

ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЁННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
«ВОЛГОГРАДСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ  
ИНСТИТУТ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ  
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

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

Диссертация

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,

доцент И. Б. Захарова

Волгоград – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Систематическое положение возбудителя мелиоидоза и краткая характеристика видов комплекса « <i>Burkholderia pseudomallei</i> ».....	14
1.2 Общая характеристика <i>Burkholderia pseudomallei</i> .....	15
1.3 Эпидемиология и глобальное распространение мелиоидоза.....	17
1.4 Мелиоидоз во Вьетнаме.....	19
1.5 Методы лабораторной диагностики мелиоидоза.....	21
1.5.1 Бактериологический.....	21
1.5.2 Применение молекулярно-генетических методов для детекции и идентификации возбудителя мелиоидоза.....	23
1.6 Генетическое разнообразие и методы генотипирования <i>Burkholderia pseudomallei</i> .....	27
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	32
2.1 Штаммы.....	32
2.2 Питательные среды и условия культивирования.....	35
2.3 Методы обработки проб почвы.....	35
2.3.1 Обработка с применением TBSS-C50.....	35
2.3.2 Обработка с применением PEG-DOC.....	37
2.3.3 Метод прямого культивирования.....	37
2.4 Определение чувствительности к антибактериальным препаратам методом дисков.....	38
2.5 Выделение ДНК.....	39
2.5.1 Метод мембранных колонок на основе диоксида кремния.....	39
2.5.2 Выделение ДНК методом протеиназного лизиса.....	39
2.6 Определение концентрации ДНК.....	39
2.7 Идентификация культур методом ПЦР и анализ продуктов амплификации.....	40
2.8 Идентификация <i>Burkholderia</i> spp. по профилю биохимической активности.....	40

2.9 Секвенирование и сборка генома.....	41
2.10 Мультилокусное сиквенс-типирование .....	41
2.11 Биоинформационные ресурсы и инструменты, использованные для конструирования праймеров.....	42
2.12 Параметры амплификации с дизайнерскими праймерами и визуализация продуктов.....	42
2.13 Рекомбиназная полимеразная амплификация .....	43
2.14 Расчет показателей критериев диагностической ценности тестов и статистический анализ .....	43
ГЛАВА 3 ФОРМИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ КЛИНИЧЕСКИХ И ПОЧВЕННЫХ ШТАММОВ <i>Burkholderia</i> spp. ....	44
3.1 Сравнительный анализ эффективности методов пробоподготовки для выделения <i>Burkholderia pseudomallei</i> из объектов окружающей среды ....	44
3.2 Формирование коллекции штаммов <i>Burkholderia</i> spp. ....	45
3.3 Идентификация штаммов <i>Burkholderia</i> spp. молекулярно-генетическими методами.....	46
3.4 Использование коллекции <i>Burkholderia</i> spp. для тестирования экспериментальных серий набора для проведения латекс-агглютинации.....	48
3.5 Оценка влияния методов идентификации на эффективность выявления <i>Burkholderia pseudomallei</i> .....	49
3.6 Особенности биохимических профилей штаммов <i>Burkholderia</i> spp., идентифицированных ВИТЕК® 2 некорректно .....	52
3.7 Типирование штамма <i>Burkholderia cepacia</i> PT02.....	53
4.1 Анализ морфологической изменчивости .....	56
4.2 Анализ чувствительности клинических штаммов <i>Burkholderia pseudomallei</i> к антибиотикам, имеющим диагностическое значение .....	59
ГЛАВА 5 АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ШТАММОВ ВЬЕТНАМСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ <i>BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI</i> .....	63
5.1 Мультилокусное сиквенс-типирование.....	63
5.2 Филогенетический анализ.....	65
ГЛАВА 6 ПОИСК И АНАЛИЗ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДЕТЕРМИНАНТ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АМИНОГЛИКОЗИДАМ У ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К ГЕНТАМИЦИНУ ШТАММОВ.....	74

ГЛАВА 7 РАЗРАБОТКА ЛАБОРАТОРНЫХ ПРОТОКОЛОВ ДЛЯ ГЕНОДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА.....	81
7.1 Разработка протокола для выявления ДНК <i>Burkholderia pseudomallei</i> методом ПЦР.....	81
7.1.1 Дизайн праймеров и оптимизация параметров ПЦР.....	81
7.1.2 Определение чувствительности и специфичности ПЦР.....	83
7.2 Разработка протокола для выявления ДНК <i>Burkholderia pseudomallei</i> методом LAMP.....	85
7.2.1 Дизайн праймеров и оптимизация параметров LAMP.....	85
7.2.2 Определение чувствительности и протокола LAMP .....	86
7.3 Сравнение разработанных протоколов ПЦР и LAMP по эффективности выявления ДНК возбудителя мелиоидоза из почвы.....	88
7.4 Апробация метода рекомбиназной полимеразной реакции с детекцией в латеральном потоке (LF-RPA) для ускоренного обнаружения <i>Burkholderia pseudomallei</i> в пробах почвы.....	91
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	94
ВЫВОДЫ.....	106
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	110
БЛАГОДАРНОСТИ .....	126

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования и степень разработанности проблемы**

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

Инфекция была впервые описана в 1911 г. А. Whitmore и С. S. Krishnaswami в Рангуне [Whitmore and Krishnaswami, 1912]. При вскрытии трупов наркоманов они наблюдали схожую с сапом патоморфологическую картину. Годом позже в обзоре, посвященном столетию *Journal of Hygiene*, Whitmore описал патологические особенности заболевания и характеристику его возбудителя [Whitmore, 1913]. Вскоре аналогичная инфекция была выявлена А. Т. Stanton и W. Fletcher в Малайских Федеративных Штатах при выяснении этиологии вспышки среди лабораторных животных, они же позже диагностировали это заболевание у людей и диких животных и предложили термин «мелиоидоз» – болезнь, подобная сапу [Stanton and Fletcher, 1921].

Клинические проявления мелиоидоза разнообразны, наиболее часто встречаются острая или хроническая пневмония с бактериемией или без, возможен тяжелый системный сепсис, независимо от клинической формы для мелиоидоза характерны множественные абсцессы внутренних органов. Средние показатели летальности при мелиоидозе составляют около 50%, при септическом шоке – более 90% [Currie and Kaestli, 2016].

Исторически Вьетнам был одной из первых стран, в которой описали мелиоидоз. Спорадические случаи мелиоидоза во Вьетнаме фиксируются в течение многих десятилетий. Первое лабораторное подтверждение случая заболевания мелиоидозом в Южном Вьетнаме было дано R. Pons и M. Advier в институте Пастера (г. Сайгон) в 1925 году [Pons and Advier, 1925]. В последующие годы был

зарегистрирован ряд случаев заболевания в Тонкине и Кохинхине (северные провинции и дельта Меконга современного Вьетнама).

Несмотря на более, чем 100-летнюю историю изучения мелиоидоза, информированность об этой опасной инфекции в мире, включая большинство эндемичных стран, продолжает оставаться невысокой как среди медицинских работников, так и среди населения. Одним из важных факторов, определяющих низкую осведомленность об этой болезни, является то, что значительная часть пациентов с мелиоидозом умирают до получения результатов лабораторной диагностики и, как следствие, причиной смерти указывается сепсис, септический шок или бактериемия неясной этиологии [Hinjoy et al., 2018]. Другим важным фактором является проблема неправильной идентификации *B. pseudomallei* [Hoffmaster et al., 2015]. При определении видовой принадлежности с использованием биохимических анализаторов около 20% штаммов *B. pseudomallei* идентифицируются как виды комплекса *B. cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa* и ряд других [Zakharova et al., 2018]. 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 определяется как возбудитель мелиоидоза.

Данные прогностического анализа глобального присутствия *B. pseudomallei* в окружающей среде свидетельствуют, что природные условия преобладающей части Вьетнама являются оптимальными для сапрофитического существования возбудителя [Limmathurotsakul et al., 2016] и присутствие *B. pseudomallei* в различных экосистемах Вьетнама показано достаточно давно [Vaucel, 1937; Chambon, 1955]. Географически Вьетнам расположен на стыке нескольких природных зон, что определяет разнообразие рельефа и климатических условий и, соответственно, множество ландшафтно-климатических зон: тропические дождевые и сухие леса, естественные луга, реки, озера и прибрежные водно-болотные угодья. Это предполагает неравномерное территориальное

распределение возбудителя, но, к настоящему времени потенциал различных естественных экотопов как экологических резервуаров *B. pseudomallei* во Вьетнаме практически не изучен. Судя по опубликованным в литературе данным, систематического изучения данной проблемы не проводилось, при том, что именно во Вьетнаме были получены первые данные о сапрофитной природе *B. pseudomallei* [Vaucel, 1937; Chambon, 1955; Luong N.B. and Kim N.T., 1961]. В доступной литературе нами было обнаружено всего три исследования по ограниченному поиску возбудителя мелиоидоза преимущественно на рисовых полях [Van Phung et al., 1993; Parry et al., 1999; Phuong et al., 2008].

До недавнего времени мелиоидоз во Вьетнаме диагностировался редко. За период 1992–1998 гг. было зарегистрировано 9 случаев заболевания [Parry et al., 1999] и 54 случая – за период 1997-2005 гг., наиболее распространенной формой заболевания являлась фатальная септицемия [Phuong et al., 2008]. Обучение специалистов и введение в практику простого в использовании алгоритма презумптивной идентификации *B. pseudomallei* позволило достичь заметного улучшения диагностики мелиоидоза в стране [Trinh et al., 2017].

Опубликованные результаты исследования ограниченного количества вьетнамских клинических (n 10) и почвенных (n 5) штаммов возбудителя мелиоидоза показали межштаммовые отличия в биохимических профилях и морфологических характеристиках возбудителя вне зависимости от источника выделения штаммов [Phung et al., 1995]. Проведенное мультилокусное секвенирование 25 клинических изолятов *B. pseudomallei* показало наличие генетической гетерогенности среди исследованных вьетнамских штаммов [Phuong et al., 2008], что позднее было подтверждено с использованием полногеномного секвенирования 19 вьетнамских штаммов в рамках проекта по изучению эволюции и филогенетических связей в глобальной популяции возбудителя [Chewapreecha et al., 2017]. Однако для понимания спектра генетического и фенотипического разнообразия региональных штаммов *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*. В отличие от штаммов северо-восточного Таиланда, вьетнамские изоляты *B. pseudomallei* не имеют единого доминантного морфотипа и у разных штаммов доминируют разные морфологические варианты колоний. Обнаружены морфотипы, не представленные среди основных морфотипов штаммов северо-восточного Таиланда. В результате проведенных исследований во Вьетнаме впервые обнаружены редко встречающиеся штаммы *B. pseudomallei* полностью или умеренно чувствительные 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 автоматизированного анализа, для дифференциации *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*. 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. Выявлено 6 новых, так называемых «молодых» ST, до настоящего времени нигде более не обнаруженных и имеющих терминальную локализацию на филогенетических линиях. Впервые во Вьетнаме разработаны собственные генодиагностические тест-системы для выявления и идентификации возбудителя мелиоидоза.

**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 был 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 препарата «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB», использование 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. sepracia* 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. sepracia* (id:2680) (международный уровень внедрения).

Материалы диссертации были использованы при подготовке практического 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. Работу проводили по следующему алгоритму: отбор проб внешней среды, сравнительная оценка различных методов пробоподготовки на ограниченном количестве проб, далее использование единого оптимального протокола обработки почвы для выделения культур возбудителя мелиоидоза, отбор подозрительных культур и их идентификация, анализ фенотипических и генотипических особенностей почвенных и клинических штаммов. В работе были использованы микробиологические и молекулярно-генетические методы исследования.

### **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 аллельного полиморфизма и фенотипических особенностей штаммов вьетнамской популяции возбудителя.

3. Штаммы вьетнамской популяции *B. pseudomallei* обладают расширенным диапазоном вариабельности 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-OrpA 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 концентрации 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.** Достоверность полученных результатов основана на анализе большого фактического материала, полученного с использованием современных научных методов.

Диссертация выполнена в рамках совместной российско-вьетнамской НИР № государственной регистрации АААА-А18-118032790070-8.

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.

Полученные в процессе выполнения диссертационной работы научные результаты были представлены и обсуждены на восьми всероссийских и международных конференциях: на 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 9<sup>th</sup> 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 интернет-конференции с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность-2020» (Москва, 2020).

**Личный вклад автора в исследования.** Автором совместно с научным руководителем к.б.н., доцентом Захаровой И. Б. разработаны алгоритм выполнения и структура диссертационной работы. Непосредственно автором был 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 изолятов *Burkholderia* spp. для тестирования диагностикума. Сбор и обработку полевого материала проводили совместно с сотрудниками ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Секвенирование полногеномных нуклеотидных последовательностей возбудителя мелиоидоза и филогенетически близких буркхольдерий осуществляли при участии сотрудников сектора биоинформационного анализа ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Выделение и презумптивная идентификация клинических штаммов *Burkholderia* spp. проводилась сотрудниками клинических лабораторий госпиталей в провинциях Вьетнама, окончательная идентификация всех штаммов, вошедших в коллекцию – непосредственно автором.

**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.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Систематическое положение возбудителя мелиоидоза и краткая характеристика видов комплекса «*Burkholderia pseudomallei*»

Род *Burkholderia* принадлежит к семейству *Burkholderiaceae*, порядка *Burkholderiales*, класса *Betaproteobacteria* и был образован в 1992 г. [Yabuuchi et al., 1992]. Первоначально в состав вновь образованного рода вошли 7 видов II группы рРНК-ДНК гомологии рода *Pseudomonas* [Palleroni, 1984]. В настоящее время род состоит из трех групп: комплексы «*B. ceracia*», «*B. pseudomallei*» и группа «*B. gladioli*».

Комплекс «*B. pseudomallei*» включает виды *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. oklahomensis*, *B. humptydoensis* и три отдельные клады, пока не имеющие видового статуса [Price et al., 2016].

*B. mallei* и *B. pseudomallei* – близкородственные виды, высокопатогенные для человека и животных. При этом *B. mallei* (возбудитель сапа) является облигатным патогеном, неспособным размножаться во внешней среде, а *B. pseudomallei* – сапрофитическая бактерия, обитающая в широком диапазоне экологических ниш. *B. thailandensis* до выделения ее в 1998 г. в самостоятельный вид считали авирулентным  $\text{Ara}^+$  биотипом *B. pseudomallei* [Brett et al., 1998]. Первый изолят *B. oklahomensis* был выделен из инфицированной раны фермера в штате Оклахома в США и был идентифицирован как возбудитель мелиоидоза. Позже были выделены идентичные штаммы из почвы и расширенный анализ показал, что они принадлежат к отдельному виду [Glass et al., 2006]. *B. humptydoensis* впервые выделена из почвы в Австралии в местности Humpty Doo [Price et al., 2016; Tuanyok et al., 2016]. Перечисленные виды схожи по фенотипу, биохимическим свойствам, генотипам, но отличаются по спектру факторов вирулентности, что является причиной их сниженной, по сравнению с возбудителями мелиоидоза и сапа, патогенности для человека и животных [Thibault et al., 2004]. *B. thailandensis* и, в

меньшей степени, *B. oklahomensis* способны вызывать у человека инфекции различной степени тяжести; заболеваний, обусловленных *B. humptydooensis*, пока не описано.

## 1.2 Общая характеристика *Burkholderia pseudomallei*

*B. pseudomallei* – грамотрицательная палочка с биполярным окрашиванием, подвижна за счет наличия нескольких жгутиков (лофотрих), спор не образует, имеет полисахаридную капсулу. Биполярность может быть не выражена у клеток из молодых культур, или культур, выращенных при дефиците питательных веществ. В мазках непосредственно из клинического материала форма клеток может варьировать от коккобацилл до нитевидных форм. Является облигатным аэробом, но способна расти в анаэробных условиях в присутствии нитратов.

*B. pseudomallei* устойчив к полимиксину и, как правило, гентамицину (при тестировании диско-диффузионным методом зона ингибирования роста отсутствует) и чувствителен к амоксициллину/клавуланату (диаметр зоны  $\geq 18$  мм). Устойчивость к гентамицину долгое время считалась одним из видовых признаков, однако, в последние годы показано, что резистентность к гентамицину присуща не всем штаммам возбудителя мелиоидоза и в отдельных местных популяциях возбудителя гентамицин-чувствительные штаммы составляют до 80% [Podin et al., 2014].

Для *B. pseudomallei* характерна так называемая I-диссоциация – присутствие на одной чашке разных морфотипов колоний. Феномен морфологической диссоциации колоний у возбудителя мелиоидоза описан L. Nicholls еще в первой трети прошлого века [Nicholls, 1930]. Некоторые клинические штаммы, особенно выделенные из мокроты, демонстрировали значительные колониальные вариации, создавая впечатление смешанной культуры, однако все типы колоний имели типичный биохимический профиль возбудителя мелиоидоза.

На среде Эшдауна [Ashdown, 1979], содержащей кристалл-виолет и нейтральный красный, возбудитель мелиоидоза формирует морфологические варианты колоний разных оттенков фиолетового цвета с преобладанием гладких форм в начальной фазе инкубации, при старении культуры переходящих в сухие и морщинистые колонии с зоной просветления агара вокруг. Все морфотипы колоний имеют металлический блеск разной интенсивности, колонии могут быть гладкие и блестящие, обычно округлые с ровным краем или сухие с различными оттенками фиолетового, розового или красного цветов, имеющие причудливые формы, иногда формируются мукоидные колонии. Отдельные штаммы возбудителя на агаре Эшдауна могут образовывать медленно растущие микроколонии (менее 0,5 мм в диаметре).

Способность *B. pseudomallei* образовывать несколько обратимых типов колоний связывают с адаптацией возбудителя к неблагоприятным условиям окружающей среды, в числе которых ограничение железа, дефицит кислорода, кислая среда, а также воздействие антибиотиков [Tandhavanant et al., 2010; Chantratita et al., 2011]. Для клинических штаммов северо-восточного Таиланда показано существование, по меньшей мере, 7 морфотипов колоний, при этом доминирующим в популяции является морфотип I, к которому относится 75,1% штаммов (Рисунок 1) [Chantratita et al., 2007].

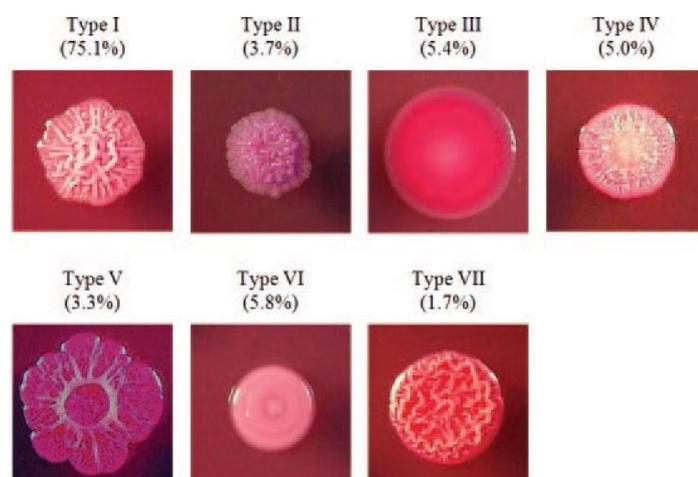


Рисунок 1 – Морфотипы *B. pseudomallei* по N. Chantratita [Chantratita et al., 2007]

Геном *B. pseudomallei* состоит из двух кольцевых репликонов – хромосомы 1 (4,07 м.п.о) и хромосомы 2 (3,17 м.п.о). Хромосома 1 преимущественно кодирует белки, участвующие в основных функциях домашнего хозяйства, таких как репликация, репарация, основные метаболические пути, синтез клеточной стенки и подвижность. Тогда как хромосома 2 в основном кодирует белки, необходимые для вспомогательных функций, участвующих в адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды [Holden et al., 2004].

### 1.3 Эпидемиология и глобальное распространение мелиоидоза

Мелиоидоз, также известный как болезнь Уитмора, встречается как у людей, так и у разнообразных животных с клиническими симптомами, варьирующими от локализованных поражений, туберкулезоподобной пневмонии до сепсиса и смерти [Currie et al., 2010].

Прогнозируемое в мире ежегодное количество смертей от мелиоидоза (89 000 человек в год) сопоставимо со смертностью от кори (95 600) и выше, чем от лептоспироза (50 000) и лихорадки денге (12 500) – заболеваниями, которые многими международными организациями здравоохранения считаются высокоприоритетными [Limmathurotsakul et al., 2016].

Чаще всего мелиоидозом заражаются при контакте с почвой, аэрогенно, а также при употреблении контаминированных воды или пищи [Currie, 2015]. Описаны редкие случаи контактно-бытовой, половой, вертикальной, нозокомиальной и зоонозной передачи мелиоидоза [Cheng and Currie, 2005].

Наиболее распространенным фактором риска, предрасполагающим к мелиоидозу, является сахарный диабет. Другие известные факторы риска включают профессиональный контакт с почвой или водой (особенно в сезон дождей), мужской пол, возраст старше 45 лет, чрезмерное употребление алкоголя, заболевания печени, хронические заболевания легких, почек и талассемия, а также продолжительное употребление стероидов и иммуносупрессия. Тем не

менее, более 80% педиатрических и около 20% взрослых пациентов не имеют признанных факторов риска [Cheng and Currie, 2005; Limmathurotsakul et al., 2010].

Хорошо известно, что *B. pseudomallei* присутствует в почве и поверхностных водах Юго-Восточной Азии и северной Австралии и в настоящее время эти регионы принято считать гиперэндемичными по мелиоидозу. Результаты недавнего прогностического моделирования глобальной распространенности мелиоидоза показали, что границы области эндемичности *B. pseudomallei* значительно шире, чем считалось ранее [Limmathurotsakul et al., 2016], а сообщения о случаях мелиоидоза и выделения возбудителя из внешней среды в 46 странах тропических и субтропических областей всех континентов на практике подтверждают данные проведенного аналитического исследования.

В некоторых странах Африки и Ближнего Востока спорадические случаи мелиоидоза человека и животных регистрировались в течение многих десятилетий [Katangwe T. et al., 2013; Birnie et al, 2019]. В 1953 г. в Египте описан мелиоидоз у лошади. Этот случай был идентифицирован по положительной реакции на пробу с маллеином при тестировании лошадей на сап. Однако последующие тесты на антигены дали противоречивые результаты и авторы заподозрили мелиоидоз. После патологоанатомического исследования была выделена *B. pseudomallei*, что подтвердило диагноз «мелиоидоз» [MacLennan et al., 1953]. Между 1967 и 1971 годами *B. pseudomallei* была выделена у свиней в Ниамее, Нигер. Кроме того, *B. pseudomallei* была выделена в Нигере из почвы. Также недавно выделены клинические и почвенные штаммы *B. pseudomallei* в Буркина-Фасо и Гамбии [Steinmetz et al., 2018]. В материковом Китае открытие *B. pseudomallei* в окружающей среде предшествовало выявлению первого случая мелиоидоза у человека более чем на 10 лет. Присутствие *B. pseudomallei* было впервые продемонстрировано в 1970-х годах, а первый случай заболевания человека мелиоидозом был выявлен в 1989 г. Болезнь оставалась без внимания в течение многих лет. Однако за последние два десятилетия ситуация изменилась и количество случаев диагностированного мелиоидоза значительно увеличилось и в Китае описано несколько серий случаев мелиоидоза [Zheng et al., 2019].

Появление мелиоидоза в областях, где он ранее не выявлялся, например, на северо-востоке Бразилии, экваториальной Африке можно частично объяснить повышением осведомленности и улучшенной диагностикой этой инфекции [Rolim et al., 2005; Salam et al., 2011, Wiersinga et al., 2015; Birnie et al., 2015].

#### 1.4 Мелиоидоз во Вьетнаме

Спорадические случаи мелиоидоза во Вьетнаме фиксируются в течение многих десятилетий. Первое лабораторное подтверждение случая заболевания мелиоидозом в Южном Вьетнаме было дано в Институте Пастера (г. Сайгон) в 1925 году [Pons and Advier, 1927]. В последующие годы был зарегистрирован ряд случаев заболевания в Тонкине и Кохинхине (северные провинции и дельта Меконга современного Вьетнама), а также центральном Вьетнаме, причем более половины из них имели фатальный исход [Trinh et al., 2018b]. Большинство зарегистрированных заболевших были иностранцами, по-видимому, из-за малодоступности медицинской помощи для коренного населения страны в те годы.

Во время военных действий во Вьетнаме 1940–1970 гг. большое количество западных солдат были инфицированы *B. pseudomallei*. Так, среди 400 000 французских военнослужащих, дислоцированных в Индокитае в период с 1948 по 1954 годы, было диагностировано, по меньшей мере, 100 случаев мелиоидоза [Sanford, 1978]. К 1973 году среди американского военного контингента было выявлено 343 случая мелиоидоза, а серопозитивными оказалось 8,9% ветеранов вьетнамской войны (около 250 000 человек), что свидетельствовало о потенциально значительно большем числе латентно инфицированных. Действительно, у ветеранов войны во Вьетнаме заболевание проявлялось и спустя десятилетия после пребывания в регионе [Koronen et al., 1991].

Все эти факты указывали на возможное широкое распространение мелиоидоза среди коренного населения Вьетнама, хотя до недавнего времени болезнь диагностировалась редко (Таблица 1).

Ретроспективное исследование опубликованных данных, проведенное Т. Т. Trinh, показало, что среди вьетнамцев за период с 1926 по 1990 гг. зарегистрировано только 20 случаев мелиоидоза [Trinh et al., 2018b]. Весьма вероятно, что одной из основных причин такой низкой выявляемости заболевания является сложность его клинической диагностики.

Таблица 1 - Количество опубликованных случаев мелиоидоза во Вьетнаме в разные годы [по Trinh et al., 2018b]

Год	Число пациентов				Ссылка
	Всего	Выздоровело	Умерло	Неизвестно	
1926	1	0	1	0	[Pons and Advier, 1927]
1949	9	5	0	4	[Alain et al., 1949]
1958	1	0	1	0	[Stein et al., 1958]
1967	1	1	0	0	[Mo and Cuong, 1967]
1985	7	1	6	0	[Morrison et al., 1988]
1990	1	1	0	0	[Worthington et al., 1990]
1999	9	0	0	9	[Parry et al., 1999]
2008	55	32	17	6	[Phuong et al., 2008]
2018	70	30	18	22	[Trinh et al., 2018a]

Еще в 1967 году Мо и Cuong предполагали, что мелиоидоз, по-видимому, ошибочно диагностируется как туберкулез или распространенные микотические инфекции [Mo and Cuong, 1967]. За период 1992–1998 гг. было зарегистрировано 9 случаев заболевания [Parry et al., 1999] и 54 случая – за период 1997–2005 гг. [Phuong et al., 2008]. Однако высокая серопозитивность среди жителей северного Вьетнама (от 6,4% до 31,8%, в зависимости от места проживания), а также выявленная связь уровня серопозитивности населения и занятости в сельском хозяйстве свидетельствовали о недооцененном уровне заболеваемости мелиоидозом в стране и распространенности *B. pseudomallei* во внешней среде [Phung et al., 1993].

Разнообразие рельефа и климатических условий, определяемые положением страны на стыке нескольких природных зон, предполагает неравномерное территориальное распределение возбудителя. Однако, судя по опубликованным в литературе данным, систематического изучения данной проблемы не проводилось. На сегодняшний день опубликовано всего три работы [Parry et al., 1999; Phuong et al., 2008; Gohler et al., 2017], касающиеся распространенности возбудителя мелиоидоза в агробиоценозах, а естественные экосистемы в этом отношении пока не исследовались.

По данным D. M. Phuong, случаи мелиоидоза в северном Вьетнаме наблюдаются с сезонной периодичностью – пик заболеваемости приходится на сезон дождей, причем наиболее распространенной формой инфекции является фатальная септицемия. У около 80% больных с бактериологически подтвержденным диагнозом «мелиоидоз» была зафиксирована септицемия с высокой летальностью (50%), причем у 30% септических больных смерть наступила в течение 48 ч после госпитализации [Phuong et al., 2008; Trinh et al., 2018a]. Одним из комплекса факторов, влияющих на уровень смертности при мелиоидозе, является своевременная диагностика инфекции. Обучение специалистов и введение в практику простого в использовании алгоритма для идентификации *B. pseudomallei* из клинических образцов позволило достичь заметного улучшения диагностики мелиоидоза в стране [Trinh et al., 2018a].

## **1.5 Методы лабораторной диагностики мелиоидоза**

### ***1.5.1 Бактериологический***

Диагностическим стандартом лабораторной диагностики мелиоидоза является выделение культуры *B. pseudomallei*. Однако, наряду со 100% специфичностью, метод не обладает достаточной чувствительностью – всего 60%. Эффективность метода в значительной степени зависит от правильности техники отбора биологических образцов, используемых питательных сред и квалификации

микробиолога. Возбудитель мелиоидоза имеет атипичную для грамотрицательных патогенов морфологию роста на питательных средах и, при отсутствии опыта работы с *B. pseudomallei*, может быть принят за постороннюю микрофлору и отброшен как контаминант [Limmathurotsakul et al., 2010].

Принятый в настоящее время стандарт для определения *B. pseudomallei* в почве – так же выделение и идентификация возбудителя методом классической бактериологии. Данный метод имеет преимущество перед другими подходами, такими как ПЦР, в том, что он имеет 100% специфичность, требует только базового оборудования и обеспечивает живые микроорганизмы для дальнейшего исследования [Limmathurotsakul et al., 2012]. Одним из основных недостатков метода являются его невысокая чувствительность, на которую влияют многочисленные факторы, включая глубину отбора проб почвы, эффективность отделения бактерий от почвенного матрикса [Trung et al., 2011], объем грунта, температура инкубации и используемые среды культивирования [Limmathurotsakul et al., 2012]. К настоящему времени полностью надежные стандартизованные коммерческие селективные среды для выделения *B. pseudomallei* отсутствуют. На широко используемом для этой цели агаре Эшдауна при 42°C также растут виды комплекса *B. ceracia*, а также целый ряд других видов: *Bordetella* spp., *Comamonas* spp., *Delftia* spp., *Roseomonas* spp., *Sphingobacterium* spp., *Acinetobacter* spp., *Moraxella* spp., а также *Neisseria* spp. В связи с чем, не исключена вероятность «зарастания» *B. pseudomallei* другими, более быстро растущими бактериями, что может привести к пропуску культивируемых форм *B. pseudomallei* (например, выросших в виде микроколоний). Кроме того, возбудитель мелиоидоза может существовать в жизнеспособном, но некультивируемом состоянии, что делает его не выявляемым бактериологическими методами и культуральный метод показывает ложноотрицательный результат [Захарова и др., 2018].

Идентификация возбудителя мелиоидоза методами классической бактериологии осложняется значительным сходством морфологических и биохимических признаков видов, входящих в комплекс «*B. pseudomallei*», также его часто сложно дифференцировать с видами комплекса «*B. ceracia*». В настоящее время для идентификации возбудителя мелиоидоза и его дифференциации от филогенетически близких видов активно используют коммерческие системы биохимической идентификации, например, VITEK® 2 и API. При этом неоднократно описывались проблемы, связанные с ошибочной

идентификацией различными биохимическими системами *B. pseudomallei* чаще всего как *B. ceracia*, а также как *Pseudomonas aeruginosa*, *Comamonas testosteroni* и некоторые другие бактерии [Zakharova et al., 2018]. Кроме того, приблизительно в 30% случаев может иметь место и ошибочное определение *B. ceracia* как *B. pseudomallei* [Kiratisin et al., 2007].

Метод выделения культуры весьма трудоемок, имеет ограниченную чувствительность, кроме того, выделение и идентификация культуры требуют не менее 4–7 суток, что задерживает начало специфического лечения. Как упоминалось выше, многие больные при этом не доживают до установления диагноза. Учитывая это, для ускоренной диагностики мелиоидоза, а также при проведении скрининговых исследований внешней среды на присутствие *B. pseudomallei* все чаще используют более быстрые и чувствительные молекулярно-генетические методы.

### ***1.5.2 Применение молекулярно-генетических методов для детекции и идентификации возбудителя мелиоидоза***

В последние годы наиболее часто используемым методом для быстрого выявления и идентификации возбудителя мелиоидоза как из клинических образцов, так и из проб внешней среды, в лабораториях, оснащенных современным оборудованием, является полимеразная цепная реакция (ПЦР). С использованием специфичных для *B. pseudomallei* генных мишеней, таких, как гены 23S-рРНК и 16S-рРНК, гены первого кластера системы секреции III типа T3SS1, флагеллярного гена *fliC*, генов *phaC* (полигидроксиалканоатсинтазы) и *mprA* (сериновой металлопротеазы) и др. к настоящему времени разработано множество различных вариантов протоколов ПЦР для идентификации возбудителя мелиоидоза [Lowe et al., 2014]. Кроме того, в литературе представлены основанные на ПЦР способы дифференциации возбудителя мелиоидоза от близкородственного возбудителя сапа и других отдельных видов комплекса «*B. pseudomallei*» [Bowers et al., 2010; Price et al., 2012; Lowe et al., 2016; Лемасова и др., 2019]. Тест-системы для

дифференциации видов комплекса «*B. pseudomallei*» и близкородственной *B. serasia* представлены всего в двух работах [Koh et al., 2012; Zakharova et al., 2017].

Несмотря на очевидные достоинства разработанных базирующихся на ПЦР протоколов идентификации возбудителя мелиоидоза, их использование в большинстве эндемичных стран ограничено крупными специализированными лабораториями. В связи с необходимостью наличия высокотехнологичного оборудования и строгим требованиям к лабораторным процедурам использование ПЦР, особенно ПЦР в режиме реального времени, в лабораториях медицинских учреждений первичного уровня в большинстве случаев недоступно.

Изотермическая амплификация нуклеиновых кислот обеспечивает упрощенные условия инкубации при постоянной температуре, не требующие термоциклирования. Инкубация при одной температуре снижает требования к оборудованию, открывая новые возможности для выхода за пределы крупных лабораторий и проведения амплификации в условиях ограниченных ресурсов. Исключение повторяющихся этапов нагрева и охлаждения также дает преимущество в значительном сокращении временных параметров анализа. Реакции происходят быстрее не только из-за сокращения времени термоциклирования, но и вследствие возможности асинхронного протекания нескольких молекулярных реакций одновременно вместо последовательной амплификации в рамках цикла нагрев - охлаждение [Li et al., 2020].

В последнее десятилетие проводятся активные исследования возможности применения методов изотермической амплификации ДНК/РНК в молекулярной диагностике инфекционных заболеваний, поскольку эти методы продемонстрировали быстрый синтез нуклеиновых кислот, экономическую эффективность, высокую надежность и воспроизводимость. Внедрение данных методов, вероятно, в значительной степени будет способствовать проведению генодиагностики непосредственно на месте оказания медицинской помощи.

*Петлевая изотермическая амплификация LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)*. LAMP – это метод быстрой репликации ДНК, впервые описанный в

работе Т. Notomi [Notomi et al., 2000], который используется для обнаружения вирусов, бактерий, грибов и простейших. Этот метод требует специального набора праймеров для распознавания до 6 областей целевого гена, тем самым повышая чувствительность и скорость реакции. Результаты LAMP-реакции можно наблюдать невооруженным глазом по появлению белого помутнения, образованного ионами магния и пирофосфатами. Обнаружение продуктов LAMP также может быть достигнуто с помощью флуоресцентных красителей, таких как кальцеин или гидроксилнафтоловый синий: флуоресцентно меченые продукты LAMP включены в нерастворимый комплекс, поэтому амплифицированные и неамплифицированные последовательности различаются по цвету. При визуализации продуктов LAMP с помощью электрофореза в агарозном геле ампликоны выглядят как лестничные полосы. Выявление и идентификация патогенов выполняются без использования сложного оборудования за 30-40 минут с очень высокой чувствительностью и специфичностью с возможностью визуальной детекции результата, что делает этот метод весьма привлекательным для использования в полевых условиях или слабооснащенных лабораториях. Кроме того, этот метод меньше подвержен ингибированию при анализе образцов окружающей среды, например почвы [Li and Macdonald, 2015], но так же, как ПЦР в реальном времени, чувствителен к ингибиторам, содержащимся в крови [Chantratita et al., 2008].

При исследовании чистых культур *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* методом LAMP, нацеленной на кластер генов T3SS1 возбудителя мелиоидоза, нижний предел обнаружения составил 38 геномных копий на реакцию при отсутствии амплификации с близкородственными буркхольдериями [Chantratita et al., 2008]. Исследования российских ученых показали влияние используемой полимеразы на эффективность реакции для идентификации возбудителей мелиоидоза и сапа, обладающих повышенным GC-составом геномов. Кроме того, в этой же работе установлено, что генетические мишени, успешные для амплификации в ПЦР, могут быть неэффективными для LAMP из-за появления вторичных структур в изотермических условиях [Щит и др., 2018].

*Рекомбиназная полимеразная амплификация* (Recombinase Polymerase Amplification, RPA) была впервые представлена в 2006 году исследовательской группой Niall Armes [Piepenburg et al., 2006] и представляет собой альтернативу полимеразной цепной реакции. Фундаментальный механизм реакции RPA основан на искусственном воспроизведении естественного клеточного процесса – гомологичной рекомбинации. Стандартные реагенты для реакции RPA включают три ключевых белка (RecA рекомбиназа, фактор загрузки рекомбиназы и SSB белок), которые впоследствии координируются с ДНК-полимеразой и другими вспомогательными компонентами. Базовый протокол RPA включает одну пару специфических праймеров.

RPA начинается со связывания рекомбиназы с праймерами при участии фактора загрузки рекомбиназы с образованием нуклеопротеиновой нити. Полученный комплекс ищет гомологичные последовательности в дуплексной ДНК. Как только гомология обнаружена, комплекс вторгается в двухцепочечную ДНК, образуя структуру D-петли. Одна сторона D-петли является двухцепочечной, где праймер гибридизируется с цепью матрицы, инициируя реакцию обмена цепей, тогда как другая сторона D-петли остается одноцепочечной и стабилизируется SSB белками. Впоследствии рекомбиназа отделяется от нуклеопротеиновой нити и сразу становится доступной для инициирования реакции замещения другой цепи с новым праймером. Со свободного 3'-ОН конца праймера, отожденного на ДНК-матрице, ДНК-полимераза (*Bsu* или *Sau*) инициирует синтез комплементарной цепи. По мере продолжения полимеризации две нити двухцепочечной ДНК-мишени продолжают разделяться. Включение как прямого, так и обратного праймеров позволяет синтезу цепи происходить одновременно в обоих направлениях и, в итоге, приводит к экспоненциальному накоплению амплифицированной дуплексной ДНК, состоящей из последовательности между прямым и обратным праймерами [Piepenburg et al., 2006].

Это простой в исполнении метод изотермической амплификации, который может обнаруживать специфическую ДНК или РНК с высокой чувствительностью (не менее 50 фг ДНК) и коротким временем реакции (5–20 минут). Метод был успешно использован для обнаружения патогенов различной природы, таких как бактерии, вирусы и простейшие [Kim et al., 2014; Liu et al., 2018; Rosser et al., 2015]. RPA можно проводить в широком диапазоне температур от 25 °С до 45 °С и даже,

при необходимости, при нагревании на теле исследователя [Crannell et al., 2014]. Детекция продукта реакции может проводиться электрофорезом в агарозном геле. В качестве альтернативы, при включении в реакцию олигонуклеотидного зонда, результаты могут быть учтены по флуоресценции с помощью специального прибора или невооруженным глазом на олигохромографической полосе с латеральным потоком (LF-RPA).

Количество публикаций по использованию RPA для ускоренной диагностики разнообразных инфекций неуклонно растет. По поисковому запросу «recombinase polymerase amplification» в текстовой базе данных медицинских и биологических публикаций PubMed обнаружено 520 работ, опубликованных за последние 10 лет, среди которых только одна работа [Peng et al., 2019], посвященная использованию RPA в генодиагностике мелиоидоза. Авторами создан набор праймеры-зонд, нацеленный на ген *orf2* в пределах кластера T3SS1, и впервые проведена оценка применимости LF-RPA для выявления *B. pseudomallei* с использованием имитации клинических проб и контаминированной почвы. Чувствительность метода составила  $10^3$  КОЕ / мл и сравнима с TaqMan ПЦР в реальном времени при отсутствии перекрестной амплификации с *B. mallei*, видами комплекса «*B. seracía*» и 35 гетерологичными видами бактерий. Значительным достоинством метода является относительная устойчивость LF-RPA к ингибиторам ПЦР, присутствующим в крови и почве, то есть метод LF-RPA является потенциальной альтернативой существующим протоколам ПЦР для обнаружения *B. pseudomallei* [Peng et al., 2019]. Полученные данные свидетельствуют, что LF-RPA весьма перспективен для ускоренного выявления возбудителя мелиоидоза, однако для полной оценки его практической применимости требуются дополнительные исследования.

## **1.6 Генетическое разнообразие и методы генотипирования *Burkholderia pseudomallei***

Для возбудителя мелиоидоза характерна существенная генетическая гетерогенность между штаммами, которая в значительной степени обусловлена горизонтальным переносом генов – значительный вклад в межштаммовые различия вносит наличие геномных островов (GI), составляющих около 5,8%

генома, с варибельным присутствием этих областей у разных штаммов [Holden et al., 2004]. Кроме того, в пангеноме *B. pseudomallei* обнаружены свидетельства рекомбинационных процессов и микроэволюционных изменений, обеспечивающих высокую пластичность и, как следствие, варибельность геномов *B. pseudomallei* [Wiersinga et al., 2018]. Возбудитель мелиоидоза является естественно компетентным видом и способен принимать ДНК из окружающей среды [Тарасова и др., 1983]. Однако установлено, что интеграция новых генов опосредуется сайт-специфической рекомбинацией и происходит локализовано в относительно небольшом количестве сайтов – в повторах генов тРНК, фланкирующих геномные острова [Tuanyok et al., 2008]. Остальная часть генома также демонстрирует признаки обширной гомологичной рекомбинации [Sim et al., 2008]. В результате, несмотря на высокий уровень горизонтального переноса, среди штаммов *B. pseudomallei* сохраняется высокая консервативность порядка генов в хромосомах, а межштаммовое разнообразие сиквенса-типов обеспечивает гомологичная рекомбинация по всему геному [Spring-Pearson et al., 2015].

Проведенный недавно филогенетический анализ с использованием данных полногеномного секвенирования значительного количества штаммов различного географического происхождения (469 изолятов) продемонстрировал четкое генетическое различие между изолятами из Австралии и Азии. Австралийская популяция *B. pseudomallei* показала наибольшее генетическое разнообразие и самый большой дополнительный геном. Изоляты из Австралии имели более длинные филогенетические ветви по сравнению с изолятами из других регионов, что подтверждает гипотезу о том, что Австралия была одним из первых резервуаров нынешней глобальной популяции *B. pseudomallei* (Рисунок 2). В эндемичной зоне Юго-Восточной Азии горячей точкой для эволюции *B. pseudomallei* был субрегион Меконга (Таиланд, Лаос, Камбоджа и Вьетнам), о чем свидетельствует большая доля эволюционного времени в этом субрегионе по сравнению с малайским (Малайзия и Сингапур) [Chewapreecha et al., 2017].

Обладая открытым геномом, штаммы *B. pseudomallei* различаются в зависимости от места происхождения, причем определенные локусы, включая

переменные факторы вирулентности, гораздо более распространены в штаммах из определенных регионов по сравнению с другими.

Генетическая дивергенция наиболее ярко выражена между австралийскими и азиатскими изолятами. Показано, что среди регион-специфичных локусов присутствуют гены, обеспечивающие функции адаптации к определенным экологическим нишам. Также известно, что некоторые из редко встречающихся клинических проявлений инфекции демонстрируют географическую сегрегацию. Имеются убедительные доказательства того, что определенные гены *B. pseudomallei* способствуют различным клиническим проявлениям мелиоидоза в Азии и Австралии. К настоящему времени известно несколько детерминант вирулентности с известными региональными вариациями. В частности, примерно 12% австралийских штаммов обладают вариантом гена фактора внутриклеточной подвижности *bimA*<sub>Bm</sub>, гомологичного ортологу *B. mallei*, тогда как все известные штаммы из Юго-Восточной Азии – вариантом *bimA*<sub>Bp</sub>. Было обнаружено, что мелиоидозный энцефаломиелит чаще развивается у пациентов, инфицированных штаммами с аллелем *bimA*<sub>Bm</sub>, а у пациентов, инфицированных *B. pseudomallei* с вариантом *bimA*<sub>Bp</sub>, в два раза чаще развивалась пневмония [Sarovich et al., 2014].

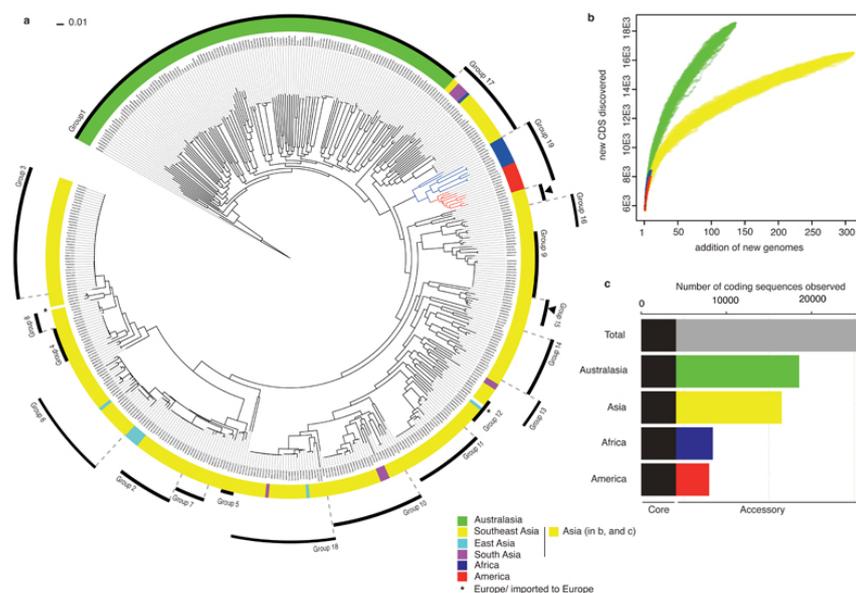


Рисунок 2 – Филогения и пангеном *B. pseudomallei* [Chewapreecha et al., 2017]

Нитчатый гемагглютинин (*fha*) представляет собой секретируемый белок, который действует как адгезин и иммуномодулятор у разных видов бактерий. У *B. pseudomallei* всегда присутствует основной ген *fhaB* и три дополнительных, количество и комбинации которых варьируют между изолятами, причем у австралийских и тайландских штаммов наблюдались разные комбинации генов *fhaB*. Отмечалось, что у пациентов, инфицированных *B. pseudomallei* с вариантом *fhaB* 3, в два раза чаще развивалась бактериемия, а штаммы, лишённые *fhaB* 3, значительно реже вызывают тяжелые формы инфекции [Sarovich et al., 2014].

Среди регион-специфичных генов также обнаружены детерминанты биосинтеза вторичных метаболитов, транспорта и метаболизма липидов, а также таких важных факторов патогенности возбудителя мелиоидоза, как компоненты третьего кластера системы секреции третьего типа T3SS-3 (*bsaU*, *bsaR*, *bsaP*, *bsaO*), T6SS-1 (*hcp*, *tssE*, *clp*) и биосинтеза капсульного полисахарида (*wcbF*, *wzm*, *wcbD*) [Chewapreecha et al., 2017].

Традиционно для молекулярного типирования возбудителя мелиоидоза использовали риботипирование, гель-электрофорез в импульсном поле (PFGE) и случайную амплификацию полиморфной ДНК (RAPD). Однако этих методов часто недостаточно для выявления мелкомасштабных генетических вариаций и эти методы генотипирования заменяются более современными, основанными на частичном и полногеномном секвенировании. Для характеристики популяционного разнообразия *B. pseudomallei* в настоящее время наиболее часто используют метод мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ, MLST), позволяющий получать унифицированные данные, сравнивать их с полученными ранее и размещенными в международной базе данных *B. pseudomallei* MLST (<http://pubmlst.org/bpseudomallei/>), предоставляющей крупнейшее в мире хранилище генотипов *B. pseudomallei*.

Схема МЛСТ для *B. pseudomallei* была впервые разработана в 2003 г. [Godoy et al., 2003], частично модифицирована в 2006 и 2017 гг. [Vesaratchavest et al., 2006; Price et al., 2016] и нацелена на семь генов домашнего хозяйства: *ace* (ацетоацетилкоэнзим-А-редуктаза), *gltB* (глутаматсинтаза), *gmhD* (ADP-1- глицеро- d- манно-гептоза-6-эпимераза), *lepA* (GTP-связывающий фактор элонгации), *lipA* (синтетаза липоевой кислоты), *narK* (белок вытеснения нитрита) и *ndh* (НАДН-дегидрогеназа), расположенных исключительно на первой хромосоме.

Высокие скорости генетической рекомбинации *B. pseudomallei* в сочетании с генетическим дрейфом в больших временных масштабах могут привести к случайным совпадениям ST у генетически различных штаммов [Pearson et al., 2009]. Такие случаи получили название гомоплазии ST [De Smet et al., 2015]. Хотя случаи гомоплазии ST встречаются редко, они представляют собой важные примеры неудачного генотипирования, которые могут существенно затруднить анализ, основанный на данных МЛСТ, и, для подтверждения необычных или неожиданных результатов генотипирования, особенно в случае такого высоко рекомбиногенного патогена, как *B. pseudomallei*, используют методы высокого разрешения, такие как полногеномное секвенирование (WGS).

В последние годы WGS предоставило быструю альтернативу для извлечения профилей МЛСТ, однако метод на основе ПЦР по-прежнему остается широко применяемым методом генотипирования из-за его надежности, портативности и доступности данных сравнения.

## СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

## ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

## 2.1 Штаммы

В работе были исследованы 109 клинических и 27 природных штаммов *Burkholderia* spp. из коллекции Института тропической медицины Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра (г. Ханой, СРВ), перечисленные в Таблице 2.

Таблица 2 – Перечень исследованных штаммов

Штамм	Место выделения		Год выделения
	Провинция	Район	
1	2	3	4
<i>Клинические штаммы B. pseudomallei</i>			
15QT1/ V1501	QuảngTrị	VĩnhLinh	2015
15QT2/ V1502	QuảngTrị	VĩnhLinh	2015
15QT3/ V1503	QuảngTrị	VĩnhLinh	2015
15QT4/ V1504	QuảngTrị	VĩnhLinh	2015
15QT5/ V1505	QuảngTrị	TriệuPhong	2015
16QT1/ V1606	QuảngTrị	HướngHóa	2016
16QT2/ V1607	QuảngTrị	VĩnhLinh	2016
16QT3/ V1608	QuảngTrị	GioPhong	2016
16QT4/ V1609	QuảngTrị	HướngHóa	2016
15QT6/ V1610	QuảngTrị	GioLinh	2015
16QT5/ V1611	QuảngTrị	VĩnhLinh	2016
15QB1/ V1512	QuảngBinh	BồTrạch	2015
15QB2/ V1513	QuảngBinh	TuyênHóa	2015
15QB3/ V1514	QuảngBinh	BồTrạch	2015
16QB1/ V1615	QuảngBinh	BồTrạch	2016
16QB2/ V1616	QuảngBinh	QuảngTrạch	2016
16QB3/ V1617	QuảngBinh	BồTrạch	2016
PT01	PhuTho	н.д.	2017
PT03	PhuTho	н.д.	2018
16YB01	Yen Bai	Van Yen	2016
18YB01	Yen Bai	Van Yen	2018
15NA01	Nghệ An	Nghĩa Đàn	2015
15NA04	Nghệ An	Thanh Chương	2015
15NA16	Nghệ An	Tân kỳ	2015
15NA19	Nghệ An	Kỳ Sơn	2015
15NA20	Nghệ An	Thanh Chương	2015
15NA27	Nghệ An	Hoàng Mai	2015
16NA02	Nghệ An	Hưng Nguyên	2016
16NA04	Nghệ An	Can Lộc	2016
16NA05	Nghệ An	Đức Thọ	2016
16NA06	Nghệ An	Yên Thành	2016
16NA07	Nghệ An	Diễn Châu	2016
16NA08	Nghệ An	Quỳnh Lưu	2016
16NA09	Nghệ An	Thanh Chương	2016

Таблица 2 (Продолжение)

1	2	3	4
16NA11	Nghệ An	Hương Sơn	2016
16NA12	Nghệ An	Cửa Lò	2016
16NA14	Nghệ An	Thanh Chương	2016
16NA15	Nghệ An	Thanh Chương	2016
16NA16	Nghệ An	Hưng Nguyên	2016
16NA17	Nghệ An	Thái Hòa	2016
16NA18	Nghệ An	Đức Thọ	2016
16NA19	Nghệ An	Đô Lương	2016
16NA22	Nghệ An	Tương Dương	2016
16NA23	Nghệ An	Tân Kỳ	2016
17HT01	Hà Tĩnh	tp Hà Tĩnh	2017
17HT02	Hà Tĩnh	Cám Xuyên	2017
17HT03	Hà Tĩnh	tp Hà Tĩnh	2017
17HT04	Hà Tĩnh	Cám Xuyên	2017
17HT05	Hà Tĩnh	Can Lộc	2017
17HT06	Hà Tĩnh	Hương Khê	2017
17NA01	Nghệ An	Thanh Chương	2017
17NA02	Nghệ An	Thanh Chương	2017
17NA03	Nghệ An	Yên Thành	2017
17NA04	Nghệ An	Yên Thành	2017
17NA05	Nghệ An	Yên Thành	2017
17NA06	Nghệ An	Tân Kỳ	2017
17NA07	Nghệ An	Đô Lương	2017
17NA08	Nghệ An	Diễn Châu	2017
17NA09	Nghệ An	TP Vinh	2017
17NA10	Nghệ An	Quỳ Hợp	2017
17NA11	Nghệ An	TP Vinh	2017
17NA12	Nghệ An	Quỳ Hợp	2017
17NA13	Nghệ An	Hương Sơn	2017
17NA14	Nghệ An	Hương Sơn	2017
17NA15	Nghệ An	Can Lộc	2017
17NA16	Nghệ An	Quỳnh Lưu	2017
17NA17	Nghệ An	Tân Kỳ	2017
17NA18	Nghệ An	Quỳ Hợp	2017
17NA19	Nghệ An	Quỳ Hợp	2017
17NA20	Nghệ An	Tân Kỳ	2017
17NA21	Nghệ An	Tân Kỳ	2017
17NA22	Nghệ An	Quỳ Hợp	2017
17NA23	Nghệ An	Quỳ Hợp	2017
17NA24	Nghệ An	Quỳ Hợp	2017
17NA25/ V1701	Nghệ An	Chau Quy	2017
18NA01	Nghệ An	Thanh Chương	2018
18NA02	Nghệ An	Hưng Nguyên	2018
18NA03	Nghệ An	Thái Hòa	2018
18NA04	Nghệ An	Đức Thọ	2018
18NA05	Nghệ An	Thanh Chương	2018
18NA06	Nghệ An	Thanh Chương	2018
18NA07	Nghệ An	Diễn Châu	2018
18NA08	Nghệ An	Diễn Châu	2018
18NA09	Nghệ An	Diễn Châu	2018
18NA10	Nghệ An	Tương Dương	2018
18NA11	Nghệ An	Tân Kỳ	2018
18NA12	Nghệ An	Thái Hòa	2018
18NA13	Nghệ An	Thanh Chương	2018
18NA14	Nghệ An	Đức Thọ	2018
18NA16	Nghệ An	Thái Hòa	2018
18NA17	Nghệ An	Thanh Chương	2018

Таблица 2 (Продолжение)

1	2	3	4
18NA18	Nghệ An	Can Lộc	2018
18NA20	Nghệ An	Hoàng Mai	2018
18NA21	Nghệ An	Diễn Châu	2018
18NA22	Nghệ An	Tương Dương	2018
18NA23	Nghệ An	Tân Kỳ	2018
17VP01	Vĩnh Phúc	Vinh Yên	2017
17VP02	Vĩnh Phúc	Sông Lô	2017
17VP03	Vĩnh Phúc	Sông Lô	2017
17VP04	Vĩnh Phúc	Sông Lô	2017
17VP05	Vĩnh Phúc	Sông Lô	2017
17VP06	Vĩnh Phúc	Sông Lô	2017
17VP07	Vĩnh Phúc	Soc Son	2017
19VP01	Vĩnh Phúc	Bình Xuyên	2019
19VP02	Vĩnh Phúc	Sông Lô	2019
20QN01	Quảng Ninh	н.д.	2020
20QN02	Quảng Ninh	н.д.	2020
20QN03	Quảng Ninh	н.д.	2020
20QN06	Quảng Ninh	н.д.	2020
19YB01	Yên Bái	н.д.	2019
19YB02	Yên Bái	н.д.	2019
19YB04	Yên Bái	н.д.	2020
20YB01	Yên Bái	н.д.	2020
<b>Клинические штаммы <i>V. ceracia</i></b>			
PT02	PhuTho		2018
<b>Почвенные штаммы <i>V. pseudomallei</i></b>			
4802	Nghệ An	Quy Chau	2017
4811	Nghệ An	Quy Chau	2017
4702	Nghệ An	Quy Chau	2017
4822	Nghệ An	Quy Chau	2017
2003	Nghệ An	Quy Hop	2017
1743	Ha Tinh	Huong Khe	2017
6501	Vinh Phuc	Song Lo	2018
1112	Nghệ An	Thanh Chuong	2019
1181	Nghệ An	Thanh Chuong	2019
1182	Nghệ An	Thanh Chuong	2019
1264	Nghệ An	Thanh Chuong	2019
1265	Nghệ An	Thanh Chuong	2019
128	Nghệ An	Thanh Chuong	2019
167	QuảngBinh	Bo Trach	2019
9601	Bắc Giang	Luc Ngan	2019
9501	Bắc Giang	Luc Nam	2019
8400	Bắc Giang	Luc Nam	2019
7803	Bắc Giang	Luc Nam	2019
7404	Bắc Giang	Luc Nam	2019
7405	Bắc Giang	Luc Nam	2019
2750	Vĩnh Phúc	Tam Đảo	2020
<b>Почвенные штаммы <i>V. thailanlensis</i></b>			
2.1	Nghệ An	Dien Chau	2015
1172	Nghệ An	Thanh Chuong	2019
1260	Nghệ An	Thanh Chuong	2019
1341	Nghệ An	Thanh Chuong	2019
1342	Nghệ An	Thanh Chuong	2019
1740	QuảngBinh	Bo Trach	2019

Сокращения: н.д. – нет данных.

## 2.2 Питательные среды и условия культивирования

Культивирование проводили на агаре Луриа, триптиказо-соевом агаре (HiMedia, Индия) с добавлением и без полимиксина (50 ЕД/мл) и амоксициллин/клавуланата (20/10 мкг/мл) и агаре Эшдауна с добавлением и без гентамицина (4 мкг/мл) (Таблица 3) при 42°C (при высеве проб внешней среды) или 37°C (чистые культуры) в течение 5-7 суток с ежедневным контролем роста, начиная с 2-х суток.

Таблица 3 - Приготовление агара Эшдауна

№	Ингредиенты	Количество
1	Сухой Триптиказо-соевый бульон (можно агар, тогда исключить п.2)	Согласно рекомендациям производителя
2	Агар	15 г
3	Глицерин	40 мл
4	Кристаллвиолет 0.1%	5 мл
5	Нейтральный красный 1%	5 мл
6	Дистиллированная вода	950 мл
Автоклавировать 15 мин при 121°C. Остудить до 50°C, добавить гентамицин до конечной концентрации 4 мг/л. Разлить по чашкам Петри.		

## 2.3 Методы обработки проб почвы

### 2.3.1 Обработка с применением TBSS-C50.

Использовали метод, предложенный D. Limmathurotsakul с соавторами [Limmathurotsakul et al., 2012] с модификациями:

1. Гомогенизировать 25 г почвы с добавлением стерильной дистиллированной воды до получения густой суспензии
2. К 5 мл полученной суспензии почвы или исследуемой воды добавить 5 мл раствора TBSS-C50

3. Тщательно перемешать на вортексе и инкубировать 48 часов при 40°C
4. Произвести высеив 50 мкл суспензии на агар Эшдауна с гентамицином и 25 мкл суспензии на вторую чашку агара Эшдауна без гентамицина.

### Приготовление Threonine basal salt solution (TBSS)

#### Раствор А

<b>Компоненты</b>	<b>Количество</b>	<b>Производитель/Catalog no.</b>
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85%	2.306 мл	Sigma/P-6560
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.556 г	Merck/1.03965
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.297 г	Merck/8883
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.0218 г	Merck/2790
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.125 г	Univar/309
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.030 г	BDH/3714260
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.030 г	Univar/360
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.062 г	Hopkin&Williams/227800
Дистиллированная вода	До 1000 мл	

Растворить все компоненты, автоклавировать при 121°C 20 минут

#### Раствор Б

<b>Компоненты</b>	<b>Количество</b>	<b>Производитель/Catalog no.</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.451 г	Sigma/P5379
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.730 г	Merck/1.05104
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.123 г	Sigma/M5921
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.0147 г	Merck/1.02382
NaCl	10 г	BDH/102415K
Nitriiotriacetic acid	0.200 г	BDH/29338
Раствор А	20 мл	
Дистиллированная вода	900 мл	

Смешать все компоненты до полного растворения солей, довести рН до 7.2 добавлением 1М КОН, стерилизовать автоклавированием при 121°C 20 минут

#### Раствор L-треонина

<b>Компоненты</b>	<b>Количество</b>	<b>Производитель/Catalog no.</b>
L-Threonine	5.956 г	Merck/1.08411
Дистиллированная вода	100 мл	

Растворить L-треонин, стерилизовать фильтрованием через 0.20 µm фильтр.

### Раствор TBSS-C50

Смешать 100 мл раствора L-треонина и 900 мл раствора Б (конечная концентрация L-треонина 0.05M), добавить колистин (или полимиксин В) до конечной концентрации 50 ЕД/мл.

### ***2.3.2 Обработка с применением PEG-DOC***

Использовали метод, предложенный T.Trung с соавторами [Trung et al., 2011] с модификациями:

1. 25 г почвы гомогенизировать с добавлением 5 мл стерильной дистиллированной воды.
2. К 2,5 мл полученной густой суспензии добавить 5 мл раствора PEG-DOC, содержащий 2,5% (w/v) полиэтиленгликоля 6000 (SERVA Electrophoresis, Гейдельберг, Германия) и 0,1% (w/v) дезоксихолата натрия (MerckKGaA, Darmstadt, Germany).
3. Встряхивать на орбитальном шейкере при 200 об / мин в течение 2 часов.
4. Дать 5 мин постоять, чтобы осела грубая взвесь.
5. Надосадочную жидкость осторожно перелить в центрифужные пробирки.
6. Центрифугировать 1400 g в течение 1 мин для осаждения крупных частиц почвы.
7. Посеять 50 мкл супернатанта на агар Эшдауна с гентамицином и 25 мкл на вторую чашку без гентамицина.

### ***2.3.3 Метод прямого культивирования***

1. В пластиковый пакет с отобранным керном почвы добавить стерильной дистиллированной воды в соотношении 2:1.
2. Гомогенизировать вручную до получения однородной массы, при необходимости добавить воды.
3. Оставить на ночь для оседания взвеси.

4. Посеять 50 мкл надосадочной жидкости на агар Эшдауна с гентамицином и 25 мкл на вторую чашку агара Эшдауна без гентамицина.

#### 2.4 Определение чувствительности к антибактериальным препаратам методом дисков

Приготовить бактериальную взвесь в стерильном физиологическом растворе эквивалентно стандарту мутности 0,5 по McFarland (соответствует  $1,5 \times 10^8$  м.к./мл). Для приготовления взвеси использовать культуру с неселективного агара. В инокулюме смочить стерильный ватный тампон, удалить излишек жидкости, аккуратно отжав тампон о стенки внутри пробирки, равномерно нанести на поверхность агара Мюллера-Хинтона. Толщина агарового слоя в чашке Петри должна быть строго 4 мм.

Инокулированные чашки выдержать при комнатной температуре для впитывания жидкости в агар (не более 15 минут). На поверхность инокулированного агара стерильным пинцетом или с помощью диспенсера нанести диски с антибиотиками (не больше 6 дисков на чашку). Расстояние между дисками и краем агара должно быть не менее 15 мм.

Перевернуть чашки и сразу же поместить их в термостат. Инкубировать при 37°C 24 часа. По окончании инкубации измерить диаметры зон подавления роста. Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *B. pseudomallei* приведены в Таблице 4.

Таблица 4 – Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *B. pseudomallei*

Антибактериальный препарат	Содержание (мкг)	Диаметр зоны подавления роста (мм)*		
		резистентный	умеренно-резистентный	чувствительный
Амоксициллин/клавуланат	20/10	≤13	14-17	≥18
Цефтазидим	30	≤14	15-17	≥18
Доксициклин	30	≤12	13-15	≥16
Имипенем	10	≤13	14-17	≥18
Меропенем	10	≤12	13-15	≥16
Триметоприм/сульфаметоксазол	1.25/23.75	≤10	11-15	≥16

\*Пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) на агаре Мюллера-Хинтона

## 2.5 Выделение ДНК

Из бактериальных культур готовили в микроцентрифужных пробирках суспензии плотностью  $2 \times 10^9$  м.к./мл в 0,15 М NaCl, pH 7,2. Суспензии клеток *Burkholderia* spp. обеззараживали мертиолятом натрия в конечной концентрации 0,01 % и прогревом при 65°C в течение 30 минут (МУ 1.3.2569-09).

### 2.5.1 Метод мембранных колонок на основе диоксида кремния

Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов для выделения геномной ДНК GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Литва) в соответствии с инструкцией производителя.

### 2.5.2 Выделение ДНК методом протеиназного лизиса

Выделение ДНК из чистых культур проводили методом протеиназного лизиса [Zakharova et al., 2017]. 200 мкл обеззараженной бактериальной суспензии в 0,85 % NaCl pH 7,2 плотностью  $2 \times 10^9$  м.к./мл смешивали с равным объемом лизирующего буфера (20 мМ трис-HCl, 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мг/мл желатина, 0,9% Nonidet P-40, 0,9% Твин 20, 150 мкг/мл протеиназы К), аккуратно перемешивали, инкубировали при 65°C 120 мин и прогревали при 99°C 30 мин. Пробы центрифугировали (10 000 об/мин, 1 мин), супернатант использовали для ПЦР.

## 2.6 Определение концентрации ДНК

Концентрацию геномной ДНК измеряли при помощи флуориметра Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием набора Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США), праймеров – с использованием набора Qubit

ssDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США), в соответствии с рекомендациями производителя.

## **2.7 Идентификация культур методом ПЦР и анализ продуктов амплификации**

Для идентификации выделенных культур использовали «Набор реагентов для выявления и дифференциации буркхольдерий группы *«pseudomallei»* в формате мультиплексной полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией «АмплигенБуркхольдерии группы *«pseudomallei»* βL B/D - EPh» по ТУ 21.20.23-014-01898084-2016» (Регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7785 от 07.11.2018 г.), разработанный в ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Постановку реакции и учет результатов проводили в соответствии с прилагаемой инструкцией. Паттерн амплификации генов β-лактамаз класса В и D: *B. pseudomallei* три фрагмента размером 727 п.н., 440 п.н. и 352 п.н.; *B. mallei* – два паттерна: два фрагмента размером 727 п.н. и 352 п.н. или один фрагмент размером 727 п.н.; *B. thailandensis* – два фрагмента размером 440 п.н. и 352 п.н.; штаммы комплекса «*B. ceracia*» – один фрагмент 352 п.н.

Детекцию результатов проводили электрофоретически в 1,5% агарозном геле, содержащем этидиум бромид (0,5 мкг/мл), в 1x TAE Buffer (Tris-acetate-EDTA) (Thermo Fisher Scientific, США) при напряженности поля 5 V/см. Для визуализации использовали гель-документирующую систему «Gel Doc» («BioRad», США).

## **2.8 Идентификация *Burkholderia* spp. по профилю биохимической активности**

Биохимическую идентификацию исследуемых культур проводили с использованием микробиологического анализатора VITEK® 2 и карт GN

(bioMérieux), предназначенных для идентификации клинически значимых ферментирующих и неферментирующих грамотрицательных палочек.

Штаммы выращивали на агаре Luria при температуре 37°C. Бактериальные суспензии плотностью 0,50–0,63 по McFarland готовили в стерильном 0,85 % растворе NaCl pH 7.0, для контроля использовали денситометр VITEK® 2 DensiCHEK™ Plus. Карты заполняли в соответствии с инструкцией изготовителя. Полученные данные анализировали при помощи программного обеспечения VITEK® 2 (версии не ниже 07.01.1.19.18).

## 2.9 Секвенирование и сборка генома

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. 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].

## 2.10 Мультилокусное сиквенс-типирование

Сиквенс-типирование проводили по схеме D. Godoy [Godoy et al., 2003] с модификациями E. Price [Price et al., 2016].

Для амплификации локусов консервативных генов *ace* (acetoacetyl coenzyme A reductase), *gluB* (glutamate synthase) использовали праймеры и параметры ПЦР, предложенные D. Godoy, для *gmhD* (ADP-L-glycero-D-manno-heptose 6-epimerase), *lepA* (GTP-binding elongation factor), *lipA* (lipoic acid synthetase), *narK* (nitrite extrusion protein) и *ndh* (NADH dehydrogenase) – предложенные E. Price. Полученные ампликоны очищали электрофоретически.

Реакцию циклического секвенирования осуществляли с использованием набора Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific,

США). Учет результатов проводили при помощи генетического анализатора ABI Prism 3130 (Applied biosystems, США). Анализ хроматограмм и выравнивание нуклеотидных последовательностей, полученных в результате секвенирования каждого локуса, осуществляли при помощи программного пакета MEGA 7. Аллели исследуемых локусов определяли путем сравнения с последовательностями, представленными в базе данных *Burkholderia pseudomallei* MLST Data bases (<https://pubmlst.org/bpseudomallei/>).

## **2.11 Биоинформатические ресурсы и инструменты, использованные для конструирования праймеров**

Для подбора олигонуклеотидных праймеров для ПЦР и оценки их специфичности использовали инструмент Primer-BLAST NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), для LAMP – Primer Explorer V4 (<https://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/>).

## **2.12 Параметры амплификации с дизайнерскими праймерами и визуализация продуктов**

Реакционная смесь для ПЦР включала: 10 мкл 2x PCR Master Mix Solution (i-Taq™) (iNtRON Biotechnology, Корея), по 1 мкл 10 мкМ праймеров F7 и R7, 6 мкл деионизированной воды, 2 мкл экстрагированной ДНК (14-20 нг), общий объем реакционной смеси 20 мкл. Температурный цикл: 94°C / 5 минут; [94°C / 20 с, 56°C / 10 с, 72°C / 20 с] x 35 циклов; 72 °C / 4 минуты. Детекцию результатов проводили электрофоретически в 1,5% агарозном геле, содержащем этидиум бромид (0,5 мкг/мл).

Реакционная смесь LAMP включала: 12,5 мкл колориметрической смеси WarmStart LAMP 2X Master Mix (New England Biolabs, США), 2,5 мкл смеси праймеров, 1 мкл (7-12 нг) матричной ДНК и воду MiliQ (Promega, США) до объема 25 мкл. После оптимизации температурно-временных параметров, амплификацию проводили при 65 °C в течение 40 минут с последующей инкубацией при 95 °C в

течение 2 минут для прекращения реакции. Учет результатов проводили визуально по цвету реакционной смеси (розовый – отрицательный, желтый – положительный) и электрофоретически в 2,5% агарозном геле с последующим окрашиванием этидиум бромидом.

### **2.13 Рекомбиназная полимеразная амплификация**

Постановку реакции осуществляли с использованием набора для амплификации ДНК TwistAmp (TwistDx Ltd., Великобритания) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Прямой, обратный праймеры и зонд добавляли по 10 мкМ каждого. Были использованы праймеры и зонд, разработанные Y. Peng с соавторами [Peng et al., 2019] и синтезированные в IDT (Integrated DNA Technologies, Inc., USA). Визуализацию результатов проводили на хроматографических полосках с латеральным потоком Milenia®HybriDetect (Milenia Biotec GmbH, Германия) в соответствии с инструкцией.

### **2.14 Расчет показателей критериев диагностической ценности тестов и статистический анализ**

Показатели критериев диагностической ценности тестов рассчитывали по формулам, определенным ГОСТ Р 53022.3-2008.

Статистический анализ проводили с использованием инструмента «регрессия» Microsoft Excel 2013.

### ГЛАВА 3 ФОРМИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ КЛИНИЧЕСКИХ И ПОЧВЕННЫХ ШТАММОВ *Burkholderia spp.*

#### 3.1 Сравнительный анализ эффективности методов пробоподготовки для выделения *B. pseudomallei* из объектов окружающей среды

Для выбора оптимального метода пробоподготовки для выделения культур *B. pseudomallei* из объектов внешней среды мы сравнили три способа первичной обработки проб почвы, описанные в разделе 2.3 главы Материалы и методы. Параллельно тремя методами было исследовано 78 образцов. Культивирование обработанных проб проводили по схеме, разработанной с учетом выявленных фенотипических особенностей клинических штаммов возбудителя (Рисунок 3). На этапе микробиологического анализа был проведен ряд дифференцирующих тестов, включающих рост на среде Эшдауна с гентамицином и без него при 42°C, определение чувствительности выросших культур к полимиксину В и амоксициллин/клавулонату, по результатам которых отбирали культуры для дальнейшей идентификации.

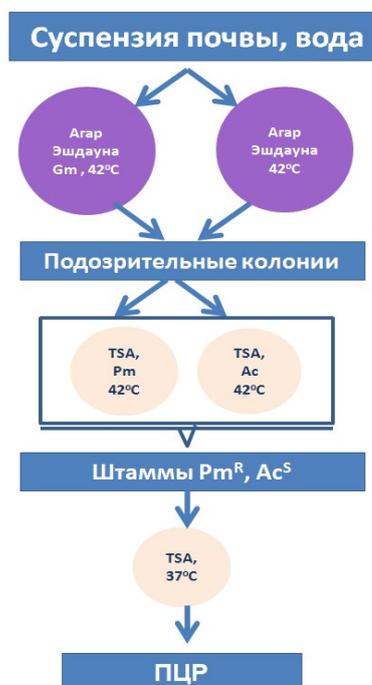


Рисунок 3 – Схема выделения *B. pseudomallei* из объектов внешней среды

После обработки проб раствором TBSS-C50, культивирования и постановки дифференцирующих тестов методом ПЦР выявлен 1 штамм *B. pseudomallei*.

Результаты применения обработки раствором PEG-DOC и метода прямого культивирования оказались сопоставимы: при использовании каждого метода были выделены чистые культуры *B. pseudomallei* из 4 проб почвы (Рисунок 4).

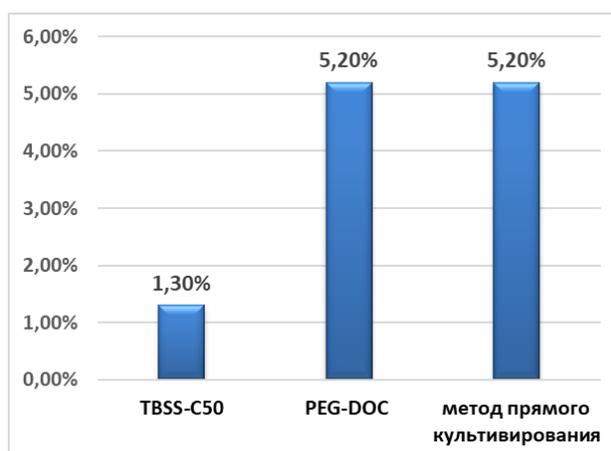


Рисунок 4 – Соотношение долей проб, из которых выделены культуры *B. pseudomallei*, при использовании трех методов пробоподготовки почвы

При этом самым длительным и трудоемким оказался метод с использованием TBSS-C50, а наиболее простым в исполнении – метод прямого культивирования. В связи с этим при проведении дальнейших исследований по выявлению возбудителя мелиоидоза в пробах внешней среды использовали метод прямого культивирования.

По отработанному алгоритму на момент написания диссертационной работы был выделен и идентифицирован 21 почвенный штамм возбудителя мелиоидоза и 6 штаммов *B. thailanlensis*.

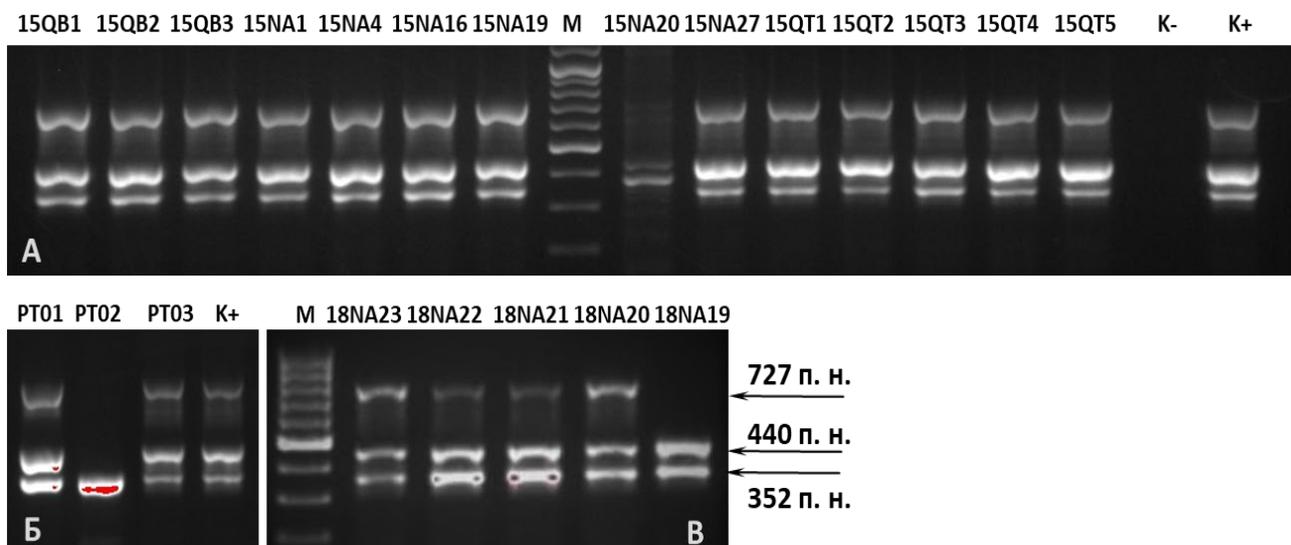
### 3.2 Формирование коллекции штаммов *Burkholderia* spp.

За период выполнения настоящей работы на базе Института тропической медицины Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и

технологического центра (г. Ханой, СРВ) автором была сформирована коллекция штаммов *Burkholderia* spp., включающая 114 клинических изолятов, 21 почвенный штамм *B. pseudomallei* и 6 штаммов *B. thailandensis*. Клинические штаммы были выделены и идентифицированы как *B. pseudomallei* в лабораториях госпиталей 8 провинций центрального и северного Вьетнама в 2015-2020 гг.: Nghệ An (n 69), Hà Tĩnh (n 6), Quảng Bình (n 6), Quảng Trị (n 11) Yên Bái (n 6), Quảng Ninh (n 4), Vĩnh Phúc (n 9) и Phú Thọ (n 3). Почвенные штаммы *B. pseudomallei* были выделены в Nghệ An (n 11), Hà Tĩnh (n 1), Quảng Bình (n 1), Vĩnh Phúc (n 9) и Bắc Giang (n 1); *B. thailandensis* – Nghệ An (n 5) и Quảng Bình (n 1).

### 3.3 Идентификация штаммов *Burkholderia* spp. молекулярно-генетическими методами

В большинстве клинических лабораторий Вьетнама основным методом определения видовой принадлежности штаммов от больных с подозрением на мелиоидоз является описанный выше метод презумптивной идентификации, часто с подтверждением на автоматизированном биохимическом анализаторе. Поскольку известно, что данные методы не дифференцируют близкородственные виды *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*, а также, в отдельных случаях, *B. ceracia*, было необходимо верифицировать видовую принадлежность исследуемых штаммов более надежными генодиагностическими методами. С этой целью все штаммы были протестированы с использованием зарегистрированного в Российской Федерации набора реагентов с электрофоретической детекцией результатов «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL B/D - EPh», который позволяет идентифицировать в формате мультиплексной ПЦР *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, а также дифференцировать перечисленные виды между собой и с буркхольдериями комплекса «*ceracia*» по индивидуальному для каждого вида набору фрагментов генов β-лактамаз молекулярных классов B и D [Zakharova et al., 2017]. Примеры результатов исследования показаны на Рисунке 5.



А – среди паттернов *B. pseudomallei* показан результат амплификации ДНК штамма неизвестного вида 15NA20,  
 Б – штамма *B. cepacia* PT02,  
 В – штамма *B. thailandensis* 18NA19.

Рисунок 5 – Выборочные результаты идентификации клинических штаммов с использованием набора «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL B/D - EPh»

В результате проведенного анализа установлено, что из 114 исследованных клинических изолятов 111 штаммов являются *B. pseudomallei*, штамм 18NA19 – *B. thailandensis*, штамм PT02 определен как *B. cepacia*, еще один штамм (15NA20) не относится к видам, идентифицируемым использованной генодиагностической тест-системой.

Почвенные изоляты, выделенные при исследовании образцов внешней среды из провинций центрального и северного Вьетнама, и подозрительные на принадлежность к виду *B. pseudomallei* по результатам скрининга бактериологическим методом, также были идентифицированы методом ПЦР с использованием набора «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL B/D

- EPh». Выделенные и идентифицированные почвенные штаммы возбудителя мелиоидоза и *B. thailanlensis* перечислены в Таблице 2.

Геномная ДНК отдельных клинических и всех почвенных штаммов возбудителя мелиоидоза, а также отдельных штаммов *B. thailanlensis* была секвенирована. Сравнение полученных полногеномных последовательностей с базой данных нуклеотидных последовательностей NR GenBank NCBI подтвердило видовую принадлежность штаммов, установленную методом ПЦР. Шотган полногеномные последовательности ряда штаммов депонированы в GenBank NCBI (номера доступа: *B. pseudomallei* – QLUX00000000, QLUY00000000, QLVA00000000, QLVB00000000, QLVC00000000, WOWY00000000, WSPI00000000, WSRT00000000, WSRU00000000, WSRV00000000, WTLF00000000, WUMQ00000000, WUMR00000000; *Burkholderia* spp. – WUMS00000000; *B. thailandensis* – WOWZ00000000, WOXA00000000 и *B. ceparica* - QLUZ00000000).

### **3.4 Использование коллекции *Burkholderia* spp. для тестирования экспериментальных серий набора для проведения латекс-агглютинации**

На выборке 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. На основании результатов первого этапа идентификации почвенных изолятов, позволяющих определить родовую принадлежность, для проведения анализа было отобрано 103 почвенных штамма *Burkholderia* spp. Видовую принадлежность определяли методом мультиплексной ПЦР и параллельно тестировали в реакции латекс-агглютинации (РЛА).

В результате методом ПЦР было идентифицировано 4 штамма *B. pseudomallei*, 62 – *B. thailandensis*, 23 – *B. ceparica* и 14 штаммов других видов.

Все штаммы *B. pseudomallei* в РЛА<sup>1</sup> показали положительный результат на 4 креста, 10 штаммов *B. thailandensis* и один *B. ceracia* – на 3 креста, остальные 88 штаммов показали отрицательные результаты, что позволило разработчикам оценить специфичность разрабатываемого диагностикума на свежевыделенных штаммах различных видов рода *Burkholderia*.

Штаммы возбудителя мелиоидоза дополнили коллекцию (номера 1264, 1265, 128 и 167). Для положительных в РЛА штаммов *B. thailandensis* и *B. ceracia* планируется проведение анализа на наличие *B. pseudomallei*-подобного капсульного полисахарида.

Таким образом созданная коллекция штаммов возбудителя мелиоидоза и близкородственных буркхольдерий, обеспечивает представительную выборку для оценки характеристик разрабатываемых средств обнаружения *B. pseudomallei*.

### **3.5 Оценка влияния методов идентификации на эффективность выявления *Burkholderia pseudomallei***

Для исследования влияния методов идентификации на эффективность выявления атипичных штаммов *B. pseudomallei* был проведен сравнительный анализ результатов биохимического профилирования у двух групп штаммов. Первую группу составили 30 клинических изолятов, идентифицированных в лабораториях госпиталей методом презумптивной идентификации и/или на автоматизированном биохимическом анализаторе. Видовая принадлежность штаммов этой группы была верифицирована нами методом ПЦР, в отдельных случаях – полногеномным секвенированием. Вторую группу составили 12 почвенных штаммов (6 штаммов *B. pseudomallei* и 6 штаммов *B. thailanlensis*), которые были выявлены методом ПЦР среди культур, подозрительных на принадлежность к виду *B. pseudomallei* (Таблица 5).

---

<sup>1</sup> Постановку РЛА и учет результатов проводил разработчик диагностикума – н.с. ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора Фролов Д.М.

Таблица 5 – Результаты идентификации исследованных штаммов на анализаторе VITEK® 2

Штамм	Определенный вид, вероятность (%)	Профиль биохимической активности*																							
		IARL	dCE	AGL	GGT	dMA	dMA	dMN	ProA	LIP	TyrA	URE	dSO	dTA	CIT	MNT	NAG	PHO	GlyA	IHISa	CMT	BGU	O129	IML	ELL
<b>Клинические штаммы <i>B. pseudomallei</i></b>																									
18NA01	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
18NA02	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18NA03	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18NA04	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
18NA05	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
18NA06	<i>B. pseudomallei</i> , (97)	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
18NA07	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
18NA09	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
18NA10	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
18NA12	<i>B. pseudomallei</i> , (89)	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
18NA13	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
18NA14	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
18NA15	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
18NA16	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18NA17	<i>B. pseudomallei</i> , (97)	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
18NA18	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
18NA20	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
18NA21	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
18NA22	<i>B. pseudomallei</i> , (96)	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
18NA23	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18PT03	<i>B. pseudomallei</i> , (97)	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
19VP01	<i>B. pseudomallei</i> , (98)	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
19VP02	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
20QN01	<i>B. pseudomallei</i> , (93)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
20QN02	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
20QN03	<i>B. pseudomallei</i> , (97)	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
20QN06	<i>B. cepacia</i> / <i>B. pseudomallei</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19YB01	<i>B. pseudomallei</i> , (96)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19YB02	<i>B. pseudomallei</i> , (94)	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19YB04	<i>B. pseudomallei</i> , (94)	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
20YB01	<i>B. pseudomallei</i> , (96)	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Клинические штаммы <i>B. thailandensis</i></b>																									
18NA19	<i>B. pseudomallei</i> , (97)	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
<b>Клинические штаммы <i>B. cepacia</i></b>																									
PT02**	<i>B. pseudomallei</i> , (97)	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
PT02***	<i>B. cepacia</i> (91)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-

Таблица 5 (Продолжение)

Штамм	Определенный вид, вероятность (%)	Профиль биохимической активности*																								
		IARL	dCEL	AGLT	GGT	dMAL	dMAN	dMNE	ProA	LIP	TyrA	URE	dSOR	dTAG	CIT	MNT	NAGA	PHOS	GlyA	IHSa	CMT	BGUR	O129R	IMI-Ta	ELLM	
<b>Почвенные штаммы <i>B. pseudomallei</i></b>																										
128	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1112	<i>Providencia stuartii</i> , (99)	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
1181	<i>B. pseudomallei</i> , (98)	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
1182	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	
1264	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	
2750	<i>B. cepacia</i> group (slashline)	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	
<b>Почвенные штаммы <i>B. thailandensis</i></b>																										
1172	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	
1341	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	
1260	<i>B. pseudomallei</i> (98)	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	
1264P	<i>B. pseudomallei</i> , (98)	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	
1342	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	
1740	<i>B. pseudomallei</i> , (99)	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	
<b>Примечания</b>																										
* В таблице не показаны единообразные для всех штаммов результаты: положительные для тестов dGLU, BNAG, BAap, SUCT, SAC и ILATk; отрицательные – ILATa, GGAA, BGLU, BGAL, 5KG, PLE, OFF, ODC, LDC, H2S, dTRE, BXYL, AGLU, AGAL, APPA, ADO и PyrA.																										
**Результат идентификации свежесывающегося штамма PT02																										
*** Результат идентификации штамма PT02 после 3 месяцев хранения.																										

Биохимическое профилирование с использованием автоматического микробиологического анализатора VITEK® 2 и карт GN (bioMérieux) показало, что подавляющее большинство исследованных клинических изолятов возбудителя мелиоидоза обладают типичным спектром биохимической активности. Корректно, с формулировкой «отличная идентификация» были определены 25 штаммов (84,4 %), «хорошая идентификация» - 4 штамма (12,5 %). Некорректно был определен только один штамм (3,1%), который система отнесла сразу к нескольким видам – комплекса «*B. cepacia*» и *B. pseudomallei* (Таблица 5). Клинический изолят 18NA19, идентифицированный нами в ПЦР как *B. thailandensis* был ожидаемо отнесен к виду *B. pseudomallei*, поскольку ни одна из автоматизированных систем биохимической идентификации эти виды не дифференцирует. Показатель диагностической эффективности биохимического профилирования в группе клинических штаммов составил 97%.

Среди 6 исследованных почвенных штаммов возбудителя мелиоидоза 4 (67%) были определены корректно с вероятностью 98–99%, один штамм система с высокой вероятностью определила как *Providencia stuartii*, еще один – как виды комплекса «*B. ceracia*» (*Bcc*) (Таблица 5). Все почвенные штаммы *B. thailandensis*, так же, как и клинический, были определены как *B. pseudomallei*. То есть, 33% штаммов, выделенных из почвы, имели атипичные профили биохимической активности, не представленные базе данных VITEK® 2. Показатель диагностической эффективности биохимического профилирования в группе почвенных штаммов составил 42%.

Суммарно в обеих группах при проведении биохимического профилирования было получено 7 ложноположительных, 3 ложноотрицательных, 1 истинно отрицательный и 32 истинно положительных результата. На основании чего были рассчитаны показатели критериев диагностической ценности теста. Диагностическая эффективность идентификации *B. pseudomallei* с использованием VITEK® 2 составила 79%, предсказательная ценность положительного результата – 82%, предсказательная ценность отрицательного результата – 25%.

Полученные данные свидетельствуют, что фенотипические методы идентификации, широко используемые в клинических лабораториях Вьетнама потенциально не выявляют до 75% атипичных штаммов возбудителя мелиоидоза.

### **3.6 Особенности биохимических профилей штаммов *Burkholderia* spp., идентифицированных VITEK® 2 некорректно**

При проведении анализа профилей биохимической активности нами было обнаружено, что все исследованные штаммы *B. thailandensis*, в отличие от штаммов *B. pseudomallei*, способны утилизировать малонат (результаты теста MNT в Таблице 5 выделены зеленым цветом). В доступной литературе сведений по этому вопросу обнаружено не было, возможно, в настоящей работе впервые выявлен признак, дифференцирующий эти два вида и входящий в панель тестов для автоматизированного анализа.

Штамм PT02 был изолирован от пациента с фатальным сепсисом. Биохимическая идентификация выделенного штамма с помощью автоматического анализатора VITEK® 2, проведенная в лаборатории госпиталя, определила PT02 с вероятностью 97% как *B. pseudomallei*. Выделенный штамм обладал резистентностью к гентамицину, колистину, амоксициллин/клавулонату и был чувствителен к цефтазидиму, меропенему, доксициклину и котримаксозолу.

Результаты проведенного нами ПЦР-анализа, а также особенности морфологии колоний на агаре Эшдауна и спектр антибиотикорезистентности штамма вызвали сомнения в корректности результатов его биохимической идентификации.

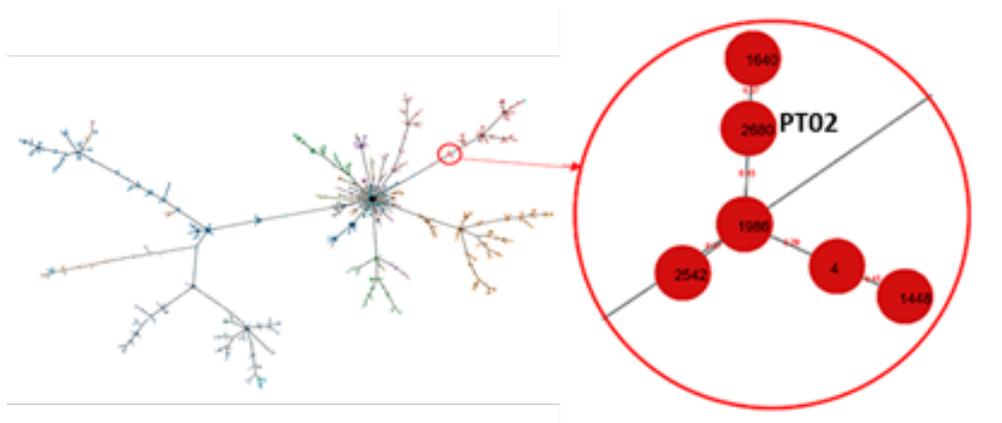
При повторной биохимической идентификации этого штамма через три месяца после первого тестирования и уже полученных результатов идентификации методом ПЦР система VITEK® 2 GN определила исследуемый изолят как *B. ceracia* с вероятностью 91% и штамм был обозначен как *B. ceracia* PT02. Проведенный нами сравнительный анализ первого и повторного профилей биохимической активности штамма показал изменение первоначально положительных результатов тестов TugA (тирозинариламидаза) и NAGA ( $\beta$ -N-ацетилгалактозаминидаза) на отрицательные.

### 3.7 Типирование штамма *Burkholderia ceracia* PT02

Для окончательной верификации видовой принадлежности штамма *B. ceracia* PT02 была секвенирована его геномная ДНК (GenBank QLUZ00000000, PubMLST ID 2680), проведено сравнение полногеномной последовательности с базой данных NR GenBank NCBI и генотипирование по схеме *Bcc*MLST (анализ консервативных генов *atpD*, *gltB*, *gyrB*, *lepA*, *phaC*, *recA* и *trpB*) [Spilker et al., 2009], что подтвердило принадлежность штамма к виду *B. ceracia*. Кроме того, мультилокусное сиквенс-типирование выявило у этого штамма новые аллельные варианты генов *gltB* и *gyrB*. Результирующему аллельному профилю *B. ceracia*

PT02 назначен сиквенс-тип ST1400, который на тот момент не был представлен базе данных PubMLST.

Сравнение аллельных профилей PT02 и всех 2688 штаммов, представленных в базе данных *BccMLST* на момент анализа, при помощи программы eBURST показало результаты, не противоречащие предыдущим: PT02 был расположен на ветви филогенетического дерева, представленной в абсолютном большинстве штаммами *B. serasia*, и вошел в клональный комплекс штамма *B. serasia* CVS136, выделенного из госпитальной внешней среды на Тайване. При этом наиболее близкими PT02 оказались корневой штамм CVS136 и штамм из Бельгии R-66653 (при коэффициентах генетической дистанции 0.43 и 0.57, соответственно) (Рисунок 6). Все штаммы этого клонального комплекса имеют клиническое происхождение: штаммы *B. serasia* R-52513, R-66653 выделены в Бельгии от пациентов без кистозного фиброза (NON), CEP0615 – в США (с кистозным фиброзом) и NML171677 – от больного (NON) с сепсисом в Канаде.



Обозначения: Красный круг выделяет клональный комплекс *B. serasia* CVS136 (id:1986), включающий изолят PT02 (id:2680)

Рисунок 6 – Дендрограмма 2688 штаммов буркхольдерий комплекса «*B. serasia*», построенная с помощью алгоритма eBURST в соответствии с аллельными профилями *BccMLST*

Филогенетический анализ объединенных последовательностей консервативных генов схемы *BccMLST* 46 штаммов *Bcc* различных геномов из базы *BccMLST* и исследуемого изолята методом максимального правдоподобия разместил PT02 на ветви филогенетического дерева среди штаммов *B. serasia* (геномовар I) (bootstrap = 1000) (Рисунок 7).

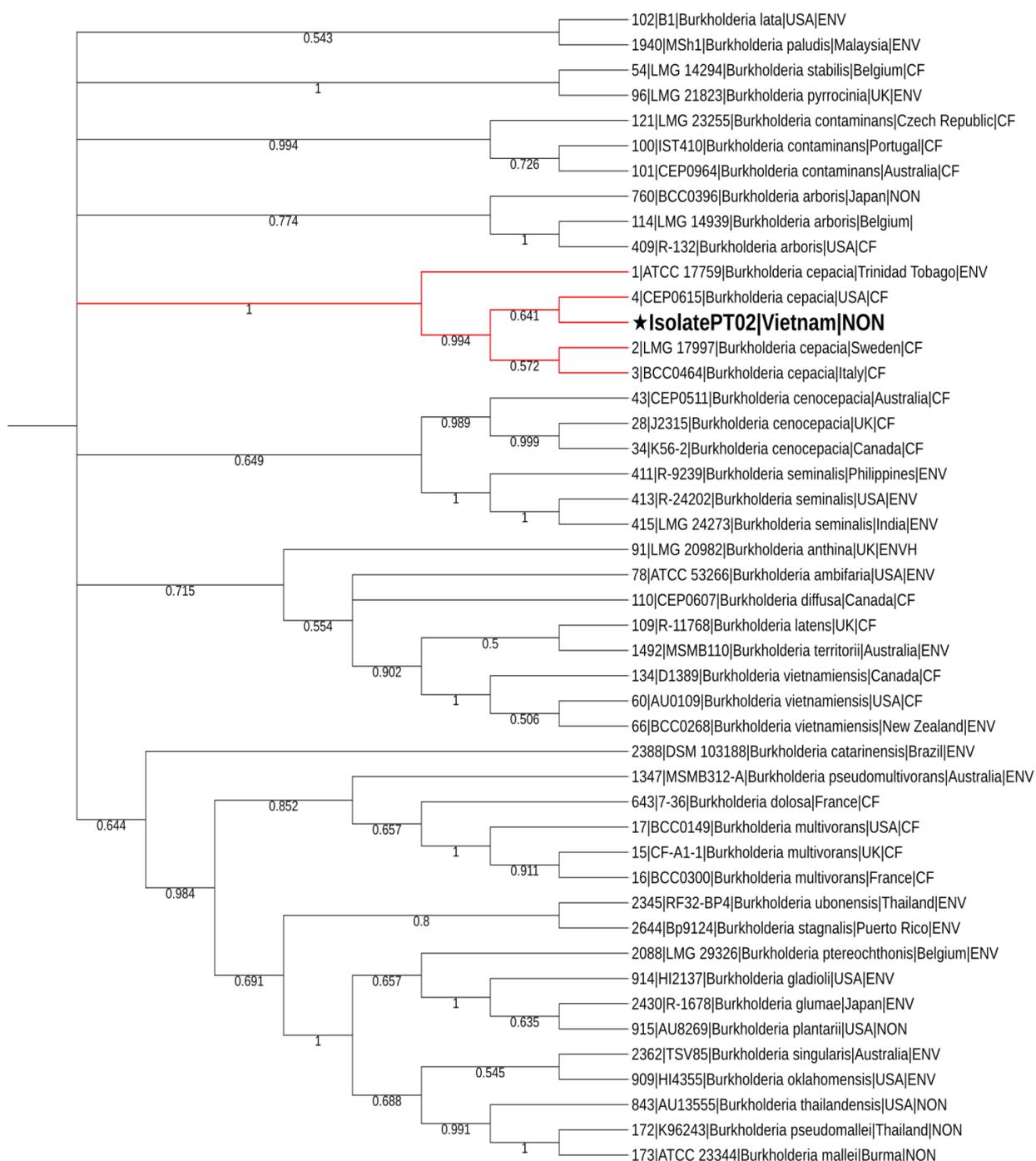


Рисунок 7 – Филогенетическое дерево, полученное путем сравнительного анализа объединенных последовательностей консервативных генов 46 штаммов *Bcc* различных геномоваров из базы *BccMLST* и исследуемого изолята методом максимального правдоподобия

Таким образом, комплексное исследование с применением молекулярно-генетических методов окончательно подтвердило принадлежность штамма PT02 к виду *B. cepacia*.

## ГЛАВА 4 АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ВЬЕТНАМСКИХ ШТАММОВ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI*, ИМЕЮЩИХ ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

### 4.1 Анализ морфологической изменчивости

Анализ характера роста на агаре Эшдауна 18 клинических штаммов, выделенных в провинциях Quảng Trị и Quảng Bình и Nghe An показал следующее: 9 штаммов (50%) образовывали микроколонии (Рисунок 8 – А), 5 штаммов (28%) на одной чашке образовывали колонии 2 морфотипов (Рисунок 8 – Б), 4 штамма (22%) – колонии более 3 морфотипов (Рисунок 8 – В).

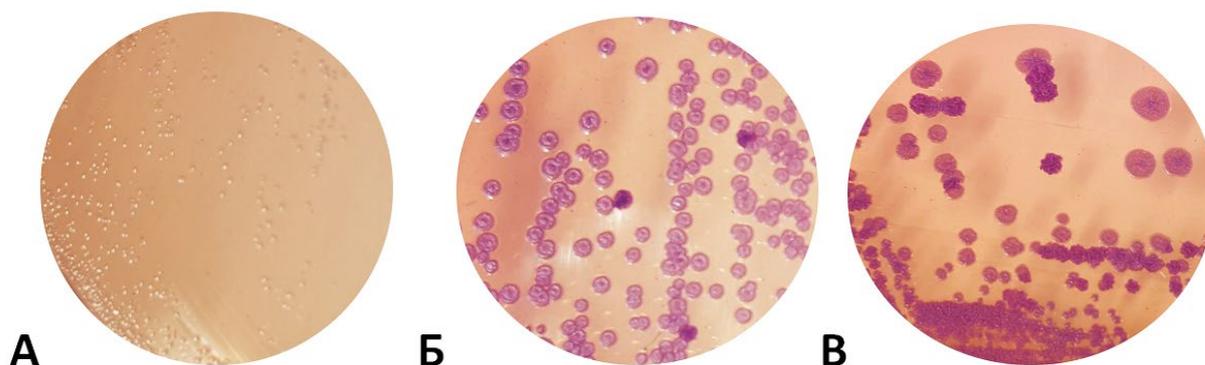


Рисунок 8 – Морфология роста 96-часовых чистых культур клинических штаммов *B. pseudomallei*, выращенных при 37°C на агаре Эшдауна

Колонии в S-форме на агаре Эшдауна встречались редко и были представлены двумя типами, обозначенными S1 и S2. Колонии в R-форме отличались значительно большим разнообразием. По морфологии мы условно выделили три основных типа колоний для R-формы: «блинчики» (pancake) – округлые, тонкие, плоские, полупрозрачные колонии с разной степени

выраженным центром или без него (6 видов – P1-P6); «пуговицы» (button) – округлые, непрозрачные колонии с валиком по окружности (5 видов – B1-B5); гвоздики (carnation) – складчатые колонии, возвышающиеся над агаровой поверхностью, похожие на махровые цветы (6 видов – C1-C6). Кроме того, были обнаружены два промежуточных типа колоний (intermediate), центр которых был в R-форме, а периферия – в S-форме (I1, I2) (Рисунок 9).

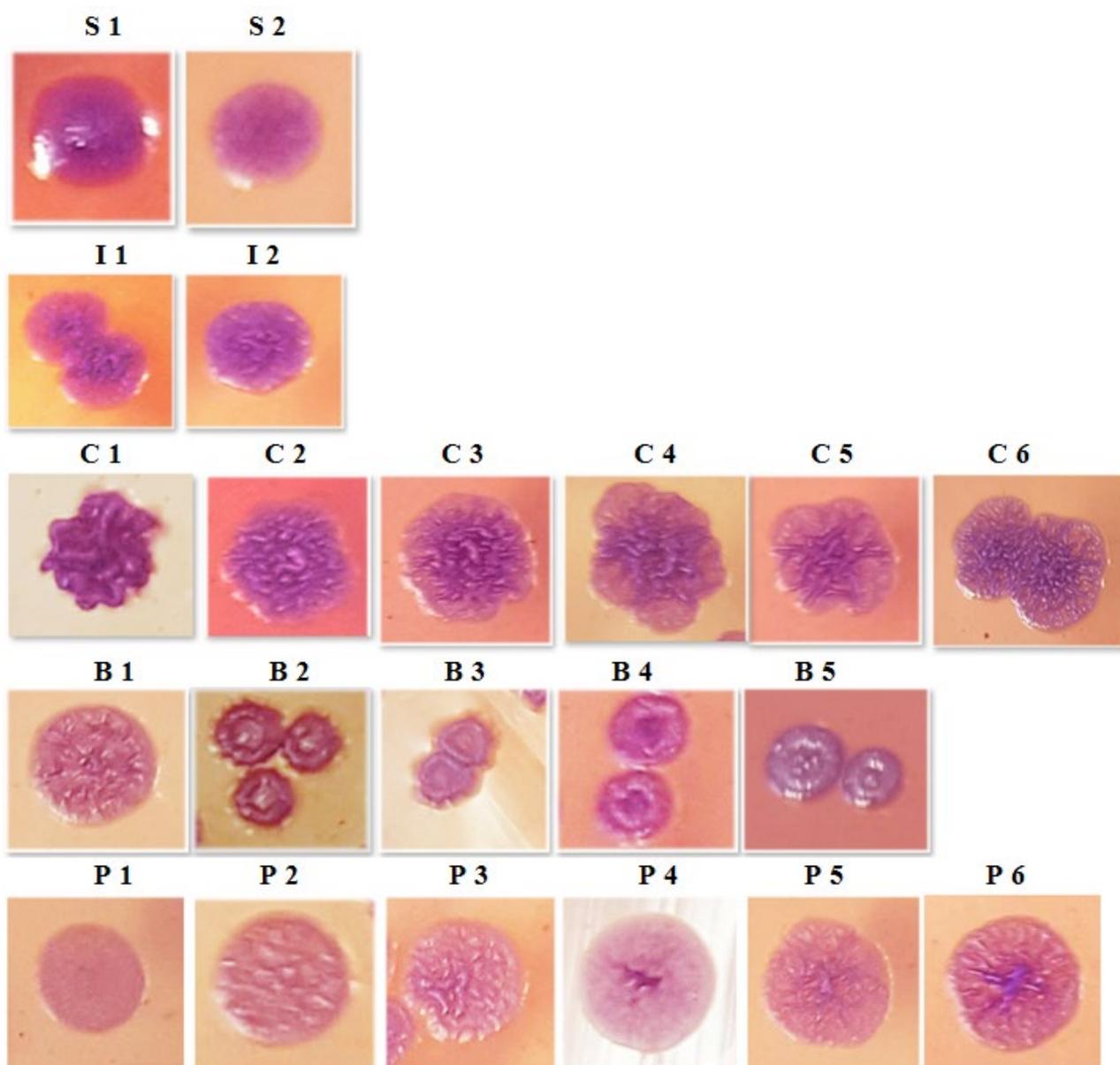
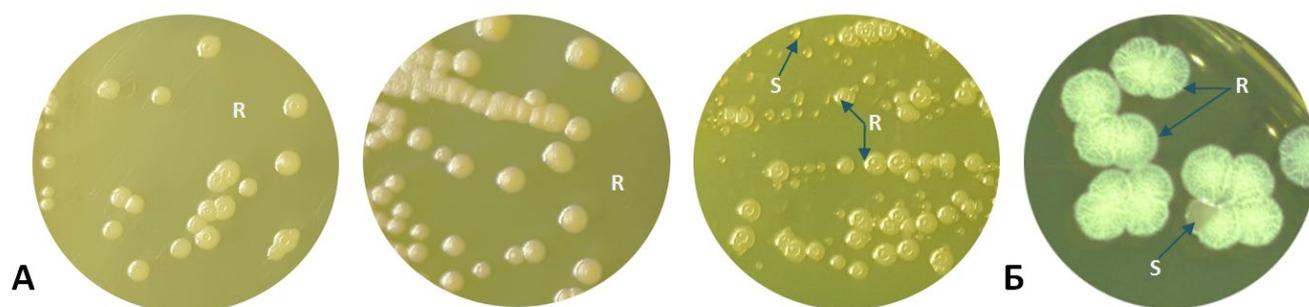


Рисунок 9 – Разнообразие морфотипов вьетнамских штаммов *B. pseudomallei* (96-часовые культуры, выращенные при 37°C на агаре Эшдауна)

Необходимо отметить, что распространенный среди вьетнамских штаммов *B. pseudomallei* морфотип В («пуговицы») отсутствует среди основных морфотипов штаммов *B. pseudomallei* северо-восточного Таиланда.

Для всех штаммов было характерно преобладание одного из морфологических вариантов колоний (70-90% колоний), при отсутствии единого для всех штаммов доминантного морфотипа.

На колумбийском и триптиказо-соевом агаре морфологическая диссоциация колоний *B. pseudomallei* также присутствует, но разнообразие морфотипов менее выражено (Рисунок 10). У исследованных клинических изолятов на коммерческих средах, также как и на агаре Эшдауна, наблюдали межштаммовые отличия в морфологии роста при идентичных условиях культивирования (Рисунок 10 – А).



А – колумбийский агар

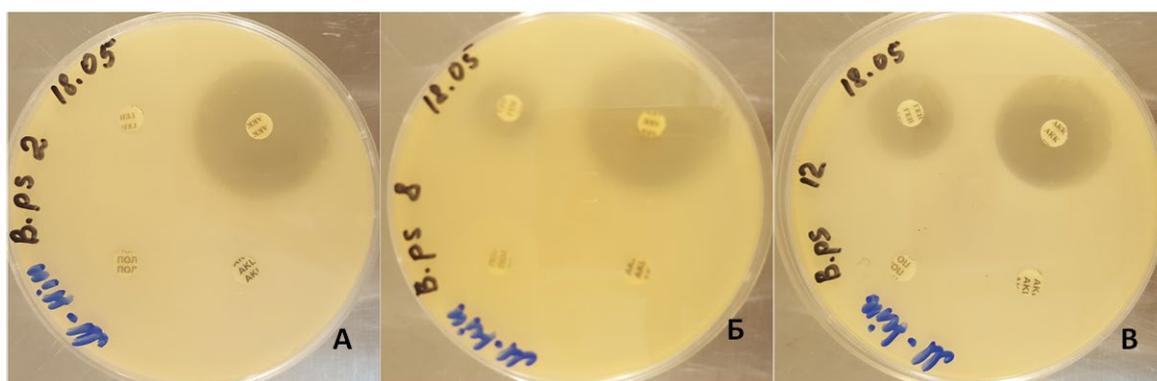
Б – триптиказо-соевый агар с 4% глицерина

(48-часовые культуры, выращенные при 37°C)

Рисунок 10 – Характер роста клинических штаммов *B. pseudomallei* на коммерческих средах

#### 4.2 Анализ чувствительности клинических штаммов *Burkholderia pseudomallei* к антибиотикам, имеющим диагностическое значение

Во Вьетнаме в клинической лабораторной практике 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 (Pol), гентамицину (Gm), амоксициллину (AO) и амоксициллин/клавулонату (AOC). В связи с этим мы оценили спектр устойчивости к перечисленным антибиотикам у 62 клинических штаммов, перечисленных в Таблице 5 диско-диффузионным методом, 56 (90,3%) из которых показали ожидаемый фенотип Pol<sup>R</sup>Gm<sup>R</sup>AO<sup>R</sup>AOC<sup>S</sup> (Рисунок 11 – А), 3 (4,8%) оказались умеренно чувствительными (Рисунок 11 – Б) и два штамма (3,3%) – чувствительными к гентамицину (Рисунок 11 – В). Кроме того, было проведено тестирование этих же штаммов на чувствительность к клинически значимым антибиотикам – цефтазидиму и имипенему. Обобщенные данные проведенного анализа представлены в Таблице 6.



А – типичная антибиотикограмма (Gm<sup>R</sup>, AOC<sup>S</sup>, Pol<sup>R</sup>, AO<sup>R</sup>);  
 Б, В – атипичные антибиотикограммы: Б – промежуточная устойчивость к гентамицину,  
 В – чувствительность к гентамицину.

Рисунок 11 – Тестирование чувствительности к полимиксину (Pol), гентамицину (Gm), амоксициллину (AO) и амоксициллин/клавулонату (AOC) диско-диффузионным методом

Таблица 6 – Чувствительность штаммов *B. pseudomallei* к диагностическим\* и клинически значимым антибиотикам

Номер штамма	Место сбора (провинция)	Диаметр зоны задержки роста (мм)			
		GN (10 мкг)	CAZ (30 мкг)	AMC (30 мкг)	IPM (10 мкг)
15NA01	Nghe An	R	25	25	33
15QB1	Nghe An	30	21	34	42
15NA16	Nghe An	R	25	27	35
15NA19	Nghe An	R	25	24	32
15NA27	Nghe An	R	25	26	30
16NA02	Nghe An	R	29	26	32
16NA04	Nghe An	R	30	25	34
16NA05	Nghe An	R	30	25	34
16NA06	Nghe An	R	28	25	36
16NA07	Nghe An	R	26	25	34
16NA08	Nghe An	R	24	25	34
16NA09	Nghe An	R	28	26	31
16NA11	Ha Tinh	R	30	25	34
16NA12	Nghe An	R	33	26	32
16NA14	Nghe An	R	25	24	30
16NA15	Nghe An	R	25	26	30
16NA16	Nghe An	28	31	35	32
16NA17	Nghe An	R	26	28	35
16NA18	Nghe An	R	25	26	32
16NA19	Nghe An	R	30	27	36
16NA22	Nghe An	R	30	30	36
16NA23	Nghe An	R	27	25	35
16QT2	Quang Tri	13	27	25	32
16QT3	Quang Tri	14	26	25	31
17NA01	Nghe An	R	26	26	33
17NA02	Nghe An	R	26	25	35
17NA03	Nghe An	R	25	24	30
17NA04	Nghe An	R	28	25	30
17NA05	Nghe An	R	26	28	37
17NA06	Nghe An	R	30	28	32
17NA07	Nghe An	R	26	30	35
17NA08	Nghe An	R	26	28	35
17NA09	Nghe An	R	26	27	30
17NA10	Nghe An	R	30	26	30
17NA11	Nghe An	R	22	20	30
17NA12	Nghe An	R	25	24	34
17NA13	Ha Tinh	R	25	25	30

Таблица 6 (Продолжение)

Номер штамма	Место сбора (провинция)	Диаметр зоны задержки роста (мм)			
		GN (10 мкг)	CAZ (30 мкг)	AMC (30 мкг)	IPM (10 мкг)
17NA14	Ha Tinh	0	24	24	39
17NA16	Nghe An	13	27	25	32
17NA17	Nghe An	0	30	25	30
17NA18	Nghe An	0	20	25	30
17NA19	Nghe An	0	25	21	30
17NA20	Nghe An (Lao)	0	25	22	30
17NA21	Nghe An	0	27	25	35
17NA22	Nghe An	0	32	30	36
17NA23	Nghe An	0	29	26	35
17NA25	Nghe An	0	29	25	35
18NA01	Nghe An	0	26	27	35
18NA02	Nghe An	0	26	26	28
18NA03	Nghe An	0	22	24	32
18NA04	Nghe An	0	28	25	34
18NA05	Nghe An	0	27	26	31
18NA06	Nghe An	0	30	25	32
18NA07	Nghe An	0	30	30	34
18NA08	Nghe An	0	30	26	35
18NA09	Nghe An	0	30	30	32
18NA10	Nghe An	0	27	25	36
18NA11	Nghe An	0	26	25	35
18NA12	Nghe An	0	24	23	32
18NA13	Nghe An	0	20	20	26
18NA14	Nghe An	0	25	24	30
18NA16	Nghe An	0	26	23	30

**Примечания**  
\* Результаты тестирования чувствительности к полимиксину и амоксициллину в таблице не показаны в связи с их единообразием – во всех случаях зона задержки роста отсутствовала.  
GN – гентамицин ( $S \geq 15$ , I – 13-14,  $R \leq 12$ ), CAZ – цефтазидим ( $S \geq 18$ , I – 15-17,  $R \leq 14$ ), AMC – амоксициллин/клавулонат ( $S \geq 18$ , I – 14-17,  $R \leq 13$ ), IPM – имипенем ( $S \geq 18$ , I – 15-17,  $R \leq 14$ ); R – резистентный, S – чувствительный, I – промежуточный.  
Оттенками красного цвета выделены атипичные результаты.

Таким образом, показано, что вьетнамские клинические штаммы возбудителя мелиоидоза, наряду с общими видовыми фенотипическими свойствами, обладают рядом отличительных особенностей. Диапазон

морфологической variability вьетнамской популяции *B. pseudomallei* превышает таковой штаммов северо-восточного Таиланда: обнаружен новый, не описанный ранее морфологический вариант колоний, обозначенный как морфотип В («пуговицы»); единый для популяции доминантный морфотип отсутствует, у разных штаммов преобладающими (свыше 70% колоний) являются разные морфотипы колоний. Обнаружены редко встречающиеся штаммы *B. pseudomallei*, полностью или умеренно (диаметр зоны задержки роста ( $d_{зр}$ ) 28-30 мм) или частично ( $d_{зр}$  13-14 мм) утратившие диагностически значимый признак резистентности к гентамицину, что следует учитывать при выделении и первичной идентификации возбудителя.

## ГЛАВА 5 АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ШТАММОВ ВЬЕТНАМСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI*

### 5.1 Мультилокусное сиквенс-типирование

Внутривидовой генетический полиморфизм оценивали методом мультилокусного сиквенс-типирования (MLST). 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). Результаты проведенного типирования 30 клинических и 17 почвенных штаммов *B. pseudomallei*, выделенных в 7 провинциях центрального и северного Вьетнама по схеме *BpcMLST* [Godoy et al., 2003; Price et al., 2016] обобщены в Таблице 7.

Таблица 7 – Результаты мультилокусного сиквенс-типирования  
вьетнамских штаммов *B. pseudomallei*

Номер штамма*	ST-тип	MLST						
		<i>ace</i>	<i>gltB</i>	<i>gmhd</i>	<i>lepA</i>	<i>lipA</i>	<i>nark</i>	<i>ndh</i>
V1501	85	4	12	14	1	1	2	1
V1502	<b>new 1</b>	4	1	3	3	1	19	3
V1503	389	3	1	11	1	1	4	1
V1504	<b>new 2</b> (1650)	4	12	14	1	1	19	1
V1505	1566	1	26	3	1	5	22	1
V1606	41	1	12	6	1	5	2	1
V1607	948	1	1	2	2	5	29	1
V1608	1566	1	26	3	1	5	22	1
V1609	41	1	12	6	1	5	2	1
V1610	1051	1	12	6	1	5	1	1
V1611	<b>new 3</b>	3	12	6	1	5	2	1
V1512	70	3	4	11	3	5	4	6
V1513	1051	1	12	6	1	1	2	1
V1514	41	1	12	6	1	5	2	1
V1615	1567	4	4	6	1	1	1	1
V1616	1567	4	4	6	1	1	1	1
V1617	<b>new 4</b>	4	26	3	2	1	22	1
V1618	858	1	12	3	2	1	1	1
V1701	46	3	1	2	1	1	3	3

Таблица 7 – Продолжение

Номер штамма	ST-тип	MLST						
		ace	gltB	gmhd	lepA	lipA	nark	ndh
16YB01	46	3	1	2	1	1	3	3
17VP01	351	3	4	4	1	5	4	1
17VP02	541	3	4	2	3	5	4	1
17VP03	549	3	12	2	3	5	4	1
20VP2k	549	3	12	2	3	5	4	1
PT03	541	3	4	2	3	5	4	1
15NA19	46	3	1	2	1	1	3	3
17NA02	new 5	1	2	13	3	1	2	1
17NA07	500	1	4	13	1	1	4	3
17NA16	70	3	4	11	3	5	4	6
17NA19	507	3	1	11	3	5	4	6
4811	46	3	1	2	1	1	3	3
4802	46	3	1	2	1	1	3	3
4702	46	3	1	2	1	1	3	3
4822	46	3	1	2	1	1	3	3
1112	16	1	2	2	1	1	10	1
1182	654	3	2	11	3	5	4	6
128	351	3	4	4	1	5	4	1
7400	201	3	4	11	3	5	4	3
7403	201	3	4	11	3	5	4	3
7801	201	3	4	11	3	5	4	3
7803	541	3	4	2	3	5	4	1
8400	201	3	4	11	3	5	4	3
9500	541	3	4	2	3	5	4	1
9501	541	3	4	2	3	5	4	1
9601	new 6	3	4	2	3	5	4	3
1610	541	3	4	2	3	5	4	1
2001	541	3	4	2	3	5	4	1
*Штаммы, депонированные в международных базах данных под номерами V1501, V1502, V1503, V1504, V1505, V1606, V1607, V1608, V1609, V1610, V1611, V1512, V1513, V1514, V1615, V1616, V1617, V1618, V1701 были переименованы - 15QT1, 15QT2, 15QT3, 15QT4, 15QT5, 16QT1, 16QT2, 16QT3, 16QT4, 15QT6, 16QT5, 15QB, , 15QB2, 15QB3, 16QB1, 16QB2, 16QB3, соответственно.								

Среди 47 исследованных штаммов *B. pseudomallei* выявлено 24 сиквенс-типа, включая 6 новых, ранее не представленных в международной базе данных PubMLST, и обозначенных new 1 – new 6.

Аллельные профили 16 штаммов *B. pseudomallei* депонированы в международной базе данных PubMLST (id:5260, id:5261, id:5262, id:5263, id:5264, id:5265, id:5266, id:5267, id:5268, id:5269, id:5270, id:5271, id:5272, id:5273, id:5274, id:5275).

## 5.2 Филогенетический анализ

Филогенетический анализ при помощи программы eBURST аллельных профилей исследованных штаммов и штаммов *B. pseudomallei*, представленных в базе данных PubMLST (<https://pubmlst.org>), распределил исследованные штаммы по 14 отдельным клональным комплексам, условно пронумерованным 1-14 (Рисунок 12).

Клональный комплекс (Кк) 1 преимущественно представлен ST штаммов из Юго-Восточной Азии (ЮВА) и Индийского субконтинента, включает два австралийских ST, а корневым в комплексе является ST 18 из Кении. Во втором Кк доминируют австралийские ST, отдельную ветвь от корневого австралийского ST 682 формируют последовательно ST 849 (Австралия, Камбоджа) и вьетнамский ST new 4, выявленный в настоящей работе. Клональные комплексы 3, 9 и 11 представлены сиквенс-типами, обнаруженными в Австралии, Южной и Юго-Восточной Азии, и в Китае, в Кк 5 и 14 – дополнительно присутствуют индийские ST. В 4-м Кк доминируют ST Индийского субконтинента. Шестой Кк в большинстве представлен ST штаммов из Южной Америки и ЮВА, а также отдельными ST из Западной Африки, Австралии и Китая. В 7-м – преимущественно ST региона Меконга и Малайзии, а также отдельные ST Южной Америки и Китая. В Кк 8 и 10 – ST региона Меконга и Малайзии и отдельные китайские ST. Двенадцатый Кк содержит ST региона Меконга, общий для Австралии, Бангладеш и Таиланда ST 1005 и ST из Пакистана. Клональный комплекс № 13 представлен исключительно ST из Малайского региона и региона Меконга (не учитывая ST завозных штаммов, выделенных на неэндемичных территориях) (Рисунок 12, Таблица 8).

Широко географически распространенные ST 70, ST 1051 и ST 389, выявленные, в том числе, и у исследованных штаммов, являются корневыми в своих клональных комплексах. Обнаруженные новые ST распределились по четырем отдаленным Кк, и все занимают в своих комплексах ( Кк 2 — ST new 4, Кк 5 – ST new 5, Кк 13 – ST new 1, Кк 14 – ST new 2 (1650) и ST new3) маргинальное положение, что, возможно, свидетельствует об их недавнем возникновении.

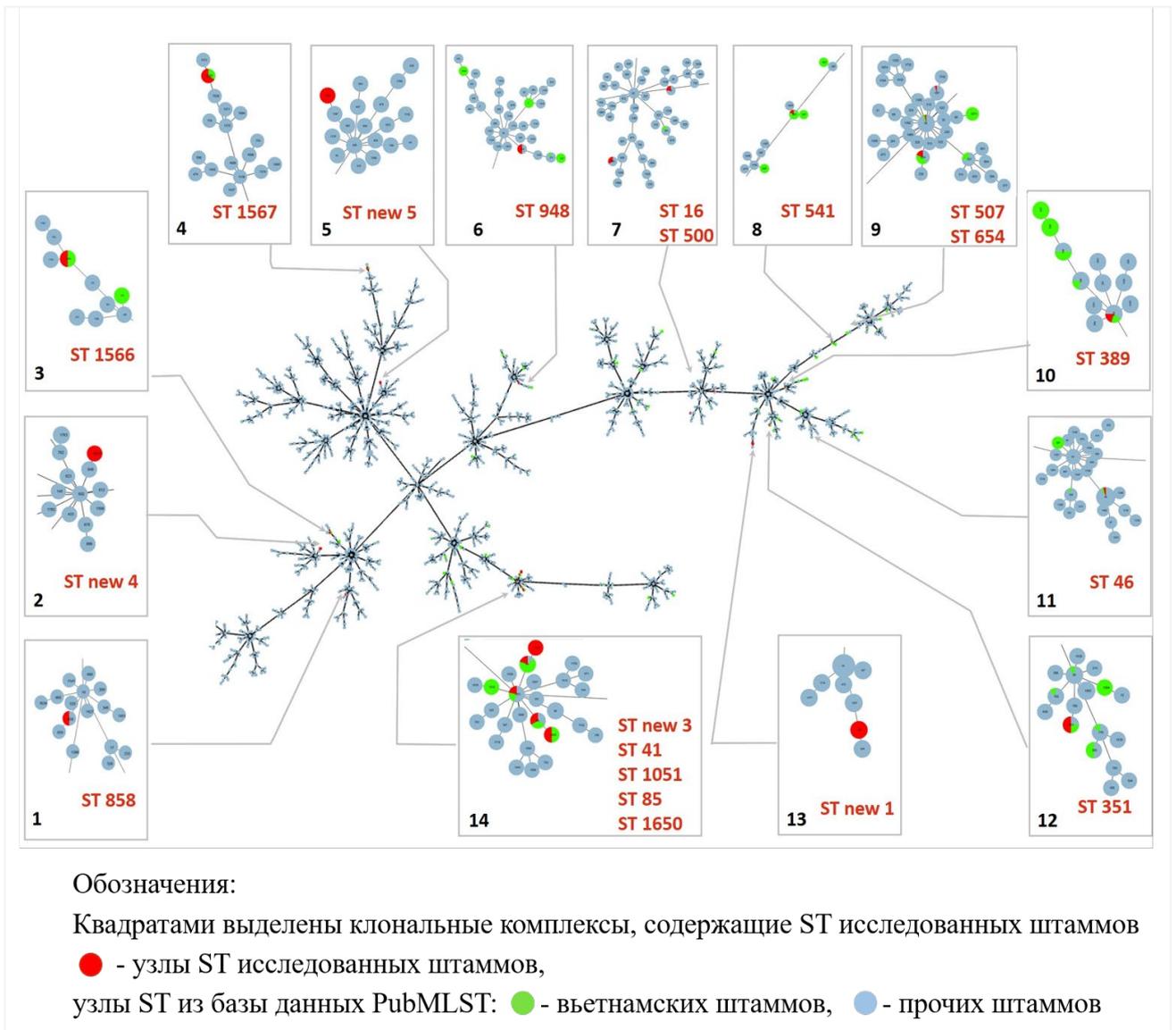


Рисунок 12 – Популяционная дендрограмма ST штаммов *B. pseudomallei*, представленных в базе данных *Burkholderia pseudomallei* PubMLST, выполненная по алгоритму eBURST

Таблица 8 - Географическое распределение клональных комплексов, включающих ST исследованных штаммов *B. pseudomallei*

Клональный комплекс	Сиквенс-тип и регион выделения штамма				
	Ядро	Орбита 1	Орбита 2	Орбита 3	Орбита 4
1	2	3	4	5	6
1	18 Кения	680 Австралия			
		309 Таиланд			
		384 Таиланд	1451 Австралия		
		17 Малайзия, Таиланд, США	233 Таиланд		
		1427 Индия, США	526 Таиланд		
		1366 Филиппины			
		858 Индия, Вьетнам	859 Индия		
		520 Камбоджа, Таиланд			
		960 Индия, США	1634 Индия		
		1141 Индия, Шри-Ланка			
2	682 Австралия	849 Австралия, Камбоджа	new 4		
		612 Австралия			
		1598 Австралия			
		870 Австралия	899 Австралия		
		433 Австралия			
		1762 Австралия			
		145 Австралия			
		623 Австралия			
762 Австралия	1763 Австралия				
3	398 Таиланд	370 Вьетнам			
		1396 Китай	472 Австралия		
		461 Австралия			
		372 Таиланд	1566 Вьетнам	924 Камбоджа 1325 Китай, Малайзия	1562 Таиланд
4	1138 Шри-Ланка	1686 Индия	110 Индия		
		1374 Индия	1093 Китай		
		1437 Шри-Ланка			
		1442 Шри-Ланка	598 Шри-Ланка 474 Шри-Ланка		
		1689 Индия			
		1372 Индия	1371 Мьянма, Индия		
			1694 Индия		
			119 Индия		
1520 Индия	1567 Вьетнам		1113 Таиланд		
5	306 Китай, Малайзия, Таиланд	979 Австралия	1768 Австралия	429 Австралия	
		949 Таиланд			
		1831 Таиланд	1722 Мьянма		
		855 Индия			
		188 Таиланд	44 Бангладеш		
		1590 Австралия			
		310 Таиланд			
		45 Таиланд			
		1379 Индия			
		1397 Китай	new 5		
		465 Австралия			
647 Австралия	604 Австралия				

Таблица 8 (Продолжение)

Клональный комплекс	Сиквенс-тип и регион выделения штамма				
	Ядро	Орбита 1	Орбита 2	Орбита 3	Орбита 4
1	2	3	4	5	6
6	95 Бразилия, Пуэрто-Рико, США	1749 Мексика	1876 Колумбия		
		7 Вьетнам	26 Нигер		
			662 Франция		
			1128 Габон	879 Испания	
			1479 Израиль		
		1741 Колумбия			
		436 Австралия, Чехия, США	1703 Панама		
		297 Бразилия, Пуэрто-Рико, США	1454 Бразилия		
		948 Таиланд, Вьетнам	1102 Китай	221 Таиланд, Вьетнам	545 Вьетнам
		1803 ЮАР			
		1355 Бразилия			
		1038 США			
		1702 Малайзия			
		898 Камбоджа, США			
		3 Таиланд, Неизвестно	493 Камбоджа, Таиланд	832 Камбоджа 1649 Вьетнам	345 Малайзия
	946 Камбоджа				
	484 Камбоджа				
836 Камбоджа	523 Таиланд	1316 США			
7	93 Таиланд	1457 Бразилия	1462 Бразилия		
		1109 Китай	87 США	495 Лаос, Таиланд	530 Таиланд
					1029 Австралия
					494 Камбоджа 730 Австралия
			1788 Таиланд		
			16 Таиланд, Вьетнам		
		227 Таиланд			
		521 Камбоджа, Таиланд	1738 Япония		
			312 Таиланд		
			381 Камбоджа, Франция, Таиланд, Вьетнам	670 Таиланд	
			299 Таиланд	529 Таиланд	
		1349 Китай	1392 Китай		
		871 Камбоджа	700 Китай		
			921 Камбоджа		
			531 Камбоджа, Таиланд	690 Камбоджа 1105 Китай	379 Таиланд
			658 Китай, Лаос, Малайзия, Таиланд	500 Лаос, Таиланд, Вьетнам	
			1358 Малайзия	1098 Китай	
		872 Таиланд	1004 Лаос	158 Таиланд, Великобритания	
				1867 Таиланд 485 Лаос	
911 Камбоджа, Китай	147 Бельгия				
	395 Таиланд				
205 Китай, Малайзия, Таиланд	61 Бангладеш				
	438 Камбоджа, Малайзия				

Таблица 8 (Продолжение)

Клональный комплекс	Сиквенс-тип и регион выделения штамма				
	Ядро	Орбита 1	Орбита 2	Орбита 3	Орбита 4
1	2	3	4	5	6
8	192 Камбоджа, Китай, Таиланд	549 Вьетнам			
		1470 Таиланд			
		1546 Малайзия			
		506 Камбоджа, Таиланд	1383 Таиланд		
		541 Китай, Вьетнам	551 Вьетнам		
			1644 Малайзия 290 Таиланд	543 Вьетнам	
9	70 Австралия, Китай, Лаос, Таиланд, Неизвестно, Вьетнам	512 Лаос			
		507 Лаос, Малайзия, Вьетнам	1742 Малайзия		
		522 Таиланд			
		32 Китай, Таиланд	68 Китай, Таиланд	1571 Вьетнам	
		229 Таиланд			
		157 Таиланд, Вьетнам	821 Япония		
			684 Китай		
			394 Таиланд	377 Таиланд	
			652 Таиланд		
		511 Лаос			
		532 Таиланд			
		513 Лаос			
		654 Лаос, Таиланд, Вьетнам	230 Таиланд		
		220 Таиланд			
		1868 Таиланд	201 Таиланд	1256 Таиланд 873 Таиланд	
		1482 Китай			
69 Китай	31 Китай				
224 Таиланд					
1533 Таиланд	1764 Австралия				
	1874 Австралия				
	1322 Малайзия				
	1732 Малайзия				
1388 Таиланд					
10	389 Таиланд, Вьетнам	589 Таиланд			
		1351 Китай			
		196 Камбоджа, Таиланд, Вьетнам	195 Таиланд, Вьетнам	542 Вьетнам	547 Вьетнам
		367 Камбоджа, Малайзия	1851 Таиланд		
		1529 Таиланд	693 Камбоджа		
		1258 Таиланд			
11	50 Китай, Малайзия, Сингапур, Таиланд	875 Малайзия			
		414 Франция, Малайзия, Сингапур, Таиланд	422 Бангладеш, Малайзия, Сингапур		
		1100 Китай			
		380 Таиланд			
		508 Таиланд			
		1339 Малайзия			
		46 Австралия, Бангладеш, Камбоджа, Китай, Индонезия, Малайзия, Новая Зеландия, Сингапур, Таиланд, Неизвестно, США, Вьетнам	1346 Китай		
			1130 Малайзия	1338 Малайзия	
			97 Малайзия, Голландия	1503 Австралия	
		1480 Китай			
1347 Китай					

Таблица 8 (Продолжение)

Клональный комплекс	Сиквенс-тип и регион выделения штамма				
	Ядро	Орбита 1	Орбита 2	Орбита 3	Орбита 4
1	2	3	4	5	6
		369 Малайзия, Таиланд, Вьетнам	1317 Малайзия 701 Китай 1382 Таиланд		
		661 Малайзия			
		1091 Китай	1318 Малайзия		
		1387 Таиланд			
		397 Вьетнам			
		49 Неизвестно			
		1108 Китай			
		12	56 Бангладеш, Мьянма, Камбоджа, Малайзия, Таиланд, Вьетнам	1538 Таиланд	
213 Таиланд					
1564 Вьетнам	72 Пакистан				
1005 Австралия, Бангладеш, Таиланд					
176 Камбоджа, Таиланд, Вьетнам	1535 Таиланд				
	193 Таиланд			504 Лаос 160 Таиланд	
192 Камбоджа, Китай, Таиланд	365 Таиланд, Вьетнам				
	351 Франция, Вьетнам				
162 Таиланд, Вьетнам	649 Таиланд				
399 Таиланд					
13	54 Индонезия, Малайзия, Сингапур, Таиланд, Великобритания	407 Таиланд			
		1057 Япония, Малайзия, Сингапур, Таиланд	new 1	945 Камбоджа	
		672 Таиланд			
		1734 Малайзия	1477 Малайзия		
14	1051 Австралия, Индия, Вьетнам	41 США, Вьетнам	new 3		
		1557 Индия			
		1515 Индия	1759 Австралия		
			671 Таиланд		
			344 США		
		161 Таиланд	90 Австралия, Мьянма, Китай, Великобритания, США	1752 Мьянма	189 Таиланд
		85 США, Вьетнам	1650 Вьетнам		
		1890 Шри-Ланка			
		1092 Китай	755 Австралия		
			1089 Таиланд		
			1443 Китай		
		387 Неизвестно	1719 Таиланд		
		525 Таиланд	703 Китай		
		1572 Вьетнам	1816 Таиланд		
1558 Таиланд					

\*Цветом выделены ячейки, содержащие ST исследованных штаммов.

На момент выполнения этого раздела работы в базе данных PubMLST ([https://pubmlst.org/bigddb?db=pubmlst\\_bpseudomallei\\_isolates&page=query](https://pubmlst.org/bigddb?db=pubmlst_bpseudomallei_isolates&page=query)) было

132 штамма *B. pseudomallei*, выделенных во Вьетнаме, которые были представлены 79 сиквенс-типами, включая обнаруженные нами. Однако сведения в PubMLST о месте выделения примерно в половине случаев ограничены указанием страны.

На примере ST, выявленных нами, был проведен анализ представленности различных сиквенс-типов в 7 провинциях центрального и северного Вьетнама. У 29 исследованных штаммов, выделенных в центральной части страны, выявлено 19 ST, тогда как у 18 штаммов, выделенных на севере, – 7 ST. (Таблица 9). То есть, субпопуляция *B. pseudomallei* центрального Вьетнама обладает большим разнообразием комбинаций аллельных вариантов консервативных генов, входящих в схему MLST, по сравнению с северной (Рисунок 13). Причем обнаружена тенденция географической приуроченности ST по макрорегионам страны – из 24 ST только два (ST 46 и ST 351) были общими для центрального и северного регионов, при этом композиции ST штаммов *B. pseudomallei* по провинциям были индивидуальными (Рисунок 14).

Таблица 9 – перечень ST штаммов *B. pseudomallei*, выделенных в центральном и северном регионах Вьетнама

Провинции центрального региона			Провинции северного региона			
Nghe An	Quảng Trị	Quảng Bình	Yen Bai	Vinh Phuc	PhuTho	Bac Giang
ST16	ST41	ST41	ST46	ST351	ST541	ST201
ST46	ST85	ST70	ST858	ST541		ST541
ST70	ST389	ST1051		ST549		STnew6
ST351	ST948	ST1567				
ST500	ST1051	STnew4				
ST507	ST1566					
ST654	STnew1					
STnew5	ST1650(new2)					
	STnew3					

Объединение полученных нами данных с данными по 64 штаммам из PubMLST, для которых присутствовала информация о регионе выделения, подтвердило значительное генетическое разнообразие субпопуляции возбудителя в центральном регионе Вьетнама: среди проанализированных 90 штаммов обнаружено 44 ST, то есть, в среднем, один ST приходится на 2,04 штамма. Из северного региона в базе данных PubMLST представлено всего 3 штамма,

относящихся к двум сиквенс-типам (ST 541 и ST 542), в совокупности соотношение количество штаммов и количество ST для северного региона составило 21/8 – один ST на 2,6 штамма. Большая выборка также подтвердила дискретное распределение ST по макрорегионам – при добавлении в анализируемую выборку 25 ST к двум общим для макрорегионов сиквенс-типам добавился только один (ST541).

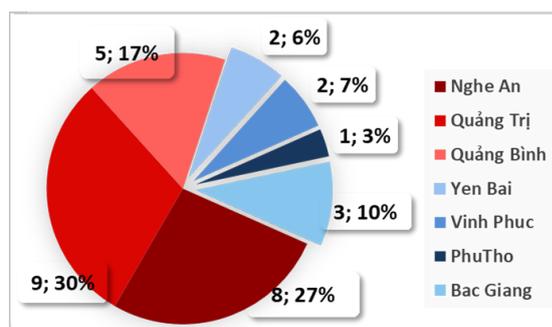


Рисунок 13 – Количество сиквенс типов, представленных в провинциях северного (выделено оттенками синего цвета) и центрального (оттенки красного) Вьетнама (значение; доля)

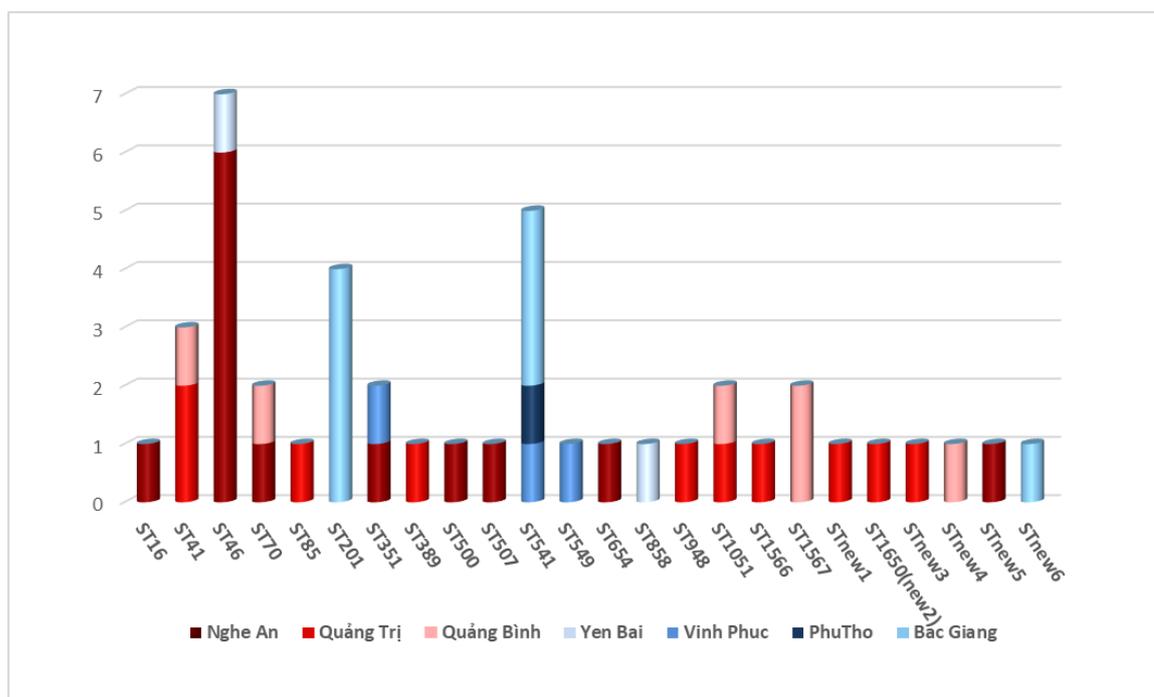


Рисунок 14 – Диаграмма представленности ST клинических и почвенных штаммов *B. pseudomallei* в 7 провинциях Вьетнама

Таким образом, 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]. Выявленные ранее [Phuong et al., 2008] и в настоящей работе новые сиквенс-типы имеют терминальную локализацию на филогенетических линиях и ограниченное географическое распространение, что, возможно, является следствием их недавнего появления и свидетельством продолжающихся эволюционных событий в популяции вьетнамских штаммов *B. pseudomallei* в настоящее время.

## ГЛАВА 6 ПОИСК И АНАЛИЗ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДЕТЕРМИНАНТ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АМИНОГЛИКОЗИДАМ У ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К ГЕНТАМИЦИНУ ШТАММОВ

Естественная устойчивость к гентамицину является для *B. pseudomallei* видовым признаком. По литературным данным доминирующим механизмом резистентности к аминогликозидам у *B. pseudomallei* являются системы эффлюкса семейства RND (resistance, nodulation, cell division), среди которых участие в обеспечении устойчивости к аминогликозидам и макролидам у *B. pseudomallei* доказано только для эффлюкс-насоса AmrAB-OprA [Moore et al., 1999; Viktorov et al., 2008]. У обнаруженных ранее редких гентамицин чувствительных штаммов *B. pseudomallei* идентифицированы точечные миссенс мутации и короткие (GC) делеции в гене транспортера AmrB RND [Podin et al., 2014; Bugrysheva et al., 2017], а также отсутствие экспрессии оперона AmrAB-OprA из-за регуляторных мутаций или его делеции [Trunck et al., 2009]. Участие других систем эффлюкса семейства RND в обеспечении резистентности к гентамицину остается неясным, так же, как неясен вклад аминогликозидтрансфераз.

В геномных последовательностях штаммов 15QB1(V1512) ST 70, 16QT2(V1607) ST948 и 16QT3(V1608) ST1566, показавших разный уровень чувствительности к гентамицину, был проведен поиск и анализ детерминант, доказано или потенциально обеспечивающих этот признак. Гены идентифицировали ручным поиском по ключевым словам в аннотации. В сравнении с референсными последовательностями большой и малой хромосом штамма *B. pseudomallei* K96243 (NCBI Reference Sequences: NC\_006350.1 и NC\_006351.1) у исследованных штаммов были 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 в гене аминогликозид-6'-N-ацетилтрансферазы (AAC (6')-III) (Таблица 10).

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 – ARG160SER, Arg116Gln и Gly237Arg, Thr317Lys (Рисунок 15). 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 Val222Met в репрессоре AmrR семейства TetR (Рисунок 16). Известно, что эффлюкс опероны *BpeAB-OprB* и *BpeEF-OprC* экспрессируется у *B. pseudomallei* только в мутантах по регуляторным белкам *BpeR* и *BpeT*, 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 потенциально может частично компенсировать выявленные структурные дефекты.

У полностью чувствительного к гентамицину штамма *B. pseudomallei* 15QB1 в гене AAC (6')-III обнаружена делеция GC, повлекшая замену L106V и сдвиг рамки считывания с образованием аномально длинного продукта за счет смещения стоп-кодона в область соседней CDS. У штаммов 16QT2 и 16QT3 с промежуточной чувствительностью к гентамицину в этом гене присутствуют две (Val102>Ala и Glu144>Gly) и три миссенс мутации (Ala5>Thr, Val102>Ala и Glu144>Gly), соответственно (Таблица 10, Рисунок 16), что не исключает вероятность участия в утрате резистентности к гентамицину мутаций в гене AAC (6')-III, а также обнаруженных мутаций у гомологов периплазматического линкера (BPSL2234) неохарактеризованного эффлюкс оперона семейства RND (Таблица 10, Рисунок 17). Выяснение данного вопроса требует проведения отдельного исследования.

Таблица 10 – Результаты сравнительного анализа потенциальных детерминант резистентности к гентамицину

	Продукт	Локус штамма K96243	Изменения в аминокислотной последовательности по сравнению с гомологом штамма K96243 (NC_006350), (референс > проба)					
			15QB1(V1512) NZ_PHRB00000 000.1	Локус	16QT2(V1607) NZ_WTLF00000 000.1	Локус	16QT3(V1608)	Локус
1	2	3	4	5	6	7	8	9
VpeAB-OprB	Регуляторный белок VpeR семейства TetR	BPSL0812	нет	CWD88_RS27790	нет	GPZ81_25110	нет	NODE_31 (73502-74137)
	Мембранный белок VpeA (AcrA)	BPSL0814	нет	CWD88_RS27780	Pro46>Ser	GPZ81_25100	нет	*
	Транспортер VpeB (AcrB)	BPSL0815	ASN956>LYS	CWD88_RS27775	нет	GPZ81_25095	нет	NODE_31 (75825-79025)
	Белок канала внешней мембраны OprB (OprM)	BPSL0816	CYS72>ARG ALA50>SER	CWD88_RS35150	CYS72>ARG	GPZ81_25090	нет	*
AmrAB-OprA	Белок канала внешней мембраны OprA	BPSL1802	нет	CWD88_RS02250	нет	GPZ81_01455	Ala443>Thr Gly514>Glu	NODE_6 (88601-90151)
	Транспортер AmrB	BPSL1803	нет	CWD88_RS02255	нет	GPZ81_01460	нет	NODE_6 (85473-88604)
	Мембранный белок AmrA	BPSL1804	ARG160>SER	CWD88_RS02260	Arg116>Gln	GPZ81_01465	Gly237>Arg Thr317>Lys	NODE_6 (84257-85456)
	Регуляторный белок AmrR семейства TetR	BPSL1805	нет	CWD88_RS02265	Val222>Met	GPZ81_01470	Val222>Met	NODE_6 (83442-84113)
RND multi-drug efflux pump	Гипотетический периплазматический адаптор	BPSL2234	Met68>Ile Arg102>His Ala123>Thr ProAlaAla395>Pro Ala396>Asp Ser416>Pro	CWD88_RS31800	AlaAla396>Asp Ser419>Pro	GPZ81_26740	AlaAla396> Asp Ser419>Pro	NODE_48 (28867-30144)
	Гипотетический транспортер семейства ACR	BPSL2235	ARG208>HIS	CWD88_RS31805	Leu303>Arg	GPZ81_26735	Leu303>Arg	NODE_48 (25724-28870)
	Гипотетический мембранный белок	BPSL2236	нет	CWD88_RS31810	Thr93>Met	GPZ81_26730	нет	*

Таблица 10 (Продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Аминогликозид-6'-N-ацетилтрансфераза	BPSS0262	(сдвиг рамки считывания) LCAAAAAWGTARG CAAFASDAPLENA ASHALHRALGFDET ERVVFFRKPLAR <b>105&gt;</b> AVRGGGGGLGHGTR LRGVRVGRAARER RVACTASRARLRR DRAGRVLQAARA LSAAAARGQPRPV NSAARRSSRGCTE SGSTTPRRHRACRP SARRASTRARPSPA ASASIPCRARRPRSS PRAHAGSRRPRAAP RETPRRRARACRSA SCRRSSRR	CWD88_RS12160	Val102>Ala Glu144>Gly	GPZ81_10965	Ala5>Thr Val102>Ala Glu144>Gly	NODE_53 (15486-15959)
VpeEF-OprC	Транскрипционный регулятор CeoR (OprC) семейства LysR	BPSS0290	нет	CWD88_RS19360	нет	GPZ81_11185	нет	*
	Мембранный белок VpeF	BPSS0292	нет	CWD88_RS19370	нет	GPZ81_11195	нет	NODE_21 (25650-26879)
	Транспортер VpeE	BPSS0293	нет	CWD88_RS19375	нет	GPZ81_11200	нет	NODE_21 (26941-30126)
	Белок канала внешней мембраны VpeT	BPSS0294	VAL294>ALA	CWD88_RS19380	VAL294>ALA	GPZ81_11205	Val294>Ala	NODE_21 (30137-31669)
RND multidrug efflux pump	АТФ-связывающая пермеаза macB (экспорт макролидов)	BPSS0624	GLN247>ARG ASP346>GLU	CWD88_RS08600	нет	GPZ81_23035	Asp251>Gly Met340>Thr Arg405>Lys Ala652>Val	NODE_20 (9097-11058)
	Гипотетический протеин (RND drug-efflux pump)	BPSS0625	HIS165>ASP	CWD88_RS08605	HIS165>ASP	GPZ81_23030	HIS165>ASP	NODE_20 (7892-9094)
* Анализ проводили по прочтениям								

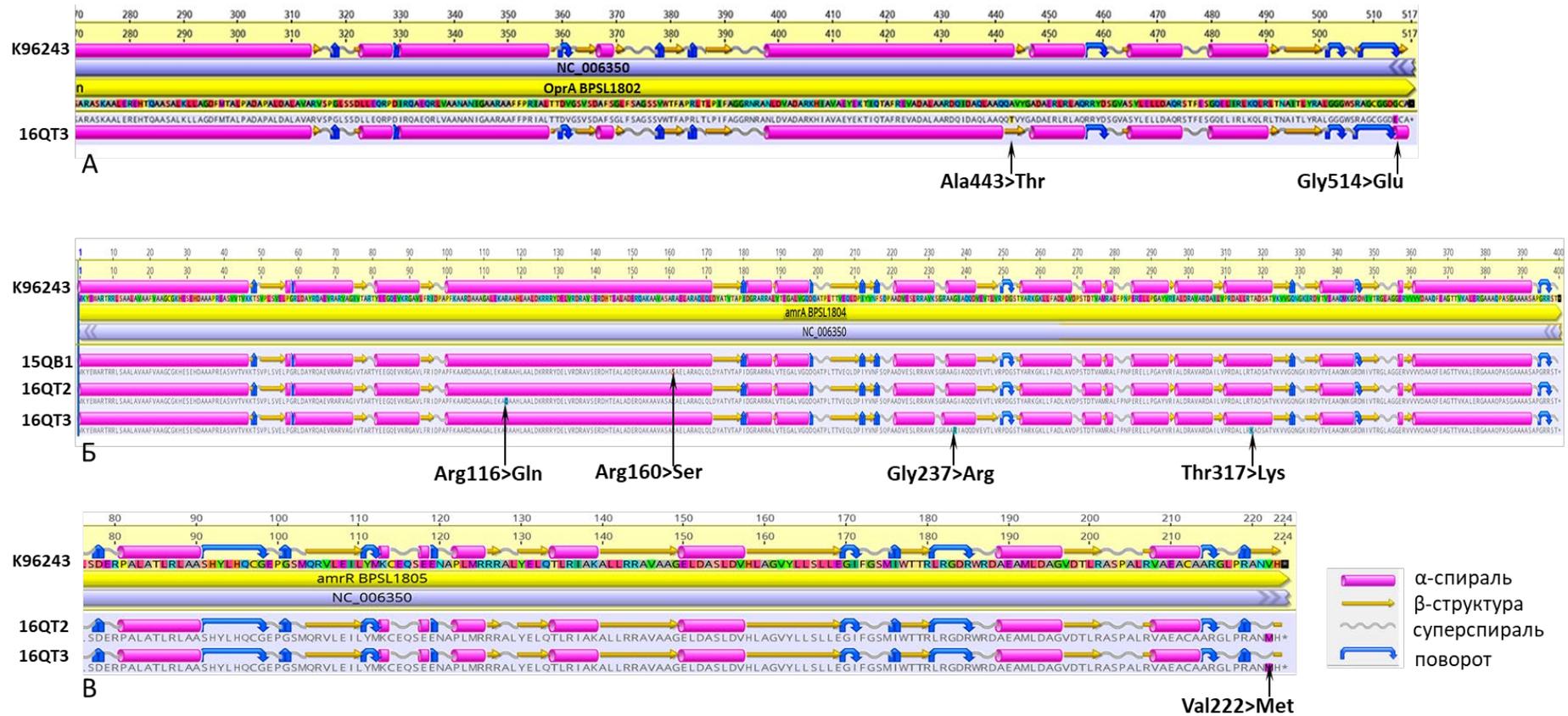


Рисунок 15 – Схема вторичной структуры и аминокислотные замены в компонентах эффлюкс-насоса AmrAB-OprA штаммов *B. pseudomallei* с различным уровнем чувствительности к гентамицину: А – мембранный липопротеин OprA; Б – периплазматический линкер AmrA; В – регуляторный белок AmrR семейства TetR



Рисунок 16 – Последовательности (А) и схема вторичной структуры (Б) ААС (6')-III штаммов *B. pseudomallei* с различным уровнем чувствительности к гентамицину (обозначения аналогичны Рисунку 15)

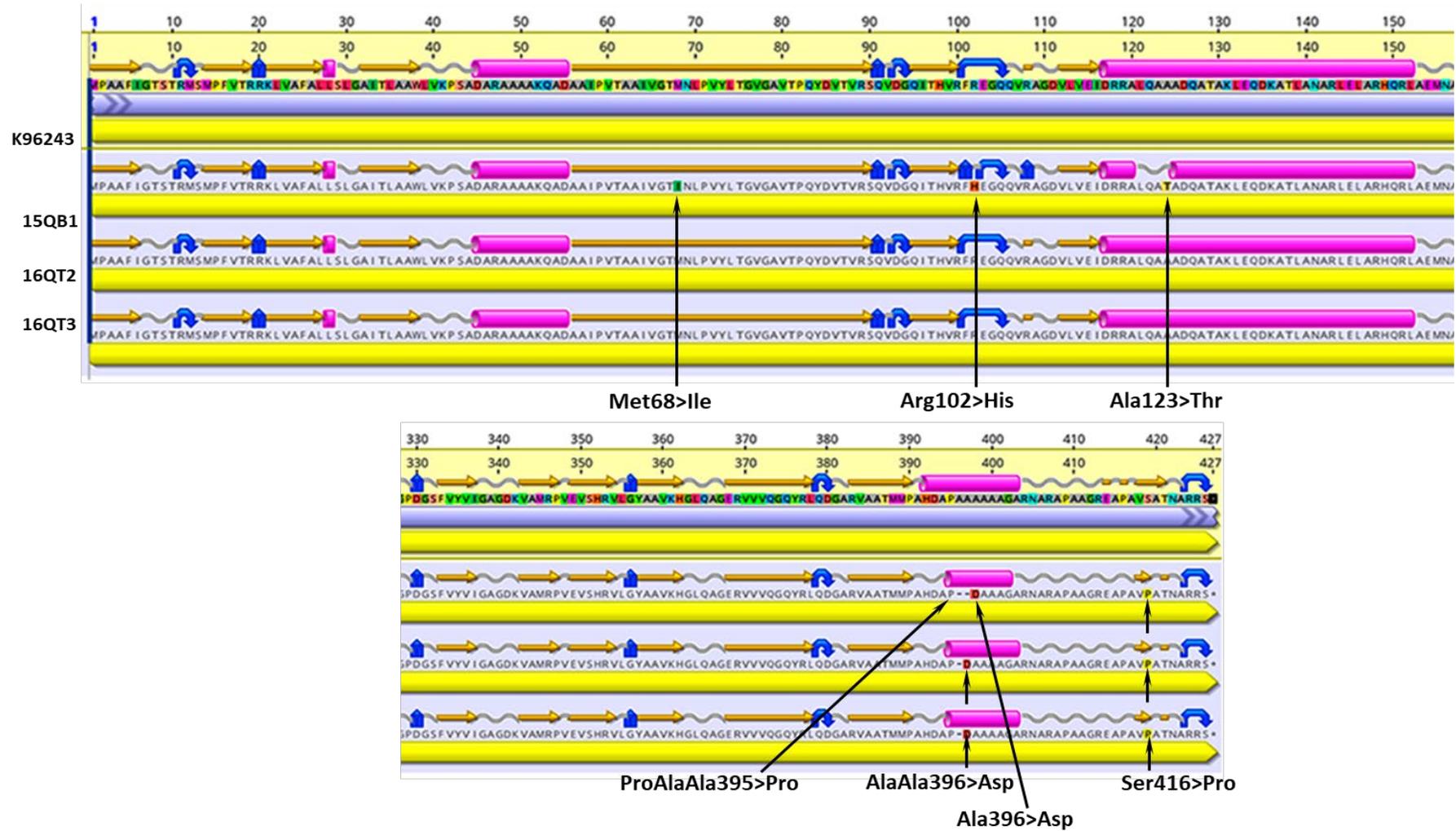


Рисунок 17 – Схема вторичной структуры и аминокислотные замены периплазматического линкера (BPSL2234) неохарактеризованного эффлюкс оперона семейства RND штаммов *B. pseudomallei* с различным уровнем чувствительности к гентамицину, неизменная часть опущена (обозначения аналогичны Рисунку 15)

## ГЛАВА 7 РАЗРАБОТКА ЛАБОРАТОРНЫХ ПРОТОКОЛОВ ДЛЯ ГЕНОДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА

### 7.1 Разработка протокола для выявления ДНК *Burkholderia pseudomallei* методом ПЦР

#### 7.1.1 Дизайн праймеров и оптимизация параметров ПЦР

В качестве матрицы для создания праймеров использовали последовательность *orf2* (Protein ID: AAD11413.1) 1 кластера генов системы секреции третьего типа (Т3SS1) штамма *B. pseudomallei* E503 (GenBank ID: AF074878.2) в диапазоне от 25391 до 26344 нуклеотида. Перспективность этой генетической мишени для выявления возбудителя мелиоидоза была показана еще в 2000 г., когда было установлено, что *orf2* протяженностью 548 п. о. в составе кластера генов Т3SS1 присутствует исключительно у штаммов *B. pseudomallei* и отсутствует у близкородственных *B. mallei* и *B. thailandensis* [Winstanley and Hart, 2000]. Созданные к настоящему времени с использованием генов Т3SS1 системы идентификации возбудителя мелиоидоза на основе ПЦР отличаются очень высокой чувствительностью [Winstanley and Hart, 2000; Novak et al., 2006; Зинченко, 2010; Щит и др., 2018; Ветчинин и др., 2019], 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. cenocepacia* [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 зарекомендовавшей генетической мишени.

Праймеры подбирали при помощи инструмента базы данных GenBank NCBI Primer-BLAST. Допустимую температуру плавления выставляли в пределах от 54

°C до 65 °C. В результате по заданным параметрам программа предложила 10 вариантов пар праймеров (Рисунок 18), из которых только три обеспечивали размеры ампликонов в пределах 300 – 400 п. н., удобные для детекции как в электрофорезе, так и в режиме реального времени, что запланировано в перспективе. По соотношению параметров разность температуры плавления и вероятность образования вторичных структур для дальнейшего тестирования была выбрана пара праймеров 7F/7R (Таблица 11).



Рисунок 18 – Варианты праймеров, предложенных Primer-BLAST

Таблица 11 – Характеристики праймеров для ПЦР

Праймер	Температура плавления	Самокомплементарность 3'-концов	Размер ампликона
4F: GTCTCCAAGACGAATGCCCT 4R: GGCGCATTGGGGGAAAATAC	59,75 59,95	5 4	380 п. н.
7F: CTGGGAGAGCGAGATGTTTCG 7R: CGTCATCTGTTGCTAGCGGA	60,25 60,18	2 2	353 п. н.
10F: CTTCTCATCCAGCGACGCAT 10R: ATATCCGCCGATTGCTCGAC	60,53 60,39	3 2	408 п. н.

Температуру отжига праймеров подбирали эмпирически в интервале 54,5 °C – 57 °C, с шагом 0,5 °C. В качестве матрицы использовали ДНК клинического штамма *B. pseudomallei* V1701. В результате установлено, что оптимальной для амплификации продукта ПЦР является температура 56 °C, при которой продукт

рассчетного размера 353 п.н. образуется наиболее эффективно, без неспецифических фрагментов (Рисунок 19).

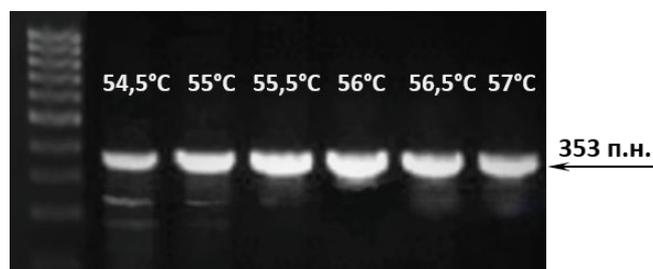


Рисунок 19 – Результаты амплификации ДНК *B. pseudomallei* V1701 с праймерами F7/R7 при различных температурах отжига

### 7.1.2 Определение чувствительности и специфичности ПЦР

Предел обнаружения ДНК возбудителя мелиоидоза при помощи разработанного протокола ПЦР определяли с использованием последовательных 10-кратных разведений выделенной ДНК клинического штамма *B. pseudomallei* V1701 в диапазоне от  $10^{-1}$  до  $10^{-7}$ , а также ДНК, выделенной из разведений бактериальной взвеси ( $10^7 - 10^2$  м.к./мл) этого же штамма. Исходная концентрация препарата ДНК составляла 6,88 мкг/мл, что соответствует  $8,61 \times 10^5$  геномных эквивалентов в мл; бактериальной взвеси –  $1,5 \times 10^8$  м.к./мл по стандарту мутности МакФарланда 0,5. Каждый эксперимент повторяли в двух сериях. Полученные результаты представлены в Таблице 12 и на Рисунке 20.

Таблица 12 – Предел обнаружения ПЦР по концентрации ДНК

№ серии	Концентрация ДНК						
	688 нг/мл	68,8 нг/мл	6,88 нг/мл	688 пг/мл	68,8 пг/мл	6,88 пг/мл	688 фг/мл
1	+	+	+	+	-	-	-
2	+	+	+	+	-	-	-

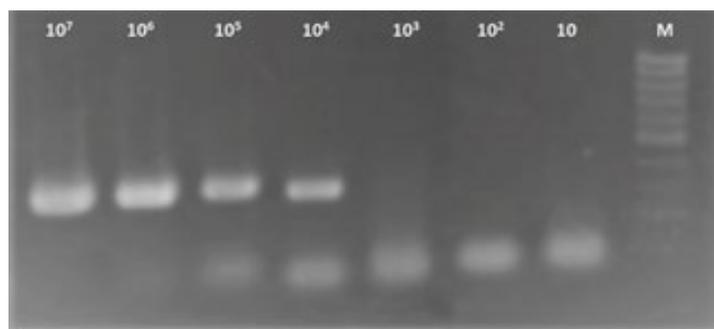


Рисунок 20 – Результаты ПЦР с использованием в качестве матрицы ДНК, выделенную из бактериальных взвесей различной концентрации

Согласно полученным результатам, чувствительность реакции составляет 688 пг/мл (или 688 фг в реакционной смеси, что соответствует 86,4 геномным эквивалентам) и разработанный протокол позволяет выявлять ДНК возбудителя мелиоидоза при его концентрации в образце не менее  $1 \times 10^4$  м.к./мл.

Разработанный протокол ПЦР был протестирован на образцах ДНК, выделенной из идентифицированных ранее клинических и почвенных штаммов. Все штаммы возбудителя мелиоидоза показали положительный результат, все штаммы *B. thailandensis* (7) и *B. ceracia* (5) – отрицательный (Рисунок 21), то есть при исследовании ДНК чистых культур специфичность разработанного протокола составила 100%.



Рисунок 21 – Пример результатов амплификации ДНК клинических штаммов *Burkholderia* spp. с праймерами F7/R7

## 7.2 Разработка протокола для выявления ДНК *Burkholderia pseudomallei* методом LAMP

### 7.2.1 Дизайн праймеров и оптимизация параметров LAMP

Дизайн праймеров для выявления ДНК *B. pseudomallei* методом петлевой изотермической амплификации специфического для возбудителя мелиоидоза фрагмента *orf2* в составе кластера T3SS1 осуществляли с помощью программного обеспечения Primer Explorer V4 (<https://primerexplorer.jp/e/>). Последовательности рассчитанных праймеров и расположение сайтов отжига представлены в Таблице 13 и на Рисунке 22.

Таблица 13 – Праймеры для выявления *B. pseudomallei* методом LAMP

Праймер	Последовательность (5'-3')
F3	CTCTTTCCGTTGCTGTGG
B3	CGAAATCGACCAGGGGTATG
F2	CATGCCGAGAACAGCCAT
R2	TCCGTCATTCGCTCGATGA
B1c	CCGCTAGCAACAGATGACGCG
F1c	TTGTCAGGCAGTGC GTTGCG
FIP (F1c AT F2 )	TTGTCAGGCAGTGC GTTGCGATCATGCCGAGAACAGCCAT
BIP (B1c AT B2 )	CCGCTAGCAACAGATGACGCGATTCCGTCATTCGCTCGATGA

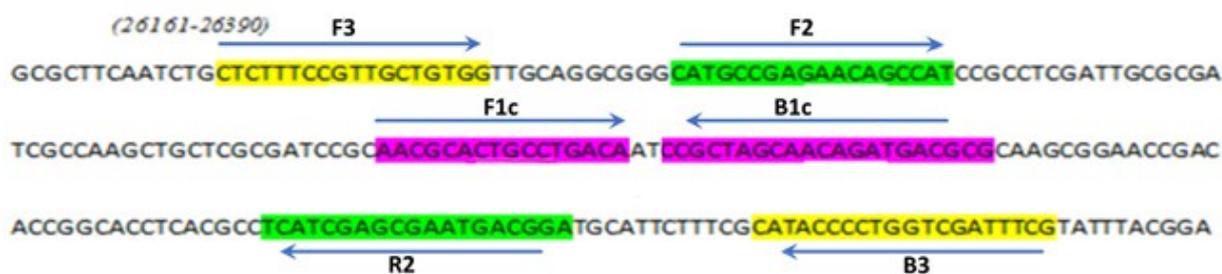


Рисунок 22 – Расположение сайтов отжига праймеров

По рекомендуемому производителем протоколу использования WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) реакция проходит при

65°C в течение 30 минут. Учитывая, что GC-содержание в геноме возбудителя мелиоидоза выше среднестатистического мы провели оптимизацию температурно-временных параметров реакции, для чего проводили инкубирование при 60°C и 65°C в течение 30, 35, 40 и 45 минут и останавливали при 95 °C в течение 2 минут. Инкубация при 60 °C через 40 минут дала наиболее четко наблюдаемое изменение цвета положительной реакции, что было подтверждено визуализацией продуктов амплификации в электрофорезе (Рисунок 23).

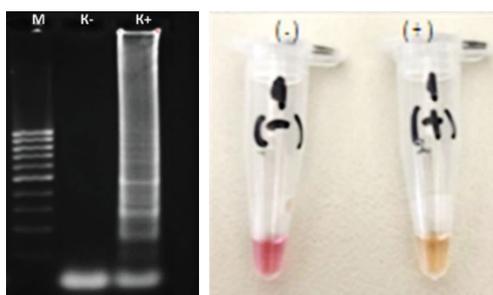


Рисунок 23 – Результаты LAMP после 40 минут инкубации при 60 °C

### 7.2.2 Определение чувствительности и протокола LAMP

Предел обнаружения ДНК возбудителя мелиоидоза при помощи разработанного протокола LAMP определяли по тому же алгоритму, что и для ПЦР. Полученные результаты представлены в Таблице 14 и на Рисунке 24.

Таблица 14 – Предел обнаружения LAMP

№ серии	Концентрация ДНК						
	688 нг/мл	68,8 нг/мл	6,88 нг/мл	688 пг/мл	68,8 пг/мл	6,88 пг/мл	688 фг/мл
1	+	+	+	+	+	-	-
2	+	+	+	+	+	-	-
	Концентрация бактериальной взвеси (м.к./мл)						
	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	10
1	+	+	+	+	+	-	-
2	+	+	+	+	+	-	-

Таким образом, чувствительность реакции составила 68,8 пг/мл (или 68,8 фг в реакционной смеси, что соответствует 8,6 геномным эквивалентам) и разработанный протокол позволяет выявлять ДНК возбудителя мелиоидоза при его концентрации в образце не менее  $1 \times 10^3$  м.к./мл.

При проведении анализа специфичности разработанного протокола LAMP все штаммы возбудителя мелиоидоза показали положительный результат, все штаммы *B. thailandensis* (7) и *B. cepacia* (5) – отрицательный (Рисунок 21), то есть при исследовании ДНК чистых культур специфичность разработанного протокола составила 100%.

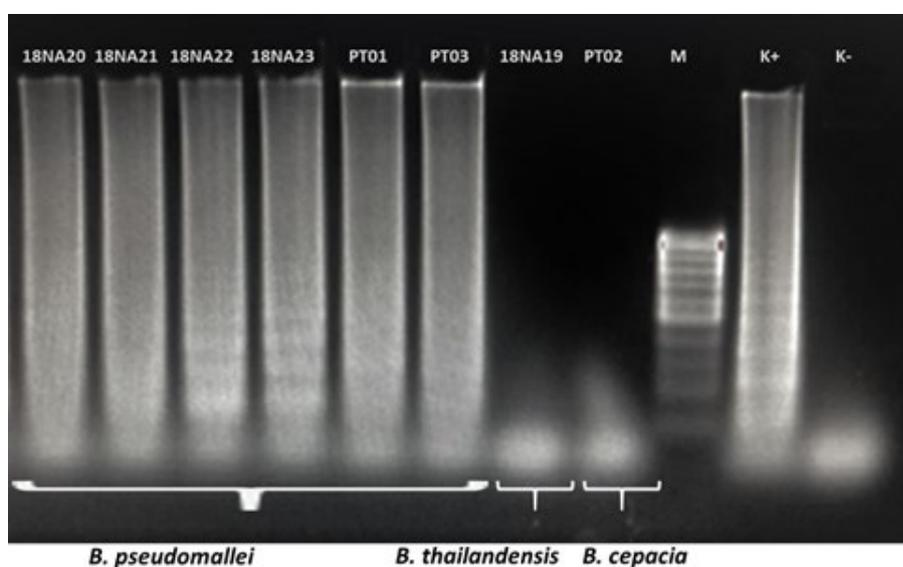


Рисунок 24 – Пример результатов LAMP с ДНК клинических штаммов *Burkholderia* spp.

В результате проделанной работы было показано, что разработанные протоколы ПЦР и LAMP при исследовании чистых культур обладают одинаково высокой специфичностью (100%). При этом более высокая чувствительность LAMP позволяет обнаруживать *B. pseudomallei* в 10 раз более низких концентрациях ДНК, чем ПЦР. То есть LAMP более перспективен для выявления возбудителя мелиоидоза из проб с низкой бактериальной нагрузкой, в частности, почвы.

### 7.3 Сравнение разработанных протоколов ПЦР и LAMP по эффективности выявления ДНК возбудителя мелиоидоза из почвы

Эффективность выявления ДНК возбудителя мелиоидоза из почвы с использованием разработанных протоколов была исследована обоими методами на образцах тотальной ДНК, выделенной непосредственно из проб почвы, отобранной в 2019 г. в провинциях Nghe An и Quang Binh. ДНК выделяли из водной фазы суспензии почвы методом мембранных колонок (для каждой пробы использовали две колонки – для выделения и дополнительной очистки ДНК). Образцы тотальной почвенной ДНК для проведения тестирования разработанного протокола были выбраны на основании результатов мультиплексной ПЦР с использованием зарегистрированного в РФ набора реагентов «АмплигенБуркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL B/D - EPh». Результаты мультиплексной ПЦР в ряде случаев были подтверждены выделением культуры *B. pseudomallei*, в случае отрицательного результата бактериологического метода – выборочным секвенированием ампликонов размером 727 п. н. В исследование были взяты 21 положительная и 4 отрицательных пробы.

Полученные результаты представлены на Рисунках 25, 26 и Таблице 15.

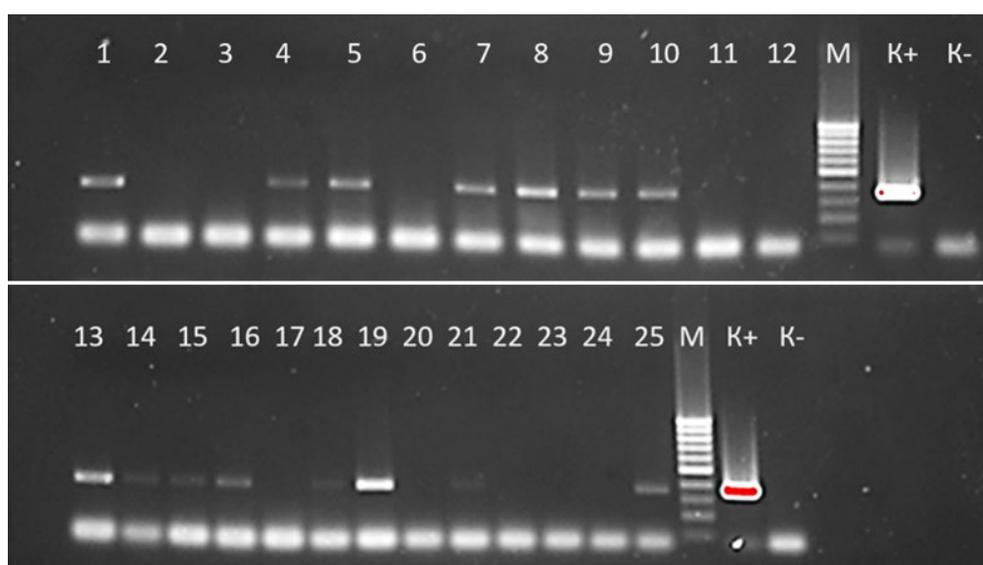


Рисунок 25 – Результаты ПЦР с тотальной ДНК, выделенной непосредственно из образцов почвы (перечислены в Таблице 15)

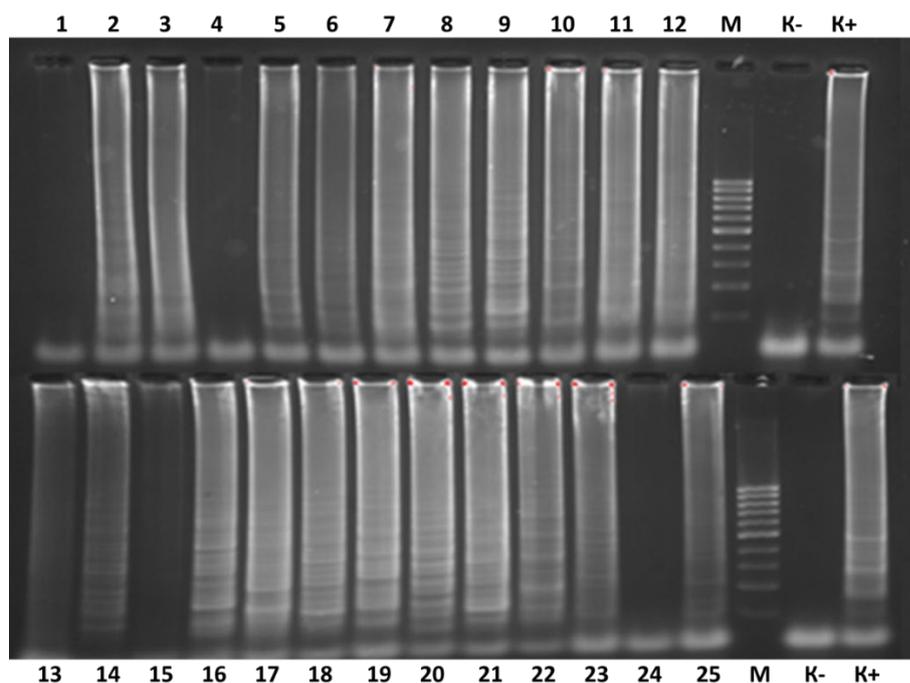


Рисунок 26 – Результаты LAMP с тотальной ДНК, выделенной непосредственно из образцов почвы (перечислены в Таблице 15)

Таблица 15 – Сравнение результатов исследования тотальной почвенной ДНК методами LAMP и ПЦР

№*	Номера образцов почвы по протоколу отбора проб	LAMP		ПЦР 353 п.н.	Мультиплекс (контрольный метод)	Сиквенс ампликона 727 п.н.
		Учет результатов				
		Визуальный по цвету	Электрофоретический			
1	4	-	-	+	+	ни
2	7	+	+	-	+	βL B
3	10	+	+	-	-	ни
4	14	-	-	+	+	ни
5	20	+	+	+	+	ни
6	22	+	+	-	+	ни
7	26	+	+	+	+	βL B
8	33	+	+	+	+	ни
9	38	+	+	+	+	ни
10	40	+	+	+	+	ни
11	48	+/-	+	-	-	ни
12	50	+	+	-	+	ни
13	56	+	+	+	+	ни
14	68	+	+	+	+	βL B
15	79	-	-	+	+	βL B

Таблица 15 – Продолжение

№*	Номера образцов почвы по протоколу отбора проб	LAMP		ПЦР 353 п.н.	Мультиплекс (контрольный метод)	Сиквенс ампликона 727 п.н.
16	80	+	+	+	+	βL B
17	81	+	+	-	-	ни
18	100	+	+	+	+	βL B
19	111	+	+	+	+	ни
20	117	+	+	-	+	βL B
21	126	+	+	+	+	ни
22	128	+	+	-	+	ни
23	147	+	+	-	+	ни
24	163	-	-	-	-	ни
25	167	+	+	+	+	ни

Примечания  
 \* – порядковые номера в таблице соответствуют порядковым номерам образцов почвы на Рисунках 22 и 23  
 ни – не исследовали  
 βL B – секвенированная последовательность является фрагментом генетической мишени BURPS1106B\_2313  
 Розовым цветом выделены номера образцов почвы, из которых была выделена культура *B. pseudomallei*; желтым – дискордантные результаты

При использовании разработанного протокола LAMP получено 3 ложноположительных и 3 ложноотрицательных результата; в ПЦР наблюдали 6 ложноотрицательных результатов при отсутствии ложноположительных. На основании полученных данных были рассчитаны показатели критериев диагностической ценности тестов. Результаты произведенных расчетов обобщены в Таблице 16.

Таблица 16 – Сравнительная оценка диагностической ценности разработанных протоколов LAMP и ПЦР

Критерий	LAMP	ПЦР
Предсказательная ценность положительного результата	86%	100%
Предсказательная ценность отрицательного результата	25%	33%
Диагностическая эффективность	76%	88%

Результаты исследования чистых культур с использованием двух молекулярно-генетических методов, выявляющих одну и ту же генетическую мишень, показали преимущество разработанного протокола LAMP по сравнению с ПЦР по аналитическим характеристикам. Тогда как тестирование реальных образцов почвы показало более высокую диагностическую ценность ПЦР (Таблица 15). Полученные нами результаты сравнения эффективности LAMP и ПЦР для выявления *B. pseudomallei* из почвы согласуются с литературными данными по оценке LAMP и ПЦР при исследовании клинических образцов – было показано преимущество ПЦР по показателю диагностической специфичности, а LAMP – по чувствительности [Chantratita et al., 2008].

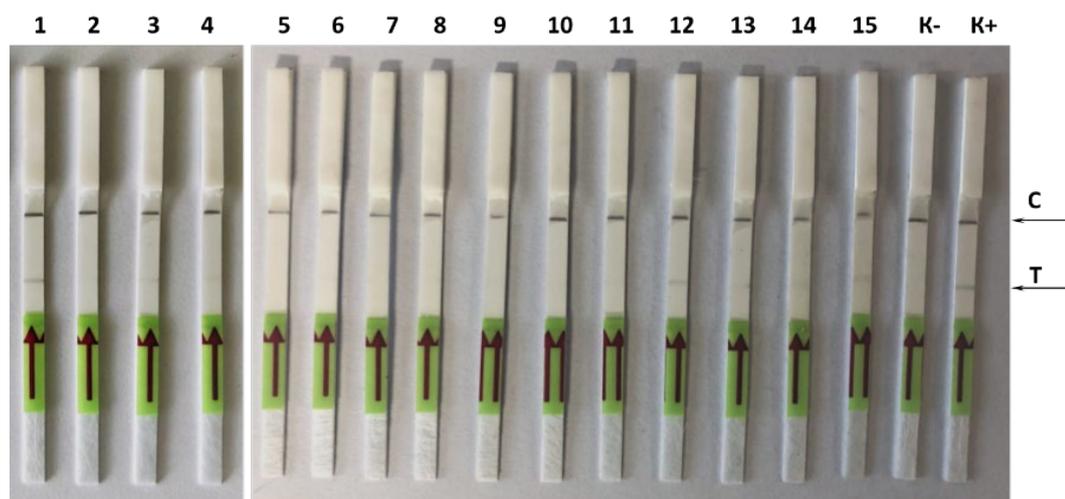
Таким образом, разработанный протокол детекции *B. pseudomallei* методом ПЦР, несмотря на меньшую аналитическую чувствительность, превосходит LAMP по критериям диагностической ценности.

#### **6.4 Апробация метода рекомбиназной полимеразной реакции с детекцией в латеральном потоке (LF-RPA) для ускоренного обнаружения *Burkholderia pseudomallei* в пробах почвы**

Еще одним многообещающим инструментом для быстрого выявления патогенов в условиях ограниченных ресурсов является метод LF-RPA. Недавно была опубликована работа по адаптации данного метода для быстрого обнаружения *B. pseudomallei* [Peng et al., 2019]. На модели контаминированных возбудителем крови и стерильной почвы авторы показали высокую аналитическую чувствительность метода ( $2,1 \times 10^3$  КОЕ / г и  $4,2 \times 10^3$  КОЕ / мл для почвы и крови, соответственно). Кроме того, авторами показано отсутствие перекрестной реакции с другими видами рода *Burkholderia* (в том числе близкородственными *B. mallei* и *B. thailandensis*) и другими видами бактерий, что предполагает высокую аналитическую специфичность этого метода и возможность применения LF-RPA для ранней точной диагностики мелиоидоза или использования в полевых условиях

[Peng et al., 2019]. Для более точной оценки практической применимости данного метода мы исследовали его эффективность на реальных образцах почвы.

Для анализа были использованы 15 образцов почвы, выделенных в провинциях Vinh Phuc и Thừa Thiên - Huế. Поскольку авторы сообщили, что метод более эффективен без этапа выделения ДНК, препараты для анализа были подготовлены следующим образом: тщательно гомогенизированную суспензию почвы в стерильной дистиллированной воде (в соотношении 1 к 1) выдерживали в течение 18 часов при температуре 42 °С для осаждения частиц почвы, из надосадочной фракции отбирали аликвоту 200 мкл для анализа в LF-RPA и по 10 мкл высевали на 2 чашки агара Эшдауна с гентамицином и 1 – без гентамицина. Отобранные 200 мкл прогревали 10 мин. при 100 °С, остывшие пробы центрифугировали 13 000 об / мин (15 000 g) в течение 10 минут, 1 мкл супернатанта использовали в качестве матрицы ДНК в LF-RPA. Для контроля реакции использовали ДНК клинического штамма *B. pseudomallei* V1701 (К+) и деионизованную воду (К-). Полученные результаты представлены на Рисунке 27 и в Таблице 17.



С – контрольная полоса; Т – тестовая полоса

Рисунок 27 – Результаты LF-RPA с экстрактом из образцов почвы (перечислены в Таблице 16)

Таблица 17 – Результаты анализа проб почвы на присутствие *B. pseudomallei* методами классической бактериологии и LF-RPA

№ п/п	№ образца	Результат LF-RPA	Выделение культуры <i>B. pseudomallei</i>
1	2.119	+	+
2	2.116	-	-
3	2.82	+	+
4	2.101	+	+
5	2.103	-	-
6	2.58	-	-
7	2.72	-	-
8	2.110	-	-
9	2.117	-	-
10	1.01	-	-
11	9.26	-	-
12	7.03	+	+
13	2.88	+	+
14	1.60	+	+
15	Мд2780	+	+

Полученные нами данные показали полное совпадение результатов LF-RPA и выделения культуры возбудителя мелиоидоза.

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 нами 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 апробация разработанного Y. Peng с соавторами способа быстрого обнаружения *B. pseudomallei* на реальных пробах почвы подтвердила его практическую ценность.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние два десятилетия в мире наблюдается растущее внимание к проблеме мелиоидоза. Исследование биологических особенностей возбудителя, разработка новых средств для выявления и идентификации *B. pseudomallei* в значительной степени способствуют ранней диагностике инфекции и снижению ее летальности.

На сегодняшний день известно, что штаммы *B. pseudomallei* различаются в зависимости от региона происхождения. Ранее опубликованные работы, посвященные анализу вьетнамских изолятов *B. pseudomallei*, приводят либо фенотипические, либо генотипические характеристики двух ограниченных выборок (15 и 25 штаммов) [Phung et al., 1995; Phuong et al., 2008]. Тогда как в настоящей работе впервые представлены результаты комплексного микробиологического и молекулярно-генетического анализа представительного набора клинических и почвенных штаммов, выделенных в провинциях центрального и северного Вьетнама.

В результате проведенной работы в институте Тропической медицины Совместного Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра (г. Ханой, Вьетнам) создан охарактеризованный представительный набор клинических и почвенных штаммов возбудителя мелиоидоза и близкородственных буркхольдерий из различных регионов страны, позволяющий создавать репрезентативные выборки для изучения фенотипических и генотипических особенностей вьетнамской популяции *B. pseudomallei*.

Почвенные штаммы возбудителя были 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 была 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.

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

Клинические штаммы *Burkholderia* spp. для формируемой коллекции были выделены и идентифицированы в лабораториях госпиталей методом презумптивной идентификации или с использованием биохимических анализаторов. Однако, бактериальные виды в составе комплекса «*B. pseudomallei*» обладают значительным сходством целого ряда фенотипических признаков, что создает определенные сложности для корректного определения их видовой принадлежности, а также для дифференциации с филогенетически близкими видами комплекса «*B. ceracia*». 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. ceracia* [Podin et al., 2014; Zakharova et al., 2018] и *B. ceracia* 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 3% штаммов первоначально были определены ошибочно: штамм 18NA19 является *B. thailandensis*, штамм PT02 – *B. ceracia*, еще один штамм (15NA20) не относится к видам, идентифицируемым использованной генодиагностической тест-системой. Полногеномное или частичное (7 консервативных генов, входящих в схему МЛСТ) секвенирование нуклеотидных последовательностей отдельных

штаммов подтвердило определенную в ПЦР видовую принадлежность исследованных изолятов.

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) и в ПЦР (группа почвенных штаммов). Подавляющее большинство (97%) штаммов первой группы обладали типичным спектром биохимической активности. Во второй группе типичных штаммов оказалось значительно меньше – 67%. Эффективность биохимической идентификации почвенных буркхольдерий комплекса «*B. pseudomallei*» также оказалась значительно ниже, чем клинических – 42% и 97%, соответственно.

Вероятно, такая значительная разница в результатах биохимической идентификации клинических и почвенных штаммов связана с тем, что в лабораториях госпиталей атипичные штаммы в большинстве случаев не идентифицируются как возбудитель мелиоидоза. Исходя из этого предположения мы на основании полученных данных рассчитали показатели критериев диагностической ценности биохимического профилирования. 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%.

Как упоминалось выше, буркхольдерии комплекса «*B. pseudomallei*» в приблизительно 14% случаев системами биохимической идентификации определяются ошибочно [Kiratisin et al., 2007; Zakharova et al., 2018], а в случае атипичных, в частности, чувствительных к гентамицину штаммов, процент верно идентифицированных штаммов составляет всего 57% [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 мы и наблюдали при анализе клинических изолятов.

Все штаммы *B. thailandensis*, выделенные и исследованные в настоящей работе, системой VITEK<sup>®</sup> 2 GN были определены как *B. pseudomallei*. При проведении анализа профиля биохимической активности нами 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 исполнении и не входит в панель тестов для автоматизированной идентификации грамотрицательных клинически значимых бактерий. 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*, что будет предметом последующих исследований.

Для *B. ceracia*, как и других видов одноименного комплекса, характерна значительная фенотипическая изменчивость даже внутри одного штамма [Larsen et al., 1993]. Способность к изменению метаболизма и биохимического профиля значительно осложняет надежную биохимическую дифференциацию видов *Bcc* как внутри комплекса, так и с представителями целого ряда других бактерий, включая *B. pseudomallei* [Kiratisin et al., 2007]. Ранее Y. Podin с соавторами сообщали, что у

штаммов *B. pseudomallei*, идентифицированных корректно и ошибочно как *B. ceracia*, биохимические профили отличаются по результатам тестов NAGA ( $\beta$ -N-ацетилгалактозаминидаза) и BNAG ( $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидаза) [Podin et al., 2014]. Проведенное позднее детальное исследование особенностей спектров биохимической активности штаммов возбудителя мелиоидоза из коллекции Волгоградского НИПЧИ показало, что у штаммов *B. pseudomallei*, некорректно идентифицированных как *B. ceracia*, присутствует комбинация активной D-целлобиазы (dCEL) с отрицательными результатами одного или более из тестов ProA (L-пролинариламидаза), TyrA (тирозинариламидаза) и NAGA [Zakharova et al., 2018]. Интересно, что у описанного в настоящей работе штамма *B. ceracia* PT02 при повторном тестировании после хранения на питательной среде изменились результаты отдельных биохимических тестов, среди которых наблюдали изменение первоначально положительных тестов TyrA и NAGA на отрицательные, при обоих тестированиях стабильно присутствовали активности D-целлобиазы и  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы. При первом тестировании *B. ceracia* PT02 был определен системой VITEK<sup>®</sup> 2 GN как *B. pseudomallei* при сочетании положительных тестов dCEL, TyrA и NAGA. Позднее штамм был идентифицирован корректно как *B. ceracia*, при наличии активности D-целлобиазы и негативных результатах тестов на тирозинариламидазу и  $\beta$ -N-ацетилгалактозаминидазу, что подтверждает ключевую роль комбинации перечисленных признаков для дифференциации этих двух видов буркхольдерий.

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 *BccMLST* (анализ консервативных генов *atpD*, *gltB*, *gyrB*, *lepA*, *phaC*, *recA* и *trpB*) [Spilker et al., 2009], подтвердило принадлежность штамма к виду *B. ceracia*. У штамма *B. ceracia* PT02 выявлены новые аллельные варианты генов *gltB* и *gyrB* и назначен сиквенс-тип ST1400, который на тот момент не был представлен 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). Дополнительный анализ аллельных профилей 2688 штаммов из базы данных *Bcc*MLST по алгоритму eBURST разместил PT02 в Кк штамма *B. ceracia* CVS136, представленный еще 5 клиническими штаммами этого вида, что окончательно подтвердило видовую принадлежность штамма PT02.

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. ceracia* и 14 штаммов других видов. Все штаммы *B. pseudomallei* в РЛА показали положительный результат на 4 креста, 10 штаммов *B. thailandensis* и один *B. ceracia* – на 3 креста, остальные 88 штаммов показали отрицательные результаты, что позволило разработчикам оценить специфичность разрабатываемого диагностикума на свежевыделенных штаммах различных видов рода *Burkholderia*.

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. 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»). Таким образом, диапазон морфологической вариабельности 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 полимиксину (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 амоксициллин/клавулонату. Описаны случаи развития в процессе лечения резистентности к цефтазидиму, а также понижения чувствительности к карбапенемам [Price et al., 2017]. Около 90% исследованных нами штаммов показали типичные для возбудителя мелиоидоза свойства в отношении протестированных 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.

В геномах штаммов, показавших разный уровень чувствительности к гентамицину, проведен поиск и структурный анализ потенциальных детерминант

резистентности к аминогликозидам. У штаммов 15QB1(V1512) ST 70, 16QT2(V1607) ST948 и 16QT3(V1608) ST1566 обнаружены точечные миссенс мутации в генах трех частично охарактеризованных эффлюкс-насосов семейства RND – AmrAB-OprA, BpeAB-OprB и BpeEF-OprC и двух с неизвестными функциями, а также гене аминогликозид-6'-N-ацетилтрансферазы AAC(6')-III.

В отличие от описанных ранее у чувствительных к гентамицину штаммов мутаций в гене транспортера AmrB системы эффлюкса AmrAB-OprA [Podin et al., 2014; Bugrysheva et al., 2017], у изолятов, исследованных в настоящей работе, изменения в данном гене отсутствовали. Однако у всех трех штаммов присутствовали аминокислотные замены в периплазматическом линкере AmrA – ARG160>SER, Arg116>Gln и Gly237>Arg, Thr317>Lys, которые, вероятно, являются основной причиной утраты резистентности к гентамицину. Межштаммовые различия в уровне чувствительности к гентамицину, по видимому, обусловлены аминокислотной заменой Val222>Met в репрессоре AmrR семейства TetR, которая присутствовала у умеренно чувствительных штаммов 16QT2(V1607) и 16QT3(V1608) и не обнаружена у полностью чувствительного штамма 15QB1(V1512). По аналогии с эффлюкс оперонами BpeAB-OprB и BpeEF-OprC, которые экспрессируется у *B. pseudomallei* только в мутантах по регуляторным белкам BpeR и BpeT, и обеспечивают невысокий уровень резистентности [Bugrysheva et al., 2017], можно предположить, 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 полной 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.

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 свидетельствуют, что определение видовой принадлежности возбудителя при подозрении на мелиоидоз только с использованием презумптивной идентификации и автоматизированного биохимического профилирования не является однозначным, и требует подтверждения.

Для анализа генетического полиморфизма внутри вьетнамской популяции возбудителя мелиоидоза нами было проведено мультилокусное сиквенс-типирование по схеме *VpcMLST* [Godoy et al., 2003; Price et al., 2016] 30 клинических и 17 природных изолятов *B. pseudomallei*, 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. Интересно, что 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. Ограниченное географическое распространение новых ST и терминальная локализация на филогенетических линиях являются свидетельством их недавнего появления и эволюционных событий, продолжающихся в популяции вьетнамских штаммов *B. pseudomallei* и в настоящее время.

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, ST 351 и ST541). Обнаруженная тенденция географической приуроченности ST по макрорегионам страны подтверждена при включении в исследованную выборку 64 штаммов из базы данных PubMLST.

В последние годы в мире появляются сообщения об обнаружении штаммов *B. pseudomallei*, устойчивых к нескольким классам антибиотиков, которые обычно эффективны для лечения мелиоидоза, включая  $\beta$ -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 диагностические препараты и одной из задач нашей работы была разработка и оценка собственных средств генодиагностики мелиоидоза.

В результате проведенного исследования разработано два лабораторных протокола для выявления ДНК *B. pseudomallei* методами LAMP и ПЦР. Оценка их аналитических и диагностических характеристик показала, что LAMP является более чувствительным методом (аналитическая чувствительность LAMP составила 68,8 фг в реакционной смеси, или  $1 \times 10^3$  м.к./мл, ПЦР – 688 фг в реакционной смеси, или  $1 \times 10^4$  м.к./мл), при одинаковой 100%-ой специфичности для чистых культур. При этом установлено, что разработанный ПЦР-протокол обладает более высокими показателями диагностической ценности: предсказательная ценность положительного результата у LAMP и ПЦР составили 86 и 100%, соответственно; отрицательного результата – 25 и 57%; диагностическая эффективность – 76 и 88%. Полученные нами результаты сравнения эффективности LAMP и ПЦР для выявления *B. pseudomallei* из почвы 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 культур методом LAMP с использованием двух вариантов наборов праймеров составили 73 и 82% [Щит и др., 2018].

Экономическая составляющая и высокая аналитическая чувствительность петлевой изотермической амплификации являются несомненными достоинствами метода. Однако его использование для выявления *B. pseudomallei* имеет и существенные ограничения. Содержание G+C в геноме возбудителя мелиоидоза (около 69%) значительно превышает среднестатистическое для бактериальных видов. Вместе с тем известно, что GC-богатые области ДНК амплифицируются менее эффективно из-за неполной денатурации цепей ДНК и повышенной стабильности вторичных структур при постоянной температуре, оптимальной для работы полимеразы. Визуальный учет результата реакции является субъективным, неясно, как интерпретировать переходные оттенки между желтым и розовым. Кроме того, паттерн амплификации при электрофоретической детекции результатов не позволяет дифференцировать истинно положительную реакцию и неспецифическую амплификацию, например, из-за образования димеров праймеров, вследствие чего регистрируются ложноположительные результаты. В связи с вышеизложенным, считаем использование петлевой изотермической амплификации для детекции возбудителя мелиоидоза нецелесообразным.

Таким образом, проведенная оценка разработанных нами 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 апробация разработанного Y. Peng с соавторами способа быстрого обнаружения *B. pseudomallei* на реальных пробах почвы 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, влияющим на клинические проявления инфекции. Исследование биологических особенностей возбудителя, разработка новых средств для выявления и идентификации *B. pseudomallei* в значительной степени способствуют ранней диагностике мелиоидоза и, как следствие, снижению летальности. При выполнении настоящей работы создан и охарактеризован набор клинических и почвенных штаммов возбудителя мелиоидоза и близкородственных буркхольдерий из различных регионов страны, 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 буркхольдерий 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. ceparia* 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.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
КОЕ	–	колониеобразующая единица
м.к./мл	–	микробные клетки в миллилитре
п.н.	–	пара нуклеотидов
МЛСТ (MLST)	–	мультилокусное сиквенс-типирование
Кк	–	клональный комплекс
ОКО	–	отрицательный контрольный образец
ПКО	–	положительный контрольный образец
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
CDS	–	кодирующая последовательность
GI	–	геномный остров
ST	–	сиквенс-тип
T3SS1	–	1 кластер генов системы секреции третьего типа
LAMP	–	петлевая изотермическая амплификация
RPA	–	рекомбиназная полимеразная амплификация
LF-RPA	–	рекомбиназная полимеразная амплификация с латеральным потоком
WGS	–	полногеномное секвенирование

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Ветчинин, С. С. и др. Возможность выявления штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза при сочетании методов иммуноблоттинга и амплификации ДНК/ С. С. Ветчинин, И. Ю. Щит, А. Г. Шевяков, С. Ф. Бикетов // Инфекция и иммунитет. – 2019. – Т. 9, №. 2. – С. 404-408.
2. Захарова, И. Б. Мелиоидоз и сап: современное состояние проблемы и актуальные вопросы эпидемиологического надзора/ И. Б. Захарова, А. В. Топорков, Д. В. Викторов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. – № 6. – С. 103-109.
3. Зинченко, О. В. Разработка методических подходов для специфической индикации и идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза с помощью полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией результатов: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.02.03 – Волгоград, 2010. – 23 с.
4. Топорков, А. В. Мелиоидоз и сап/ Д. В. Викторов, А. В. Липницкий, Л. К. Меринова, Н. П. Храпова, С. И. Жукова, И. Б. Захарова, Г. А. Ткаченко, В. А. Антонов, С. С. Савченко, И. И. Корсакова, Е. В. Шубникова// Коллективная монография. – Волгоград: Волга-Пресс, 2016. – 400 с.
5. Тарасова, Т. Д. Использование трансформации для картирования хромосомы *Pseudomonas pseudomallei*/ Т. Д. Тарасова, Л. А. Ряпис, Л. К. Меринова, Н. М. Сычева// Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1983. – №.1. – С.33-36.
6. Щит, И. Ю. Сравнительный анализ методов LAMP и ПЦР-РВ для обнаружения возбудителей сапа и мелиоидоза/ И. Ю. Щит, К. Б. Игнатов, С. Ф. Бикетов// Клиническая лабораторная диагностика. – 2018.– Т. 63, №. 6. – С. 378-384. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-6-378-384
7. Ashdown, L. R. An improved screening technique for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clinical specimens/ L. R. Ashdown// Pathology. – 1979. – Vol. 11, №. 2. – P. 293-297. DOI: 10.3109/00313027909061954

8. Benoit, T. J. A review of melioidosis cases in the Americas/ T. J. Benoit, D. D. Blaney, T. J. Doker, J. E. Gee, M. G. Elrod et. al.// The American journal of tropical medicine and hygiene. – 2015. – Vol. 93, №. 6. – P. 1134-1139. DOI: 10.4269/ajtmh.15-0405
9. Birnie, E. Melioidosis in Africa: should we be looking more closely?/E. Birnie, W. J. Wiersinga, D. Limmathurotsakul, M. P. Grobusch//Future Microbiol. – 2015. – Vol. 10, №. 2. – P. 273-81. DOI: 10.2217/fmb.14.113
10. Birnie, E. Global burden of melioidosis in 2015: a systematic review and data synthesis / E. Birnie, H. S. Virk, J. Savelkoel, R. Spijker, E. Bertherat et. al.// The Lancet Infectious Diseases. – 2019. – Vol. 19, №. 8. – P. 892-902. DOI: 10.1016/S1473-3099(19)30157-4
11. Brett, P. J. sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species / P. J. Brett, D. DeShazer, D. E. Woods// International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1998. – Vol. 48, №. 1. – P. 317-320. DOI: 10.1099/00207713-48-1-317
12. Bugrysheva, J. V. Antibiotic Resistance Markers in *Burkholderia pseudomallei* Strain Bp1651 Identified by Genome Sequence Analysis/ J. V. Bugrysheva, D. Sue, J. E. Gee, M. G. Elrod, A. R. Hoffmaster et. al.//Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2017. – Vol. 61, №. 6. – P. e00010-17. DOI: 10.1128/AAC.00010-17
13. Chambon, L. Isolement du bacille de Whitmore à partir du milieu extérieur/ Chambon, L.// Ann. Inst. Pasteur. –1955. – Vol. 89, №. 2. – P. 229–235
14. Chantratita, N. Loop-mediated isothermal amplification method targeting the TTS1 gene cluster for detection of *Burkholderia pseudomallei* and diagnosis of melioidosis/ N. Chantratita, E. Meumann, A. Thanwisai, D. Limmathurotsakul, V. Wuthiekanun et. al.//J Clin Microbiol. – 2008. – Vol. 46, №. 2. – P. 568-73. DOI: 10.1128/JCM.01817-07
15. Chantratita, N. Biological relevance of colony morphology and phenotypic switching by *Burkholderia pseudomallei*/N. Chantratita, V. Wuthiekanun, K.

- Boonbumrung, R. Tiyawisutsri, M. Vesaratchavest et. al.//Journal of bacteriology. – 2007. – Vol.189, №. 3. – P. 807-817. DOI: 10.1128/JB.01258-06
16. Cheng, A. C. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management / A. C. Cheng, B. J. Currie //Clinical microbiology reviews. – 2005. – Vol. 18, №. 2. – P. 383-416. DOI: 10.1128/CMR.18.2.383-416.2005
  17. Chewapreecha, C. Global and regional dissemination and evolution of *Burkholderia pseudomallei*/C. Chewapreecha, M. T. Holden, M. Vehkala, N. Välimäki, Z. Yang et. al.//Nature microbiology. – 2017. –Vol. 2, № 4. – P. 16263
  18. Choy, J. L. Animal melioidosis in Australia/ J. L. Choy, M. Mayo, A. Janmaat, & B. J. Currie//Acta tropica. –2000. –Vol. 74, №. 2-3. – P. 153-158. DOI: 10.1016/s0001-706x(99)00065-0
  19. Crannell, Z. A. Equipment-free incubation of recombinase polymerase amplification reactions using body heat// Z. A. Crannell, B. Rohrman, R. Richards-Kortum// PloS one. –2014. –Vol. 9, №. 11. – P. e112146. DOI: 10.1371/journal.pone.0112146
  20. Craw, P. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review/P. Craw, W. Balachandran// Lab on a Chip. –2012. – Vol. 12, №. 14. – P. 2469-2486. DOI: 10.1039/c2lc40100b
  21. Currie, B. J. Epidemiology: A global picture of melioidosis/ B. J. Currie, M. Kaestli//Nature. –2016. –Vol. 529, №. 7586. – P. 290-291. DOI: 10.1038/529290a
  22. Currie, B. J. Melioidosis: evolving concepts in epidemiology, pathogenesis, and treatment/ B. J. Currie // In Seminars in respiratory and critical care medicine. Thieme Medical Publishers. – 2015. – Vol. 36, №.1. – P. 111-125. DOI: 10.1055/s-0034-1398389
  23. Currie, B. J. Neurological melioidosis/ B. J. Currie, D. A. Fisher, D. M. Howard, J. N. Burrow// Acta tropica. – 2000. – Vol. 74, №. 2-3. – P. 145-151. DOI: 10.1016/s0001-706x(99)00064-9
  24. Currie, B. J. Endemic melioidosis in tropical northern Australia: a 10-year prospective study and review of the literature/ B. J. Currie, D. A. Fisher, D. M.

- Howard, J. N. Burrow, D. Lo et. al.// *Clinical Infectious Diseases*. – 2000. – Vol. 31, №. 4. – P. 981-986. DOI: 10.1086/318116
25. Currie, B. J. The epidemiology and clinical spectrum of melioidosis: 540 cases from the 20 year Darwin prospective study/ B. J. Currie, L. Ward, A. C. Cheng // *PLoS Negl Trop Dis*. – 2010. – Vol. 4, № 11. – P. e900. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000900
26. Currie, B. J. Melioidosis: evolving concepts in epidemiology, pathogenesis, and treatment / B. J. Currie, // *Seminars in respiratory and critical care medicine*. – Thieme Medical Publishers, 2015. – Vol. 36, № 01. – P. 111-125.
27. De Smet, B. Whole-genome sequencing confirms that *Burkholderia pseudomallei* multilocus sequence types common to both Cambodia and Australia are due to homoplasmy/ B. De Smet, D. S. Sarovich, E. P. Price, M. Mayo, V. Theobald et. al.// *J Clin Microbiol*. – 2015. – Vol. 53, №1. – P. 323–326. DOI: 10.1128/JCM.02574-14
28. Douglas, M. W. Epidemiology of community acquired and nosocomial bloodstream infections in tropical Australia: a 12 month prospective study/ M. W. Douglas, G. Lum, J. Roy, D. A. Fisher, N. M. Anstey et. al.// *Tropical Medicine & International Health*. – 2004. – Vol. 9, № 7. – P. 795-804. DOI: 10.1111/j.1365-3156.2004.01269.x
29. Duong, H. M. A typical case of melioidosis in South Vietnam/ H.M. Duong, T. H. Cuong// *Milit Med*. – 1967. – Vol. 132, № 2. – P. 98-100.
30. Elschner, M. C. Isolation of the highly pathogenic and zoonotic agent *Burkholderia pseudomallei* from a pet green Iguana in Prague, Czech Republic/ M. C. Elschner, J. Hnizdo, I. Stamm, H. El-Adawy, K. Mertens et. al.// *BMC veterinary research*. – 2014. – Vol. 10, № 1. – P. 1-5. DOI: 10.1186/s12917-014-0283-7
31. Gill, P. Nucleic acid isothermal amplification technologies—a review/ P. Gill, A. Ghaemi// *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. – 2008. – Vol. 27, № 3. – P. 224-243. DOI: 10.1080/15257770701845204
32. Gilling, D. H. The identification and differentiation between *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* using one gene pyrosequencing/ D. H. Gilling, V.

- A. Luna, C. Pflugradt// International Scholarly Research Notices. – 2014. – Article ID 109583. DOI: 10.1155/2014/109583
33. Glass, M. B. Comparison of four selective media for the isolation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*/M. B. Glass, C. A. Beesley, P. P. Wilkins, A. R. Hoffmaster//The American journal of tropical medicine and hygiene. – 2009. – Vol. 80, № 6. – P. 1023-1028. DOI: 10.1155/2014/109583
34. Glass, M. B. Pneumonia and septicemia caused by *Burkholderia thailandensis* in the United States/ M. B. Glass, J. E. Gee, A. G. Steigerwalt, D.Cavuoti, T. Barton et. al.//Journal of clinical microbiology. – 2006. – Vol. 44, № 12. – P. 4601-4604. DOI: 10.1128/JCM.01585-06
35. Godoy, D. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*/D. Godoy, G. Randle, A. J. Simpson, D. M. Aanensen, T. L. Pitt et. al.//Journal of clinical microbiology. – 2003. –Vol. 41, № 5. – P. 2068-2079. DOI: 10.1128/JCM.41.5.2068-2079.2003
36. Göhler, A. Multitarget quantitative PCR improves detection and predicts cultivability of the pathogen *Burkholderia pseudomallei*/A. Göhler, T. T. Trung, V. Hopf, C. Kohler, J. Hartleib et. al.// Applied and environmental microbiology. – 2017. – Vol. 83, № 8. – P. e03212-16. DOI: 10.1128/AEM.03212-16
37. Harvey, S. P. Ribotyping of *Burkholderia mallei* isolates/ S. P. Harvey & J. M. Minter// FEMS Immunology & Medical Microbiology. – 2005. – Vol. 44, № 1. – P. 91-97. DOI: 10.1016/j.femsim.2004.12.002
38. Hinjoy, S. Melioidosis in Thailand: Present and Future/S. Hinjoy, V. Hantrakun, S. Kongyu, J. Kaewrakmuk, T. Wangrangsimakul et. al. //Trop Med Infect Dis. – 2018. – Vol. 3, № 2. – P. 38. DOI: 10.3390/tropicalmed3020038
39. Hoffmaster, A. R. Melioidosis diagnostic workshop, 2013/A. R. Hoffmaster, D. AuCoin, P. Baccam, H. C. Baggett, R. Baird, S. Bhengsri & N. Chantratita //Emerging infectious diseases. – 2015. – Vol. 21, № 2. – P. e141045 DOI: 10.3201/eid2102.141045

40. Holden, M. T. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*/ M. T. Holden, R. W. Titball, S. J. Peacock, A. M. Cerdeño-Tárraga, T. Atkins et. al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. –Vol. 101, №. 39. – P. 14240-14245. DOI: 10.1073/pnas.0403302101
41. Kaestli, M. Sensitive and specific molecular detection of *Burkholderia pseudomallei*, the causative agent of melioidosis, in the soil of tropical northern Australia/ M. Kaestli, M. Mayo, G. Harrington, F. Watt, J. Hill, et. al. // Applied and environmental microbiology. – 2007. –Vol. 73, №. 21. – P. 6891-6897. DOI: 10.1128/AEM.01038-07
42. Katangwe, T. Human melioidosis, Malawi, 2011/ T. Katangwe, J. Purcell, B. D. Naor Bar-Zeev, J. Montgomery, M. Alaerts et. al. // Emerging infectious diseases. – 2013. – Vol. 19, № 6. – P. 981-984. DOI: 10.3201/eid1906.120717
43. Kim T.H. Fully integrated lab-on-a-disc for nucleic acid analysis of food-borne pathogens/ T. H. Kim, J. Park, C.J. Kim, YK. Cho //Anal Chem. – 2014. – Vol. 86, №. 8. – P. 3841–3848. DOI: 10.1021/ac403971h
44. Kiratisin, P. Accuracy of commercial systems for identification of *Burkholderia pseudomallei* versus *Burkholderia cepacia*/P. Kiratisin, P. Santanirand, N. Chantratita, S. Kaewdaeng //Diagnostic microbiology and infectious disease. – 2007. – Vol. 59, № 3. – P. 277-281. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.06.013
45. Koponen, M. A. Melioidosis: forgotten, but not gone! / M. A. Koponen, D. Zlock, D. L. Palmer, T. L. Merlin//Archives of internal medicine. – 1991. – Vol. 151, № 3. – P. 605-608. DOI: 10.1001/archinte.151.3.605
46. Larsen G.Y. Marked phenotypic variability in *Pseudomonas cepacia* isolated from a patient with cystic fibrosis/ G.Y. Larsen, T.L. Stull, J.L. Burns//J Clin Microbiol. – 1993. – Vol. 31, № 4. – P. 788-792. DOI: 10.1128/jcm.31.4.788-792.1993
47. Li, J. Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes/J. Li, J. Macdonald//Biosensors and Bioelectronics. – 2015. – Vol. 64. – P. 196-211. DOI: 10.1016/j.bios.2014.08.069

48. Li, J. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification/J. Li, J. Macdonald, F. V. Stetten //Analyst. – 2020. – Vol. 145, № 5. – P. 1950-1960. DOI: 10.1039/c9an90127b
49. Limmathurotsakul, D. Systematic review and consensus guidelines for environmental sampling of *Burkholderia pseudomallei*/D. Limmathurotsakul, D. A. Dance, V. Wuthiekanun, M. Kaestli, M. Mayo et al. //PLoS neglected tropical diseases. – 2013. – Vol. 7, № 3. – P. e2105. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002105
50. Limmathurotsakul, D. Melioidosis: a clinical overview/ D. Limmathurotsakul & S. J. Peacock//British medical bulletin. – 2011. – Vol. 99, № 1. – P. 125-139. DOI: 10.1093/bmb/ldr007
51. Limmathurotsakul, D. Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis/ D. Limmathurotsakul, N. Golding, D. A. Dance, J. P. Messina, D. M. Pigott et. al. //Nature microbiology. – 2016. – Vol. 1, № 1. – P. 15008. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2015.8
52. Limmathurotsakul, D. Defining the true sensitivity of culture for the diagnosis of melioidosis using Bayesian latent class models/ D. Limmathurotsakul, K. Jansen, A. Arayawichanont, J. A. Simpson, L. J. White et. al. // PloS one. –2010. – Vol. 5, № 8. – P. e12485. DOI: 10.1371/journal.pone.0012485
53. Limmathurotsakul, D. Chronic melioidosis, relapse and latency/D. Limmathurotsakul, G. C. Koh, S. J. Peacock, B. Currie// Melioidosis: a century of observation and research, Elsevier. – 2012. – P. 120-129.
54. Lipuma, J. J. Update on the *Burkholderia cepacia* complex/ J. J. Lipuma //Current opinion in pulmonary medicine. – 2005. – Vol. 11, № 6. – P. 528-533. DOI: 10.1097/01.mcp.0000181475.85187.ed
55. Liu, L. Visual and equipment-free reverse transcription recombinase polymerase amplification method for rapid detection of foot-and-mouth disease virus/L. Liu, J. Wang, R. Zhang, M. Lin, R. Shi et al. //BMC Vet Res. –2018. – Vol. 14, № 1. – P. 263. DOI: 10.1186/s12917-018-1594-x

56. Lo, T. J. Melioidosis in a tropical city state, Singapore/ T. J. Lo, L. W. Ang, L. James, K. T. Goh// Emerging infectious diseases.– 2009 . – Vol. 15, № 10. – P. 1645. DOI: 10.3201/eid1510.090246
57. Lowe, W. PCR-based Methodologies Used to Detect and Differentiate the *Burkholderia pseudomallei* complex: *B. pseudomallei*, *B. mallei*, and *B. thailandensis*/ W. Lowe, J. K. March, A. J. Bunnell, K. L. O'Neill, R. A. Robison //Curr Issues Mol Biol. – 2014. –Vol. 16. – P. 23-54.
58. Lowe, C. W. A Quadruplex Real-Time PCR Assay for the Rapid Detection and Differentiation of the Most Relevant Members of the *B. pseudomallei* Complex: *B. mallei*, *B. pseudomallei*, and *B. thailandensis*/ C. W. Lowe, B. A. Satterfield, D. B. Nelson, J. D. Thiriot, M. J. Heder et. al. // PloS one. – 2016. – Vol. 11, № 10. – P. e0164006. DOI: 10.1371/journal.pone.0164006
59. Luong, N.B. La mélioirose porcine au Vietnam/ N.B. Luong, Kim N.T.// Off. Int. Epizoot. – 1961. –Vol. 56. – P. 944–976.
60. MacLennan, J. D. Bacterial digestion of collagen/J. D. MacLennan, I. Mandl, E. L. Howes//The Journal of clinical investigation. –1953. – Vol. 32, № 12. – P. 1317-1322. DOI: 10.1172/JCI102860
61. Meumann, E. M. Clinical evaluation of a type III secretion system real-time PCR assay for diagnosing melioidosis/ E. M. Meumann, R. T. Novak, D. Gal, M. E. Kaestli, M. Mayo et. al. //Journal of Clinical Microbiology. –2006. – Vol. 44, № 8. – P. 3028-3030. DOI: 10.1128/JCM.00913-06
62. Moore, R. A. Efflux-mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*/ R. A. Moore, D. DeShazer, S. Reckseidler, A. Weissman, D. E. Woods //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1999. – Vol. 43, № 3. – P. 465-470.
63. Ngauy, V. Cutaneous melioidosis in a man who was taken as a prisoner of war by the Japanese during World War II/V. Ngauy, Y. Lemeshev, L. Sadkowski, G. Crawford//Journal of clinical microbiology. – 2005. – Vol. 43, № 2. – P. 970-972. DOI: 10.1128/JCM.43.2.970-972.2005

64. Nicholls L. Melioidosis, with special reference to the dissociation of *Bacillus whitmore* / L. Nicholls //British journal of experimental pathology. – 1930. – Vol. 11, № 6. – P. 393.
65. Notomi, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA/ T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino et. al. //Nucleic acids research. – 2000. – Vol. 28, № 12. – P. e63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63
66. Novak, R. T. Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting the type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei*/ R. T. Novak, M. B. Glass, J. E. Gee, D. Gal, M. J. Mayo et. al. //Journal of clinical microbiology. – 2006. – Vol. 44, № 1. – P. 85-90. DOI: 10.1128/JCM.44.1.85-90.2006
67. Palleroni, N. Family of *Pseudomonadaceae*. Bergey's manual of systematic bacteriology / N. Palleroni, N. Krieg, G. Holt// Baltimore. – 1984. – Vol. 1. – P. 141-219.
68. Parry, C. M. Melioidosis in Southern Vietnam: clinical surveillance and environmental sampling/ C. M. Parry, V. Wuthiekanun, N. T. T. Hoa, T. S. Diep, L. T. T. Thao et. al. //Clinical infectious diseases. – 1999. – Vol. 29, № 5. – P. 1323-1326.
69. Peng, Y. Rapid detection of *Burkholderia pseudomallei* with a lateral flow recombinase polymerase amplification assay/ Y.Peng, X. Zheng, B. Kan, W. Li, W. Zhang et. al. //PloS one. – 2019. – Vol. 14, № 7. – P. e0213416. DOI: 10.1371/journal.pone.0213416
70. Phung L.V. Cellular lipid and fatty acid compositions of *Burkholderia pseudomallei* strains isolated from human and environment in Vietnam/ L.V. Phung, T.B. Tran, H. Hotta, E. Yabuuchi, I. Yano// Microbiol. Immunol. –1995. – Vol. 39. – P. 105–116. DOI: 10.1111/j.1348-0421.1995.tb02176.x
71. Phuong, D. M. Clinical and microbiological features of melioidosis in northern Vietnam/ D. M. Phuong, T. T. Trung, K. Breitbach, N. Q. Tuan, U. Nübel et. al. //Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 2008. – Vol. 102, № 1. – P. S30-S36. DOI: 10.1016/S0035-9203(08)70009-9

72. Piepenburg, O. DNA detection using recombination proteins/ O. Piepenburg, C. H. Williams, D. L. Stemple, N.A. Armes// PLoS Biol. – 2006. – Vol. 4, № 7. – P. e204. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040204
73. Pearson, T. Phylogeographic reconstruction of a bacterial species with high levels of lateral gene transfer/ T. Pearson, P. Giffard, S. Beckstrom-Sternberg, R. Auerbach, H. Hornstra, A. Tuanyok, G. J. Allan //BMC biology. – 2009. – Vol. 7, № 1. – P. 78. DOI: 10.1186/1741-7007-7-78
74. Podin, Y. *Burkholderia pseudomallei* isolates from Sarawak, Malaysian Borneo, are predominantly susceptible to aminoglycosides and macrolides/ Y. Podin, D. S. Sarovich, E. P. Price, M. Kaestli, M. Mayo et. al. //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2014. – Vol. 58, № 1. – P. 162-166. DOI:10.1128/AAC.01842-13
75. Pons, R. Melioidosis in Cochin China/ R. Pons, M. Advier //J Hyg (Lond). –1927. – Vol. 26, № 1. – P. 28-30. DOI: 10.1017/s0022172400008871
76. Price, E. P. Improved multilocus sequence typing of *Burkholderia pseudomallei* and closely related species / E. P. Price, B. MacHunter, B. G. Spratt, D. M. Wagner, B. J. Currie et. al. //Journal of medical microbiology. – 2016. – Vol. 65, № 9. – P. 992-997. DOI: 10.1099/jmm.0.000312
77. Price, E. P. Unprecedented melioidosis cases in northern Australia caused by an Asian *Burkholderia pseudomallei* strain identified by using large-scale comparative genomics/ E. P. Price, D. S. Sarovich, E. J. Smith, B. MacHunter, G. Harrington et. al. //Applied and environmental microbiology. – 2016. – Vol. 82, № 3.– P. 954-963. DOI: 10.1128/AEM.03013-15
78. Price, E. P. Whole-genome sequences of *Burkholderia pseudomallei* isolates exhibiting decreased meropenem susceptibility/ E. P. Price, M. L. Smith, E. E. Paxinos, L. J. Tallon, L. Sadzewicz et. al. //Genome announcements. – 2017. – Vol. 5, № 14. DOI: 10.1128/genomeA.00053-17
79. Ralph, A. Transmission of *Burkholderia pseudomallei* via breast milk in northern Australia/ A. Ralph, J. McBride, B. J. Currie//The Pediatric infectious disease journal. –2004. – Vol. 23, № 12. – P. 1169-1171.

80. Roesnita, B. Diagnostic use of *Burkholderia pseudomallei* selective media in a low prevalence setting/ B. Roesnita, S. T. Tay, S. D. Puthuchery & I. C. Sam //Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. –2012. – Vol. 106, № 2. – P. 131-133. DOI: 10.1016/j.trstmh.2011.10.007
81. Rolim, D. B. Melioidosis, northeastern Brazil/ D. B. Rolim, D. C. Vilar, A. Q. Sousa, I. S. Miralles, D. C. de Oliveira et. al. // Emerg Infect Dis. – 2005. – Vol. 11, № 9. – P. 1458-1460. DOI: 10.3201/eid1109.050493
82. Rosser, A. Isothermal Recombinase Polymerase amplification (RPA) of *Schistosoma haematobium* DNA and oligochromatographic lateral flow detection/A. Rosser, D. Rollinson, M. Forrest, B. L. Webster//Parasit Vectors. – 2015. – Vol. 8, № 446. DOI: 10.1186/s13071-015-1055-3
83. Sadiq M. A. The relationship between bacterial sources and genotype to the antimicrobial resistance pattern of *Burkholderia pseudomallei*/ M. A. Sadiq, L. Hassan, S. A. Aziz, Z. Zakaria, H. I. Musa et. al. //Vet World. – 2018. – Vol. 11, № 10. – P. 1404-1408. DOI: 10.14202/vetworld.2018.1404-1408
84. N. Saïdani, Melioidosis as a travel-associated infection: case report and review of the literature/N. Saïdani, K. Griffiths, M. Million, P. Gautret, G. Dubourg et. al. //Travel medicine and infectious disease. – 2015. – Vol. 1, № 5. – P. 367-381. DOI: 10.1016/j.tmaid.2015.08.007
85. Salam A. P. Melioidosis acquired by traveler to Nigeria/ A. P. Salam, N. Khan, H. Malnick, D. T. Kenna, D. A. Dance et. al. //Emerg Infect Dis. – 2011. – Vol. 17, № 7. – P. 1296-8. DOI: 10.3201/eid1707.100502
86. Sanford, J. P. Melioidosis: forgotten but not gone/ J. P. Sanford//Transactions of the American Clinical and Climatological Association. – 1978. – Vol. 89. – P. 201-205.
87. Sarovich, D. S. Phylogenomic analysis reveals an Asian origin for African *Burkholderia pseudomallei* and further supports melioidosis endemicity in Africa /D.S. Sarovich, B. Garin, B. De Smet, M. Kaestli, M. Mayo et. al. //MSphere. – 2016. – Vol. 1, № 2. – P. e00089-15. DOI: 10.1128/mSphere.00089-15

88. Sarovich, D. S. Variable virulence factors in *Burkholderia pseudomallei* (melioidosis) associated with human disease / D. S. Sarovich, E. P. Price, J. R. Webb, L. M. Ward//PLoS One. – 2014. – Vol. 9, №. 3.– P. e91682. DOI: 10.1371/journal.pone.0091682
89. Sim, S. H. The core and accessory genomes of *Burkholderia pseudomallei*: implications for human melioidosis/ S. H. Sim, Y. Yu, C. H. Lin, R. K. Karuturi, V. Wuthiekanun et. al. //PLoS Pathog. – 2008. – Vol. 4, №. 10. – P. e1000178. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000178
90. Spring-Pearson S. M. Pangenome Analysis of *Burkholderia pseudomallei*: Genome Evolution Preserves Gene Order despite High Recombination Rates/ S. M. Spring-Pearson, J. K. Stone, A. Doyle, C. J. Allender, R. T. Okinaka et. al. //PLoS One. – 2015. – Vol. 10, №. 10. – P. e0140274. DOI: 10.1371/journal.pone.0140274
91. Stanton, A.T. Melioidosis, a new disease of the tropics/ A. T. Stanton, W. Fletcher //Trans Congr Far East Assoc Trop Med. –1921. – Vol. 2 . – P. 196–198.
92. Steinmetz, I. Melioidosis in Africa: time to uncover the true disease load/ I. Steinmetz, G. E. Wagner, E. Kanyala, M. Sawadogo, H. Soumeiya et. al. //Tropical medicine and infectious disease. –2018 . – Vol. 3, №. 2 . – P. 62. DOI: 10.3390/tropicalmed3020062
93. Tandhavanant, S. Effect of colony morphology variation of *Burkholderia pseudomallei* on intracellular survival and resistance to antimicrobial environments in human macrophages in vitro/ S. Tandhavanant, A. Thanwisai, D. Limmathurotsakul, S. Korbsrisate, N. P. Day et. al. // BMC microbiology. –2010 . – Vol. 10 , №. 1 . – P. 303. DOI: 10.1186/1471-2180-10-303
94. Thibault, F. M. Identification and discrimination of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, and *B. thailandensis* by real-time PCR targeting type III secretion system genes/ F. M. Thibault, E. Valade, D. R. Vidal//Journal of clinical microbiology. – 2004. – Vol. 42, №. 12 . – P. 5871-5874. DOI: 10.1128/JCM.42.12.5871-5874.2004

95. Trinh, T. T. A simple laboratory algorithm for diagnosis of melioidosis in resource-constrained areas: A study from north-central Vietnam/T. T. Hoang, T. S Trinh, D. A. Tran, V. T. Trinh, A. Göhler et. al. //Clinical Microbiology and Infection. – 2018. – Vol. – 24, №. 1. – P. e1-84. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.07.029
96. Trinh, T. T. Melioidosis in Vietnam: Recently improved recognition but still an uncertain disease burden after almost a century of reporting/ T. T. Trinh, L. D. Nguyen, T. V. Nguyen, C. X. Tran, A. V. Le et. al. //Tropical Medicine and Infectious Disease. – 2018b. – Vol. 3, №. 2. – P. 39. DOI: 10.3390/tropicalmed3020039
97. Trunck, L. A. Molecular basis of rare aminoglycoside susceptibility and pathogenesis of *Burkholderia pseudomallei* clinical isolates from Thailand / L. A. Trunck, K. L. Propst, V. Wuthiekanun, A. Tuanyok, S. M. Beckstrom-Sternberg, J. S. Beckstrom-Sternberg, H. P. Schweizer //PLoS neglected tropical diseases. – 2009. – Vol. 3, № 9. – P. e519.
98. Trung, T. T. Improved culture-based detection and quantification of *Burkholderia pseudomallei* from soil/ T. T., Trung, A. Hetzer, E. Topfstedt, A. Göhler, D. Limmathurotsakul et. al. //Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 2011 . – Vol. 105 , №. 6 . – P. 346-351. DOI: 10.1016/j.trstmh.2011.03.004
99. Tuanyok, A. Genomic islands from five strains of *Burkholderia pseudomallei*/ A. Tuanyok, B. R. Leadem, R. K. Auerbach, S. M. Beckstrom-Sternberg, J. S. Beckstrom-Sternberg, M. Mayo et. al. //BMC Genomics. – 2008 . – Vol. 9. – P. 566. DOI: 10.1186/1471-2164-9-566
100. U'Ren, J. M. Tandem repeat regions within the *Burkholderia pseudomallei* genome and their application for high resolution genotyping/ J. M. U'Ren, J. M. Schupp, T. Pearson, H. Hornstra, C. L. C. Friedman et. al. //BMC microbiology. – 2007. – Vol. 7, №. 1. – P. 23. DOI: 10.1186/1471-2180-7-23
101. Van Phung, L. Pilot study of exposure to *Pseudomonas pseudomallei* in northern Vietnam/ L. Van Phung, H. T. Quynh, E. Yabuuchi, D. A. Dance//Transactions of

- the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 1993 . – Vol. 87, №. 4 . – P. 416-416. DOI: 10.1016/0035-9203(93)90017-k
102. Van Zandt, K. E. Glanders: an overview of infection in humans/K. E. Van Zandt, M. T. Greer, H. C. Gelhaus//Orphanet journal of rare diseases. – 2013 . – Vol. 8, №. 1. – P. 1-7. DOI: 10.1186/1750-1172-8-131
  103. Vaucel, M. Presence probable du bacille de Whitmore dans l'eau de mer au Tonkin/ M. Vaucel//Bull Soc Pathol Exot. – 1937. – Vol. 30. – P. 10-15.
  104. Vesaratchavest, M. Nonrandom distribution of *Burkholderia pseudomallei* clones in relation to geographical location and virulence/ M. Vesaratchavest, S. Tumapa, N. P. Day, V. Wuthiekanun, W. Chierakul *et al.* //J Clin Microbiol. – 2006 . – Vol. 44. – P. 2553–2557. DOI: 10.1128/JCM.00629-06
  105. Viktorov, D. V. High-level resistance to fluoroquinolones and cephalosporins in *Burkholderia pseudomallei* and closely related species/ D. V. Viktorov, I. B. Zakharova, M. V. Podshivalova //Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 2008. – Vol. 102, № Supplement 1. – P. S103-S110.
  106. Wand, N. I. V. Point-of-care diagnostic assay for the detection of Zika virus using the recombinase polymerase amplification method/N. I. V. Wand, L. C. Bonney, R. J. Watson, V. Graham, R. Hewson //The Journal of general virology. – 2018. – Vol. 99, №. 8 . – P. 1012. DOI: 10.1099/jgv.0.001083
  107. Whitlock, G. C. Glanders: off to the races with *Burkholderia mallei*/ G. C. Whitlock, D. Mark Estes, A. G. Torres // FEMS microbiology letters. – 2007. – Vol. 277, №. 2 . – P. 115-122. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00949.x
  108. Whitmore, A. An account of the discovery of a hitherto undescribed infective disease occurring among the population of Rangoon Indian/ A. Whitmore, C. S. Krishnaswami //Med Gaz. – 1912 . – Vol. 47, №. 7. – P. 262–267.
  109. Whitmore, A. An account of a glanders-like disease occurring in Rangoon// J Hyg – 1913. – Vol. 13, №. 1. – P. 34. DOI: 10.1017/s0022172400005234
  110. Wiersinga, W.J. Clinical, environmental, and serologic surveillance studies of melioidosis in Gabon, 2012-2013/ W. J. Wiersinga, E. Birnie, T. A. Weehuizen, A.

- S. Alabi, M. A. Huson et. al. // *Emerg Infect Dis.* – 2015. – Vol. 21, №. 1 . – P. 40-47. DOI: 10.3201/eid2101.140762
111. Wiersinga, W. J. Melioidosis/W. J. Wiersinga, B. J. Currie, & S. J. Peacock// *New England Journal of Medicine.* – 2012 . – Vol. 367, №. 11 . – P. 1035-1044. DOI: 10.1056/NEJMra1204699
112. Wiersinga, W. J. Melioidosis/ W. J. Wiersinga, H. S. Virk, A. G. Torres, B. J. Currie, S. J. Peacock et. al. //*Nature reviews Disease primers.* –2018. – Vol. 4, №. 1. – P. 1-22. DOI: 10.1038/nrdp.2017.107
113. Wongsuvan, G. Lack of correlation of *Burkholderia pseudomallei* quantities in blood, urine, sputum and pus/ G. Wongsuvan, D. Limmathurotsakul, S. Wannapasni, W. Chierakul, N. Teerawattanasook et. al. //*Southeast Asian J Trop Med Public Health.* – 2009. – Vol. 40 , №. 4. – P. 781-784.
114. Xiao, X. A multi-label classifier for predicting the subcellular localization of gram-negative bacterial proteins with both single and multiple sites/X. Xiao, Z. C. Wu, K. C Chou// *PloS one.* – 2011. – Vol. 6, №. 6. – P. e20592. DOI: 10.1371/journal.pone.0020592
115. Yabuuchi, E. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov/ E. Yabuuchi, Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta et. al. // *Microbiol. Immunol.* – 1992. – Vol. 36 – P. 1251-1275. DOI: 10.1111/j.1348-0421.1992.tb02129.x
116. Zakharova, I. B. Development of a multiplex PCR assay for the detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia thailandensis*, and *Burkholderia cepacia* complex/ I. B. Zakharova, N. Teteryatnikova, A. Toporkov, D. Viktorov//*Acta Tropica* –2017. – Vol. 174. – P. 1-8. DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.06.016
117. Zakharova, I. B. Influence of biochemical features of *Burkholderia pseudomallei* strains on identification reliability by VITEK® 2 System / I.B. Zakharova, Y. A. Lopasteyskaya, A. V. Toporkov, D. V. Viktorov//*Journal of global infectious diseases.* – 2018. – Vol. 10, № 1. – P. 7-10. DOI: 10.4103/jgid.jgid\_39\_17

118. Zhao, Y. Isothermal amplification of nucleic acids/ Y. Zhao, F. Chen, Q. Li, L. Wang, C. Fan// *Chemical reviews*. – 2015. – Vol. 115, №. 22. – P. 12491-12545. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00428
119. Zheng, X. Endemic melioidosis in southern China: past and present/X. Zheng, Q. Xia, L. Xia, W. Li // *Tropical medicine and infectious disease*. –2019. – Vol. 4, №. 1. – P. 39. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00428
120. Bankevich, A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing/ A. Bankevich, S. Nurk, D. Antipov, A. A. Gurevich, M. Dvorkin et al.// *J Comput Biol*. –2012. – Vol.19, №.5. – P. 455-477. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021
121. Zimin, A.V. The MaSuRCA genome assembler/A. V. Zimin, G. Marçais, D. Puiu, M. Roberts, S. L. Salzberg, J. A. Yorke et. al. // *Bioinformatics*. – 2013. – Vol. 29, №.21. – P. 2669-2677. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt476
122. Tatusova, T. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline/ T. Tatusova, M. DiCuccio, A. Badretdin et al. // *Nucleic Acids Res*. – 2016. – Vol. 44, №.14. – P. 6614-6624. DOI: 10.1093/nar/gkw569

## БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую признательность и благодарность научному руководителю работы к.б.н., доценту Захаровой И. Б. за профессиональные советы и поддержку в процессе работы.

Благодарю директора ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора Топоркова А. В. за предоставленную возможность выполнения работы.

Выражаю искреннюю благодарность сотрудникам ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора д.б.н. Викторову Д. В., к.м.н. Шпаку И.М., за помощь на различных этапах работы и обсуждение результатов исследования.