

БУЙ ТХИ ЛАН АНЬ

**ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* И
БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА
ТЕРРИТОРИИ СОЦИАЛИСТИЧЕСКОЙ РЕСПУБЛИКИ ВЬЕТНАМ, И
СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ АЛГОРИТМОВ ИХ ИДЕНТИФИКАЦИИ**

1.5.11 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Волгоград – 2021

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и в Российско-Вьетнамском Тропическом научно-исследовательском и технологическом центре (Социалистическая Республика Вьетнам, Ханой)

Научный руководитель: Захарова Ирина Борисовна, кандидат биологических наук (специальность 1.5.11 – микробиология), доцент, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, лаборатория патогенных буркхольдерий, ведущий научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Павлович Наталья Владимировна, доктор медицинских наук (специальность 1.5.11 – микробиология), Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, лаборатории туляремии, главный научный сотрудник, г. Ростов-на-Дону.

Заднова Светлана Петровна, доктор биологических наук (специальность 1.5.11 – микробиология), Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб"» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, лаборатории патогенных вибрионов, ведущий научный сотрудник, г. Саратов.

Ведущая организация:

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, г. Ставрополь.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2021 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: Территория «Квартал А», р.п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская обл., 142279

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

и на сайте <https://www.obolensk.org/center/diss/competitor.htm>

Автореферат разослан «_____» _____ 2021 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Сапрофитическая по своей природе бактерия *Burkholderia pseudomallei*, естественной средой обитания которой являются почва и воды стоячих водоемов тропических и субтропических регионов мира, является этиологическим агентом мелиоидоза – тяжелого инфекционного заболевания людей и большинства классов позвоночных животных.

До недавнего времени мелиоидоз во Вьетнаме диагностировался редко, что, в основном, обусловлено общими для эндемичных по мелиоидозу стран факторами. Значительная часть пациентов с мелиоидозом умирают до получения результатов лабораторной диагностики и причиной смерти указывается сепсис, септический шок или бактериемия неясной этиологии [Hinjoy et al., 2018]. Другой общепризнанной проблемой является сложность выделения и идентификации возбудителя. *B. pseudomallei* имеет разнообразную и атипичную для грамотрицательных патогенов морфологию роста на питательных средах и может быть принят за постороннюю микрофлору и отброшен как контаминант [Limmathurotsakul et al., 2010; Hoffmaster et al., 2015]. Также существует проблема, связанная с ошибочной идентификацией *B. pseudomallei* различными биохимическими системами как *B. cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Comamonas testosteroni* и некоторые другие бактерии [Podin et al., 2014; Zakharova et al., 2018]. Причем в случае атипичных региональных штаммов, в частности, чувствительных к гентамицину, процент верно идентифицированных штаммов составляет всего 57% [Podin et al., 2014]. Кроме того, ни одна из существующих коммерческих автоматизированных систем биохимической идентификации не содержит в базе данных филогенетически близкий вид *B. thailandensis*, которая по биохимическим свойствам идентична *B. pseudomallei*, за исключением способности утилизировать арабинозу, вследствие чего ошибочно определяется как возбудитель мелиоидоза.

Степень разработанности темы исследования. В последнее десятилетие проблеме мелиоидоза во Вьетнаме уделяется значительное внимание, что позволило достичь заметного улучшения качества диагностики этой инфекции. Морфологические характеристики *B. pseudomallei* детально описаны для субпопуляции северо-восточного Таиланда [Chantratita et al., 2007], тогда как данные о фенотипических свойствах и генетических особенностях штаммов *B. pseudomallei* во Вьетнаме остаются фрагментарными. В доступной литературе опубликована единственная работа, посвященная фенотипической характеристике вьетнамских штаммов [Phung et al., 1995] и две работы по генотипированию [Phuong et al., 2008; Chewapreecha et al., 2017]. В работе L.V. Phung исследовано 15 штаммов *B. pseudomallei* из северного Вьетнама, показавших типичные для возбудителя мелиоидоза свойства. В работе D. M. Phuong проведено мультилокусное сиквенс-типирование 25 кли-

нических штаммов, выявлено 17 ST, показаны филогенетические связи с изолятами из соседних эндемичных регионов. В исследовании С. Chewapreecha, посвященном определению структуры глобальной популяции *B. pseudomallei* путем филогенетической реконструкции на основании однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), в числе 469 изолятов *B. pseudomallei* из 30 стран определен SNP-профиль и 19 штаммов из Вьетнама. Однако для более полного понимания спектра генетического и фенотипического разнообразия в региональной популяции *B. pseudomallei*, важного для повышения эффективности лабораторной диагностики инфекции, актуально расширение объема исследований как клинических, так и почвенных штаммов возбудителя.

Цель исследования: комплексное изучение диагностически значимых генетических и фенотипических особенностей вьетнамских природных и клинических штаммов *B. pseudomallei*.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ эффективности различных методов пробоподготовки для выделения *B. pseudomallei* из природных и антропогенных экосистем.
2. Создать охарактеризованный набор штаммов *B. pseudomallei* и близкородственных буркхольдерий, выделенных из различных источников.
3. Исследовать вариабельность имеющих диагностическое значение фенотипических свойств вьетнамских природных и клинических штаммов *B. pseudomallei*.
4. Оценить генетическое разнообразие региональной популяции возбудителя мелиоидоза на основании данных мультилокусного сиквенс-типирования.
5. Провести структурный анализ потенциальных детерминант резистентности к аминогликозидам у чувствительных к гентамицину штаммов.
6. Разработать лабораторные протоколы для выявления *B. pseudomallei* молекулярно-генетическими методами.

Научная новизна. Впервые показан широкий диапазон морфологической вариабельности вьетнамских штаммов *B. pseudomallei*: обнаружены морфотипы, не представленные среди основных морфотипов штаммов северо-восточного Таиланда. Впервые у возбудителя мелиоидоза установлено отсутствие единого для популяции доминантного морфотипа. Во Вьетнаме впервые обнаружены редко встречающиеся штаммы *B. pseudomallei* полностью (диаметр зоны задержки роста ($d_{зр}$) 28-30 мм) или частично ($d_{зр}$ 13-14 мм) утратившие диагностически значимый признак резистентности к гентамицину и штаммы *B. thailandensis*, экспрессирующие *B. pseudomallei*-подобный капсульный полисахарид. У чувствительных к гентамицину штаммов впервые обнаружены аминокислотные замены в периплазматическом линкере системы эффлюкса AmrAB-OprA AmrA. Впервые показан потенциал теста на утилизацию малоната, входящего в панель тестов для автоматизиро-

ванного анализа, для дифференциации *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*. Выявлено 18 известных сиквенс-типов (ST 16, ST 41, ST 46, ST 70, ST 85, ST201, ST 351, ST 389, ST 500, ST 507, ST 541, ST549, ST 654, ST 858, ST 948, ST 1051, ST 1566, ST 1567) и 6 новых ST, до настоящего времени нигде более не обнаруженных. Установлена генетическая гетерогенность вьетнамской популяции возбудителя мелиоидоза как между двумя макрорегионами страны, так и внутри каждого из них. Впервые показано, что клональные комплексы, включающие исследованные в настоящей работе штаммы, содержат сиквенс-типы (ST) штаммов всех известных эндемичных по мелиоидозу регионов мира, причем в трех из них ST штаммов из Вьетнама являются комплексообразующими. Впервые во Вьетнаме разработаны собственные генодиагностические средства для выявления и идентификации возбудителя мелиоидоза (аналитическая чувствительность 10^4 и 10^3 м.к./мл, при 100%-ой специфичности для чистых культур).

Теоретическая и практическая значимость. Автором получены экспериментальные данные, подтверждающие гипотезу, что субрегион Меконга (Таиланд, Лаос, Камбоджа и Вьетнам) исторически являлся горячей точкой эволюции *B. pseudomallei* в Юго-Восточной Азии, а также свидетельства эволюционных событий, продолжающихся в популяции вьетнамских штаммов *B. pseudomallei* и в настоящее время («молодые» ST).

Созданный набор клинических и почвенных штаммов возбудителя мелиоидоза и близкородственных буркхольдерий использован в деятельности Референс-центра по мониторингу за возбудителем мелиоидоза ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора для тестирования разработанных экспериментальных серий диагностикума для выявления возбудителей мелиоидоза и сапа в реакции латекс-агглютинации и генодиагностического набора «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB»; добавление расширенного набора штаммов *B. thailandensis*, отсутствующих в коллекциях Российской Федерации, позволяет проводить объективную оценку специфичности разрабатываемых средств выявления возбудителя мелиоидоза (Справка о внедрении прилагается).

Секвенированы, аннотированы и депонированы в GenBank NCBI шотган полногеномные сиквенсы 7 клинических и 6 почвенных штаммов *B. pseudomallei* (QLVC00000000, WOWY00000000, WSPI00000000, WSRT00000000, WSRU00000000, WSRV00000000, WTLF00000000 и QLUX00000000, QLUY00000000, QLVA00000000, QLVB00000000, WUMQ00000000, WUMR00000000) и штамма *B. ceracia* PT02 (QLUZ00000000). В международной базе данных PubMLST размещены аллельные профили 16 штаммов *B. pseudomallei* (id:5262, id:5265, id:5266, id:5267, id:5268, id:5269, id:5270, id:5271, id:5272, id:5273, id:5274, id:5275, id:5260, id:5261, id:5263, id:5264) и одного – *B. ceracia* (id:2680) (международный уровень внедрения). Материалы диссертации использованы при подготовке прак-

тического руководства Лабораторный скрининг и идентификация *Burkholderia pseudomallei*. Под редакцией А. В. Топоркова, А. Н. Кузнецова, Х. Зы Нгуен. – Волгоград: Волга-Пресс, 2018. – 96 с., изданного на русском и вьетнамском языках.

Методология и методы исследования. Методологической основой исследования служили труды ведущих мировых специалистов в области лабораторной диагностики мелиоидоза, биологии его возбудителя, а также международно принятые рекомендации по стратегии отбора проб для изоляции *B. pseudomallei* из почвы. В работе использованы микробиологические, молекулярно-генетические и биоинформатические методы.

Штаммы. В работе исследованы 114 клинических и 27 природных штаммов комплекса «*B. pseudomallei*», выделенные в 9 провинциях центрального и северного Вьетнама в 2015–2020 гг., из коллекции Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра (г. Ханой, СРВ).

Микробиологические методы. Для выделения *B. pseudomallei* почву обрабатывали растворами TBSS-C50, PEG-DOC и дистиллированной водой. Культивирование проводили на триптиказо-соевом агаре (HiMedia, Индия) и агаре Эшдауна при 42°C или 37°C в течение 5-7 суток. Чувствительность к антибактериальным препаратам определяли диско-диффузионным методом. Биохимическое профилирование штаммов проводили на анализаторе VITEK® 2 Compact (bioMérieux, Франция). Показатели критериев диагностической ценности тестов рассчитывали в соответствии с ГОСТ Р 53022.3-2008.

Молекулярно-генетические методы. ДНК выделяли методами протеиназного лизиса [Zakharova et al., 2017] и мембранных колонок (GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Thermo Scientific, Литва). Концентрацию ДНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Штаммы идентифицировали в ПЦР с использованием набора реагентов «АмплигенБуркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL B/D - EPh» (РУ РЗН 2018/7785 от 07.11.2018 г.) (ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией. Секвенирование проводили на платформах IonTorrent (Thermo Fisher Scientific, США), Illumina MiSeq (Illumina Inc., США) и Oxford Nanopore MinION (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания), используя рекомендованные производителями наборы реагентов. Реакцию циклического секвенирования осуществляли с использованием набора Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Учет результатов проводили на анализаторе ABI Prism 3130 (Applied biosystems, США). Сиквенс-типирование проводили по схеме D. Godoy [Godoy et al., 2003] с модификациями E. Price [Price et al., 2016].

Биоинформатические ресурсы и инструменты. Геномы собирали de-novo на ассемблерах SPAdes v. 3.1.0 [Bankevich et al., 2012] и MaSuRCA v. 3.3.2 [Zimin et al., 2013]. Аннотацию осуществляли при помощи сервиса NCBI PGAP v. 4.10 [Tatusova et al., 2016].

Аллели локусов по схеме MLST определяли при помощи инструментария базы данных *Burkholderia pseudomallei* MLST Data bases (<https://pubmlst.org/bpseudomallei/>). Статистический анализ проводили с использованием инструмента «регрессия» Microsoft Excel 2013.

Положения, выносимые на защиту:

1. Оптимальным по соотношению «эффективность / трудоемкость» способом пробоподготовки для выделения *B. pseudomallei* из почвы является метод прямого культивирования.

2. Созданная коллекция клинических и почвенных изолятов *Burkholderia* spp., выделенных в различных регионах страны, обеспечивает представительный набор штаммов для тестирования разрабатываемых средств обнаружения *B. pseudomallei*, а также изучение генетических и фенотипических особенностей вьетнамской популяции возбудителя.

3. Штаммы вьетнамской популяции *B. pseudomallei* обладают расширенным диапазоном варибельности диагностически значимых фенотипических признаков. Фенотипические методы идентификации *B. pseudomallei*, используемые в клинических лабораториях Вьетнама, не обладают достаточной диагностической эффективностью и в большинстве случаев не выявляют атипичные штаммы возбудителя мелиоидоза.

4. Вьетнамские штаммы *B. pseudomallei* обладают высоким уровнем внутривидового полиморфизма консервативных генов – 24 выявленных сиквенс-типа (ST) на глобальной дендрограмме распределены по 14 отдаленным клональным комплексам, включающим ST штаммов всех эндемичных по мелиоидозу регионов мира. Субпопуляции *B. pseudomallei* северного и центрального макрорегионов Вьетнама отличаются по композициям ST при наличии отдельных общих сиквенс-типов (ST 46 и ST 351).

5. У штаммов *B. pseudomallei*, полностью (15QB1) или частично (16QT2 и 16QT3) утративших резистентность к гентамицину, в периплазматическом линкере AmrA эффлюкс-насоса AmrAB-OrfA присутствуют индивидуальные для каждого штамма аминокислотные замены. Репрессор оперона AmrR у штамма 15QB1 имеет неизменную последовательность, у штаммов 16QT2 и 16QT3 присутствует идентичная замена валина на метионин в 222-м положении.

6. Разработаны оригинальные праймеры и технологические процедуры для идентификации *B. pseudomallei* методами ПЦР и петлевой изотермической амплификации (LAMP), выявляющие возбудителя в концентрациях не менее 10^4 и 10^3 м.к./мл, при 100%-ой специфичности для чистых культур; разработанный ПЦР-протокол обладает более высокими показателями критериев диагностической ценности тестов.

Степень достоверности и апробация результатов. Диссертация выполнена в рамках совместной российско-вьетнамской НИР № государственной регистрации АААА-А18-118032790070-8. Достоверность полученных результатов обеспечена анализом достаточно-

го объема фактического материала, полученного с использованием современных научных методов. Полученные в процессе выполнения диссертационной работы научные результаты представлены и обсуждены на восьми всероссийских и международных конференциях: IX-й Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (г. Иркутск, 2017), XI-м съезде Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения» (г. Санкт-Петербург, 2017), II Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (г. Ставрополь, 2017), XIV-й Межгосударственной научно-практической конференции «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ» (г. Саратов, 2018), III-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (г. Ставрополь, 2019), IX-м всемирном конгрессе по мелиоидозу The 9th World Melioidosis Congresses (Hanoi, Vietnam, 2019), Российско-Вьетнамской научно-практической конференции «Актуальные направления и перспективы Российско-Вьетнамского сотрудничества в сфере обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия» (Москва, 2019), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность-2020» (Москва, 2020).

Личное участие автора в получении результатов. Автором совместно с научным руководителем к.б.н., доцентом Захаровой И. Б. разработаны структура и алгоритм выполнения диссертационной работы. Непосредственно автором проведен анализ литературы по проблеме исследования. Вклад автора в получение и обработку экспериментальных данных является основным. Вкладом автора в выполнение раздела 3.7 было выделение и идентификация почвенных штаммов и формирование набора штаммов различных видов рода *Burkholderia* для тестирования диагностикума. Сбор полевого материала, секвенирование нуклеотидных последовательностей проводили совместно с сотрудниками ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Выделение и презумптивную идентификацию клинических штаммов *Burkholderia* spp. проводили сотрудники клинических лабораторий, окончательную идентификацию – непосредственно автор.

Публикации. Основные результаты исследований изложены в 16 опубликованных работах, в том числе 2 – в рецензируемых периодических изданиях, индексируемых WoSCC и SCOPUS, 1 практическом руководстве, 1 коллективной монографии, 2 – в других зарубежных журналах и 10 тезисах в материалах международных и Всероссийских научных конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 126 листах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, методической части, 5 глав экспериментальных исследований, заключения, выводов, перечня сокращений и списка литературы, включающего 122 источника, в том числе 6 на русском языке и 116 на английском. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 27 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Формирование коллекции клинических и почвенных штаммов *Burkholderia* spp.

За период выполнения настоящей работы в Российско-Вьетнамском Тропическом научно-исследовательском и технологическом центре (г. Ханой, СРВ) автором сформирована коллекция штаммов *Burkholderia* spp., включающая 135 штаммов *B. pseudomallei* (114 клинических и 21 почвенный) и 6 штаммов *B. thailandensis*. Клинические штаммы выделены и идентифицированы как *B. pseudomallei* в лабораториях госпиталей 8 провинций Вьетнама в 2015-2020 гг. Почвенные штаммы возбудителя изолированы непосредственно автором в ходе проведения пилотных исследований распространенности возбудителя мелиоидоза в естественных и аграрных биоценозах на территории Вьетнама. Поскольку эффективность выделения возбудителя из почвы напрямую зависит от целого ряда факторов, включающих, в том числе, используемый метод первичной обработки образцов, в процессе выполнения работы проведена сравнительная оценка различных методов пробоподготовки: с применением обработки растворами TBSS-C50, PEG-DOC и метода прямого культивирования. По результатам сравнения методов для дальнейшей работы был выбран оптимальный по соотношению «эффективность – трудоемкость» метод прямого культивирования (Рисунок 1).

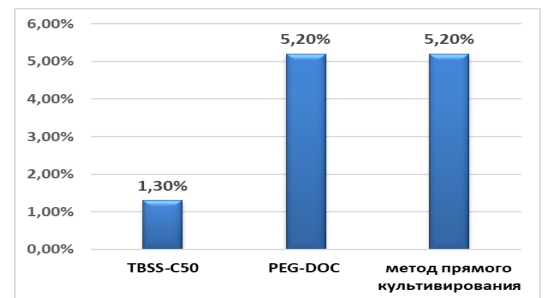


Рисунок 1 – Соотношение долей проб, из которых были выделена *B. pseudomallei*, при пробоподготовке почвы тремя методами

Выделенные в представленной работе почвенные штаммы возбудителя были идентифицированы методом ПЦР с использованием набора реагентов «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL V/D - EPh» для выявления *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* и их дифференциации от видов комплекса «*B. ceracia*» (*Bcc*).

Клинические штаммы *Burkholderia* spp. для формируемой коллекции были выделены и идентифицированы в лабораториях госпиталей методом презумптивной идентификации (описан на стр.14) или с использованием биохимических анализаторов. Однако бактериальные виды в составе комплекса «*B. pseudomallei*» обладают значительным сходством фенотипических признаков, что создает определенные сложности для корректного определения

их видовой принадлежности, а также для дифференциации с филогенетически близкими видами *Bcc*. В настоящее время ни один из коммерческих автоматических биохимических анализаторов не дифференцирует близкородственные виды *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*, которые значительно отличаются по патогенным свойствам. Также неоднократно описаны случаи ошибочной идентификации системой VITEK® 2 GN *B. pseudomallei* как *B. cecropia* [Podin et al., 2014; Zakharova et al., 2018] и *B. cecropia* как *B. pseudomallei* [Kiratisin et al., 2007]. В связи с этим в настоящей работе была проведена верификация видовой принадлежности клинических штаммов методом ПЦР, которая показала, что около 3% штаммов первоначально были определены ошибочно: штамм 18NA19 является *B. thailandensis*, штамм PT02 – *B. cecropia*, штамм 15NA20 не относится к видам, идентифицируемым использованной генодиагностической тест-системой (Рисунок 2).

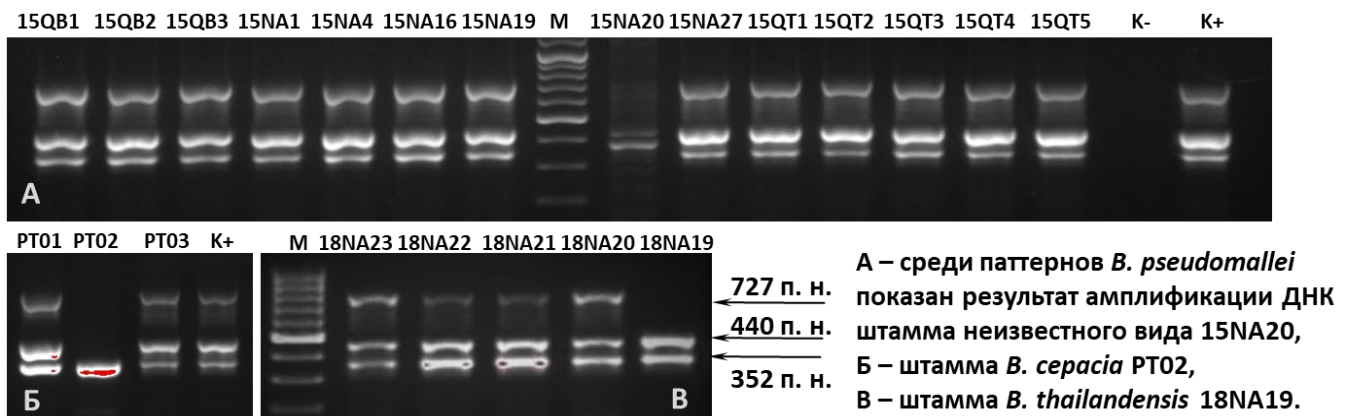


Рисунок 2 – Выборочные результаты идентификации клинических штаммов с использованием набора «Амплиген Буркгольдерии группы «*pseudomallei*» βL B/D - EPh»

Полногеномное или частичное (7 консервативных генов, входящих в схему MLST) секвенирование нуклеотидных последовательностей отдельных штаммов подтвердило определенную в ПЦР видовую принадлежность исследованных изолятов.

На выборке из 103 почвенных штаммов, выделенных из полевого материала в процессе пополнения коллекции, была проведена апробация диагностикума для латекс-агглютинации, разработанного в ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Штаммы параллельно исследовали в реакции латекс-агглютинации (РЛА) и ПЦР. Методом ПЦР было идентифицировано 4 штамма *B. pseudomallei*, 62 – *B. thailandensis*, 23 – *B. cecropia* и 14 штаммов других видов. Все штаммы *B. pseudomallei* в РЛА показали положительный результат на 4 креста, 10 штаммов *B. thailandensis* и один *B. cecropia* – на 3 креста, остальные 88 штаммов показали отрицательные результаты, что позволило разработчикам оценить специфичность разрабатываемого диагностикума на свежесыведенных штаммах различных видов рода *Burkholderia*.

Для исследования влияния методов идентификации на эффективность выявления атипичных штаммов *B. pseudomallei* был проведен сравнительный анализ результатов биохимического профилирования у двух групп штаммов, первоначально идентифицированных с использованием фенотипических методов (группа клинических штаммов, n 30) и в ПЦР (группа почвенных штаммов *B. pseudomallei*, и *B. thailandensis* – по 6 каждого вида). Подавляющее большинство (97%) штаммов первой группы обладали типичным спектром биохимической активности. Во второй группе типичных штаммов *B. pseudomallei* оказалось значительно меньше – 67%. Эффективность биохимической идентификации почвенных буркхольдерий комплекса «*B. pseudomallei*» также оказалась значительно ниже, чем клинических – 42% и 97%, соответственно. Суммарно в обеих группах при проведении биохимического профилирования было получено 7 ложноположительных, 3 ложноотрицательных, 1 истинно отрицательный и 32 истинно положительных результата. Диагностическая эффективность идентификации *B. pseudomallei* с использованием VITEK® 2 составила 79%, предсказательная ценность положительного результата – 82%, предсказательная ценность отрицательного результата – 25%.

В среднем, доля ошибочно определенных системами биохимической идентификации штаммов *B. pseudomallei* составляет приблизительно 14% [Kiratisin et al., 2007; Zakharova et al., 2018], а в случае атипичных, в частности, чувствительных к гентамицину штаммов, доля неверно идентифицированных штаммов возрастает до 43% [Podin et al., 2014]. Кроме того, чувствительные к гентамицину штаммы не учитываются при презумптивной идентификации, как не учитываются штаммы, определенные биохимическими анализаторами некорректно. Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют, что фенотипические методы идентификации, широко используемые в клинических лабораториях Вьетнама потенциально не выявляют до 75% атипичных штаммов возбудителя мелиоидоза. В результате чего в лабораториях госпиталей идентифицированными оказываются преимущественно штаммы, обладающие типичными для вида свойствами, что наблюдали при анализе клинических изолятов.

Все штаммы *B. thailandensis*, выделенные и исследованные в настоящей работе, системой VITEK® 2 GN были определены как *B. pseudomallei*. При проведении анализа профиля биохимической активности было обнаружено, что штаммы *B. thailandensis*, в отличие от штаммов *B. pseudomallei*, способны утилизировать малонат. В доступной литературе эта особенность нигде не описана. До настоящего времени считается, что единственным дифференцирующим эти два близкородственных вида биохимическим признаком является способность *B. thailandensis*, в отличие от *B. pseudomallei*, использовать L-арабинозу в качестве единственного источника углерода. Однако тест на утилизацию арабинозы сложен в испол-

нении и не входит в панель тестов для автоматизированной идентификации. Возможно, в настоящей работе впервые выявлен признак, дифференцирующий *B. thailandensis* и *B. pseudomallei* и входящий в панель тестов для автоматизированного анализа. Для окончательного решения данного вопроса необходимо провести исследование более представительной выборки штаммов *B. thailandensis*.

Для *B. ceracia*, как и других видов одноименного комплекса, характерна значительная фенотипическая изменчивость. Способность к изменению метаболизма и биохимического профиля у одного и того же штамма [Larsen et al., 1993] значительно осложняет надежную биохимическую дифференциацию видов *Bcc* как внутри комплекса, так и с представителями целого ряда других бактерий, включая *B. pseudomallei*.

Штамм PT02, изолированный от пациента с фатальным сепсисом, тестировался дважды, оба раза – в лаборатории госпиталя. Непосредственно после выделения от больного штамм был определен системой VITEK® 2 GN как *B. pseudomallei* с вероятностью 97% при сочетании положительных тестов dCEL (D-целлобиаза), TyrA (тирозионариламидаза) и NAGA (β -N-ацетилгалактозаминидаза). При повторной биохимической идентификации этого же штамма через три месяца после первого тестирования и уже полученных результатов идентификации методом ПЦР система VITEK® 2 GN определила исследуемый изолят как *B. ceracia* с вероятностью 91% и штамм был обозначен как *B. ceracia* PT02. Сравнительный анализ первого и повторного профилей биохимической активности штамма показал изменение первоначально положительных результатов тестов TyrA и NAGA на отрицательные, что подтверждает ранее выявленную ключевую роль комбинации перечисленных признаков для дифференциации этих двух видов буркхольдерий [Zakharova et al., 2018].

В связи с получением дискордантных результатов при идентификации высоковирулентного штамма, ставшего причиной острого фатального сепсиса, было проведено его исследование с применением молекулярно-генетических методов. Секвенирование генома и генотипирование по схеме *Bcc*MLST [Spilker et al., 2009], показало наличие новых аллельных вариантов генов *gltB* и *gyrB*, штамму *B. ceracia* PT02 присвоен id:2680 и сиквенс-тип ST1400, на тот момент не представленный в базе данных PubMLST.

Филогенетический анализ объединенных последовательностей консервативных генов схемы *Bcc*MLST методом максимального правдоподобия 46 штаммов различных видов *Bcc* разместил PT02 на ветви филогенетического дерева среди штаммов *B. ceracia* (bootstrap = 1000). Дополнительно анализ аллельных профилей 2688 штаммов из базы данных *Bcc*MLST по алгоритму eBURST разместил PT02 в клональный комплекс (Кк) штамма *B. ceracia* CVS136, представленный еще 5 клиническими штаммами этого вида (Рисунок 3), что окончательно подтвердило видовую принадлежность штамма PT02.

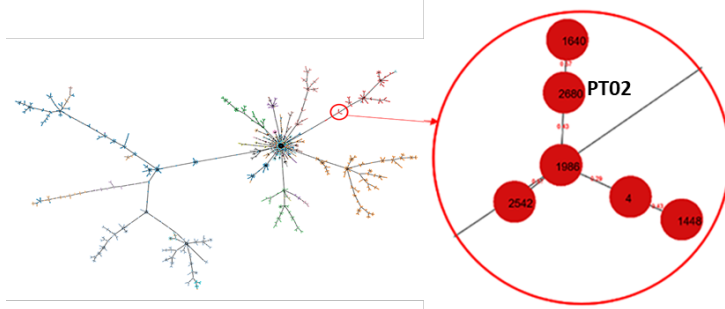
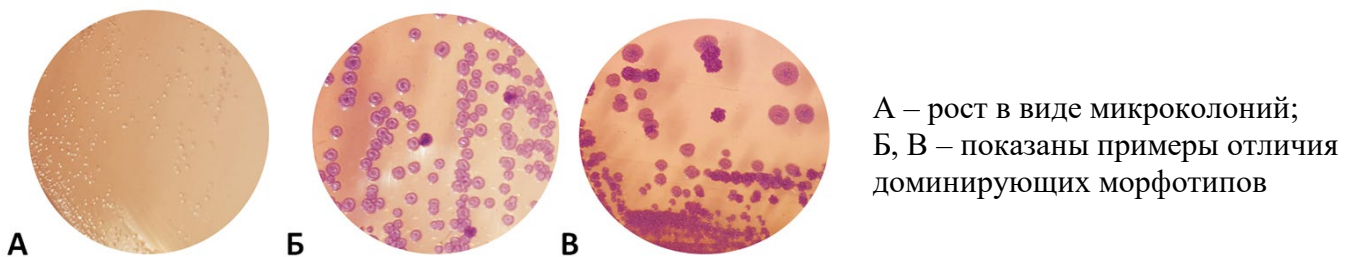


Рисунок 3 – Дендрограмма 2688 штаммов различных видов *Bcc*, построенная по алгоритму eBURST в соответствии с аллельными профилями *Bcc*MLST. Выделен клональный комплекс *B. ceracia* CVS136 (id:1986), включающий штамм *B. ceracia* PT02 (id:2680)

Анализ особенностей фенотипических признаков вьетнамских штаммов *Burkholderia pseudomallei*, имеющих диагностическое значение

У исследованных в настоящей работе штаммов возбудителя мелиоидоза, наряду с общими для всех штаммов *B. pseudomallei* фенотипическими свойствами, отмечено наличие ряда отличительных особенностей. К настоящему времени показано, что клинические штаммы возбудителя мелиоидоза способны образовывать несколько обратимых типов колоний. В частности, тайландские штаммы возбудителя представлены 7 обратимыми морфотипами колоний, при общем для большинства штаммов доминирующем морфотипе I [Chantratita et al., 2007]. Для вьетнамских штаммов такой закономерности обнаружено не было. Более того, 50% штаммов на агаре Эшдауна росли в виде едва заметных микроколоний. Для каждого из штаммов, образовавших колонии обычного размера, также как и для тайландских штаммов, было характерно преобладание одного морфотипа (70–90% колоний), однако у разных штаммов преобладали разные морфотипы (Рисунок 4).



А – рост в виде микроколоний;
Б, В – показаны примеры отличия доминирующих морфотипов

Рисунок 4 – Морфология роста 96-часовых чистых культур клинических штаммов *B. pseudomallei*, выращенных при 37°C на агаре Эшдауна:

Кроме того, обнаружен ряд морфологических вариантов колоний, не представленных среди основных морфотипов штаммов, выделенных в Таиланде, в том числе не описанный ранее морфотип В («пуговицы») (Рисунок 5).

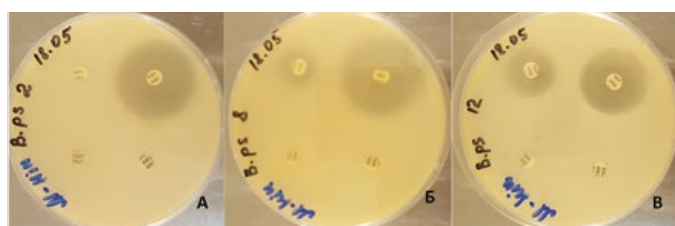
Таким образом, диапазон морфологической варибельности во вьетнамской популяции *B. pseudomallei* значительно шире, чем среди штаммов Таиланда. Полученные данные имеют важное значение для идентификации возбудителя, поскольку морфология колоний является одним из первых критериев отбора подозрительных штаммов для дальнейшего тестирования.

В настоящее время в клинической лабораторной практике Вьетнама широко используется простой в исполнении и не требующий специального оборудования метод презумптивной идентификации возбудителя мелиоидоза, основанный на оценке характера окраски бактериальных клеток по Граму, оксидазной активности и чувствительности к полимиксину, гентамицину, амоксициллину и амоксициллин/клавулонату. Устойчивость к полимикси-



Рисунок 5 – Разнообразие морфотипов вьетнамских штаммов *B. pseudomallei* (96-часовые культуры, выращенные при 37°C на агаре Эшдауна)

ну (Pol) является родовым признаком буркхольдерий; к гентамицину (Gm) большинство штаммов *B. pseudomallei* устойчивы, все штаммы возбудителя устойчивы амоксициллину (АО), но чувствительны к амоксициллин/клавулонату (АОС) [Мелиоидоз и сап. Коллективная монография под ред. А. В. Топоркова, 2016]. К настоящему времени показано, что некоторые штаммы утратили резистентность к гентамицину [Podin et al., 2014], а отдельные штаммы могут приобретать устойчивость к АОС. Около 90% исследованных штаммов показали типичные для возбудителя мелиоидоза свойства в отношении перечисленных выше антибактериальных препаратов. В настоящей работе впервые во Вьетнаме обнаружены штаммы возбудителя полностью (3,2%) или частично (4,8%) утратившие диагностически значимый признак резистентности к гентамицину (Рисунок 6).



А – типичная антибиотикограмма (Gm^R, AOC^S, Pol^R, АО^R);
 Б, В – атипичные антибиотикограммы:
 Б – промежуточная устойчивость к гентамицину,
 В – чувствительность к гентамицину.

Рисунок 6 – Тестирование чувствительности к полимиксину (Pol), гентамицину (Gm), амоксициллину (АО) и амоксициллин/клавулонату (АОС) диско-диффузионным методом

Полученные данные свидетельствуют о поразительно широком диапазоне фенотипической вариабельности вьетнамских штаммов *B. pseudomallei*, включая признаки, имеющие диагностическое значение.

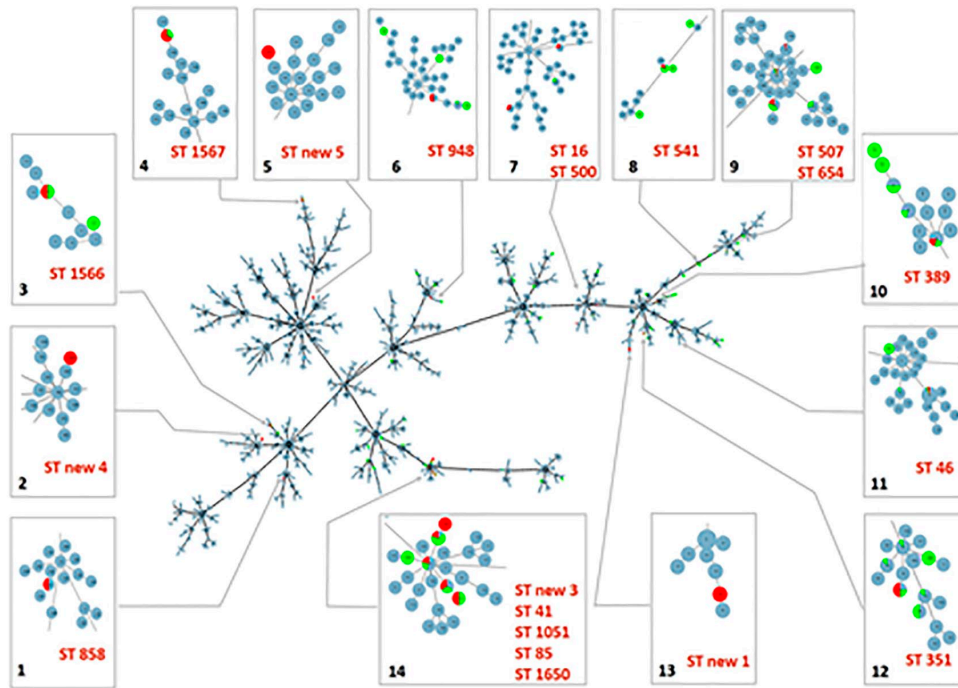
Невысокая диагностическая эффективность (79%) и низкая предсказательная ценность отрицательного результата (25%) фенотипических методов идентификации показывают, что определение видовой принадлежности возбудителя при подозрении на мелиоидоз только с использованием презумптивной идентификации и автоматизированного биохимического профилирования не является однозначным, и требует подтверждения.

Анализ генетического разнообразия штаммов вьетнамской популяции

Burkholderia pseudomallei

Для анализа генетического полиморфизма внутри вьетнамской популяции возбудителя мелиоидоза проведено мультилокусное сиквенс-типирование по схеме WpcMLST [Godoy et al., 2003; Price et al., 2016] 30 клинических и 17 природных изолятов *B. pseudomallei*. Сиквенс-типы (ST) для 16 штаммов были определены по алгоритму амплификации и секвенирования целевых локусов, сиквенс-типы остальных штаммов определены при анализе полногеномных сиквенсов (WGS). Выявлено 24 сиквенс-типа, включая 6 ранее неизвестных. Проведенный филогенетический анализ аллельных профилей исследованных штаммов и штаммов из базы данных PubMLST показал высокий уровень внутривидового полиморфизма консервативных генов среди вьетнамских штаммов возбудителя. Сиквенс-типы исследованных в данной работе штаммов расположены практически на всех крупных ветвях мировой популяционной дендрограммы (Рисунок 7). Клональные комплексы, включающие исследованные штаммы, содержат ST штаммов всех известных эндемичных по мелиоидозу регионов мира. В изученной выборке присутствовали штаммы, ST которых (ST 70, ST 1051 и ST 389) являются комплексообразующими. Кроме того, мы выявили новые, так называемые «молодые» ST, до настоящего времени нигде более не обнаруженные.

Анализ территориальной представленности различных сиквенс-типов у исследованных штаммов показал, что субпопуляция *B. pseudomallei* центрального Вьетнама обладает большим разнообразием комбинаций аллельных вариантов консервативных генов по схеме MLST (у 29 штаммов выявлено 19 ST), по сравнению с северной (18 штаммов – 7 ST) (Рисунок 8), с индивидуальными композициями ST по провинциям. Выявлены отдельные сиквенс-типы, общие для изолятов из центрального и северного макрорегионов (ST 46 и ST 351) (Рисунок 9). Обнаруженная тенденция географической приуроченности ST по макрорегионам страны подтверждена при включении в исследованную выборку 64 вьетнамских штаммов из базы данных PubMLST, количество общих ST возросло до 3 (ST 46, ST 351 и ST541).



Обозначения: ● Узлы ST исследованных штаммов; ST штаммов из базы PubMLST: ● - вьетнамских штаммов ● - прочих штаммов

Рисунок 7 – Популяционная дендрограмма ST штаммов *B. pseudomallei*, представленных в базе данных *Burkholderia pseudomallei* PubMLST, выполненная по алгоритму eBURST.

Полученные данные свидетельствуют о генетической гетерогенности субпопуляций *B. pseudomallei* как между макрорегионами Вьетнама, так и между отдельными провинциями. Что является подтверждением гипотезы С. Chewarreescha, которая на основании масштабного филогенетического анализа SNP полногеномных последовательностей 469 штаммов *B. pseudomallei* различного географического происхождения предположила, что субрегион Меконга (Таиланд, Лаос, Камбоджа и Вьетнам), был горячей точкой для эволюции *B. pseudomallei* в Юго-Восточной Азии [Chewarreescha et al., 2017]. Ограниченное географическое распространение обнаруженных новых ST и терминальная локализация на филогенетических линиях являются свидетельством их недавнего появления и эволюционных событий, продолжающихся во вьетнамской популяции *B. pseudomallei* и в настоящее время.

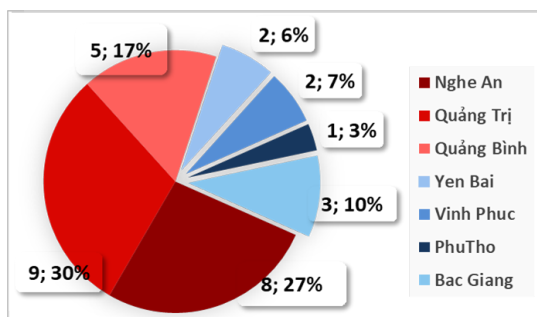


Рисунок 8 – Количество сиквенс типов, представленных в провинциях северного (выделено синим) и центрального (оттенки красного) Вьетнама (значение; доля).

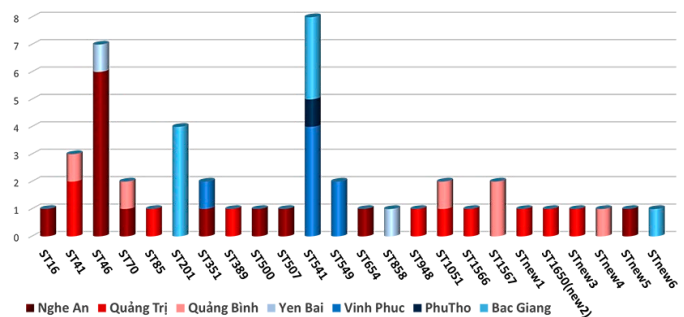


Рисунок 9 – Диаграмма представленности ST клинических и почвенных штаммов *B. pseudomallei* в 7 провинциях Вьетнама.

Поиск и анализ потенциальных детерминант резистентности к аминогликозидам у чувствительных к гентамицину штаммов

У штаммов 15QB1(V1512) ST 70, 16QT2(V1607) ST948 и 16QT3(V1608) ST1566, показавших разный уровень чувствительности к гентамицину обнаружены точечные миссенс мутации в генах трех частично охарактеризованных эффлюкс-насосов семейства RND – AmrAB-OprA, VreAB-OprB и VreEF-OprC и двух с неизвестными функциями, а также гене аминогликозид-6'-N-ацетилтрансферазы AAC(6')-III. Система эффлюкса AmrAB-OprA опосредует устойчивость *B. pseudomallei* к аминогликозидам и макролидам. В описанных ранее случаях чувствительность штаммов к гентамицину авторы связывали с мутациями в гене транспортера AmrB [Podin et al., 2014; Bugrysheva et al., 2017], тогда как у всех исследованных в настоящей работе штаммов изменения в данном гене отсутствовали. У всех трех штаммов присутствовали аминокислотные замены в периплазматическом линкере AmrA – ARG160>SER, Arg116>Gln и Gly237>Arg, Thr317>Lys, соответственно. Поскольку все системы эффлюкса семейства RND функционируют в виде гетеротримера, нарушения последовательности любого из компонентов отражаются на его эффективности, и причиной утраты резистентности к гентамицину у всех трех штаммов, вероятно, являются аминокислотные замены в AmrA. У умеренно чувствительных штаммов 16QT2(V1607) и 16QT3(V1608) обнаружена идентичная замена Val222>Met в репрессоре семейства TetR – AmrR. Известно, что эффлюкс опероны VreAB-OprB и VreEF-OprC экспрессируется у *B. pseudomallei* только в мутантах по регуляторным белкам VreR и VreT, и обеспечивают невысокий уровень резистентности [Bugrysheva et al., 2017]. Возможно, что у исследованных штаммов промежуточный уровень чувствительности к гентамицину опосредован конститутивной экспрессией оперона AmrAB-OprA, что частично компенсирует выявленные структурные дефекты. Также не исключена вероятность участия в утрате резистентности к гентамицину динуклеотидной делеции в гене аминогликозид-6'-N-ацетилтрансферазы AAC(6') – III, а также обнаруженных мутаций у гомологов периплазматического линкера (BPSL2234) неохарактеризованного эффлюкс оперона семейства RND. Выяснение данного вопроса требует проведения отдельного исследования.

Разработка лабораторных протоколов для генодиагностики возбудителя мелиоидоза

В последние годы в мире появляются сообщения об обнаружении штаммов *B. pseudomallei*, устойчивых к нескольким классам антибиотиков, которые обычно эффективны для лечения мелиоидоза, включая β-лактамы, такие как амоксициллин/клавулановая кислота, цефалоспорины (цефтазидим) и карбапенемы [Bugrysheva et al., 2017; Sadiq et al., 2018]. В связи с чем вопрос о ранней диагностике инфекции становится особенно острым и для его решения требуется более широкое внедрение в практику лабораторной диагностики мелиоидоза молекулярно-генетических методов. Во Вьетнаме в настоящее время для ПЦР-

диагностики инфекции используют импортные наборы и одной из задач настоящей работы была разработка и оценка собственных средств генодиагностики мелиоидоза.

В результате проведенного исследования разработано два лабораторных протокола для выявления ДНК *B. pseudomallei*, основанных на детекции видоспецифичной последовательности *orf2* (Protein ID: AAD11413.1) 1-го кластера генов системы секреции третьего типа (Т3SS1) методами LAMP и ПЦР. Созданные к настоящему времени с использованием генов Т3SS1 системы идентификации возбудителя мелиоидоза на основе ПЦР отличаются высокой чувствительностью, однако при исследовании клинического материала и образцов почвы имеют место как ложноотрицательные, так и ложноположительные результаты, среди которых отмечены положительные реакции с *B. thailandensis* и *B. cepacia* [Lowe et al., 2014]. Значительное пополнение в последние годы международных баз данных полногеномными последовательностями штаммов *B. pseudomallei* и близкородственных видов, а также совершенствование алгоритмов поиска специфических праймеров открывают новые возможности для создания генодиагностических систем на основе этой хорошо зарекомендованной генетической мишени. Последовательности разработанных праймеров приведены в Таблице 1. Оптимальной для амплификации продукта ПЦР является температура 56 °С, при которой продукт расчетного размера 353 п.н. образуется наиболее эффективно, без неспецифических фрагментов (Рисунок 10). Для LAMP оптимальным температурно-временным режимом, при котором наблюдали наиболее четкое изменение цвета положительной реакции, подтвержденной визуализацией продуктов амплификации в электрофорезе, установлена инкубация 40 минут при 60 °С (Рисунок 11).

Таблица 1 – Праймеры для выявления *B. pseudomallei* методом ПЦР и LAMP

Праймер	Последовательность (5'-3')
ПЦР	
7F	CTGGGAGAGCGAGATGTTCG
7R	CGTCATCTGTTGCTAGCGGA
LAMP	
F3	CTCTTCCGTTGCTGTGG
B3	CGAAATCGACCAGGGGTATG
F2	CATGCCGAGAACAGCCAT
R2	TCCGTCATTGCTCGATGA
B1c	CCGCTAGCAACAGATGACGCG
F1c	TTGTCAGGCAGTGCCTTGCG
FIP (F1c AT F2)	TTGTCAGGCAGTGCCTTGCGATCATGCCGAGAACAGCCAT
BIP (B1c AT B2)	CCGCTAGCAACAGATGACGCGATTCCGTCATTGCTCGATGA

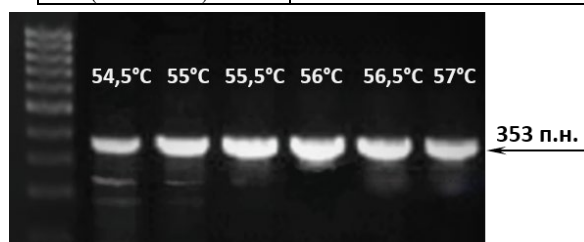


Рисунок 10 – Амплификация с праймерами F7/R7 при различных температурах отжига.

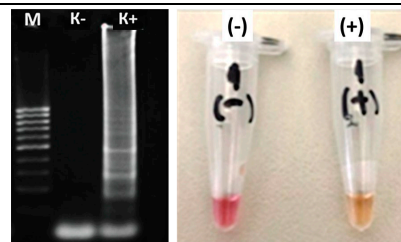


Рисунок 11 – Результаты LAMP после 40 минут инкубации при 60 °С.

Оценка аналитических и диагностических характеристик разработанных протоколов показала, что LAMP является более чувствительным методом (аналитическая чувствитель-

ность LAMP составила 68,8 фг в реакционной смеси, или 1×10^3 м.к./мл, ПЦР – 688 фг в реакционной смеси, или 1×10^4 м.к./мл), при одинаковой 100%-ой специфичности для чистых культур.

Для оценки эффективности выявления ДНК возбудителя мелиоидоза из почвы обоими методами исследовали тотальную ДНК, выделенную непосредственно из проб почвы, отобранных в 2019 г. в провинциях Nghe An и Quang Binh. Образцы для тестирования были выбраны на основании результатов мультиплексной ПЦР с использованием зарегистрированного в РФ набора реагентов «АмплигенБуркхольдерии группы «*pseudomallei*» β L B/D - EPh». Результаты мультиплексной ПЦР в ряде случаев были подтверждены выделением культуры *B. pseudomallei*, в случае отрицательного результата бактериологического метода – секвенированием полученных в контрольной ПЦР строго специфичных *B. pseudomallei* ампликонов (727 п. н.). В исследование были взяты 21 положительная и 4 отрицательных пробы. Полученные результаты представлены на Рисунке 12.

При использовании разработанного протокола LAMP получено 3 ложноположительных и 3 ложноотрицательных результата; в ПЦР наблюдали 6 ложноотрицательных результатов при отсутствии ложноположительных. Предсказательная ценность положительного результата у LAMP и ПЦР составили 86 и 100%, соответственно; отрицательного результата – 25 и 57%; диагностическая эффективность – 76 и 88%.

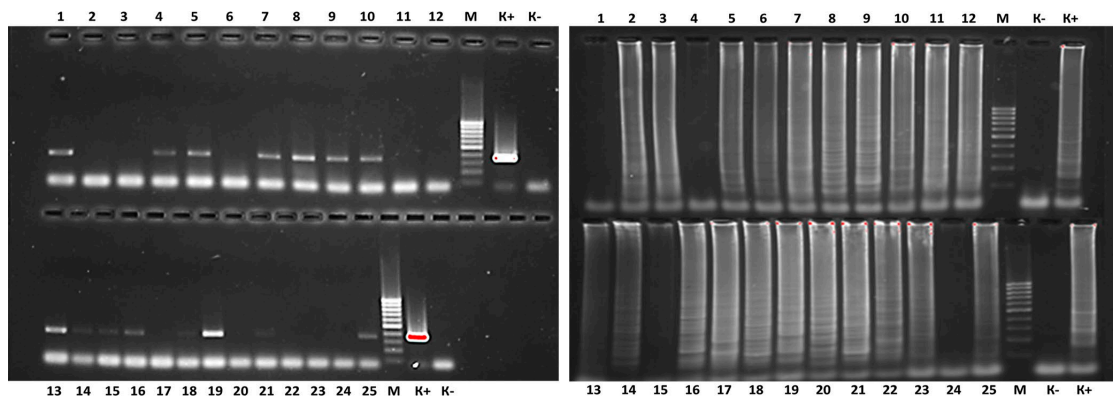


Рисунок 12 – Результаты ПЦР и LAMP с тотальной ДНК образцов почвы

Полученные результаты свидетельствуют о преимуществе разработанного ПЦР-протокола по показателям диагностической ценности, что согласуются с литературными данными по оценке LAMP и ПЦР. Так, N. Chantratita с соавторами при исследовании клинических образцов установили преимущество ПЦР по показателю диагностической специфичности, а LAMP – по чувствительности, причем авторы отметили, что для исследования крови оба метода не обладают достаточной чувствительностью [Chantratita et al., 2008]. По данным российской группы авторов доли истинных результатов при анализе чистых куль-

тур методом LAMP с использованием двух вариантов наборов праймеров составили 73 и 82% [Щит и др., 2018].

Использование LAMP для выявления *B. pseudomallei* имеет существенные ограничения: высокое G+C содержание (около 69%); визуальный учет результата реакции является субъективным; паттерн амплификации при электрофоретической детекции не позволяет дифференцировать истинно положительную реакцию и неспецифическую амплификацию, вследствие чего регистрируются ложноположительные результаты. В связи с вышеизложенным, считаем использование петлевой изотермической амплификации для детекции возбудителя мелиоидоза нецелесообразным.

Проведена независимая апробация разработанного Y. Peng с соавторами [Peng et al., 2019] способа быстрого обнаружения *B. pseudomallei* методом рекомбиназной полимеразной реакции с детекцией в латеральном потке (LF-RPA) на реальных пробах почвы. В LF-RPA и параллельно культуральным методом были исследованы 15 образцов почвы, выделенных в провинциях Vinh Phuc и Thừa Thiên - Huế. Результаты LF-RPA и выделения культуры возбудителя мелиоидоза показали полное совпадение. Пониженная чувствительность реакции LF-RPA к ингибиторам, содержащимся в почве, быстрота и эффективность детекции *B. pseudomallei* непосредственно из образцов почвы без этапа выделения ДНК свидетельствуют о высоком потенциале этого многообещающего инструмента для масштабных скрининговых исследований объектов окружающей среды.

Таким образом, проведенная оценка разработанных способов генодиагностики *B. pseudomallei* показала убедительное преимущество инструмента для детекции и идентификации возбудителя мелиоидоза, основанного на методе ПЦР по сравнению с LAMP, детектирующего ту же генетическую мишень. А независимая оценка LF-RPA подтвердила его практическую ценность.

В заключение необходимо отметить, что хотя в последние годы во Вьетнаме был достигнут значительный прогресс в улучшении лабораторной диагностики мелиоидоза, систематического изучения особенностей региональной популяции *B. pseudomallei* не проводилось. Тогда как известно, что штаммы *B. pseudomallei* различаются в зависимости от региона происхождения, в том числе и по вирулентным свойствам. При выполнении настоящей работы создан и охарактеризован набор клинических и почвенных штаммов возбудителя мелиоидоза и близкородственных буркхольдерий, позволяющий создавать репрезентативные выборки для изучения фенотипических и генотипических особенностей вьетнамской популяции *B. pseudomallei* и впервые представлены результаты комплексного микробиологического и молекулярно-генетического анализа представительного набора клинических и почвенных штаммов, выделенных в провинциях центрального и северного Вьетнама.

ВЫВОДЫ

1. Сравнительный анализ влияния методов пробоподготовки на эффективность выделения *B. pseudomallei* из одной и той же выборки образцов почвы показал наименьшую эффективность метода с применением обработки раствором TBSS-C50 (1,3%), эффективность методов с применением раствора PEG-DOC и дистиллированной воды (прямого культивирования) составила 5,2%; по соотношению «эффективность – трудоемкость» оптимальным является метод прямого культивирования.

2. Сформирована коллекция из 141 клинического и почвенных штаммов возбудителя мелиоидоза и близкородственных бургхольдерий из различных регионов страны, обеспечивающая представительный набор штаммов для тестирования разрабатываемых средств обнаружения *B. pseudomallei*, а также изучение генетических и фенотипических особенностей штаммов вьетнамской популяции возбудителя.

3. Установлено, что штаммы вьетнамской популяции *B. pseudomallei* обладают широкой амплитудой вариабельности фенотипических признаков, имеющих диагностическое значение: обнаружено отсутствие единого для большинства штаммов доминантного морфотипа колоний, впервые описан морфотип В («пуговицы»), не представленный среди основных морфотипов тайландских штаммов, обнаружены штаммы полностью (3,2%) или частично (4,8%) утратившие диагностически значимый признак резистентности к гентамицину (диаметр зоны задержки роста 28-30 мм и 13-14 мм, соответственно).

4. Фенотипические методы идентификации *B. pseudomallei*, широко используемые в клинических лабораториях Вьетнама, имеют предсказательную ценность отрицательного результата не выше 25% и потенциально не выявляют до 75% атипичных штаммов возбудителя мелиоидоза. При верификации видовой принадлежности клинических штаммов генодиагностическими методами установлено, что 3 % штаммов, идентифицированных в лабораториях госпиталей как *B. pseudomallei*, были определены ошибочно (*B. thailandensis* 18NA19, *B. serapia* PT02 и 15NA20).

5. Показано, что вьетнамские штаммы *B. pseudomallei* обладают высоким уровнем внутривидового полиморфизма консервативных генов, входящих в схему мультилокусного сиквенс-типирования. У 47 исследованных штаммов выявлено 18 известных сиквенс-типов (ST 16, ST 41, ST 46, ST 70, ST 85, ST201, ST 351, ST 389, ST 500, ST 507, ST 541, ST549, ST 654, ST 858, ST 948, ST 1051, ST 1566, ST 1567) и 6 новых ST. Сиквенс-типы вьетнамских штаммов возбудителя мелиоидоза распределены по 14 отдаленным клональным комплексам, включающим ST штаммов всех известных эндемичных по мелиоидозу регионов мира.

6. Анализ территориальной представленности различных сиквенс-типов у исследованных штаммов показал, что субпопуляция *B. pseudomallei* центрального Вьетнама обладает большим разнообразием комбинаций аллельных вариантов консервативных генов по

схеме MLST (у 29 штаммов выявлено 19 ST), по сравнению с северной (18 штаммов – 7 ST), с индивидуальными композициями ST по провинциям. Выявлены отдельные сиквенс-типы, общие для изолятов из центрального и северного макрорегионов (ST 46 и ST 351). Обнаруженная тенденция географической приуроченности ST по макрорегионам страны подтверждена при дополнении исследованной выборки 64 штаммами из базы данных PubMLST.

7. У штаммов *B. pseudomallei*, полностью (15QB1) или частично (16QT2 и 16QT3) утративших резистентность к гентамицину, обнаружены аминокислотные замены в периплазматическом линкере AmrA эффлюкс-насоса AmrAB-OprA – ARG160SER, Arg116Gln и Gly237Arg, Thr317Lys, соответственно. У умеренно чувствительных штаммов в репрессоре AmrR семейства TetR присутствует идентичная замена Val222Met.

8. Установлено, что разработанные оригинальные праймеры и технологические процедуры для идентификации *B. pseudomallei* методами ПЦР и LAMP обладают 100%-ой специфичностью для чистых культур при аналитической чувствительности 10^4 и 10^3 м.к./мл. При этом разработанный ПЦР-протокол обладает более высокими показателями диагностической ценности: предсказательная ценность положительного результата у LAMP и ПЦР составили 86 и 100%, отрицательного результата – 25 и 57%; диагностическая эффективность – 76 и 88%, что свидетельствует о преимуществе инструмента для детекции и идентификации возбудителя мелиоидоза, основанного на методе ПЦР.

Рекомендации по использованию результатов диссертационного исследования

1. При проведении презумптивной идентификации *B. pseudomallei* рекомендуется учитывать вариабельность признака устойчивости к гентамицину.

2. Созданная коллекция буркхольдерий комплекса «*B. pseudomallei*» может быть использована при разработке средств диагностики мелиоидоза.

3. Полученные данные о географической приуроченности ST *B. pseudomallei* по макрорегионам страны могут быть полезны при изучении различных аспектов эпидемиологии мелиоидоза.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в реферируемых научных журналах

1. **Bui, L.A.T.** The Complexity of the identification of *Burkholderia cepacia* strain which caused septicemia / **L.A.T. Bui**, I. Zakharova, I. Shpak, N. Teteryatnikova, D. Ustinov, Y. Kuzyutina, H.N. Nguyen, D. Viktorov // *Jundishapur Journal of Microbiology*. – 2018. – Vol. 11, N 11. – P. e82834. – DOI: 10.5812/jjm.82834. (**WoSCC, WoS и SCOPUS**)

2. Фролов, Д.М. Разработка теста латекс-агглютинации для выявления патогенных буркхольдерий и его апробация в эндемичных регионах Вьетнама /Д.М Фролов, Н.Н. Тетерятникова, **T.L.A. Bui**, И.Б. Захарова, Н.П. Храпова // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2020. – №4. – С.133-138. (**SCOPUS**)

Монографии и практические руководства

3. Захарова, И.Б. Лабораторный скрининг и идентификация *Burkholderia pseudomallei*: практическое руководство / И.Б. Захарова, И.М. Шпак, Н.Н. Тетерятникова, Ю.А. Кузютина, Г.А. Ткаченко, Л.В. Лемасова, Д.В. Викторов, **Т.Л. Ань Буй**, В. Кыонг Во, К. Шау Чинь; под ред. А.В. Топркова, А.Н. Кузнецова, Х. Зы Нгуен.– Волгоград: Волга-Пресс, 2018. – 96с.

4. Захарова, И.Б. Мелиоидоз во Вьетнаме. Актуальные вопросы мониторинга *Burkholderia pseudomallei*/ И.Б. Захарова, **Т.Л.А. Вуй**, И.М. Шпак, Н.Н. Тетерятникова, Ю.А. Кузютина и др.// В кн.: Актуальные направления и перспективы Российско-Вьетнамского сотрудничества в сфере обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия. Ред: Попова А.Ю., Топорков А.В. Волгоград: ООО «Издательство «Волга-Пресс», 2019. – С. 70–94. ISBN978-5-9908533-6-2

Статьи в других научных изданиях

5. **Bùi, T. L. A.** Evaluation of PCR and LAMP techniques for detection of *Burkholderia pseudomallei*/ **T. L. A. Bùi**, T. H. G. Phạm, T. L. A. Lê, V. C. Võ, Phạm V. H., A. T. Quê, I. Zakharova, D. Viktorov// Vietnam Journal of Preventive Medicine. – 2020. – V.30, 3. – P.55-60

6. Zakharova, I. Can Frozen *Burkholderia pseudomallei* Come Back to Life? / I. Zakharova, P. Chirskov, Ya. Lopasteyskaya, **T.L.A. Bui**, A. Toporkov, D. Viktorov// *EC Microbiology*. 2021– V.17, N4. – p. 58-63.

Тезисы научных конференций

7. Zakharova, I. *Burkholderia pseudomallei* survives after freezing/ I. Zakharova, Ya. Lopasteyskaya, P. Chirskov, **L. A. T. Bui**, A. Toporkov, D. Viktorov// The 9th World Melioidosis Congress (WMC), Hanoi, Vietnam. Abstract book. – 2019. – P. 130

8. Zakharova, I. Genetic and morphological diversity of *Burkholderia pseudomallei* in northern Central Vietnam/ I. Zakharova, **L. A. T. Bui**, I. Shpak, N. Teteryatnikova et al. // The 9th World Melioidosis Congress (WMC), Hanoi, Vietnam. Abstract book. – 2019. – P. 187.

9. Vasilyeva, K. The variability of a gene composition of capsular polysaccharide biosynthesis cluster in *Burkholderia thailandensis*/ K. Vasilyeva, N. Teteryatnikova, Yu. Kuzyutina, **L. A. T. Bui**, et al. // The 9th World Melioidosis Congress (WMC), Hanoi, Vietnam. Abstract book. – 2019. – P. 186

10. Лопастейская, Я.А. Влияние биохимической вариабельности у изогенных морфотипов колоний *B. pseudomallei* на достоверность биохимической идентификации / Я.А. Лопастейская, **Т.Л.А. Буй**, И.Б. Захарова, Д.В. Викторов // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: Материалы III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (24-25 апреля 2019 г., Ставрополь).- 2019. - С. 175-176.

11. **Буй, Т.Л.А.** Идентификация штамма *Burkholderia* spp., выделенного от больной с предварительным диагнозом «мелиоидоз» / **Т.Л.А. Буй**, И.Б. Захарова, И.М. Шпак, Н.Н. Тетерятникова, Д.В. Устинов, Ю.А. Кузютина, Н.Х. Нгуен, Д.В. Виктор // Материалы XIV Межгосударственной научно-практической конференции «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ», г. Саратов. – 2018. – С. 65-68.

12. **Буй, Т.Л.А.** Особенности биохимической идентификации клинических штаммов *Burkholderia pseudomallei*, выделенных во Вьетнаме / **Т.Л.А. Буй**, Я.А. Лопастейская, Т.Н. Нго, Ю.А. Кузютина, И.Б. Захарова // Инфекция и иммунитет. –2017. – №5. – С. 907.

13. Тетерятникова, Н.Н. Идентификация штаммов *Burkholderia* spp., выделенных в провинциях центрального Вьетнама, методом мультиплексной ПЦР / Н.Н. Тетерятникова, **Т.Л.А. Буй**, И.Б. Захарова, Т.Н. Нго, Ю.А. Кузютина, Д.В. Виктор // Инфекция и иммунитет. –2017. – №5. – С. 907.

14. Антонов, А.С. Мультилокусное сиквенс-типирование изолятов *Burkholderia pseudomallei*, выделенных на территории Вьетнама / А.С. Антонов, Д.В. Устинов, **Т.Л.А. Вуй**, Н.Н. Тетерятникова, Т.Н. Ngo, И.М. Шпак, И.Б. Захарова // Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены», г. Иркутск. – 2017. – С. 18-19.

15. Тетерятникова, Н.Н. Оценка эффективности метода детекции и дифференциации четырех видов *Burkholderia* spp., основанного на определении набора генов β -лактамаз молекулярных классов В и D в формате мультиплексной ПЦР / Н.Н. Тетерятникова, И.Б. Захарова, **Т.Л.А. Вуй**, Т.Н. Ngo, Н.Г. Плеханова, Д.В. Виктор //

16. Устинов, Д.В. Высокопроизводительное секвенирование штамма *Burkholderia thailandensis*, выделенного на территории Вьетнама в 2016 году / Д.В. Устинов, А.С. Антонов, **Т.Л.А. Вуй**, Н.Н. Тетерятникова, Т.Н. Ngo, И.М. Шпак, И.Б. Захарова // Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены», г. Иркутск. – 2017. – С. 144.