили на базе лабораторий Референс-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза Волгоградского научно-исследовательского противочумного института.

Материалы и методы. Для внутреннего контроля качества лабораторных исследований руководствовались ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025-2006 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий», ГОСТ Р ИСО 9001 «Система качества. Термины и определения», а также МУ 4.2.2787-10 [4]. Использованные в испытаниях диагностические препараты (16 медицинских изделий) разработаны и произведены ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора.

В исследовании использовали штаммы *B. pseudomallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia*, полученные из коллекционного центра Волгоградского научно-исследовательского противочумного института. В качестве контрольных образцов готовили взвеси клеток штаммов плотностью $1 \cdot 10^6$ м.кл./мл в 0,9% хлориде натрия; подготовку и аликвотирование контрольных образцов проводили с обязательным контролем показателя КОЕ/мл. Серии проб (по 5 типичных штаммов каждого вида буркхольдерий) шифровали и передавали в лаборатории Референс-центра для исследования различными методами. Все виды работ с ПБА II группы патогенности выполняли в соответствии с требованиями СП 1.3.1285-03 [5].

В исследовании с помощью МФА применяли коммерческий набор «Имуноглобулины диагностические флюоресцирующие мелиоидозные моноклональные» (РУ № ФСР 2011/11615, ТУ 9389-001-01898084-2011, серия 52/13) и экспериментальные серии флюоресцирующих иммуноглобулинов, полученных на основе разноэпитопных моноклональных антител (МКА) 1F₄, 3C₆, 5C₂, 5C₉, 6B₇, 7A₈, 4A₁₀ к антигену 200 kDa *B. pseudomallei* (по 1 серии каждого типа МКА).

РНГА ставили с коммерческим набором реагентов «Диагностикум эритроцитарный сапной и мелиоидозный иммуноглобулиновый сухой» (РУ № ФСР 2011/11613, ТУ 9388-003-01898084-2011, серия 90/13). Для подтверждения специфичности РНГА прибегали к реакции ее торможения (РТНГА). Результаты учитывали через 2–3 ч и окончательно на следующие сутки.

При ТИФМ использовали экспериментальный набор реагентов «Тест-система иммуоферментная моноклональная для выявления водорастворимых антигенов возбудителя мелиоидоза» с вариантами иммунопероксидазного конъюгата на основе МКА 5C₂ и 2A₆.

Для исследований с помощью ПЦР использовали коммерческий набор реагентов для выявления ДНК возбудителей сапа (*B. mallei*) и мелиоидоза (*B. pseudomallei*) методом ПЦР «Burk23S – Eph» (РУ № ФСР 2012/13066, ТУ 9389-004-01898084-2011, серия 1-13) и 5 экспериментальных генодиагностических средств: 1) набор реагентов для выявления ДНК возбудителей сапа (*B. mallei*) и мелиоидоза (*B. pseudomallei*) методом ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией «Амплиген Burk», 2) набор праймеров Bps1s/Bps2as для обнаружения ДНК возбудителя мелиоидоза методом ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией, 3) набор праймеров BCR1-BCR2 для обнаружения ДНК бактерий комплекса *B. cepacia* методом ПЦР, 4) набор праймеров Burt1s-Burt2as для обнаружения ДНК *B. thailandensis*, 5) набор реагентов для детекции и типирования генов устойчивости к антибиотикам β-лактаминового ряда у патогенных бактерий рода *Burkholderia* в формате мультиплексной ПЦР.

Пробоподготовку для ПЦР проводили в соответствии с СП 1.3.1285-03 и МУ 1.3.2569 -09 [3]. Постановку реакций осуществляли с использованием амплификаторов Терцик (ЗАО «НПФ ДНК-технология», Россия), Rotor-Gene 6000 («Corbett Research», Австралия), C1000 («Bio-Rad», США).

В случае элетрофоретической детекции продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле и визуализировали окрашиванием бромистым этидием [2]. При гибридизационно-флюоресцентной детекции накопление специфического продукта амплификации участка ДНК *B. mallei* и *B. pseudomallei* детектировалось по каналу FAM/Green, накопление продукта амплификации ДНК внутреннего контрольного образца (ВКО) – по каналу Cy5/Red.

Исследование проб бактериологическим методом проводили в соответствии с МУ 4.2.2787-10 [4]. Видовую принадлежность выделенных чистых культур микроорганизмов подтверждали повторно с использованием испытуемых диагностических средств.

Результаты и обсуждение. СИ ПБА предусматривает индикацию и идентификацию микроорганизмов в неизвестных бактериальных взвесах с помощью обязательных (табельных) методов лабораторной диагностики в соответствии с перечнем наиболее вероятных ПБА. Поскольку длительность анализа регламентирована как можно более короткими сроками (до 48 ч), основными критериями оценки диагностической ценности наборов реагентов являются чувствительность, специфичность, а также время проведения исследований и выдачи результатов.

На этапе СИ МФА (см. таблицу) позволил через 6 ч получить сигнальный ответ о наличии в сериях проб 3 и 4 возбудителя мелиоидоза или близкородственных буркхольдерий, т. е. было невозможно дифференцировать *B. pseudomallei* от практически идентичного по антигенной структуре *B. thailandensis*. Результат анализа проб, содержащих *B. ceracia* (серия 2), был отрицательным, что свидетельствовало

о специфичности испытуемых флюоресцирующих моноклональных мелиоидозных иммуноглобулинов только для видов буркхольдерий группы «*pseudomallei*» – *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* (см. таблицу). При использовании 7 типов моноклональных флюоресцирующих мелиоидозных иммуноглобулинов к различным антигенным детерминантам *B. pseudomallei* (МКА 1F₄, 3C₆, 5C₂, 5C₉, 6B₇, 7A₈, 4A₁₀) преимуществ в сравнении с коммерческим препаратом по параметрам специфической активности и специфичности выявлено не было (см. таблицу).

Используемый для постановки РНГА препарат (см. таблицу) обладает группоспецифическими свойствами и позволяет выявить комплексный (общий) антиген для возбудителей *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, что также объясняет невозможность дифференцирования *B. pseudomallei* от *B. thailandensis* в сериях проб 3 и 4. Данный диагностический препарат оказался применимым лишь на этапах классического лабораторного анализа (3 сут исследования) после подрашивания исследуемых бактериальных суспензий; в пределах 4–6 ч от начала исследований в РНГА получен отрицательный результат, так как концентрации бактерий в пробах были ниже показателя чувствительности метода (> 1 · 10⁶ м.кл./мл). С культурами *B. ceracia* зарегистрирован отрицательный результат, что подтверждает заявленный показатель специфичности данного набора реагентов в соответствии с ТУ (см. таблицу).

В течение 4–6 ч от начала исследований результаты применения ТИФМ с экспериментальным набором реагентов, приготовленным на основе МКА к гликопротеину капсулы возбудителя мелиоидоза (антиген 200 kDa), были отрицательными со

Сводные результаты СИ на наличие/отсутствие возбудителей инфекционных болезней

Исследуемые пробы	МФА	РНГА	ТИФМ	Варианты ПЦР					
				реагенты для выявления ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза методом ПЦР с электрофоретической детекцией "Burk23S-Eph"	реагенты для выявления ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза методом ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией "Амплиген Burk"	праймеры Bps1s/Bps2as для обнаружения ДНК возбудителя мелиоидоза методом ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией	праймеры BCR1–BCR2 для обнаружения ДНК бактерий комплекса <i>B. ceracia</i> методом ПЦР	праймеры Burt1s-Burt2as для обнаружения ДНК <i>B. thailandensis</i>	реагенты для детекции и типирования генов β-лактамаз патогенных <i>Burkholderia</i> spp. в формате мультилокусной ПЦР
Результаты исследований, полученные через 5–6 ч после поступления проб на исследование									
Отрицательные пробы	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Серия 1									
<i>B. ceracia</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Серия 2									
<i>B. thailandensis</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Серия 3									
<i>B. pseudomallei</i>	+	-	-	+	+	+	-	+	+
Результаты исследований, полученные через 48–72 ч на этапе идентификации чистых культур									
Отрицательные пробы	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Серия 1									
<i>B. ceracia</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Серия 2									
<i>B. thailandensis</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	+
Серия 3									
<i>B. pseudomallei</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+

Примечание. (-) – отрицательный результат; (+) – положительный результат.

всеми исходными пробами (см. таблицу). Через 72 ч на этапе идентификации при работе со взвешиваемыми чистыми культурами (концентрация $1 \cdot 10^7$ – 10^9 м.кл./мл), изолированных из серий проб 3 и 4, апробированы 2 варианта экспериментальной тест-системы, описанные выше. С одним из них достигнута чувствительность $1 \cdot 10^7$ м.кл./мл в детекции штаммов *B. pseudomallei* при отрицательном результате реакции с клетками *B. thailandensis*, с другим вариантом, наоборот, выявлялись штаммы *B. thailandensis* в концентрации $5 \cdot 10^6$ м.кл./мл. Результаты исследований свидетельствовали о недостаточной чувствительности экспериментального набора для ТИФМ. Данные тест-системы могут быть рекомендованы в качестве средства обнаружения растворимых антигенов возбудителя мелиоидоза на этапах идентификации и дифференциации выделенных культур буркхольдерий II и III–IV групп патогенности.

При использовании вариантов ПЦР-анализа на этапе индикации через 5 ч получен положительный результат относительно наличия возбудителей в пробах 2, 3, 4 и определен вид микроорганизма во всех пробах (см. таблицу).

Праймеры Burt1s-Burt2as, помимо ДНК *B. thailandensis*, с высокой чувствительностью обнаруживали ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза, поэтому вид микроорганизма в пробах серии 3 установлен методом вычитания результатов амплификации, полученных в реакции с другими праймерами.

Использование наборов реагентов с гибридационно-флуоресцентной детекцией позволило получить результат на 1–1,5 ч быстрее, так как при таком способе детекции исключается этап электрофореза. Флуоресцентные технологии более безопасны и способствуют снижению риска контаминации продуктами ПЦР, поскольку при регистрации результатов не открываются пробирки после этапа амплификации.

Большой диагностический интерес представляли результаты с экспериментальным «Набором реагентов для детекции и типирования генов устойчивости к антибиотикам β -лактамазного ряда у патогенных бактерий рода *Burkholderia* с помощью мультиплексного ПЦР-анализа». Результаты испытаний свидетельствовали о диагностической эффективности, чувствительности и специфичности тест-системы. Данный набор при использовании отличался экономичностью расходования реагентов, экспрессностью и информативностью в получении результатов и позволил при одномоментной постановке ПЦР осуществить идентификацию и дифференциацию всех 3 видов близкородственных микроорганизмов уже на первом этапе через 6 ч. Проведенная ранее апробация мультилокусной тест-системы на широком наборе штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* и штаммов различных геномов *seraciac*-комплекса продемонстрировала возможность дифференциации различных видов рода *Burkholderia* по набору генов β -лактамаз молекулярных классов В и D, а также отсутствие детекции ДНК видов отдаленной гетерологии (псевдомонады, вибрионы, различные виды энтеробактерий, грамположительные кокки и бациллы) [1].

При проведении СИ ПБА, положительные результаты МФА и ПЦР дали основание установить наличие в пробах серии 4 возбудителя мелиоидоза. С помощью различных вариантов ПЦР через 5–6 ч после поступления проб на исследование проведена идентификация до видов *B. pseudomallei*, *B. thailandensis*, *B. seracia* в пробах серии 2, 3 и 4 и получен предварительный ответ.

Бактериологическое исследование воспроизведено в традиционном виде для всех неферментирующих глюкозу грамотрицательных бактерий и дало возможность идентифицировать *B. seracia*, *B. thailandensis*, *B. pseudomallei* в соответствующих пробах через 72 ч. После идентификации выделенных культур и повторного исследования проб с помощью перечисленных выше методов получен окончательный ответ с указанием вида буркхольдерий (см. таблицу).

Заключение. При проведении СИ ПБА основными регламентированными методами являются МФА, РНГА, ТИФМ и ПЦР [7]. Предусмотренные ими диагностические препараты должны обеспечивать в кратчайшие сроки установление ви-

довой принадлежности возбудителя, что особенно важно в условиях чрезвычайных ситуаций, вызванных вспышками опасных инфекционных заболеваний.

Сравнительные испытания имеющихся медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП) показали, что в первые часы от момента поступления проб выявление *B. pseudomallei* и филогенетически близких видов буркхольдерий с помощью иммунологических методов РНГА, МФА, ТИФМ недостаточно эффективно, поскольку МФА не позволил идентифицировать буркхольдерии II и III–IV групп патогенности, а РНГА и ТИФМ с испытываемыми наборами реагентов – обнаружить буркхольдерии в пробах с низкой концентрацией бактерий. Основным недостатком бактериологического метода являлась длительность анализа, для выполнения которого в полном объеме требовалось 3–4 сут.

Большое значение при диагностике мелиоидоза могут представлять молекулярно-генетические методы, главным образом различные варианты ПЦР. Диагностические наборы реагентов для различных вариантов ПЦР значительно превышали соответствующие показатели чувствительности и специфичности для иммунологических методов, а диагностическая ценность (за счет отсутствия ложноположительных результатов) была выше по основным показателям. После завершения этапов сравнительных испытаний и государственной регистрации данные тест-системы могут быть рекомендованы в качестве средств экспресс-обнаружения возбудителя мелиоидоза и дифференциации буркхольдерий II и III–IV групп патогенности.

Вышеизложенное объективно обосновывает необходимость более широкого использования ПЦР в рамках деятельности Референс-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза и лабораторий различного уровня на этапах индикации проб, подозрительных на зараженность патогенными бактериями рода *Burkholderia*. Дальнейшие контрольные сравнительные испытания наборов реагентов для различных вариантов ПЦР на широком наборе штаммов гомологичных и гетерологичных видов микроорганизмов позволят принять окончательное решение об их преимуществах и алгоритмах их применения в схемах лабораторной диагностики патогенных буркхольдерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Романова А.В., Захарова И.Б., Замараев В.С., Викторов Д.В. Конструирование праймеров для детекции и типирования генов β -лактамаз патогенных видов рода *Burkholderia*. *Проблемы опасных инфекций*. 2012; 2 (112): 59–61.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. *Молекулярное клонирование*. М.: Мир; 1984.
3. МУ 1.3.2569-09. «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».
4. МУ 4.2.2787-10. «Лабораторная диагностика мелиоидоза».
5. СП 1.3.1285-03. «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».
6. СП 1.2.036-95. «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности».
7. Онищенко Г.Г., ред. *Специфическая индикация патогенных биологических агентов: Практическое руководство*. М.: 2006.
8. Dance D.A. Melioidosis is an emerging global problem. *Acta Trop.* 2000; 74 (2–3): 115–9.

REFERENCES

1. Romanova A.V., Zakharova I.B., Zamaraev V.S., Victorov D.V. Design of Primers for Detection and Typing of β -Lactamase Genes from Pathogenic Species of *Burkholderia*. *Problemy osobno opasnykh infektsiy*. 2012; 2 (112): 59–61. (in Russian)
2. Maniatis T., Fritch E., Sambrook Dzh. *Methods of genetic engineering. Molecular cloning [Metody geneticheskoy inzhenerii. Molekulyarnoe klonirovanie]*. Moscow: Mir; 1984. (in Russian)

3. MU 1.3.2569-09. *Organization of the laboratories using nucleic acid amplification techniques when working with material containing microorganisms I-IV pathogenicity groups [Organizatsiya raboty laboratoriy, ispol'zuyushchikh metodyamplifikatsii nukleinovykh kislot pri rabote s materialom, sodержashchimi mirkoorganizmy I-IV grupp patogennosti]*. (in Russian)
4. MU 4.2.2787-10. *Laboratory diagnosis of melioidosis [Laboratornaya diagnostika melioidoza]*. (in Russian)
5. JV 1.3.1285-03. *Safe handling of microorganisms I-II pathogenicity groups (hazard) [Bezopasnost' raboty s mikroorganizmami I-II grupp patogennosti (opasnosti)]*. (in Russian)
6. SP 1.2.036-95. *The treatment, storage, transfer and transport of microorganisms I-IV pathogenicity groups [Poryadok ucheta, khraneniya, peredachi i transportirovaniya mikroorganizmov I-IV grupp patogennosti]*. (in Russian)
7. Onishchenko G.G., ed. *Specific of pathogenic biological agents: A Practical Guide [Spetsificheskaya indikatsiya patogennykh biologicheskikh agentov. Prakticheskoe rukovodstvo]*. Moscow; 2006. (in Russian)
8. Dance D.A. Melioidosis is an emerging global problem. *Acta Trop.* 2000; 74 (2-3): 115-9.

Поступила 10.04.14

Received 10.04.14

© МАКАРОВ В.К., МАКАРОВ П.В., 2014

УДК 616.33/34-002-079.4

Макаров В.К., Макаров П.В.

СПОСОБ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗНОГО И ОСТРОГО АЛКОГОЛЬНОГО ГАСТРОЭНТЕРИТОВ

Кафедра инфекционных болезней и эпидемиологии ГБОУ ВПО «Тверская государственная медицинская академия»
Минздрава РФ, 170100, Тверь

Цель исследования – разработка способа дифференциальной диагностики сальмонеллезного и алкогольного гастроэнтеритов на основе фосфолипидного спектра сыворотки крови. Исследовали показатели фосфолипидных фракций сыворотки крови у 50 здоровых, 50 больных острым алкогольным гастроэнтеритом (ОАГЭ) и 50 больных сальмонеллезным гастроэнтеритом (СГЭ). Изучено относительное содержание следующих фракций общих фосфолипидов: суммарных лизофосфолипидов (ЛФЛ), сфингомиелина, фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭ). Фосфолипидный спектр сыворотки крови может быть использован для дифференциальной диагностики СГЭ и ОАГЭ. Нарушения метаболизма липидов при данных патологических состояниях носят разнонаправленный характер. СГЭ характеризуется снижением по сравнению с нормой относительного содержания ЛФЛ и повышением уровня ФХ, ОАГЭ – повышением относительного содержания ЛФЛ, ФЭ и снижением уровня ФХ. Содержание в сыворотке крови ЛФЛ ниже 35% или 30 мг% позволяет диагностировать ОАГЭ. Содержание в сыворотке крови ФХ выше 40% или 50 мг% позволяет диагностировать СГЭ.

Ключевые слова: сальмонеллез; алкоголь; гастроэнтерит; фосфолипиды.

V.K. Makarov, P.V. Makarov

THE MODE OF DIFFERENTIAL DIAGNOSTIC OF AND ACUTE ALCOHOLIC GASTROENTERITIS

The Tver state medical academy of Minzdrav of Russia, Tver, Russia

The study was carried out to develop mode of differential diagnostic of salmonella and acute alcoholic gastroenteritis on the basis of phospholipid specter of blood serum. The indicators of phospholipid fractions of blood serum were analyzed in 50 healthy persons, 50 patients with acute alcoholic gastroenteritis and 50 patients with salmonella gastroenteritis were analyzed. The relative content of following fractions of whole phospholipids were analyzed - total lysophospholipids, sphingomyelin, phosphatidcholine, phosphatidyletanolamin. The phospholipid spectrum of blood serum can be applied in differential diagnostic of salmonella gastroenteritis and acute alcoholic gastroenteritis. The disorders of metabolism of lipids under given pathological conditions have a multidirectional character. The salmonella gastroenteritis is characterized by decreasing of relative content of total lysophospholipids and increasing of phosphatidcholine as compared with standard conditions. The acute alcoholic gastroenteritis is characterized by increasing of relative content of total lysophospholipids and phosphatidcholine and decreasing of level of phosphatidcholine. The content of total lysophospholipids in blood serum is lower on 35% or 30.0 mg% permits diagnosing acute alcoholic gastroenteritis. The content of phosphatidcholine in blood serum higher than 40% or 50 mg% permits diagnosing salmonella gastroenteritis.

Key words: salmonellosis; alcohol; gastroenteritis; phospholipids.

Введение. Сальмонеллез встречается во всех регионах мира [17] и занимает значительное место среди всего этиологического спектра диарейных заболеваний [2]. Заболеваемость в РФ сальмонеллезами продолжает расти [10], нанося значительный экономический ущерб. Наиболее частым кли-

ническим вариантом течения сальмонеллеза является гастроэнтеритический вариант гастроинтестинальной формы. В клинике наблюдаются интоксикационный, диспептический и диарейный синдромы, проявляющиеся тошнотой, рвотой, болями в животе, частым обильным водянистым жидким стулом [12]. Диагноз подтверждается бактериологическим методом, на что требуется от 3 до 5 дней [3].

Помимо инфекционной этиологии, причиной гастроэнтеритов может быть токсическое воздействие алкоголя [5]. Алкогольная ситуация в РФ характеризуется как критическая, потому что потребление алкоголя в России расценивается как избыточное [9]. Для острого алкогольного

Для корреспонденции:

Макаров Виктор Константинович, д-р мед. наук, проф., зав. каф. инфекц. болезней и эпидемиологии
Адрес: 170100, Тверь, ул. Советская, 4
E-mail: makarov.tver@mail.ru