

ОСОБЕННОСТИ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ КОМПЛЕКСА *BURKHOLDERIA CEPACIA* И РОДА *PSEUDOMONAS* С ПОМОЩЬЮ БИОХИМИЧЕСКОГО АВТОМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА VITEK 2

А. В. Незнамова¹, Я. А. Лопастейская^{1,2}, Е. В. Молчанова^{1,2}, Н. П. Агеева¹, Д. В. Викторов^{1,2}

¹Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт,

²Волгоградский государственный медицинский университет, кафедра молекулярной биологии и генетики

С помощью автоматического биохимического анализатора VITEK 2 8 из 9 штаммов комплекса *Burkholderia cepacia* были идентифицированы как виды: *B. Cepacia* / *Burkholderia vietnamiensis* / *Burkholderia multivorans* / *Burkholderia stabilis*. Один штамм *Burkholderia cepocapacia* был неправильно определен как вид *Acinetobacter Iwoffii*. Пять штаммов рода *Pseudomonas*, с неустановленной видовой принадлежностью, были идентифицированы как вид *Pseudomonas aeruginosa* со степенью вероятности 98—99 %.

Ключевые слова: идентификация, *Burkholderia*, *B. cepacia*, VITEK 2, *Pseudomonas aeruginosa*.

IDENTIFICATION OF *BURKHOLDERIA CEPACIA* AND *BURKHOLDERIA PSEUDOMONAS* COMPLEX BACTERIA USING VITEK 2, AN AUTOMATED BIOCHEMICAL ANALYZER

A. V. Neznamova¹, Y. A. Lopasteyskaya^{1,2}, E. V. Molchanova^{1,2}, N. P. Ageeva¹, D. V. Viktorov^{1,2}

¹Volgograd Research Plague Control Institute,

²Volgograd State Medical University, Department of molecular biology and genetics

8 out of 9 strains of *Burkholderia cepacia* complex have been identified as *B. cepacia*/ *Burkholderia vietnamiensis*/ *Burkholderia multivorans*/ *Burkholderia stabilis* species using VITEK 2, an automated biochemical analyzer. *Burkholderia cepocapacia* strain was falsely identified as *Acinetobacter Iwoffii*. Five unidentified strains of the *Pseudomonas* genus have been identified as *Pseudomonas aeruginosa* with probability of 98—99 %.

Key words: identification, *Burkholderia*, *B. cepacia*, VITEK 2, *Pseudomonas aeruginosa*.

B. cepacia относится к роду буркгольдерий, грамотрицательных неферментирующих бактерий, выделенных в 1992 г. в самостоятельный таксон из рода *Pseudomonas* [8]. Вид *B. cepacia* является типовым видом рода и относится к IV группе патогенности в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». Изоляты «*B. cepacia*» различного происхождения характеризуются значительной гетерогенностью, что обусловило разделение *cepacia*-комплекса на геномвары, в дальнейшем получивших статус видов. До 2009 г. их насчитывалось 9, к 2011 г. — уже 17, в настоящее время комплекс представлен 18 отдельными бактериальными видами [2, 6, 7].

Ряд представителей комплекса *B. cepacia* в настоящее время признаны в качестве основных оппортунистических патогенов респираторного тракта больных муковисцидозом, хроническим гранулематозом и некоторыми иммунодефицитными состояниями [4, 5]. Описаны случаи развития некротизирующих пневмоний, абсцессов легких, послеоперационных раневых инфекций и септицемий, инфекций мочевого тракта, возникающих при использовании контаминированных микроорганизмами дезинфектантов, растворов и систем для внутривенного введения лекарств. Приблизительно у 20 % больных, инфицированных *B. cepacia*, возникает так называемый *cepacia*-синдром, который характеризуется некротизирующей пневмонией с ли-

хорадкой, бактериемией и может быстро привести к летальному исходу. Как правило, внутрибольничные вспышки инфекции *B. cepacia* связаны с недостаточной дезинфекцией изделий медицинского назначения многократного использования. Данные бактерии могут передаваться от человека к человеку в медицинских и немедицинских учреждениях при прямом и косвенном контактах, а также воздушно-капельным путем [6].

Идентификация микроорганизмов комплекса *B. cepacia* с использованием методов бактериологического анализа сложна в силу выраженного полиморфизма фенотипических признаков.

Для идентификации бактерий в большинстве клинических диагностических лабораторий в настоящее время используются автоматические системы бактериологического анализа, такие как BD Phoenix (Becton Dickinson, США), VITEK и VITEK 2 (bioMerieux, Франция), WalkAway (Dade Behring, США), основанные на сопоставлении биохимических свойств исследуемых штаммов с имеющейся базой данных, содержащей информацию о типичных биохимических профилях всех входящих в нее видов микроорганизмов.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Исследование особенностей идентификации коллекционных штаммов комплекса *B. cepacia* и установление видовой принадлежности представителей рода *Pseudomonas* с использованием системы VITEK 2.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы штаммы из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора: 9 штаммов комплекса *B. cepacia*, геномовары которых были определены ранее [1], и 5 штаммов рода *Pseudomonas* с неустановленной видовой принадлежностью (табл. 1).

Определение видовой принадлежности проводили на биохимическом автоматическом анализаторе VITEK 2 (BioMérieux, Франция), с использованием NG-карт, предназначенных для идентификации клинически значимых ферментирующих и неферментирующих грамотрицательных палочек и включающих 47 индивидуальных биохимических тестов.

Штаммы микроорганизмов выращивали на L-агаре (Difco, США) при температуре 32 °С. Для заполнения соответствующих карт прибора из 18 ч культур готовили суспензию 0,5–0,63 плотности по МакФарланду согласно инструкции производителя bioMérieux (Франция).

Время получения результата — 5–10 часов. На каждую исследуемую культуру был получен протокол идентификации микроорганизма с подробной инфор-

мацией о его биохимической активности. Рассчитывался количественный показатель — относительная вероятность, отражающая степень соответствия полученных результатов типичному профилю биохимической активности каждого вида из базы данных анализатора. Система делала единственный выбор при относительной вероятности 85–99 %. В случае несоответствия биохимического профиля ни одному из имеющихся в базе данных система выдавала сообщение о невозможности идентификации или список вероятных микроорганизмов. В последнем случае лабораторный отчет содержал перечень дополнительных тестов, необходимых для окончательной идентификации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного анализа с помощью автоматической системы VITEK 2 восемь штаммов комплекса *B. cepacia* (ATCC 25416, 323, AB 1934, 8235, 8236, 8238, 3181, 3189) были отнесены к группе *B. cepacia* (*B. Cepacia* / *B. Vietnamiensis* / *B. Multivorans* / *B. stabilis*) (табл. 2).

Таблица 1

Штаммы, используемые в работе

№ п/п	Штамм	Номер геномовара	Вид согласно геномовару
1	<i>B. cepacia</i> ATCC 25416	I	<i>B. cepacia</i>
2	<i>B. cepacia</i> AB 1934	II	<i>B. multivorans</i>
3	<i>B. cepacia</i> 323	III	<i>B. cenocepacia</i>
4	<i>B. cepacia</i> 8235	IV	<i>B. stabilis</i>
5	<i>B. cepacia</i> 8236	III	<i>B. cenocepacia</i>
6	<i>B. cepacia</i> 8238	III	<i>B. cenocepacia</i>
7	<i>B. cepacia</i> 8240	III	<i>B. cenocepacia</i>
8	<i>B. cepacia</i> 3181	I	<i>B. cepacia</i>
9	<i>B. cepacia</i> 3189	I	<i>B. cepacia</i>
10	<i>Pseudomonas</i> sp. 5809	—	—
11	<i>Pseudomonas</i> sp. 5810	—	—
12	<i>Pseudomonas</i> sp. 5811	—	—
13	<i>Pseudomonas</i> sp. 5812	—	—
14	<i>Pseudomonas</i> sp. 5813	—	—

Таблица 2

Результаты идентификации микроорганизмов комплекса *B. cepacia* с использованием VITEK 2 system

№ п/п	Название штаммов коллекции	Результаты идентификации
1	<i>B. cepacia</i> ATCC 25416	<i>B. cepacia</i> / <i>B. vietnamiensis</i> / <i>B. multivorans</i> / <i>B. stabilis</i>
2	<i>B. multivorans</i> AB 1934	<i>B. cepacia</i> / <i>B. vietnamiensis</i> / <i>B. multivorans</i> / <i>B. stabilis</i>
3	<i>B. cenocepacia</i> 323	<i>B. cepacia</i> / <i>B. vietnamiensis</i> / <i>B. multivorans</i> / <i>B. stabilis</i>
4	<i>B. stabilis</i> 8235	<i>B. cepacia</i> / <i>B. vietnamiensis</i> / <i>B. multivorans</i> / <i>B. stabilis</i>
5	<i>B. cenocepacia</i> 8236	<i>B. cepacia</i> / <i>B. vietnamiensis</i> / <i>B. multivorans</i> / <i>B. stabilis</i>
6	<i>B. cenocepacia</i> 8238	<i>B. cepacia</i> / <i>B. vietnamiensis</i> / <i>B. multivorans</i> / <i>B. stabilis</i>
7	<i>B. cenocepacia</i> 8240	<i>A. lwoffii</i>
8	<i>B. cepacia</i> 3189	<i>B. cepacia</i> / <i>B. vietnamiensis</i> / <i>B. multivorans</i> / <i>B. stabilis</i>
9	<i>B. cepacia</i> 3181	<i>B. cepacia</i> / <i>B. vietnamiensis</i> / <i>B. multivorans</i> / <i>B. stabilis</i>
10	<i>Pseudomonas</i> sp. 5809	<i>P. aeruginosa</i> / <i>P. putida</i>
11	<i>Pseudomonas</i> sp. 5810	<i>P. aeruginosa</i>
12	<i>Pseudomonas</i> sp. 5811	<i>P. aeruginosa</i>
13	<i>Pseudomonas</i> sp. 5812	<i>P. aeruginosa</i>
14	<i>Pseudomonas</i> sp. 5813	<i>P. aeruginosa</i>

Лабораторный отчет по этим штаммам содержал информацию по дополнительным тестам (утилизация сахарозы, наличие бета-галактозидазы, желатиназы и желтого пигмента), с помощью которых можно было определить эти штаммы до вида.

В ряде работ при идентификации штаммов комплекса *B. seracía* авторы отмечали ложную идентификацию как на уровне генома, так и на уровне вида и рода при использовании анализатора VITEK 2 [3]. В данной работе три штамма *B. senoseracia* 323, 8236, 8238 были идентифицированы как другие виды комплекса *B. seracia* (*B. seracia* / *B. Vietnamiensis* / *B. Multivorans* / *B. stabilis*), что возможно связано с их нестабильным биохимическим профилем.

Штамм *B. senoseracia* 8240 был неправильно определен прибором как вид *A. lwoffii* с вероятностью 91 %. В статье Brisse S., et al. было указано, что при идентификации культур комплекса *B. seracia* с помощью VITEK 2 в 4 % случаев анализируемый изолят был отнесен к разным видам неферментирующих грам-негативных бактерий (в том числе и к *Acinetobacter spp.*) [3]. Ложная идентификация культуры может определяться нехарактерными для типового штамма биохимическими свойствами. Так, *B. senoseracia* 8240 отличался от других штаммов этого вида набором таких показателей, как отсутствие β -N-ацетилглюкозоамидазной и наличие L-пролинариламидазной и тирозинариламидазной активностей, неспособность к утилизации сахарозы и др. Стоит отметить, что в проведенных нами исследованиях по автоматической бактериологической идентификации филогенетически родственных микроорганизмов *Burkholderia pseudomallei* (возбудителя особо опасного заболевания — мелиоидоза) и *Burkholderia mallei* (возбудителя особо опасного заболевания — сапа) у части штаммов были выявлены биохимические особенности, заключающиеся в нетипичном результате перечисленных выше тестов. В результате, данные штаммы *B. pseudomallei* и *B. mallei* были неправильно идентифицированы как виды *B. seracia* и *Sphingomonas paucimobilis* соответственно.

Штаммы рода *Pseudomonas sp.* были идентифицированы бактериологическим анализатором как *P. aeruginosa* с вероятностью 98—99 % (5810, 5811, 5812, 5813). *Pseudomonas sp.* 5809 был отнесен к двум видам *P. Aeruginosa* / *P. putida*, а лабораторный отчет системы содержал рекомендации по проведению дополнительных тестов для дальнейшей дифференциации (рост при 42 °С, наличие пигмента пиоцианина). Способность к росту при данной температуре, а также наличие сине-зеленого диффундирующего пигмента свидетельствовали о его видовой принадлежности к *P. aeruginosa*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием автоматического биохимического анализатора VITEK 2 установлено, что большинство исследуемых штаммов различных геноваров

B. seracia (8 из 9) были идентифицированы как виды комплекса *B. seracia*.

Более половины (5 из 9) штаммов определены как принадлежащие одному из четырех видов комплекса: *B. cepacia* / *B. Vietnamiensis* / *B. Multivorans* / *B. stabilis*. Из 47 тестов, заложенных в NG карте прибора, не было отмечено ни одного нетипичного результата, что говорит о типичном биохимическом профиле данных штаммов, характерном для микроорганизмов этого комплекса. Оставшиеся 4 штамма, относящиеся к виду *B. senoseracia* анализатором VITEK 2, были ложно идентифицированы как штаммы других видов *seracia*-комплекса, при этом один штамм был определен как вид *A. lwoffii*.

Таким образом, при применении VITEK 2 в лабораторной практике для ускоренной идентификации микроорганизмов комплекса *B. seracia* следует иметь в виду возможность ошибочного определения их видовой принадлежности. В случаях диагностики заболевания с характерным анамнезом для *B. seracia*-инфекции и нетипичными результатами при идентификации выделенной культуры микроорганизмов с помощью автоматической системы VITEK 2 необходимы дополнительные исследования с использованием как традиционных фенотипических (бактериологических, биохимических), так и молекулярно-генетических методов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В. А., Илюхин В. И., Сенина Т. В., Лобойко А. Д., Ткаченко Г. А., Зинченко О. В., Мазурова И. Ю. Фенотипическая и генотипическая идентификация бактерий комплекса *Burkholderia cepacia* // Журн. микробиол. — 2008. — № 4. — С. 78—82.
2. Носенко В. М., Лаверухин Ю. Н., Макиенко В. В. Редкий случай ожогового сепсиса, вызванного *Burkholderia cepacia* // Мед.-соц. пробл. семьи. — 2013. — № 2 (18). — P. 168—172.
3. Brisse S., Stefani S., Verhoef J., Belkum A., Vandamme P., Goessens W. Comparative evaluation of the BD Phoenix and VITEK 2 automated instruments for identification of isolates of the *Burkholderia cepacia* complex // J. Clin. Microbiol. — 2002. — Vol. 40 (5). — P. 1743. DOI: 10.1128/JCM.40.5.1743-1748.2002.
4. Mahenthiralingam E., Bischof J., Byrne S., Radomski C., Davies J., Av-Gay Y., Vandamme P. DNA-Based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III // J Clin Microbiol. — 2000. — Vol. 38 (9). — P. 3165—3173.
5. Plesa M., Kholi A., Vermis K., Vandamme P., Panagea S., Winstanley C., Cornelis P. Conservation of the *opcL* gene encoding the peptidoglycan-associated outer-membrane lipoprotein among representatives of the *Burkholderia cepacia* complex // J. of Med. Microbiology. — 2004. — Vol. 53. — P. 389—398.
6. Saiman L., Siegel J., LiPuma J., Brown R., Bryson E., Chambers M., Downer V., Fliege J., Hazle L., Jain M., Marshall B., O'Malley C., Pattee S., Potter-Bynoe G., Reid S., Robinson K., Sabadosa K., Schmidt H., Tullis E.,

Webber J., Weber D. Infection prevention and control guideline for cystic fibrosis: 2013 update. 2014 Aug; 35 (Supp 1 1): S1-S67.

7. Sousa S., Ramos C., Leitao J. *Burkholderia cepacia* complex: emerging multihost pathogens equipped with a wide range of virulence factors and determinants // International Journal of Microbiology. — vol. 2011, Article ID 607575, 9 pages, 2011. doi:10.1155/2011/607575.

8. Yabuuchi E., Kosako Y., Oyaizu H. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group 2 to the New Genus, with the Type Species *Burkholderiacepacia* (Palleroni and

Holmes 1981) comb. nov. // Microbiol-Immunol. — 1992. — Vol. 36 (12). — P. 1251—1275.

Контактная информация

Молчанова Елена Владимировна — к. б. н., с. н. с. лаборатории коллекционных штаммов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, ассистент кафедры молекулярной биологии и генетики Волгоградского государственного медицинского университета, e-mail: elenakalinki@yandex.ru