

На правах рукописи

ЗАХАРОВА ИРИНА БОРИСОВНА

**МЕЛИОИДОЗ - АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ СОВРЕМЕННОЙ
ЭВОЛЮЦИИ И РАЗНООБРАЗИЯ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* В
АСПЕКТАХ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ
ДИАГНОСТИКИ**

1.5.11 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Волгоград – 2022

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора)

Научный консультант: Топорков Андрей Владимирович, доктор медицинских наук (3.2.2 – Эпидемиология), доцент, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, директор.

Официальные оппоненты:

Малецкая Ольга Викторовна, доктор медицинских наук (специальность 1.5.11 – микробиология), профессор, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, заместитель директора по научной и противоэпидемической работе, г. Ставрополь.

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

Кафтырева Лидия Алексеевна, доктор медицинских наук (специальность 1.5.11 – микробиология), Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующий лабораторией кишечных инфекций, руководитель отдела микробиологии, г. Санкт-Петербург.

Ведущая организация:

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

Защита диссертации состоится «__» _____ 202__ г. в __ часов на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: Территория «Квартал А», р.п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская обл., 142279

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на сайте <https://www.obolensk.org/center/diss/competitor.htm>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Мелиоидоз, вероятно, одна из самых опасных и сложных как для клинической, так и лабораторной диагностики инфекций. Ключевое значение в патогенезе мелиоидоза имеет способность возбудителя – *Burkholderia pseudomallei* – проникать, выживать и размножаться в клетках млекопитающих, что определяет полиморфность клинических проявлений, сложность лечения, латентную форму и высокую частоту рецидивов (5–28%) [Meraj et al., 2019]. Дифференциация между мелиоидозом и другими инфекциями часто невозможна [Inglis et al., 2009]. Больным нередко диагностируют вирусные лихорадки, туберкулез, онкологические и другие заболевания. Летальность при мелиоидозе варьирует от 90% при отсутствии или неадекватной терапии, в случаях септического шока до 80% при соответствующем лечении, до практически нулевой при вовремя диагностированных кожных формах, в среднем 10 - 50%, в зависимости от уровня диагностических возможностей и доступности интенсивной терапии [Currie, 2015].

Биологическими особенностями *B. pseudomallei* обусловлена и значительная сложность его идентификации и дифференциации с филогенетически близкими видами комплексов «*B. pseudomallei*» (Bpc), «*B. cepacia*» (Bcc) и рядом других грамотрицательных неферментирующих бактерий. Четыре из восьми видов Bpc – *B. mallei*, *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* и *B. humptydooensis* – формируют отдельный филогенетический кластер и имеют очень высокое фенотипическое, биохимическое, антигенное и генетическое сходство [Tuanyok et al., 2017], другие четыре вида – *B. oklahomensis*, *B. singularis*, *B. mayonis* sp. nov. и *B. savannae* sp. nov. – расположены на отдельных ветвях внутри комплекса [Vandamme et al., 2017; Hall et al., 2021] и также имеют сходство с возбудителем мелиоидоза по диагностически значимым признакам.

B. pseudomallei – сапрофит по своей природе и в естественных условиях входит в состав микробиоты влажных почв эндемичных регионов мира. Кроме того, микроб успешно выживает в клетках ряда видов свободноживущих простейших, способен колонизировать растения и некоторые микоризные грибы, вызывать инфекцию у разных классов позвоночных животных, и мелиоидоз – у человека.

Благодаря внушительному набору факторов патогенности *B. pseudomallei* способна персистировать в различных типах клеток-хозяев и во внеклеточном пространстве, а также манипулировать сигнальными путями хозяина для уклонения от его иммунного ответа [Lazar Adler et al., 2009, 2016; Buddhisa et al., 2015]. Роль гуморально-

го ответа в развитии иммунитета к мелиоидозу неоднозначна, возможны случаи повторного заражения даже при наличии высоких уровней антител [Vasu et al., 2003]. Ключевая роль для защиты от прогрессирования инфекции и бактериального клиренса принадлежит клеточно-опосредованному иммунному ответу [Jenjaroen et al., 2015].

Неполное понимание патофизиологии инфекционного процесса при мелиоидозе является одной из проблем для создания эффективной вакцины – средства специфической профилактики мелиоидоза и сапа отсутствуют [Morici et al., 2019]. В связи с высокой вирулентностью, низкой инфицирующей дозой возбудителя мелиоидоза и сапа относятся ко второй группе патогенных для человека микроорганизмов и категории «В» потенциальных средств биотерроризма [Онищенко и др., 2016; Gilad et al., 2007].

Ранняя диагностика мелиоидоза и начало специфического лечения в значительной степени определяют прогноз заболевания и неверный или отсроченный диагноз могут иметь тяжелые последствия, так как большинство антибиотиков, обычно используемых для лечения септицемии, неэффективны против *B. pseudomallei* [Sadiq et al., 2016; Cummings and Slayden, 2017].

Степень разработанности проблемы. Диагностическим стандартом для мелиоидоза является выделение и идентификация культуры. Однако способность *B. pseudomallei* при различного рода стрессах, в том числе при воздействии антибиотиков, переходить в жизнеспособное, но некультивируемое состояние [Inglis and Sagripanti, 2006] нередко делают патоген невыявляемым методами классической бактериологии, что, вероятно, является одной из причин невысокой диагностической эффективности (около 60%) метода выделения культуры [Limmathurotsakul, 2010]. Необычная для грамотрицательных бактерий и весьма разнообразная форма колоний даже внутри одного штамма [Chantratita et al., 2007; Shea et al., 2017], а также невысокая скорость роста значительно затрудняют распознавание патогена при исследовании нестерильного в норме материала. Широкий диапазон внутривидовой вариабельности целого ряда биохимических признаков и высокий уровень сходства с оппортунистическими буркхольдериями являются причиной ошибок идентификации *B. pseudomallei* коммерческими биохимическими анализаторами приблизительно в 15% исследований [Zong et al., 2012; Podin et al., 2013]. Для быстрого определения видовой принадлежности выделенных культур весьма перспективно использование метода масс-спектрометрического профилирования [Suttisunhakul et al., 2017]. Однако

референтные масс-спектры для буркхольдерий комплекса «*B. pseudomallei*» в коммерческих базах данных либо отсутствуют, либо представлены рибосомными белками. Для обеспечения точной идентификации и дифференциации видов внутри комплекса существует потребность в расширении имеющихся баз данных дополнительными эталонными спектрами.

Для идентификации возбудителя мелиоидоза широко используется полимеразная цепная реакция, но высокая частота рекомбинации и геномная гетерогенность штаммов [Spring-Pearson et al., 2015; Price et al., 2017] не исключают вероятности получения ложных результатов [Kaestli et al., 2012; Price et al., 2017].

Перечисленные факты свидетельствуют, что существует проблема выявления и надежной дифференциации *B. pseudomallei* от других видов буркхольдерий, а разработка новых инструментов для быстрой и точной идентификации возбудителя мелиоидоза остается актуальной.

Цель работы: Совершенствование методических подходов лабораторной диагностики мелиоидоза и дифференциации *B. pseudomallei* от филогенетически близких видов патогенных буркхольдерий на основании комплексного анализа современных представлений о геномике, биологических свойствах, экологии возбудителя и актуальных вопросов эпидемиологии мелиоидоза.

Задачи исследования:

1. Проанализировать актуальные аспекты филогении и геномики рода *Burkholderia* и видов комплекса «*B. pseudomallei*» в ракурсе проблемы дифференциации возбудителя мелиоидоза и других патогенных представителей рода.
2. На основании данных мультилокусного сиквенс-типирования и сиквенс-типирования ядра генома оценить филогенетические связи внутри вьетнамской популяции *B. pseudomallei* и определить закономерности территориальной приуроченности штаммов возбудителя с различными сиквенс-типами.
3. Провести анализ дивергенции между видами *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* по признаку основных факторов вирулентности.
4. Охарактеризовать современную эпидемиологическую ситуацию по мелиоидозу в эндемичных регионах мира, определить тенденции заноса инфекции на неэндемичные территории. Провести ретроспективный анализ особенностей влияния предрасполагающих факторов на риск развития мелиоидоза у посетителей эндемичных регионов в сравнении с коренными жителями.

5. Определить нижний предел температурного диапазона выживания *B. pseudomallei* для понимания климатических границ его потенциального распространения.
6. Оценить эффективность современных фенотипических методов лабораторной диагностики мелиоидоза и сапа, разработать способы ее повышения: определить комплексы биохимических признаков, влияющих на корректность идентификации *B. pseudomallei* и *B. mallei*; создать набор референтных масс-спектров общеклеточных белков возбудителей мелиоидоза и сапа, позволяющий достоверно определять их видовую принадлежность методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.
7. Провести анализ распространенности и генетической стабильности генов β -лактамаз среди штаммов возбудителя мелиоидоза, сапа и *B. thailandensis* различного географического происхождения и оценить возможность их использования в качестве генодиагностических мишеней для выявления и дифференциации патогенных буркхольдерий.
8. Оценить диагностическую эффективность каждого из методов лабораторной диагностики мелиоидоза и их вклад в установление диагноза.

Научная новизна. Впервые проведена оценка генетического разнообразия штаммов *B. pseudomallei* на территории Вьетнама с использованием анализа аллельного полиморфизма по схеме мультилокусного сиквенс-типирования, а также полногеномных последовательностей. Показано неслучайное распределение штаммов по биогеографическим нишам и разделение вьетнамской популяции *B. pseudomallei* на отдельные субпопуляции, имеющие территориальную приуроченность.

Впервые получены экспериментальные доказательства способности возбудителя мелиоидоза длительное время выживать при температурах около 0 °С, а также при воздействии отрицательных температур как в постоянном режиме, так и в условиях неоднократного замораживания и оттаивания. Полученные данные подтверждают гипотезу, что возбудитель мелиоидоза не является исключительно тропическим обитателем и свидетельствуют о потенциально более широком естественном ареале *B. pseudomallei*.

На основании ретроспективного анализа нуклеотидных последовательностей семи консервативных генов, входящих в схему MLST, впервые показано различное происхождение штаммов *B. pseudomallei*, выделенных во Франции от животных и из внешней среды в период активной эпизоотии мелиоидоза (1976–1978 гг.).

Проведенный анализ заносных случаев мелиоидоза в неэндемичные страны позволил впервые показать отсутствие статистически достоверного влияния возраста ($t = 0,36, p = 0,7458$) и предрасполагающих заболеваний ($t = 1,24, p = 0,3040$) на риск развития мелиоидоза у посетителей эндемичных территорий, в отличие от коренного населения.

Установлено, что вариабельная часть видового пангенома *B. thailandensis* содержит более широкий, чем считалось ранее, набор ответственных за патогенность детерминант с высоким уровнем гомологии белковых продуктов с ортологами *B. pseudomallei*.

В настоящей работе впервые определены комплексы ключевых признаков, влияющие на корректность определения автоматическим анализатором Vitek 2 видовой принадлежности штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* с атипичными профилями биохимической активности: определяющие низкую дискриминацию между видами *B. pseudomallei* и *B. ceracia*, *B. mallei* и *B. ceracia* и ошибочную идентификацию возбудителя мелиоидоза как *B. ceracia*.

Впервые сформированы масс-спектры общеклеточных белков *B. pseudomallei* и *B. mallei*, включенные в электронные базы данных MALDI-TOF спектров S.A.R.A.M.I.S.[™] и MALDI Biotyper.

Впервые показана возможность использования генов β -лактамаз молекулярных классов В и D в качестве генетических мишеней для идентификации и дифференциации *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*. Установлено, что бактерии перечисленных видов отличаются по наборам генов β -лактамаз молекулярных классов В и D, выбранные гены имеют хромосомную локализацию, присутствуют у всех штаммов в соответствии с видовым репертуаром, являются консервативными, стабильно сохраняются в неселективных условиях в течение длительного времени, что определяет их пригодность для использования в качестве генодиагностических мишеней.

Сконструированы и запатентованы: набор праймеров, детектирующих β -лактамазы буркхольдерий комплекса «*B. pseudomallei*» молекулярных классов А, В и D, относящихся к суперсемействам β -лактамазы/транспептидазы и металлогидролазы/оксидоредуктазы; два набора праймеров для амплификации высокоиммунногенных мембранных протеинов *B. pseudomallei* с целью получения рекомбинантных антигенов; набор олигонуклеотидных праймеров для выявления вариантных

штаммов *B. thailandensis*, содержащих высоко гомологичный *B. pseudomallei* кластер генов биосинтеза капсульного полисахарида.

Приоритетность проведенных исследований подтверждена 10 патентами (RU 2280688 C1, RU 2413763 C1, RU 2458117 C1, RU 2458140 C1, RU 2474614 C1, RU 2608505 C, RU 2608506 C, RU 2728356 C1, RU 2662957 C2, RU 2662958 C2).

Теоретическая значимость работы. Получены экспериментальные подтверждения гипотезы о неслучайном распределении штаммов *B. pseudomallei* по различным экологическим нишам. На основании филогенетического анализа данных мультилокусного сиквенс-типирования по классической схеме и мультилокусного сиквенс-типирования ядра генома штаммов вьетнамской популяции возбудителя мелиоидоза показано, что современная микроэволюция *B. pseudomallei* обусловлена адаптацией возбудителя к конкретному экологическому окружению. Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о ведущей роли гомологичной рекомбинации в процессах адаптивной эволюции возбудителя мелиоидоза, что выражается в формировании новых сиквенс-типов (ST), являющихся одно- и двух-локусными вариантами ранее обнаруженных ST.

Проведено теоретическое обоснование принадлежности вида *B. thailandensis* к оппортунистическим патогенам при наличии экспериментально подтвержденных межштаммовых отличий в вирулентности.

На основании полученных данных о толерантности *B. pseudomallei* к длительному воздействию низких температур, включая отрицательные, высказана гипотеза, что область экологической пригодности для сохранения возбудителя в природе гораздо шире, чем прогнозировалось ранее, и существует потенциальная возможность интродукции возбудителя на ряде территорий Российской Федерации.

Теоретически обоснованы технологические решения, позволяющие существенно повысить эффективность средств идентификации видов комплекса «*B. pseudomallei*» и их дифференциации с филогенетически близкими бактериями рода *Burkholderia*. Проведен сравнительный анализ характеристик коммерческих биохимических анализаторов в аспекте их пригодности для идентификации возбудителей мелиоидоза и сапа. Охарактеризованы особенности биохимических профилей атипичных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, статистически достоверно определяющие их некорректную идентификацию автоматическими анализаторами как *B. ceracia*. Осуществлена оптимизация протокола времяпролетной масс-

спектрометрии для идентификации буркхольдерий II группы патогенности, что обеспечивает эффективную белковую экстракцию при необходимом уровне биологической безопасности. Определены новые генодиагностические мишени, позволяющие в формате мультиплексной ПЦР идентифицировать *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*.

Результаты проведенного исследования позволяют теоретически обосновать степень информативности каждого из методов лабораторной диагностики мелиоидоза и их вклад в установление диагноза.

Практическая значимость работы. Аналитические и экспериментальные данные, полученные при выполнении диссертационной работы, послужили основой проекта методических указаний «Лабораторная диагностика мелиоидоза и сапа. Организация и проведение в лабораториях различного уровня», представленные в практическом руководстве «Лабораторный скрининг и идентификация *Burkholderia pseudomallei*» (Волгоград, 2018), а также были использованы в проекте Методических Указаний «Порядок молекулярного типирования возбудителей особо опасных инфекционных болезней на базе референс-центров и национальных центров верификации диагностической деятельности» и методических рекомендациях МР 3.1.0129-18 «Порядок организации и проведения индикации патогенных биологических агентов, в том числе неустановленного систематического положения», утвержденных Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека - Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 31 мая 2018 г. (федеральный уровень внедрения).

Полученные в настоящей работе данные по спектрам биохимической активности штаммов *Burkholderia* spp. и профили генов β -лактамаз молекулярных классов А, В и D внесены в паспорта штаммов коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (учрежденческий уровень внедрения).

Разработан раздел референтных MALDI TOF спектров типичных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* электронной базы данных S.A.R.A.M.I.S.TM, который также размещен в единой базе данных «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I–II групп патогенности для программы MALDI Biotyper», зарегистрированной Федеральной службой по интеллектуальной собственности (номер регистрации в Реестре баз данных 2016620345 от 15.03.2016) (федеральный уровень внедрения).

Зарегистрирован в установленном порядке разработанный «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.) (федеральный уровень внедрения).

Аннотированы и депонированы в GenBank NCBI нуклеотидные последовательности генов β-лактамаз молекулярных классов В и D: суперсемейства «металлогидролазы / оксидоредуктазы» семейств β-CASP РНК-метаболизирующие гидролазы (KU053951, KU053952, KU053953, KU053954, KU053955) и глиоксалазы II (KU165828, KU165829, KU165830, KU165831, KU165832, KU165833), суперсемейства β-лактамазы/транспептидазы, семейства β-лактамазы/D-ala карбоксипептидазы (оксациллиназы) (MG384618, MG384619, MG384620, MG384621, MG384622, MG384623) штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* дикого типа и их полирезистентных производных. Депонированы в GenBank NCBI последовательности шотган полногеномных сиквенсов двух пар изогенных штаммов *B. pseudomallei*, отличающихся по чувствительности к цефтазидиму и имипенему (QLUY00000000.1, QLVB00000000.1, QLUX00000000.1, QLVA00000000.1), а также штаммов дикого типа *B. pseudomallei* (QLVC00000000.1, PHRB00000000.1, PHRC00000000.1, WTLF00000000.1, WSRT00000000.1, WSRV00000000.1, WSRU00000000.1, WSPI00000000.1, WUMQ00000000.1, WTLF00000000.1, WOWY00000000.1), *B. separacia* (QLUZ00000000.1), *B. thailandensis* (PHRD00000000.1, WOXA00000000.1, WOWZ00000000.1) (международный уровень внедрения).

В Государственной Коллекции Патогенных Бактерий РосНИПЧИ «Микроб» (ГКПБ «М») депонированы полирезистентные варианты и инсерционные мутанты со сниженным уровнем устойчивости к β-лактамам штаммов *Burkholderia* spp. под номерами КМ 195, КМ 196, КМ 197, КМ 30 и КМ 32. В Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» депонированы охарактеризованные типичные штаммы *B. pseudomallei* и *B. mallei* дикого типа (справки о депонировании №№ 360–363 от 23.03.2012 г.) (федеральный уровень внедрения).

Материалы анализа мирового опыта лабораторной диагностики мелиоидоза и сапа, а также практические рекомендации, сделанные на основании проведенных ис-

следований, включены в лекционные курсы дополнительного послевузовского образования при ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (учрежденческий уровень внедрения).

Разработанные в настоящей работе методические приемы, алгоритмы анализа и генодиагностический набор реагентов используются в деятельности Референс-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, а также для идентификации клинических и почвенных изолятов на эндемичной по мелиоидозу территории Социалистической Республики Вьетнам в лаборатории молекулярной биологии Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра (г. Ханой) и вошли в практическое руководство «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 (международный уровень внедрения).

Методология и методы исследования. Методологической основой настоящего исследования являются труды отечественных и зарубежных авторов в области фундаментальных исследований биологии *B. pseudomallei*, эпидемиологии и лабораторной диагностики мелиоидоза. Дизайн исследования, в соответствии с поставленной целью, предполагал рассмотрение вопросов эпидемиологии мелиоидоза на современном этапе; анализ филогенетических связей внутри рода *Burkholderia*, а также аспектов структурной, сравнительной и функциональной геномики видов комплекса «*Burkholderia pseudomallei*»; оценку эффективности методов лабораторной диагностики инфекции и разработку способов ее повышения. В исследовании использованы системный подход и специальные методы, включающие ретроспективный анализ, микробиологические, молекулярно-генетические, биоинформатические и статистические.

Положения, выносимые на защиту:

1. Филогенетически близкие штаммы *B. pseudomallei* северного и северо-центрального макрорегионов Вьетнама имеют неслучайное распределение по биогеографическим нишам и формируют два кластера, соответствующие регионам происхождения изолятов. Формирование генетического разнообразия *B. pseudomallei* обусловлено процессами адаптивной микроэволюции за счет гомологичной рекомбинации, что выражается в образовании «молодых» сиквенс-типов,

представляющих новые комбинации известных аллелей и являющихся одно- и двух-локусными вариантами известных сиквенс-типов.

2. У *B. thailandensis* и *B. pseudomallei* уровень идентичности ортологичных белков, обеспечивающих способность возбудителя мелиоидоза успешно инфицировать и колонизировать млекопитающих, превышает среднее значение совпадения протеомов (72,1%) и составляет 91% (ДИ 82,1–100) и 89,25% (ДИ 80,8–97,7) для ортологов, локализованных на хромосомах 1 и 2, соответственно. Штаммы *B. thailandensis* отличаются по набору факторов вирулентности и степени патогенности. Сапрофитическая бактерия *B. thailandensis* не является полностью авирулентным видом.
3. На фоне увеличения уровня заболеваемости мелиоидозом в эндемичных регионах наблюдается тенденция прогрессивного роста количества случаев заноса инфекции на неэндемичные территории при значительном расширении перечня регионов инфицирования. Наличие предрасполагающих факторов развития мелиоидоза у посетителей эндемичных регионов, в отличие от коренных жителей, не имеет статистически достоверного влияния на риск развития инфекции (возраст – $t = 0,36$, $p = 0,7458$; предрасполагающие заболевания – $t = 1,24$, $p = 0,3040$).
4. *B. pseudomallei* способна переживать длительное воздействие отрицательных температур при условии постепенной адаптации к холоду. Устойчивость штаммов возбудителя мелиоидоза к отрицательным температурам статистически достоверно зависит от степени выраженности феномена I-диссоциации ($p < 0,0001$).
5. Выявлены комплексы ключевых признаков, статистически достоверно влияющие на корректность идентификации патогенных буркхольдерий комплекса «*B. pseudomallei*» системой Vitek 2 GN (ANOSIM $R = 0,836$ – $0,981$, $P = 0,001$). Отсутствие активности β -N-ацетилгалактозаминидазы, фосфатазы и β -N-ацетилглюкозаминидазы в комплексе с активными D-целлобиазой, тирозинариламидазой и L-пролинариламидазой определяют низкую дискриминацию между видами *B. pseudomallei* и *B. ceracia*. Комплекс активной D-целлобиазы с отсутствием активности одного или более из ферментов β -N-ацетилгалактозаминидазы, тирозинариламидазы или L-пролинариламидазы приводит к некорректной идентификации *B. pseudomallei* как *B. ceracia*. Сочетание у штаммов *B. mallei* способности к утилизации одного или более из сахаров: D-трегалозы, сахарозы и D-маннозы с активной гамма-глутамилтрансферазой приводит к идентификации возбудителя сапа с низкой дискриминацией между видами *B. mallei* и *B. ceracia*. Изогенные морфо-

логические варианты колоний возбудителя мелиоидоза могут отличаться по спектрам биохимической активности, что оказывает влияние на корректность видовой идентификации системой Vitek 2 GN. Колонии *B. pseudomallei* морфотипа В («пуговицы») идентифицируются ошибочно как *P. aeruginosa* в 100% случаев.

6. Адаптированный протокол пробоподготовки для идентификации возбудителей мелиоидоза и сапа методом MALDI-TOF MS обеспечивает эффективную белковую экстракцию при необходимом уровне биологической безопасности. С использованием профилирования общеклеточных белков созданы наборы референтных масс-спектров штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, внедренные в электронные базы данных S.A.R.A.M.I.S.TM и MALDI Biotyper, что обеспечивает достоверную идентификацию буркхольдерий II группы патогенности.
7. Гены β -лактамаз молекулярных классов В и D у *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* представлены индивидуальным для каждого вида набором, являются консервативными, присутствуют у всех штаммов в соответствии с видовым репертуаром, стабильно сохраняются в неселективных условиях в течение длительного времени, что определяет их пригодность для использования в качестве диагностических генетических мишеней, детекция которых в формате мультиплексной ПЦР обеспечивает идентификацию и дифференциацию видов комплекса «*B. pseudomallei*». Созданный набор реагентов «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» β LB/D - EPh» с высокой эффективностью идентифицирует штаммы *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* различного географического происхождения, независимо от срока давности и источника выделения культур, а также штаммы перечисленных видов с измененным уровнем резистентности к β -лактамам.
8. Оценка диагностической эффективности методов лабораторной диагностики мелиоидоза на основании собственных экспериментальных исследований и анализа литературных данных продемонстрировала высокие показатели для метода ПЦР – не менее 99,0 %, невысокие (60%) – для бактериологического метода и неоднозначность отрицательных результатов методов иммунодиагностики – среди бактериологически подтвержденных случаев мелиоидоза результаты РНГА отрицательные в 42 %, ТИФА – в 33 %, НМФА – в 10,5% случаев.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов основана на анализе значительного объема литературных данных и

фактического материала, полученного с использованием современных методов исследования. Основные положения, изложенные в настоящей работе, опубликованы в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах и прошли экспертную оценку.

Диссертация выполнена в рамках 12 государственных тем: 029-3-04 (№ гос. регистрации 01200407957), 034-5-04 (№ гос. регистрации 01200407962), 046-3-07 (№ гос. регистрации 01200707220), 055-1-11 (№ гос. регистрации 01201155412), 071-7.4-11 (№ гос. регистрации 01201168591), 052-1-14 (№ гос. регистрации 01201376018), 059-3-11 (№ гос. регистрации 01201155410), 061-3-11 (№ гос. регистрации 01201155414), 081-3-13 (№ гос. регистрации 01201351985), 086-2-16 (№ гос. регистрации АААА-А17-117022850059-6), 090-3-17 (№ гос. регистрации АААА-А17-117022850054-1) и № гос. регистрации АААА-А18-118032790070-8, в трех из которых автор был ответственным исполнителем, в трех – руководителем.

Основные результаты исследований изложены в 121 опубликованной работе, из них 25 – в рецензируемых периодических изданиях, входящих в перечень ВАК; 4 – в зарубежных журналах, индексируемых WoSCC, WoS и SCOPUS; а также в 4 учебно-методических работах, одной коллективной монографии, 10 патентах на изобретения и вошли в одну базу данных.

Результаты исследований по теме диссертационной работы были представлены на 26-ти Всероссийских и международных научных и научно-практических форумах, включая конгрессы «Vaccine & Immunization» (Manchester, 1999), «The 4th World Melioidosis Congress (WMC)» (Perth, Australia, 2001), «The 6th WMC» (Khon Kaen, Thailand, 2007) и «The 9th WMC» (Hanoi, Vietnam, 2019).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена в форме монографии на 310 страницах компьютерного текста и состоит из введения, 5 глав, содержащих анализ мирового опыта по проблеме исследования и экспериментальные разделы, заключения, выводов и списка литературы, включающего 563 источника. Работа иллюстрирована 35 таблицами и 42 рисунками.

Личный вклад автора. Непосредственно автором разработана концепция исследования, определены алгоритмы и методология выполнения работы, обобщены литературные данные по проблеме, проведены аналитические и *in silico* исследования, а также анализ и интерпретация результатов экспериментальных исследований. Отдельные этапы экспериментальных исследований и сбор полевого материала выполнены совместно с сотрудниками лаборатории патогенных буркхольдерий ФКУЗ

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора и Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра (СРВ, Ханой), работавших под руководством автора настоящей работы. Секвенирование нуклеотидных последовательностей и MALDI-ToF масс-спектрометрия проведены совместно с сотрудниками лабораторий биоинформационного и протеомного анализа ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора в рамках выполнения государственных НИР. Сканирующая электронная микроскопия была выполнена при технической поддержке сотрудников ООО "ТЕСКАН". Формирование референтных белковых профилей масс-спектров *B. pseudomallei* и *B. mallei* для базы данных MALDI Biotyper проведено совместно со специалистами ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Биологическое разнообразие, сравнительная геномика и филогения рода *Burkholderia*. Расширенный анализ полных геномных последовательностей привел к переоценке установленных ранее филогенетических связей внутри рода, в результате чего было образовано четыре независимых таксона. В обновленный состав рода *Burkholderia* вошли клинически значимые и фитопатогенные виды, сгруппированные в комплексы «*B. pseudomallei*» (Врс) и «*B. ceracia*» (Всс), и группу «*B. glumae-gladioli*».

Возбудитель мелиоидоза обладает обширными генетическими ресурсами, что позволяет ему адаптироваться к широкому спектру сред обитания. В разных экологических нишах в результате отбора образуются геномные клады, имеющие специфические рекомбинационные паттерны. То есть, разные условия внешней среды предполагают различные наборы рекомбинационных гаплотипов и неслучайное распределение штаммов по биогеографическим нишам. Проведенный в настоящей работе анализ аллельного полиморфизма и структуры вьетнамской популяции *B. pseudomallei* подтвердил данную гипотезу и показал адаптивную диверсификацию штаммов возбудителя в соответствии природно-климатическими условиями на территории страны. Мультилокусное сиквенс-типирование 31 клинического и 24 почвенного изолятов, а также 4 штаммов *B. pseudomallei* от животных, выделенных в центральном и северном макрорегионах Вьетнама в 2015–2021 гг. выявило 28 сиквенс-типов, в числе которых присутствовали 20 известных ST (ST15, ST16, ST41, ST46, ST70, ST85, ST201,

ST351, ST389, ST500, ST507, ST542, ST541, ST549, ST654, ST858, ST948, ST1051, ST1566, ST1567) и обнаружено 8 новых, так называемых «молодых» сиквенс-типов (ST1650, ST1915, ST1923, ST1924, ST1925 и трех ST, обозначенных new 6–8, ждущих присвоения номеров). Все «молодые» ST представляли собой новые комбинации известных аллелей и являлись SLV и DLV ST, обнаруженных ранее во Вьетнаме, Камбодже и Китае, что подтверждает ведущую роль гомологичной рекомбинации в процессах адаптивной эволюции возбудителя мелиоидоза и соответствует современным представлениям о характере формирования генетического разнообразия *B. pseudomallei* в субпопуляции Юго-Восточной Азии.

Филогенетический анализ на основании данных MLST и cgMLST показал распределение штаммов исследованной выборки по двум кластерам, соответствующим северному и северо-центральному регионам происхождения изолятов. Дендрогаммы, полученные с использованием двух наборов данных и разных алгоритмов вывода деревьев (Рисунки 1, 2), имели сходную общую топологию, что свидетельствует о неслучайном расселении *B. pseudomallei* и наличии в северном и северо-центральном регионах Вьетнама отдельных субпопуляций. Это, вероятно, обусловлено адаптацией возбудителя к экологическому окружению, значительно отличающемуся в разных регионах страны (Рисунок 3).

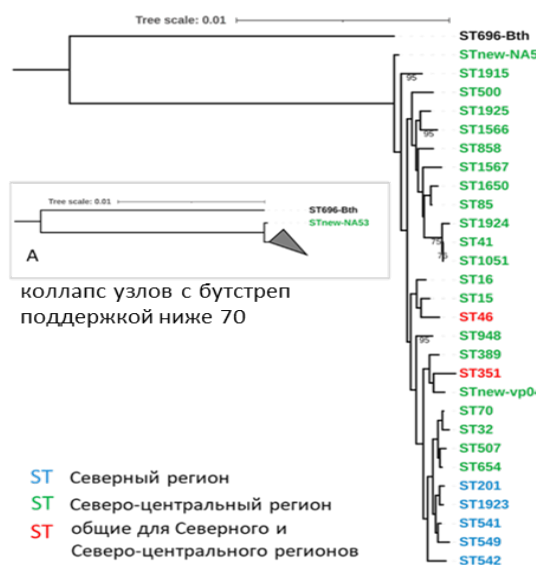


Рисунок 1 – Распределение штаммов возбудителя мелиоидоза по регионам Вьетнама, филогенетический анализ 7 генов схемы MLST, вывод дерева по алгоритму FastME

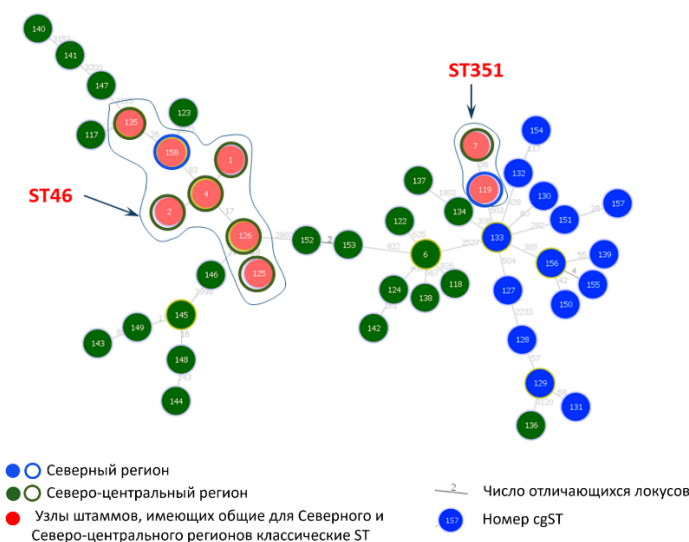


Рисунок 2 – Распределение штаммов возбудителя мелиоидоза по регионам Вьетнама, филогенетический анализ конкатенированных последовательностей 4274 локусов по схеме cgMLST, вывод дерева по алгоритму goeBurst

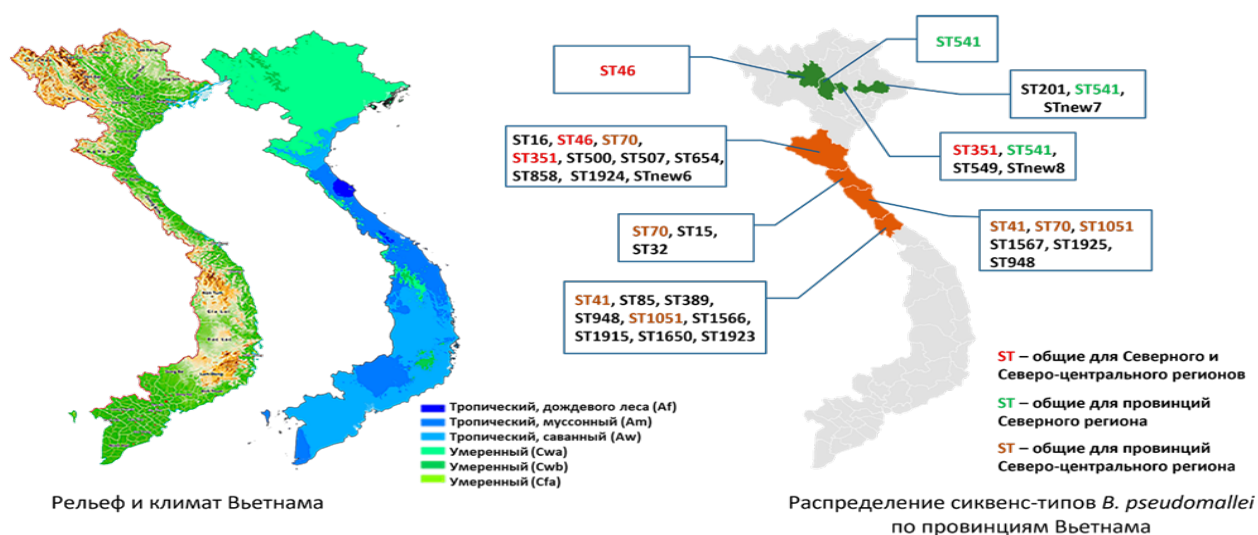


Рисунок 3 – Экологические условия и композиции сиквенс-типов *B. pseudomallei* в провинциях северного и северо-центрального регионов Вьетнама

Полученные данные о присутствии на территории Вьетнама разных субпопуляций возбудителя мелиоидоза в комплексе с использованием алгоритма молекулярного типирования с высокой дифференцирующей способностью позволяют точно определять регион происхождения штаммов возбудителя и характер клональности случаев мелиоидоза, что было продемонстрировано при проведении молекулярно-эпидемиологического расследования случаев мелиоидоза животных во Вьетнамском Центре спасения медведей (VBRC).

Геномные сравнения между патогенными и близкородственными непатогенными видами сыграли важную роль в выявлении механизмов, ответственных за приобретение вирулентности в естественной среде обитания. На основании ранее опубликованных сведений и собственного биоинформатического исследования геномных последовательностей, размещенных в базах данных GenBankNCBI, проведен анализ дивергенции между *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* по более, чем ста генам и их продуктам с доказанной функцией факторов вирулентности. Обнаружено, что из 16 генов факторов вирулентности, локализованных на хромосоме 1, у *B. thailandensis* отсутствует всего два – гены *bpaC* и *boaB*, детерминирующие автотранспортеры T5SS, ответственные у возбудителя мелиоидоза за адгезию микроба к нефагоцитирующим клеткам макроорганизма. Также установлено, что белковые продукты ортологичных детерминант вирулентности первой хромосомы обладают значительно более высоким уровнем идентичности (в интервале 82,1 %–100 %), чем среднее совпадение (72,1%) протеомов этих двух видов, и, в большинстве случаев, выше средней идентичности (94,0%) ортологов. Исключение составили субъединица Pila пилина типа IV (82,1 %)

и BLF1 – *Burkholderia* летальный фактор 1 (85,3%) при 100% длине выравнивания. Наиболее высокая идентичность белковых продуктов ортологичных генов первой хромосомы (98,1% и 99,2%) обнаружена у детерминант (локусы BPSL0791 и BPSL0919), ответственных за биосинтез липополисахаридов, представляющих один из основных факторов вирулентности *B. pseudomallei* и являющихся медиаторами сепсиса, а также у σ -фактора РНК полимеразы RpoE (100 %), опосредующего у возбудителя мелиоидоза устойчивость к разного рода стрессам, а также способность к формированию биопленки и выживанию в макрофагах.

Подавляющее большинство (103) генетических детерминант факторов вирулентности *B. pseudomallei* и их ортологов у *B. thailandensis* локализованы на второй хромосоме. Известно, что у *B. thailandensis* отсутствует большая часть кластера генов T3SS-1. Кроме того, проведенный анализ показал отсутствие генов эффекторных белков T3SS и T6SS – *CHBP* и *hcp1*, соответственно, а также аналогов генов BPSS0796 (фактор адгезии) и *bimA*, опосредующего актин-зависимую подвижность. Средний показатель сходства белковых продуктов генов факторов вирулентности, присутствующих у обоих видов на второй хромосоме, составил 82,7%, что, как и в случае, ортологов первой хромосомы, выше среднего показателя сходства протеомов между этими видами. Более того, два вида полностью разделяют известные детерминанты, ответственные за инвазию, с высоким уровнем идентичности белковых продуктов (86,2–95,5%) и четыре из пяти, обеспечивающие избегание эндоцитоза, с гомологией продуктов 80,8–97,7% (Таблица 1).

Таблица 1 – Ортологи детерминант факторов вирулентности

Функция у <i>B. pseudomallei</i>	Количество факторов	Наличие ортологов у <i>B. thailandensis</i>	Гомология ортологичных белков (%)
Адгезия	5	2 (нет адгезинов VoaA, VoaB, VpaC)	82,1 - 91,2
Инвазия	4	4	86,2 - 95,5
Избегание эндоцитоза	5	4 (нет эффектора CHBP)	80,8 - 97,7
Система секреции III типа	3 кластера	2 кластера (нет T3SS-1)	74,3 - 82,6
Внутриклеточное выживание	10	10	86,2 - 100
Актин-зависимая подвижность	2	1 (нет BimA)	89,64
Образование MNGC	<i>vgrG5</i>	BTH П0863	90,08
Биосинтез капсульного полисахарида	<i>wcb - оперон</i>	Vp-like CPS	96,23
Биосинтез липополисахаридов	2	2	98,1 - 99,2
Блокировка инициации транскрипции у клетки-хозяина	BLF1	CO709_28610	85,3
Средняя гомология протеомов между двумя видами 72,1 %			

Таким образом, проведенный анализ показал, что гомология белковых продуктов ортологичных генов *B. thailandensis* и *B. pseudomallei*, обеспечивающих способность возбудителя мелиоидоза успешно инфицировать и колонизировать млекопитающих, значительно выше, чем среднее значение совпадения их протеомов. Кроме то-

го, установлено, что в видовом пангеноме *B. thailandensis* детерминанты факторов вирулентности представлены значительно разнообразнее, чем считалось ранее. Штаммы внутри вида отличаются по набору ответственных за патогенность детерминант и, соответственно обладают разным уровнем вирулентности. Проведенная экспериментальная оценка вирулентности штаммов *B. thailandensis* из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора на моделях экспериментальных инфекций у лабораторных животных с различной видовой чувствительностью подтвердила полученные биоинформатическими методами данные о наличии у данной бактерии межштаммовых отличий в уровне вирулентности – LD50 для белых мышей варьировала в интервале от $1,3 \times 10^6$ до более, чем $>10^7$ м.к., для золотистых хомяков – от $7,3 \times 10^4$ до $1,4 \times 10^6$ м.к. Полученные данные в комплексе с регулярными сообщениями об инфекциях различной степени тяжести, включая сепсис и летальный исход [Chang et al., 2017], этиологическим агентом которых являлась *B. thailandensis* свидетельствуют, что вид *B. thailandensis* не является авирулентным.

Актуальные аспекты эпидемиологии мелиоидоза на современном этапе.

Реальное глобальное бремя мелиоидоза неизвестно в связи с отсутствием официальной статистики, поскольку случаи мелиоидоза не подлежат уведомлению государственных органов здравоохранения в подавляющем большинстве стран мира.

В первой четверти прошлого века мелиоидоз считался редкой тропической инфекцией с узким ареалом. Примечательно, что, по представлениям того времени, область его распространения удивительным образом полностью совпадала с регионами, в которых присутствовали британские, французские и голландские колониальные медицинские службы. До недавнего времени считалось, что эндемичный по мелиоидозу регион ограничен странами Юго-Восточной Азии и Северной Австралии. Однако в этом возникали обоснованные сомнения. Во-первых, *B. pseudomallei* обладает паразитически высокой способностью адаптироваться к разнообразным средам обитания, что отражено в его метаболическом репертуаре с возможностью использовать широкий спектр субстратов, а накопление значительных гранул полигидроксибутирата в качестве запасного источника энергии отражает его приспособленность к долгосрочному выживанию в неблагоприятных условиях. Во-вторых, недавняя всемирная распространенность сапа (включая Европу, Австралию, Северную Америку и Советский Союз, где он был ликвидирован лишь к середине XX века), возбудитель которого –

B. mallei – генетически является делеционным вариантом *B. pseudomallei*. И, наконец, убиквитарность филогенетически близкой возбудителям мелиоидоза и сапа *B. cepacia* (типовой вид рода *Burkholderia*). Еще в 60-е годы прошлого века J. Fournier предполагал, что область эндемичности мелиоидоза в мире гораздо шире [Fournier, 1960, 1968].

В настоящее время известные границы распространения *B. pseudomallei* охватывают территории между 30-ми параллелями северной и южной широт во влажных тропических и субтропических зонах всех континентов. Однако полного понимания климатических границ распространённости *B. pseudomallei* до сих пор нет.

Эпизоотия мелиоидоза («Affaire du Jardin des Plantes») и два связанных с ней случая фатальной инфекции людей во Франции в 1976-78 годах была первым сообщением о вспышке этого заболевания в умеренных широтах, осложненной стойкой контаминацией возбудителем внешней среды в течение, по меньшей мере, 10 лет [Dodin and Galimand, 1986; Mollaret, 1988]. Источник заражения достоверно определен не был. Вместе с тем, проведенное в настоящей работе ретроспективное исследование генетического родства штаммов, выделенных во Франции от животных, из почвы и воды в период эпизоотии показало неклональный характер случаев мелиоидоза. Семь доступных в PubMLST французских штаммов *B. pseudomallei* этого периода представлены 6-ю сиквенс-типами (ST1, ST57, ST82, ST27, ST347 и ST348), причем ST 1, 82, 347 и 348 более нигде не обнаружены.

Сиквенс-типы штаммов, выделенных от животных в период вспышки (ST1, ST82), на глобальной популяционной кладограмме кластеризуются в пределах одного узла, тогда как ST экологических штаммов – распределены по отдаленным ветвям кладограммы и принадлежат к разным клональным комплексам, включающим штаммы, выделенные на территориях бывших французских колоний или сопредельных (Рисунок 4). Уникальность французских ST и их маргинальное положение на филогенетических линиях предполагают неопределенный срок давности завоза возбудителя, а распределение на кладограмме – неоднократность такого события.

Перечисленные факты свидетельствует о возможности неопределенно долгого выживания возбудителя мелиоидоза во внешней среде на широтах выше 30-х параллелей.

Ключевым фактором внешней среды, ограничивающим потенциальный ареал возбудителя, является температурный. *B. pseudomallei* способна успешно размно-

жаться в диапазоне температур от 25 до 42 °С, переживать кратковременное (до одного часа) воздействие 50 °С [Vanaporn et al., 2008; Pumirat et al., 2017].

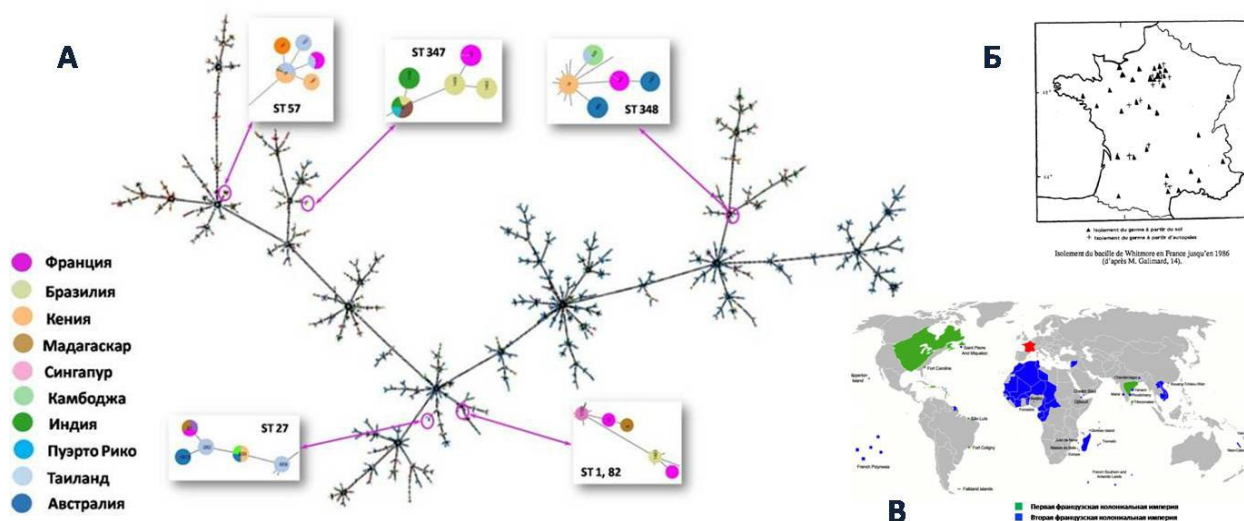
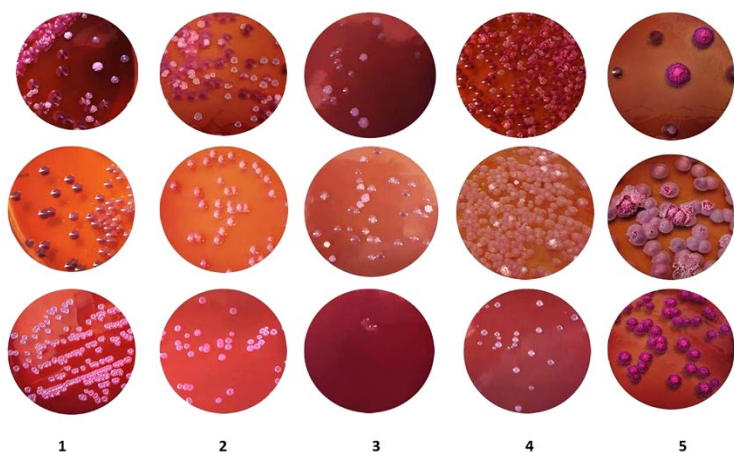
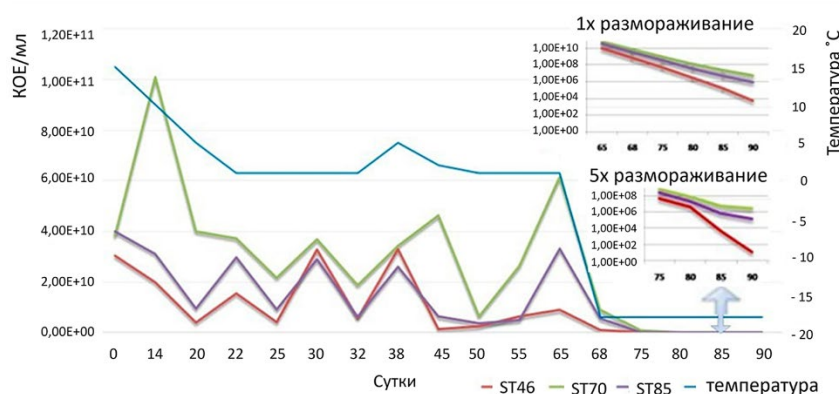


Рисунок 4 – Распределение на популяционной кладограмме ST штаммов *B. pseudomallei* от животных и из внешней среды, выделенных в 1975-78 гг. во время эпизоотии мелиоидоза во Франции (А); масштаб эпизоотии (Б) [Dodin and Galimand, 1986]; французская колониальная империя 1546 – 1939 гг.

Потенциал выживания при отрицательных температурах не исследовался. По литературным данным в лабораторных условиях большинство исследованных штаммов выживают при 5 °С более 160 дней [Yabuuchi et al., 1993], а при 2 °С – не менее 28 суток [Robertson et al., 2010] при снижении количества культивируемых бактерий в $10^2 - 10^3$ раз. Однако в цитируемых исследованиях культуры возбудителя были подвергнуты резкому холодовому шоку, что не могло не сказаться на уровне выживаемости. В проведенном в рамках настоящей работы исследовании влияния длительного воздействия низких температур на выживаемость *B. pseudomallei* температуру инкубации снижали постепенно, давая возможность микробу адаптироваться к холоду. После 65-суточной инкубации при пониженных температурах, включая 32 дня при 1 °С, отмечено статистически недостоверное ($t = 0,15 < t_{кр} = 2,447$) снижение числа КОЕ/мл в 3,4 и 1,2 раза для штаммов 4811(ST46) и 1501 (ST85) и увеличение в 1,6 раза для штамма 1512 (ST70). Постепенно адаптированные к холоду штаммы возбудителя пережили как непрерывное воздействие температуры минус 18 °С, так и не менее 5 раундов замораживания-оттаивания не менее 25 суток при статистически достоверном снижении численности культивируемых клеток в $4,8 \times 10^3 - 1 \times 10^9$ раз от исходного количества ($P < 0,0001 - 0,0002$), в зависимости от штамма и условий опыта. Максимальную устойчивость к воздействию отрицательных температур проявил штамм, с наиболее выраженной морфологической диссоциацией колоний (Рисунок 5).

Полученные данные не являются исчерпывающими, поскольку в лаборатории невозможно в полной мере создать модель естественных условий, в которых возбудитель избегает резкого изменения температуры, перемещаясь в глубокие слои почвы. Еще в 1993 году Е. Yabuuchi с коллегами призывали пересмотреть мнение, что возбудитель мелиоидоза является исключительно тропическим обитателем [Yabuuchi et al., 1993]. Проведенное в настоящей работе исследование устойчивости *B. pseudomallei* к воздействию низких температур представляет убедительные, по нашему мнению, экспериментальные доказательства возможности выживания *B. pseudomallei* в условиях длительного воздействия низких, в том числе отрицательных, температур, что объясняет длительное выживание возбудителя мелиоидоза на территории Франции и в корне меняет устоявшееся мнение о невозможности интродукции возбудителя на территории России.



Линии:
ST 70 1 - исходные культуры, 2 - 10 суток инкубации при 1 °С, 3 - 25 суток при минус 18 °С и пять размораживаний,
ST 85 4 - 25 суток при минус 18 °С и однократное размораживание, 5 - культуры линии 4 после дополнительной инкубации.
ST 46 Культуры, показанные на линиях 1-4, инкубировали при 37 °С 4 суток, дополнительная инкубация 5 суток при 25 °С.

Рисунок 5 – Динамика изменения числа КОЕ/мл и морфологии роста штаммов *B. pseudomallei* при воздействии низких температур

В последние годы наблюдается тенденция к прогрессивному увеличению числа зарегистрированных случаев заболевания практически во всех известных на сегодняшний день эндемичных регионах. Кроме того, возбудитель впервые обнаружен в окружающей среде целого ряда стран, в которых он ранее не выявлялся. Также все

чаще стали поступать сообщения о завозных случаях мелиоидоза в страны умеренного климата. Не вызывает сомнения, что существенное увеличение числа регистрируемых в разных странах случаев мелиоидоза связано не только с объективными причинами, включающими как природные, так и социальные факторы, но и с растущей информированностью о мелиоидозе.

С целью определения тенденции в многолетней динамике заноса мелиоидоза в неэндемичные страны и определения влияния предрасполагающих факторов на риск заражения мелиоидозом при посещении эндемичных регионов проведен анализ завозных случаев заболевания на неэндемичные территории за пятнадцатилетний период, предшествующий проведению исследования.

Проведенный анализ опубликованных сведений о завозных случаях заболевания на неэндемичные территории за период с 2003 по апрель 2017 года показал некоторые отличия клинико-демографических данных между заболевшими коренными и некоренными жителями эндемичных регионов. В частности, среди авто- и неавтоного населения большинство заболевших составляют мужчины, но среди некоренного контингента соотношение между заболевшими мужчинами и женщинами приблизительно 4:1, тогда как в странах Юго-Восточной Азии – около 3:2. Группой риска на эндемичных территориях являются люди старше 55 лет, тогда как наибольший процент заболевших путешественников пришелся на группу со средним возрастом 33 года при отсутствии статистически достоверной корреляции между возрастом и количеством заболевших ($t = 0,36$, $p = 0,7458$). Статистически достоверного влияния наличия предрасполагающих заболеваний на риск заражения мелиоидозом, как и в случае возраста, не выявлено ($t = 1,24$, $p = 0,3040$). Данные проведенного анализа завозных случаев инфекции показали, что среди исследованной выборки заболевших мелиоидозом предрасполагающие факторы риска имели 46,7%. А по данным за 1982 – 2015 и 1968 – 2015 годы эта доля была либо меньше – 37,5% [Danet al., 2015], либо выше – 64,3% [Saidani et al., 2015], в среднем – 49,5%. То есть, риск развития мелиоидоза после контакта с возбудителем для некоренных жителей эндемичных регионов не зависит от наличия предрасполагающих факторов. Однако наличие факторов риска, прежде всего диабета второго типа, значительно влияет на исход заболевания: летальность среди пациентов исследованной выборки, имевших факторы риска, была в два раза выше, чем среди ранее здоровых (6,7% против 3,3%), независимо от возрастных групп. Похожее соотношение зафиксировано при анализе влияния факторов рис-

ка на летальность от мелиоидоза в Малайзии (41,46% против 23,81%) [Hassan et al., 2010]. Общий показатель летальности в исследованной выборке заболевших составил 12,5%, что значительно ниже среднего уровня летальности от мелиоидоза в Северо-Восточном Таиланде (приблизительно 40%) и сопоставимо с 14% в Австралии [Wiersinga et al., 2018]. Очевидно, что значительно более низкий процент летальности обусловлен доступностью своевременной диагностики и адекватной терапии инфекции.

Регулярная регистрация завозных случаев мелиоидоза началась с конца 1970-х годов, что совпадает с интенсификацией международного туризма в направлении Азиатско-Тихоокеанского региона. Проведенный анализ динамики случаев заноса мелиоидоза в неэндемичные регионы продемонстрировал явную тенденцию к увеличению их количества: за период 1975 - 1985 гг. среднегодовое количество случаев составило 0,9, за 1986 - 2002 гг. – 1,5, за 2003- 2017 (4 мес.) гг. – 8 и за 2017 (8 мес.) - 2019 гг. – 9 случаев. То есть, прослеживается статистически достоверная корреляция (коэффициент корреляции $R = 0,945$) между трендом развития международного туризма и возрастающей динамикой случаев заноса мелиоидоза в неэндемичные страны мира (Рисунок 6). Расширилась также и география регионов инфицирования: страны Юго-Восточной Азии по-прежнему преобладают по количеству заразившихся туристов (62,5%), впервые зарегистрированы случаи инфицирования в Китае, Мексике, странах Карибского бассейна и Южной Америки, в Восточной Африке и на Мадагаскаре, а также в Океании.

В Российской Федерации наблюдается тенденция активного развития международного туризма, в том числе и экологического. По данным Росстата, за 4 года, предшествующих пандемии новой коронавирусной инфекции и связанными с ней ограничениями, количество туристических поездок российских граждан в регионы, неблагополучные по мелиоидозу, увеличилось на 54 – 503 %. По числу въезжающих туристов Россия входит в десятку лидеров в мире, при этом наибольший прирост составляют туристы из Азии и Латинской Америки, что определяет возрастание вероятности завоза инфекционных заболеваний, включая мелиоидоз. В России у клиницистов отсутствует настороженность в отношении этой инфекции, и, как следствие, при дифференциальной диагностике острых лихорадочных состояний мелиоидоз, как правило, не рассматривается. Неправильный диагноз может иметь фатальные послед-

ствия для больного, а также предполагает риск непреднамеренного инфицирования лабораторного персонала.

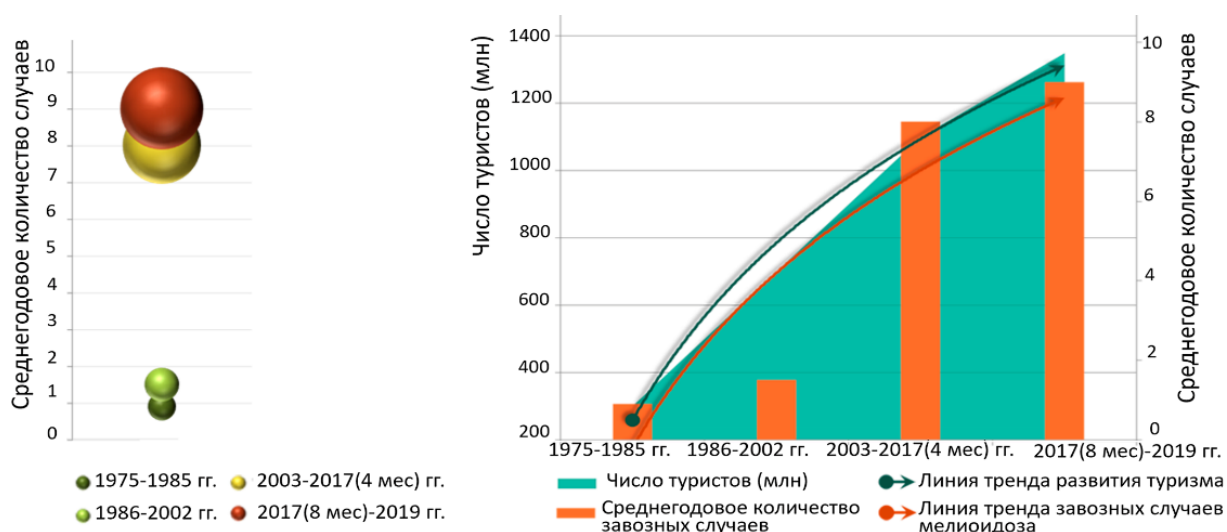


Рисунок 6 – Динамика количества случаев заноса мелиоидоза в неэндемичные регионы и связь между трендом развития международного туризма

Потенциальные серьезные последствия для здоровья и жизни как пациентов, так и работников здравоохранения, определяют важное значение своевременной и качественной диагностики этого заболевания.

Проблемы и пути совершенствования фенотипических методов идентификации буркхольдерий комплекса *Burkholderia pseudomallei*. Диагностическим стандартом для мелиоидоза является выделение культуры, однако чувствительность бактериологического метода составляет около 60%, и зависит как от объективных (биологические свойства штаммов) так и от субъективных (квалификация персонала) факторов [Limmathurotsakul et al., 2010; Hoffmaster et al., 2015].

К настоящему времени полностью надежные стандартизованные коммерческие селективные среды для выделения *B. pseudomallei* отсутствуют. Оптимальной средой для выделения возбудителя из нестерильных проб считается агар Эшдауна, который обладает более высокой чувствительностью, чем аналоги, а также ингибирует рост микроскопических грибов. Ни одна из используемых селективных сред не обладает специфичностью в отношении *B. pseudomallei*. На агаре Эшдауна при 42 °С, по нашим данным, также растут виды комплекса *B. cepacia*, а также целый ряд других видов: *Ralstonia* spp., *Bordetella* spp., *Comamonas* spp., *Delftia* spp., *Roseomonas* spp., *Sphingobacterium* spp., *Acinetobacter* spp., *Moraxella* spp., а также *Neisseria* spp.

Хронологически первым критерием оценки принадлежности культуры к роду *Burkholderia* является характер роста на плотных питательных средах. Особенности

морфологии колоний *B. pseudomallei* значительно затрудняют распознавание патогена, что является определенной проблемой лабораторной диагностики инфекции. Помимо межштатммовой морфологической вариабельности для *B. pseudomallei* характерна так называемая I-диссоциация – присутствие на одной чашке морфологически весьма разнообразных (R-, S-, M- и переходные формы) типов колоний (Рисунок 7).

По-видимому, способность *B. pseudomallei* к образованию колоний различных морфотипов является стратегией минимизации рисков за счет фенотипической гетерогенности внутри изогенной популяции бактерий. Что проявляется в виде образования колоний, имеющих различную морфологию и обладающих уникальными характеристиками, обеспечивающими выживание популяции при нечастых, но предсказуемых стрессах (Chantratita et al., 2007; Austin et al., 2015; Shea et al., 2017).

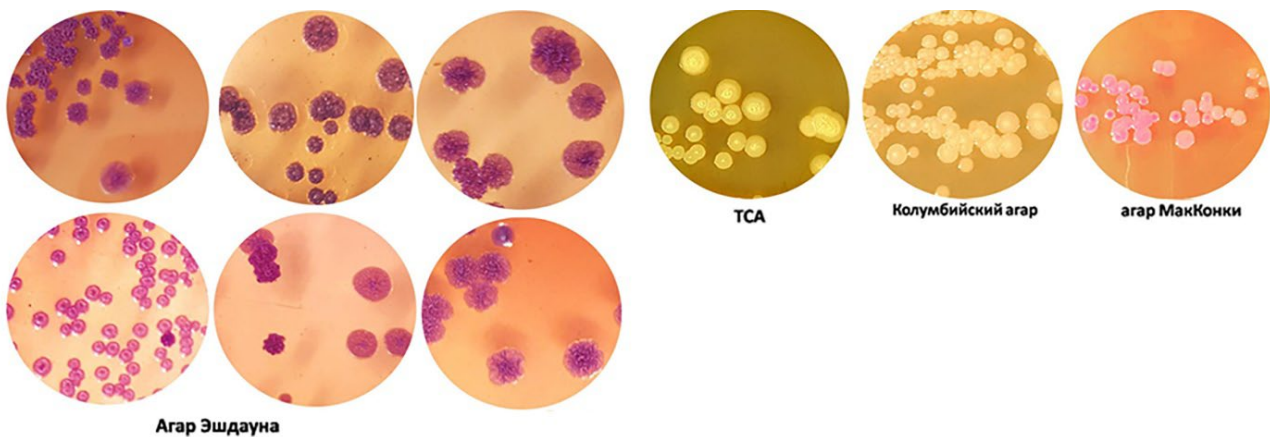


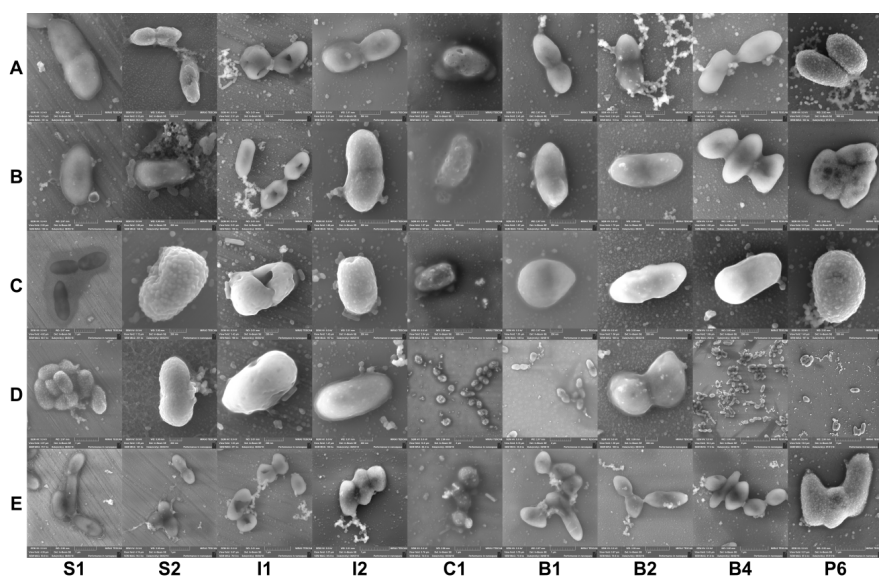
Рисунок 7 – Характер роста чистых культур штаммов *B. pseudomallei*

Проведенное исследование с использованием сканирующей электронной микроскопии показало вполне ожидаемые отличия в морфологии клеток из отдельно взятых колоний различных морфотипов, но, что более интересно, клетки значительно отличаются между собой и внутри одной колонии (Рисунок 8).

Присутствие в генетически идентичном потомстве единственной клетки морфологически отличных вариантов клеток, по нашему мнению, позволяет предположить, что таким адаптационным потенциалом обладает не только популяция в целом, но и каждая клетка *B. pseudomallei* в отдельности.

В настоящее время для классификации морфологических вариантов колоний *B. pseudomallei* используется схема, предложенная N. Chantratita [Chantratita et al., 2007], в которой присутствует 7 морфотипов, обозначенных римскими цифрами. Однако нередко случаи, когда морфология колоний не подходит под критерии ни одного из

этих морфотипов, то есть существующая классификация не в полной мере охватывает морфологическое разнообразие возбудителя мелиоидоза.



В вертикальных рядах показаны клетки одной колонии; группы морфологических вариантов – S2, I2 и S1, I1, C1 являются изогенными; клетки морфотипов B1, B2, B4 и P6 – принадлежат разным штаммам

Рисунок 8 – Ультрамикроморфология клеток *B. pseudomallei* колоний различных морфотипов

Нами предложена новая классификация с номенклатурой, отражающей морфологические особенности колоний. Выделено 5 основных групп морфотипов, обозначенных прописными латинскими буквами S, I, C, B и P, внутри которых предусмотрены варианты, обозначаемые арабскими цифрами (Рисунок 9).

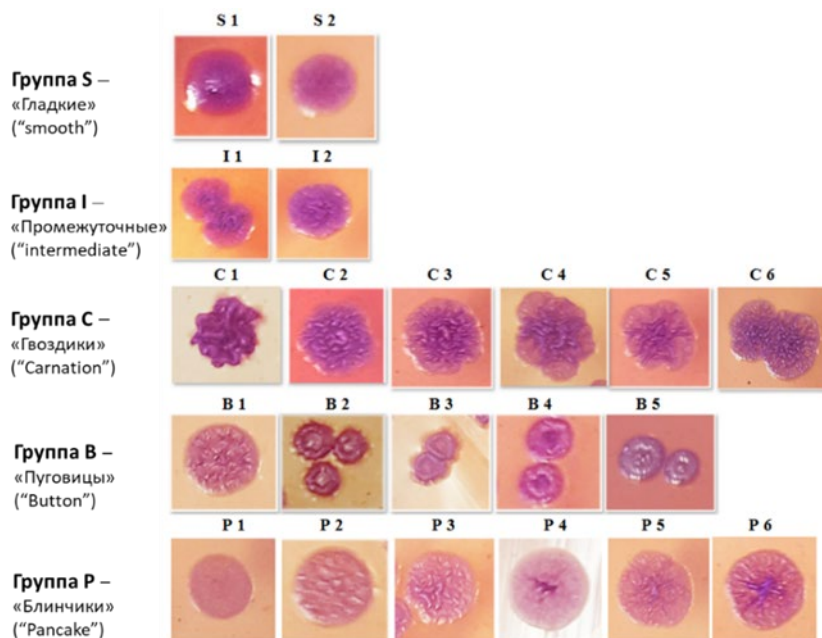


Рисунок 9 – Основные группы морфотипов *B. pseudomallei*

Группа S (smooth – гладкие) объединяет колонии в S-форме; группа I (intermediate – промежуточные) колонии с шероховатым центром и гладкой периферией. Шероховатые колонии разделены на три группы в соответствии с основными

морфологическими характеристиками: группа С (“carnation”, «гвоздики») – складчатые колонии неправильной формы, возвышающиеся над агаровой поверхностью, похожие на махровые цветы; группа В (“button”, «пуговицы») – округлые, непрозрачные колонии с валиком по окружности, в отдельных случаях валик сегментирован; группа Р (“pancake”, «блинчики») – округлые, тонкие, плоские, полупрозрачные колонии с центром разной степени выраженности или без него. Предлагаемая классификация, в отличие от классификации N. Chantratita, предполагает дополнение вновь описанными морфологическими вариантами, а предложенная номенклатура дает представление о том или ином морфотипе колонии по его названию.

Активное использование в лабораторной практике полуавтоматических и автоматических биохимических анализаторов типа API, Vitek 2 и ряда других значительно расширило возможности классического бактериологического метода идентификации возбудителей. При исследовании культур, подозрительных на принадлежность к высокопатогенным бактериям, необходимо учитывать ряд критических пунктов: возможность их эксплуатации в соответствии с требованиями биологической безопасности, определенными действующими СанПиН; наличие в базах данных систем идентификации референтных биохимических профилей; а также информацию о вероятности ошибочного определения видовой принадлежности.

Сравнение двух доступных нам систем идентификации API и Vitek 2 (bioMérieux, Франция) показало значительное преимущество анализатора Vitek 2 по двум первым пунктам. У Vitek 2 отсутствуют открытые реакционные лунки и необходимость вскрывать стеклянные ампулы; заполнение и герметизация карты происходят автоматически в одной камере, стенки которой доступны для обработки дезинфектантами, в камеру может быть помещен переносной УФ-облучатель. Система Vitek 2, в отличие от API, предусматривает идентификацию *B. mallei*. В базах данных обеих систем присутствует *B. pseudomallei* и отсутствует *B. thailandensis*, которая определяется либо как *B. pseudomallei*, либо как *B. ceracia*.

Вероятность ошибочного определения видовой принадлежности возбудителя мелиоидоза для систем API 20 NE и Vitek 2 GN является сопоставимой и составляет в среднем 13 и 14%, соответственно. И проблема точной идентификации атипичных штаммов возбудителя мелиоидоза, а также его дифференциации от близких непатогенных сапрофитных представителей рода, широко распространенных в естественных биоценозах эндемичных регионов, по-прежнему актуальна.

Проведённый анализ показателей сходства биохимических профилей хорошо охарактеризованных наборов коллекционных штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа методом nMDS показал статистически достоверные внутривидовые отличия между ошибочно и корректно идентифицированными штаммами (показатель стресса 0,16 и 0,05, соответственно) и распределил исследованные штаммы *B. pseudomallei* по 8 кластерным группам, а штаммы *B. mallei* по 6 группам (Рисунок 10).

Непараметрический анализ сходства (ANOSIM) показал достоверные отличия биохимических профилей между кластерами штаммов *B. pseudomallei* (ANOSIM R 0,903, P 0,001) и очень высокую достоверность отличий биохимических профилей между сформированными кластерами *B. mallei* (ANOSIM R 0,981, P 0,001).

Оценка среднего вклада отдельных биохимических тестов в отличия биохимических профилей между кластерами штаммов *B. pseudomallei*, а также между кластерами штаммов *B. mallei* позволила выявить ряд особенностей, с высокой статистической достоверностью влияющих на корректность идентификации возбудителей мелиоидоза и сапа системой Vitek 2 GN (Таблица 2).

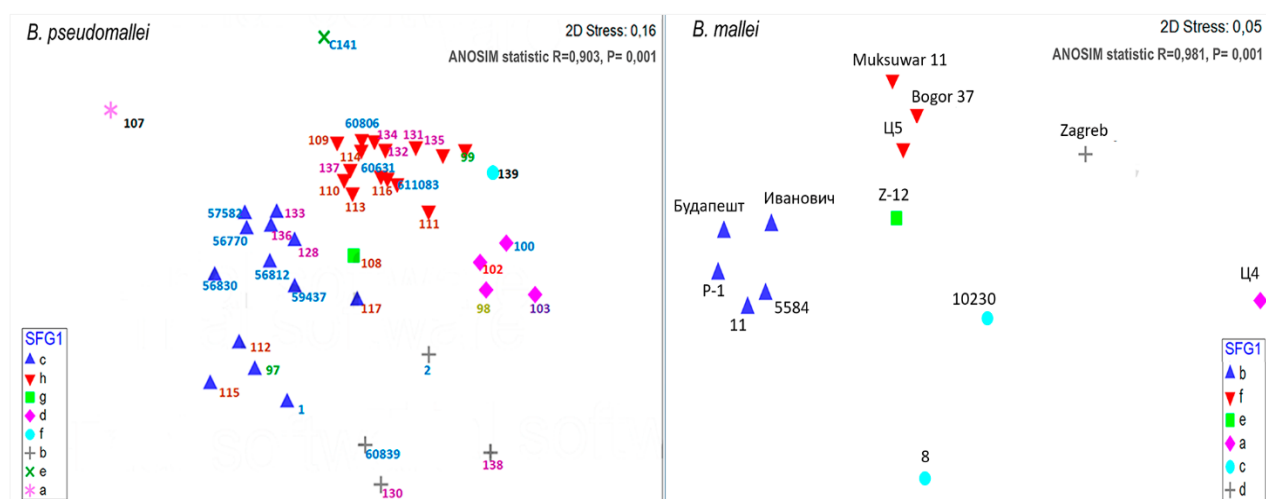


Рисунок 10 – Распределение штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа методом неметрической многомерной градации показателей сходства биохимических профилей (nMDS)

Штаммы *B. pseudomallei*, не обладающие активностью β -N-ацетилгалактозаминидазы (NAGA), фосфатазы (PHOS) и β -N-ацетилглюкозаминидазы (BNAG) в сочетании с активными D-целлобиазой (dCEL), тирозинариламидазой (TyrA) и L-пролинариламидазой (ProA) система Vitek 2 GN определяет с низкой дискриминацией между видами *B. pseudomallei* и *B. ceracia*. Комбинация отрицательных результатов одного или более из тестов NAGA, TyrA и ProA с положительным тестом dCEL приводит к некорректному определению возбудителя мелиоидоза как *B. ceracia*. Сочета-

ние в биохимических профилях штаммов *B. mallei* таких признаков, как наличие активности гамма-глутамилтрансферазы и способности утилизировать один или более из сахаров: сахарозу, D-трегалозу и D-маннозу приводит к идентификации возбудителя сапа с низкой дискриминацией между видами *B. mallei* и *B. ceracia* (Таблица 3).

Таблица 2 – Отличия биохимических профилей штаммов *B. pseudomallei*

Штамм	dCEL	NAGA	PHOS	BNAG	AGLTr	dMAL	dMAN	ProA	TyrA	dSOR	CIT	MNT
<i>B. pseudomallei</i> 2	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 138	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>B. pseudomallei</i> 130	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 60839	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+

Обозначения: dCEL - D-целлобиоза; NAGA - β-N-ацетилгалактозаминидаза; BNAG - β-N-ацетилглюкозаминидаза; PHOS – фосфатаза; AGLTr – глутамилариламидаза; dMAL - D-мальтоза; dMAN - D-маннит; ProA - L-пролинариламидаза; TyrA - тирозинариламидаза; dSOR - D-сорбит; CIT - цитрат; MNT – малонат.

Таблица 3 – Отличия биохимических профилей штаммов *B. mallei*

Штамм	GGT	SAC	dCEL	BNAG	dMNE	ProA	dTRE	URE	O129R	PHOS
Иванович	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
P-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Будапешт	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
5584	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
8	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Bogor-37	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
Mukuwar-11	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1
Z-12	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1
Ц-5	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1
10230	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1
Zagreb	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
Ц-4	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0

*Штаммы, идентифицированные с низкой дискриминацией и некорректно, выделены светло- и темносерым цветом

Проведен анализ биохимической вариабельности изогенных морфотипов *B. pseudomallei*, выращенных на агарах Луриа и Эшдауна, и ее влияния на достоверность биохимической идентификации. Установлено, что время инкубации культуры возбудителя мелиоидоза на L-агаре в пределах 72-х часов не влияет на корректность идентификации. Увеличение времени культивирования приводило к выраженной агрегации клеток у отдельных штаммов, что делало их суспензии непригодными для дальнейшего анализа. Все колонии в S- и R-формах четырех штаммов, выращенных на L-агаре, были идентифицированы корректно с вероятностью 93-99%, но мы обнаружили тенденцию более высокой вероятности идентификации колоний, выросших на L-агаре в R-форме, тем не менее, не превышающей таковую при исследовании 36-часовых культур, у которых диссоциация еще не очевидна. Из 11 протестированных различных морфологических вариантов колоний этих же штаммов, выросших на агаре Эшдауна, в одном случае (9%) идентификация отсутствовала, по 5 морфотипов (45,5%) были определены корректно с вероятностью 90-99% и некорректно как *P. aeruginosa* с вероятностью 93-95%. Причем все ошибочно идентифицированные и единственный неидентифицированный морфотипы относились к группе В («пуговицы»). Анализ спектров биохимической активности у трех пар корректно и ошибочно идентифицированных морфологически отличных изогенных вариантов *B. pseudomallei* показал индивидуальные для каждого штамма отличия и какой-либо закономерности в сочетании признаков, влияющих на корректность идентификации,

нам выявить не удалось. Результаты проведенного исследования показали недопустимость проведения идентификации подозрительных колоний непосредственно с агара Эшдауна, несмотря на то, что это сокращает время анализа не менее чем на 36 часов. Возможность ошибочной идентификации возбудителей мелиоидоза и сапа была известна и ранее, однако авторы ограничивались лишь констатацией данного факта. Полученные в настоящей работе результаты впервые в мире позволили выявить комплексы ключевых признаков, влияющих на корректность определения видовой принадлежности штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* с атипичными профилями биохимической активности.

Таким образом, результаты биохимической идентификации культур, подозрительных на *B. pseudomallei*, в сомнительных случаях (например, несоответствие морфологических признаков, спектра антибиотикорезистентности штамма виду микроорганизма, определенного системой Vitek 2) требуют верификации видовой принадлежности штаммов другими методами.

Одним из весьма перспективных методов, дополняющих морфологические, биохимические, и молекулярные методы идентификации особо опасных патогенов, является времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS). Однако для идентификации и межвидовой дифференциации буркхольдерий комплекса «*B. pseudomallei*» этот метод в настоящее время находится в стадии лабораторных разработок. Коммерческие базы данных не содержат достаточного количества референтных спектров для *B. pseudomallei* и близкородственных видов. В связи с этим перед нами стояла задача расширения базы данных дополнительными эталонными спектрами буркхольдерий комплекса «*B. pseudomallei*», а также оптимизации методики пробоподготовки объекта исследования для получения качественных масс-спектров с учетом соблюдения требований биологической безопасности при работе с ПБА II группы патогенности.

Для идентификации возбудителей мелиоидоза и сапа с использованием профилирования общеклеточных белков методом MALDI-TOF MS адаптирован протокол пробоподготовки, включающий выращивание культур на L-агаре при 37 °C в интервале 18 – 30 часов и выделение белков с применением муравьиной кислоты и ацетонитрила. Адаптированный протокол обеспечивает эффективную белковую экстракцию при необходимом уровне биологической безопасности. Выявлено семь характерных для *B. pseudomallei* и *B. mallei* пиков с молекулярными массами 3780, **4815**, **5202**,

6560, 7090, 7560, 9624 и 10460 Da, присутствовавших в спектрах всех исследованных штаммов, причем пять из них (выделены жирным шрифтом) имели максимальную интенсивность. Белки, дифференцирующие возбудителей сапа и мелиоидоза, не обнаружены, однако масс-спектры имели выраженные видовые отличия по интенсивности пиков белков 6560, 8000 и 8127 Da (Рисунок 11). На основании сформированных идентификационных масс-спектров патогенных видов *Burkholderia* разработан оригинальный раздел электронной базы данных MALDI-TOF спектров S.A.R.A.M.I.S.[™] для идентификации *B. pseudomallei* и *B. mallei*.

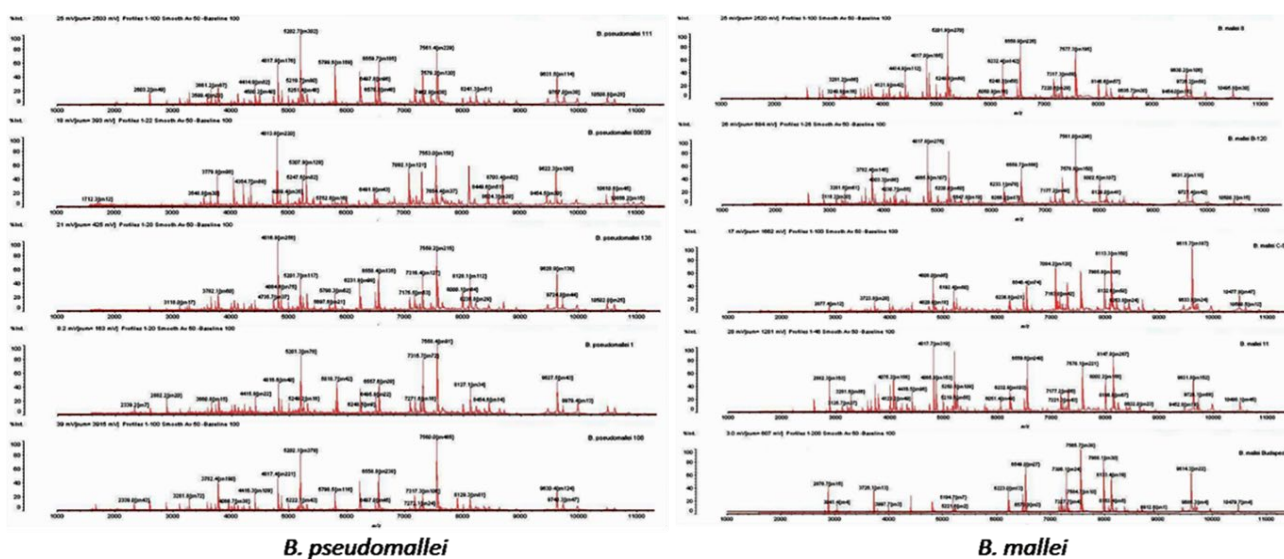


Рисунок 11 – Референтные масс-спектры общеклеточных белков штаммов патогенных буркгольдерий

Полученные референтные спектры белковых экстрактов типичных штаммов возбудителей мелиоидоза также размещены в единой базе данных «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I-II групп патогенности для программы MALDI Biotyper», зарегистрированной Федеральной службой по интеллектуальной собственности (номер регистрации в Реестре баз данных 2016620345 от 15.03.2016), что позволяет достоверно определять видовую принадлежность штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа.

Фенотипические методы позволяют идентифицировать возбудителей сапа и мелиоидоза с наиболее распространенными биохимическими профилями, но остаются проблемы атипичных штаммов и дифференциации между близкородственными видами комплексов «*B. pseudomallei*» и «*B. ceracia*», значительно отличающимися по уровню патогенности для человека и животных.

Особенности иммунодиагностики мелиоидоза. Серологические тесты представляют собой основу лабораторной диагностики многих инфекционных заболева-

ний и в действующих во время выполнения настоящей работы нормативных документах по лабораторной диагностике мелиоидоза и сапа (МУ 4.2.2787-10 и МУ 4.2.2831-11) регламентируются как один из основных критериев для установления диагноза. Однако проведенный анализ опубликованных данных о диагностической эффективности иммунологических методов при мелиоидозе, полученных в эндемичных регионах на репрезентативных выборках пациентов, показал, что результаты серологической диагностики мелиоидоза не являются однозначными и не могут являться основным критерием для установления диагноза. С одной стороны, это связано с серопревалентностью населения эндемичных регионов и возможным отсутствием сероконверсии в около 30% случаев при тяжелых формах инфекции. С другой, – имеются значительные ограничения, связанные с диагностической эффективностью используемых методов. Так, среди бактериологически подтвержденных случаев мелиоидоза результаты РНГА отрицательные в среднем в 42 (21–63) % случаев, ТИФА – в 33 (10–56) %, НМФА – в 10,5 (9–12) %, OPS-ЛА – в 15 %, IgM ICT – в 11,5 (0–23) % случаев.

Использование РНГА и ТИФМ для выявления антигенов лимитировано пределом чувствительности методов, составляющего в большинстве случаев $n \times 10^6$ м.к./мл. Пробы мокроты, мочи, отделяемого абсцессов, как правило, имеют достаточно высокую бактериальную нагрузку. Тогда как в крови, являющейся основным объектом исследования при невыраженном фокусе инфекции, содержание *B. pseudomallei* редко достигает уровня обнаружения возбудителя методами РНГА и ТИФА. Как зарубежные, так и отечественные иммунодиагностические препараты, направленные на выявление антигенов возбудителя, не обладают достаточными диагностическими характеристиками. Средние значения диагностической чувствительности и специфичности ТИФА составили 73 (71–75) % и 98 %, аналитические характеристики – 10^6 м.к./мл и 100 %, соответственно. Обладающий наиболее высокой аналитической чувствительностью метод флюоресцирующих антител (2×10^3 м.к./мл) имеет невысокую диагностическую чувствительность (46,9 %), выявляя возбудитель менее, чем у половины больных мелиоидозом, при диагностической специфичности 99,3 %.

Тем не менее, использование методов иммунодиагностики может обеспечить быстрый предварительный диагноз, при этом необходимо учитывать неоднозначность отрицательных результатов и верифицировать данные серологических реакций с применением других методов, включая молекулярно-генетические.

Молекулярно-генетические методы идентификации и дифференциации видов комплекса *Burkholderia pseudomallei*. Методы и технологии, основанные на анализе структуры генома, достаточно давно успешно используются в диагностике инфекций различной этиологии. Необходимость надежной идентификации возбудителя мелиоидоза и его дифференциации с близкородственными буркхольдериями определило в свое время активный поиск в этом направлении.

Две характерные особенности *B. pseudomallei* – геномная гетерогенность и высокая частота рекомбинации делают разработку молекулярных методов для идентификации *B. pseudomallei* нетривиальной задачей. За прошедшие 25 лет было разработано и апробировано множество ПЦР-систем, основанных на детекции разнообразных генных мишеней. Тем не менее, даже признанные в настоящее время наиболее оптимальными методы в отдельных случаях показывают ложноотрицательные и ложноположительные результаты, в том числе и при исследовании чистых культур. Для минимизации данного риска рационально параллельно использовать не менее двух вариантов ПЦР или мультиплексные системы, определяющие сразу несколько генных мишеней. Дополнительным преимуществом формата мультилокусной ПЦР является возможность дифференциации в формате одной реакции определенного перечня вероятных возбудителей.

Одним из критериев выбора бактериального гена-мишени является минимальный риск его утраты в процессе адаптации к макроорганизму или в результате применения антибиотиков. В связи с этим, на наш взгляд, было логично изучить потенциал использования в этом качестве генов β -лактамаз, широко и разнообразно представленных у *B. pseudomallei*. В связи с чем проведен анализ распространенности и генетической стабильности генов β -лактамаз среди штаммов возбудителя мелиоидоза различного географического происхождения и оценка возможности их использования в качестве генодиагностических мишеней для выявления и дифференциации патогенных буркхольдерий. С этой целью сконструированы пять пар праймеров, детектирующих β -лактамазы молекулярных классов А, В и D буркхольдерий комплекса «*B. pseudomallei*». Результаты экспериментальной оценки распространенности генетических мишеней и анализа видоспецифичности разработанных праймеров представлены в Таблице 4.

На основании полученных результатов установлено, что использование набора из трех пар праймеров (*bm1F2-bm14R2*, *bps1F4-bps8R4* и *bps1F3-bps1R3*) является до-

статочным для дифференциации видов буркхольдерий как внутри комплекса «*B. pseudomallei*», так и с *B. cepacia*. Тестирование набора из трех пар олигонуклеотидов в формате мультиплексной ПЦР на представительном перечне коллекционных штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*, а также клинических и почвенных

Таблица 4 – Распространенность генов β-лактамаз у *Burkholderia* spp.

Вид	Мишень, праймеры, размер ампликона				
	BPS_RS29225 bm1F2-bm14R2 352 п.н.	BPS_RS30385 bps1F3-bps1R3 727 п.н.	BPS_RS29690 bps1F4-bps8R4 440 п.н.	BPS_RS23870 bm1F1/bm4R1 680 п.н.	BPS_RS01965 bps3F5- bps8R5 190 п.н.
<i>B. pseudomallei</i>	+	+	+	+	+
<i>B. mallei</i>	+/-	+	-	+	+
<i>B. thailandensis</i>	+	-	+	-	+
<i>B. cepacia</i>	+	-	-	+	+
Гетерологичные виды*	-	-	-	-	+

* клинические штаммы *Klebsiella* spp., *E. coli*, *P. mirabilis*, *Acinetobacter* spp., *Staphylococcus* spp., коллекционные штаммы *V. cholerae* O1 и O139, резистентные к β-лактамам

штаммов *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*, выделенных во Вьетнаме в 2016–2019 гг., показало корректную идентификацию всех исследованных штаммов как дикого типа, так и спонтанных и инсерционных мутантов с измененной чувствительностью к β-лактамам (Рисунок 12).

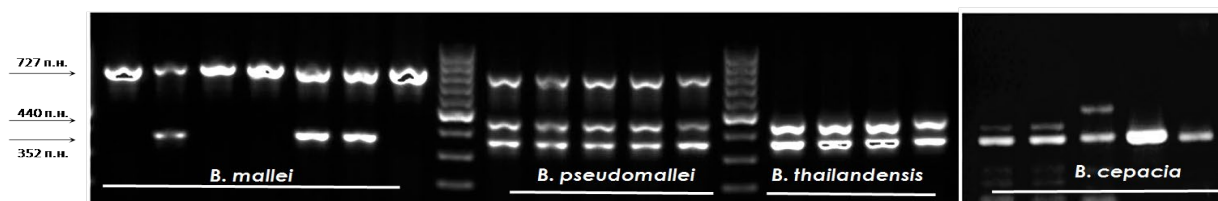


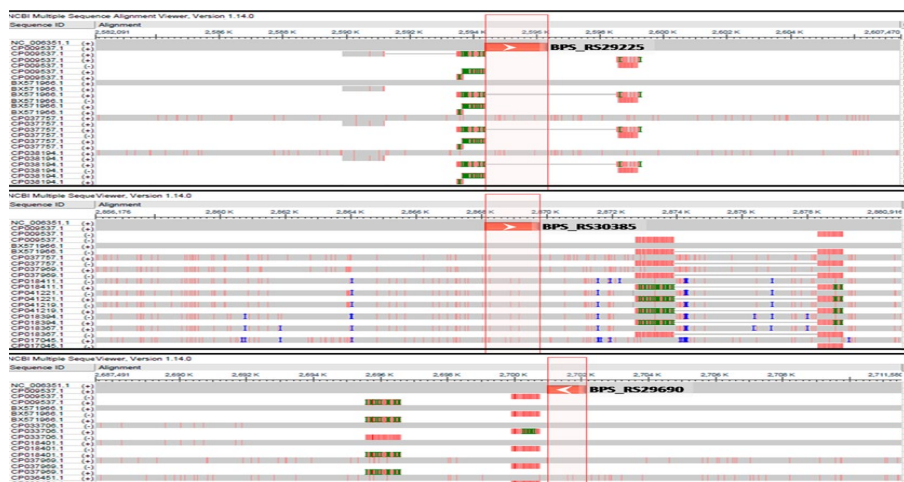
Рисунок 12 – Детекция в мультиплексной ПЦР штаммов Врс и Всс

Штаммы возбудителя мелиоидоза из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора представляют значительную часть эндемичных регионов мира: Австралию и Юго-Восточную Азию, Западную и Центральную Африку, Иран, Китай. Кроме того, в коллекции присутствуют штаммы *B. pseudomallei* неизвестного происхождения. Штаммы *B. mallei* большей частью были выделены в ряде стран Восточной Европы, два штамма имеют российское происхождение, два – монгольское и по одному штамму из Индии и Индонезии. Коллекционные штаммы были выделены из разных источников в период с 1917 по 1985 гг., и, несмотря на столь длительное хранение в искусственных условиях, при тестировании с разработанным набором реагентов показали характерный для каждого из видов паттерн амплификации. Гены β-лактамаз классов В и D были обнаружены нами в штаммах *B. pseudomallei* различного географического происхождения, выделенных в значительном временном интервале, том числе и экологических, которые никогда

не подвергались воздействию β -лактамов в терапевтических концентрациях. Идентичные результаты получены при исследовании клинических и почвенных изолятов возбудителя, выделенных во Вьетнаме в 2016 – 2019 гг. По нашему мнению, это является весомым аргументом в пользу стабильности выбранных генетических мишеней.

Возможности биоинформатических технологий позволили значительно расширить круг исследованных штаммов и показать присутствие исследованных генов у всех штаммов заявленных видов, и их отсутствие у гетерологичных видов в соответствии с экспериментально определенной видоспецифичностью. Проведенный анализ позволил доказать присутствие анализируемых генов β -лактамаз молекулярных классов В и D как в штаммах возбудителя мелиоидоза дикого типа, так и в штаммах, утративших значительную часть генома – *B. pseudomallei* SBCT-RF80-BP1(NZ_LWVW0000000.1) и *B. pseudomallei* MSHR1655 (CP008779.1). Анализируемые последовательности присутствовали во всех штаммах с нетипичным уровнем резистентности, как у исследованных *in vitro* полирезистентных спонтанных мутантов и инсерционных мутантов с пониженным уровнем резистентности к β -лактамам, так и *in silico* – в геномах штаммов *B. pseudomallei* Bp1651 (CP012042.1), *B. pseudomallei* MSHR5864 (CP017049), MSHR6755 (CP017047.1) и MSHR7929 (CP017045.1). *B. pseudomallei* Bp1651 – атипичный по антигенным свойствам клинический изолят, чувствительный к гентамицину и резистентный к нескольким классам антибиотиков, которые обычно эффективны для лечения мелиоидоза, включая тетрациклины, сульфонамиды и β -лактаммы (цефтазидим, амоксициллин-клавуланат, имипенем и меропенем); штаммы *B. pseudomallei* MSHR5864, MSHR6755 и MSHR7929 – клинические изоляты со сниженной восприимчивостью к меропенему.

Для оценки структурной стабильности участков генома, содержащих исследуемые генетические мишени, проведен анализ межштаммовой вариабельности фрагментов хромосомы 2 размером около 24 т.п.н., содержащих анализируемые гены, который показал высокую межштаммовую идентичность (99-100%) всех трех фрагментов генома, при длине выравнивания 99 – 100% у фрагментов, содержащих локусы BPS_RS29690 (β -лактамаза-оксациллиназа класса D) и BPS_RS30385 (β -лактамаза класса В семейства Глиоксалазы II), и 88-100% – для фрагмента с локусом BPS_RS29225 (β -лактамаза класса В семейства β -CASP РНК-метаболизирующие гидролазы). Обнаружено, что исследованные гены не имеют гомологичных последовательностей, кроме собственных паралогов (Рисунок 13).



Обозначения:
Серым цветом обозначены идентичные участки. Другие цвета означают несовпадение в последовательности. Длинные строки отражают выравнивание исследуемого фрагмента хромосомы 2 с паралогичными участками, короткие строки на белом фоне – с гомологичными участками других областей хромосомы

Рисунок 13 – Графическое представление множественного выравнивания фрагментов хромосомы, содержащих анализируемые генетические мишени

Проведенный анализ GC-содержания фрагментов хромосомы, фланкирующих гены-мишени показал соответствие данного показателя среднему по геному GC-составу (~ 68%): у содержащих локусы BPS_RS29690 и BPS_RS30385 равен 67%, а у фрагмента с локусом BPS_RS29225 – 69%, что исключает внешнее происхождение исследуемых генов β -лактамаз. Оценка уровня гомологии паралогов β -лактамаз *B. pseudomallei* показала их межштаммовую идентичность в пределах 99,33–100%, при наличии как полиморфных сайтов – идентичные SNP обнаружены у 2 и более штаммов, так и уникальных нуклеотидных замен (Рисунок 14).

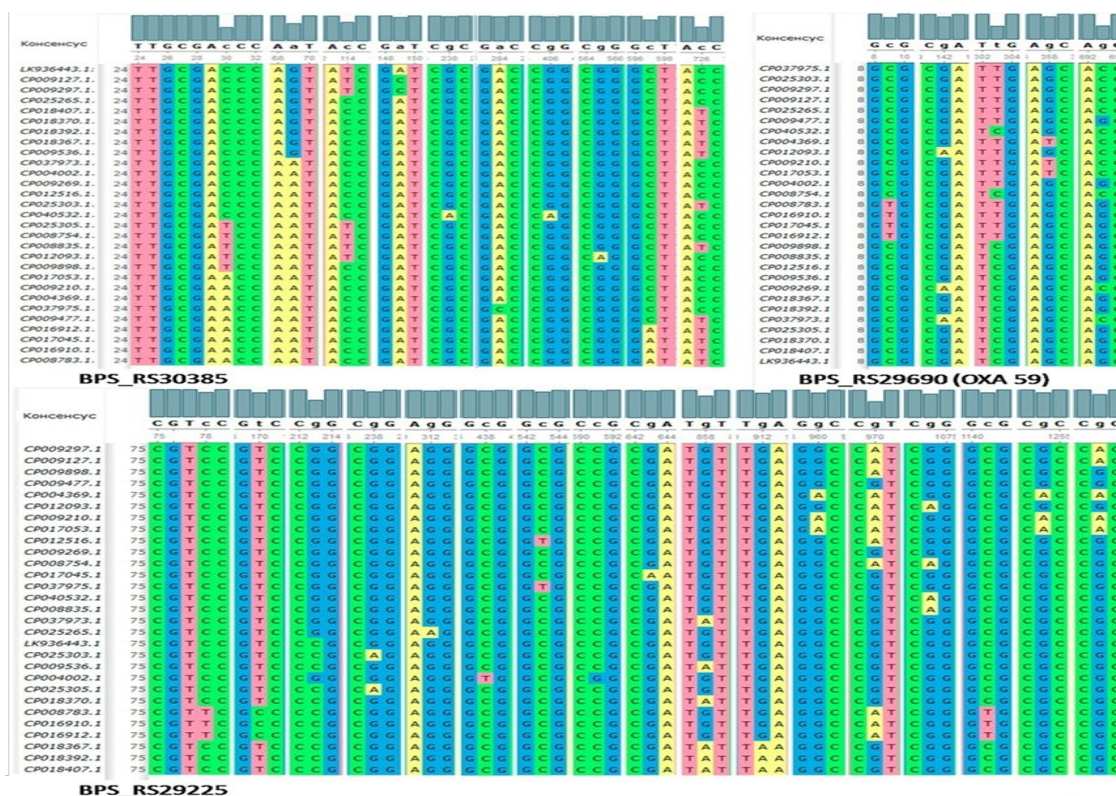


Рисунок 14 – Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей генов β -лактамаз молекулярных классов В и D штаммов *B. pseudomallei*

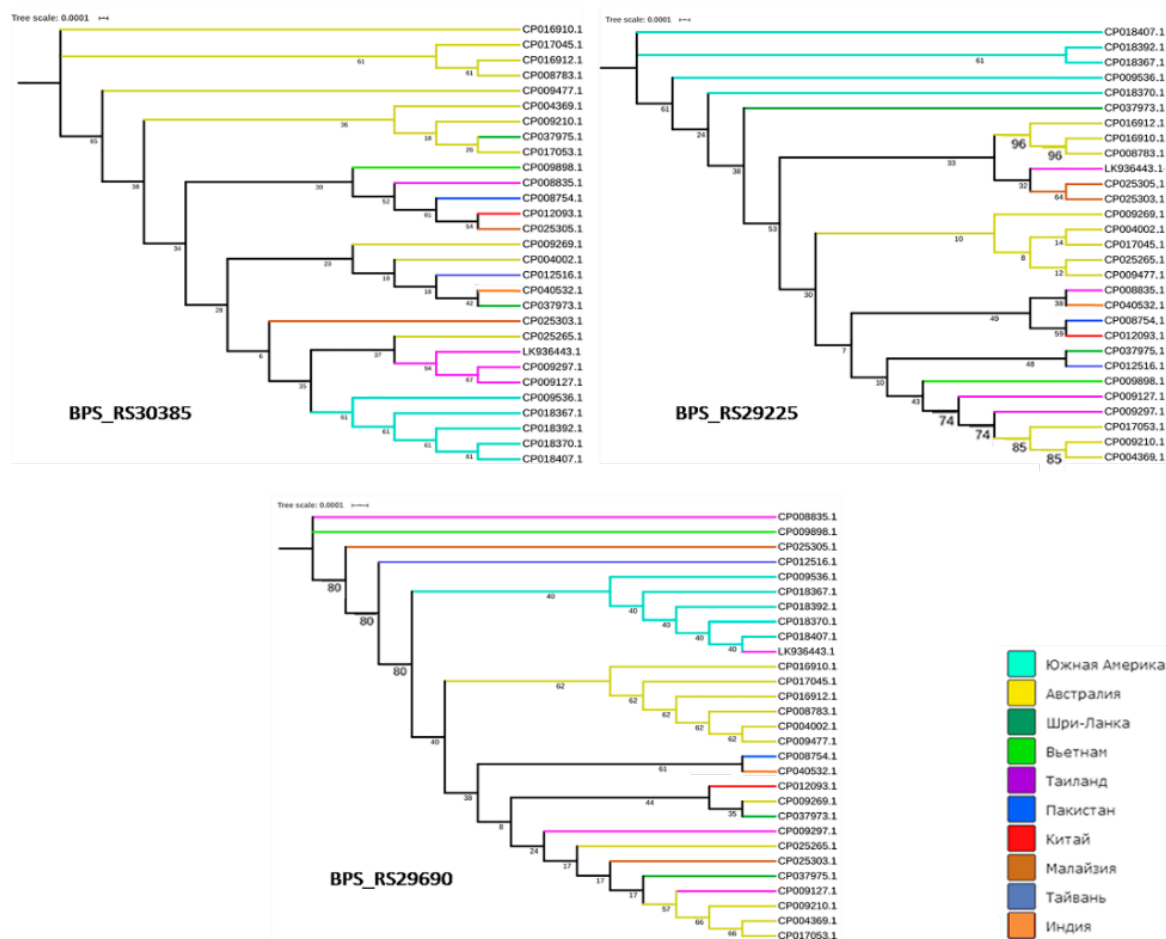
Дополнительно проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей ампликонов генов β -лактамаз классов В и D штаммов дикого типа и их полирезистентных производных, показавший стабильность областей посадки праймеров у спонтанных мутантов, что обеспечивает уверенную детекцию этих генов у штаммов с измененным уровнем резистентности.

Проведенный филогенетический анализ полных нуклеотидных последовательностей исследованных генов β -лактамаз *B. pseudomallei* показал их распределение по нескольким отдельным кластерам с группированием преимущественно в соответствии с регионом происхождения штаммов (Рисунок 15).

Кластеризация последовательностей паралогов BPS_RS30385 не имела значимой бутстреп-поддержки (< 70%); для BPS_RS29225 бутстреп выше 70% имели 6 из 25 узлов, для BPS_RS29690 – 3 из 26 узлов, что свидетельствует об их общей консервативности при наличии отдельных полиморфных сайтов.

Всеобщая распространенность исследованных генов, высокая межштаммовая идентичность генного контента областей хромосомы 2, фланкирующих проанализированные локусы, свидетельствует об отсутствии рекомбинационных процессов в исследованных участках и структурной стабильности этих фрагментов генома, а соответствие их GC-состава среднему по геному – об их исконной принадлежности. В комплексе с показанной консервативностью нуклеотидных последовательностей исследованных генов, полученные данные позволяют сделать вывод о пригодности данных локусов для использования в качестве генодиагностических мишеней.

Виртуальное тестирование праймеров к выбранным генодиагностическим мишеням с полными геномными последовательностями всех видов, представленных на момент проведения анализа в GenBankNCBI, показало их строгую специфичность в отношении заявленных видов бактерий, что полностью подтвердило полученные экспериментальные данные. Таким образом, установлена применимость разработанного триплекса праймеров для детекции и дифференциации штаммов буркхольдерий комплекса «*B. pseudomallei*» дикого типа, вне зависимости от присутствия в геноме того или иного аллельного варианта целевых генов. Набор праймеров также успешно выявляет штаммы с повышенным уровнем устойчивости к антибиотикам различных классов и инсерционные мутанты со сниженной резистентностью.



Дендрограммы построены быстрым методом минимальной эволюции (FastME v. 2.1.6.1_1) с использованием эволюционной модели Tamura-Nei (TN93), уточнением топологии методом ближайших соседних развязок (NNI) и дополнительным бутстрэп-анализом 100 случайных выборок

Рисунок 15 – Филогенетический анализ паралогов β -лактамаз штаммов *B. pseudomallei*

Разработанный на основании полученных данных «Набор реагентов для выявления и дифференциации буркхольдерий группы «*pseudomallei*» в формате мультиплексной полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией «АмплигенБуркхольдерии группы «*pseudomallei*» β L B/D - EPh» по ТУ 21.20.23-014-01898084-2016» успешно прошел все этапы государственной регистрации медицинского изделия и зарегистрирован в установленном порядке (Регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7785 от 07.11.2018 г.).

ВЫВОДЫ

1. На модели вьетнамской популяции возбудителя мелиоидоза показано, что современное формирование генетического разнообразия *B. pseudomallei* обусловлено процессами адаптивной микроэволюции за счет гомологичной рекомбинации, что выражается в образовании новых «молодых» сиквенс-типов, представляющих новые комбинации известных аллелей и являющихся одно- и двух-локусными вари-

антами известных сиквенс-типов. Выявлено 28 сиквенс-типов, в числе которых 20 известных (ST15, ST16, ST41, ST46, ST70, ST85, ST201, ST351, ST389, ST500, ST507, ST541, ST542, ST549, ST654, ST858, ST948, ST1051, ST1566, ST1567) и 8 «молодых» ST (ST1650, ST1915, ST1923, ST1924 и ST1925, три находятся в процессе присвоения номеров). Филогенетический анализ штаммов *B. pseudomallei* северного и северо-центрального макрорегионов Вьетнама, основанный на данных мультилокусного сиквенс-типирования и сиквенс-типирования ядра генома показал неслучайное распределение штаммов по биогеографическим нишам с формированием двух кластеров, соответствующих регионам происхождения изолятов.

2. Установлено, что вариабельная часть видового пангенома *B. thailandensis* содержит более широкий, чем считалось ранее, набор генетических детерминант факторов патогенности. Показано, что гомология белковых продуктов ортологичных генов *B. thailandensis* и *B. pseudomallei*, обеспечивающих способность возбудителя мелиоидоза успешно инфицировать и колонизировать млекопитающих, превышает среднее значение совпадения их протеомов и составляет 91% (ДИ 82,1 – 100) и 89,25% (ДИ 80,8 – 97,7) для ортологов, локализованных на хромосомах 1 и 2, соответственно. Штаммы вида *B. thailandensis* отличаются по набору факторов патогенности, вирулентности для чувствительных лабораторных животных и способны вызывать инфекции людей различной степени тяжести, включая сепсис. В этой связи вид *B. thailandensis* нельзя продолжать считать непатогенным.
3. Выявлена тенденция увеличения числа зарегистрированных случаев мелиоидоза во всех известных эндемичных регионах мира и статистически достоверная корреляция (критерий корреляции $R_{xy} = 0,945$) между трендом роста международного туризма и возрастающей динамикой случаев заноса мелиоидоза в неэндемичные страны мира. Выявлены отличия влияния возраста и предрасполагающих заболеваний на риск развития мелиоидоза у коренных и некоренных жителей эндемичных регионов – для путешественников показано отсутствие статистически достоверной зависимости количества заболевших от возраста ($t = 0,36$, $p = 0,7458$) и наличия предрасполагающих заболеваний ($t = 1,24$, $p = 0,3040$).
4. Постепенно адаптированные к холоду штаммы возбудителя успешно выживают при 1 °С не менее 32 суток и переживают как непрерывное воздействие температуры минус 18 °С, так и не менее 5 раундов замораживания-оттаивания в течение

не менее 25 суток. Показана статистически достоверная зависимость устойчивости штаммов возбудителя к воздействию отрицательных температур от степени выраженности феномена I-диссоциации ($t = 5,391$, $p < 0,0001$). Толерантность *B. pseudomallei* к длительному воздействию низких, в том числе отрицательных, температур свидетельствуют о потенциальной возможности интродукции возбудителя на ряде территорий Российской Федерации.

5. Показаны статистически достоверные отличия биохимических профилей (ANOSIM $R = 0,836$, $P = 0,001$) между корректно и ошибочно идентифицированными штаммами *B. pseudomallei*. Определены комплексы ключевых биохимических признаков, влияющих на корректность идентификации патогенных буркхольдерий комплекса «*B. pseudomallei*» с использованием системы Vitek 2 GN. Штаммы *B. pseudomallei*, не обладающие активностью β -N-ацетилгалактозаминидазы, фосфатазы и β -N-ацетилглюкозаминидазы в сочетании с активными D-целлобиазой, тирозинариламидазой и L-пролинариламидазой определяются с низкой дискриминацией между видами *B. pseudomallei* и *B. ceracia*. Комплекс активной D-целлобиазы с отсутствием активности одного или более из ферментов β -N-ацетилгалактозаминидазы, тирозинариламидазы или L-пролинариламидазы приводит к некорректной идентификации *B. pseudomallei* как *B. ceracia*.
6. С высокой статистической достоверностью (ANOSIM $R = 0,981$, $P = 0,001$) показаны отличия биохимических профилей штаммов *B. mallei*, идентифицированных корректно и с низкой дискриминацией. Сочетание в биохимических профилях штаммов *B. mallei* таких признаков, как утилизация одного или более из сахаров: D-трегалозы, сахарозы и D-маннозы с активной гамма-глутамилтрансферазой приводит к идентификации возбудителя сапа с низкой дискриминацией между видами *B. mallei* и *B. ceracia*.
7. Выявлены индивидуальные для каждого штамма *B. pseudomallei* различия в спектрах биохимической активности изогенных морфологических вариантов, оказывающие влияние на корректность видовой идентификации системой Vitek 2 GN. Морфотипы S, I, C и P идентифицируются корректно с вероятностью 90 – 99%, что соответствует вероятности идентификации исходных культур; морфотип B – в 100% случаев идентифицируется ошибочно как *P. aeruginosa* с вероятностью 93 – 95%. Показаны отличия клеточной морфологии по форме, структуре клеточной

поверхности, размерам клеток между морфологическими вариантами колоний как разных, так и одного и того же штаммов, а также внутри каждого морфотипа.

8. Доказано, что адаптированный протокол пробоподготовки для идентификации возбудителей мелиоидоза и сапа методом MALDI-TOF MS обеспечивает эффективную белковую экстракцию при необходимом уровне биологической безопасности. Созданные наборы референтных масс-спектров общеклеточных белков штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, внедренные в электронные базы данных S.A.R.A.M.I.S.TM и MALDI Biotyper, обеспечивают достоверную идентификацию буркхольдерий II группы патогенности.
9. Установлено, что виды комплекса «*B. pseudomallei*» различаются по набору генов β-лактамаз молекулярных классов В и D: в геномах штаммов *B. pseudomallei* представлены все три исследованных гена; у штаммов *B. mallei* присутствует ген β-лактамазы семейства Глиоксалазы II, отсутствует ген β-лактамазы-оксациллиназы класса D и наблюдается межштаммовая вариабельность по гену β-лактамазы семейства β-CASP РНК-метаболизирующие гидролазы; у штаммов *B. thailandensis* имеются гены β-лактамазы-оксациллиназы класса D, β-лактамазы семейства β-CASP РНК-метаболизирующие гидролазы и отсутствует ген β-лактамазы семейства Глиоксалазы II. Что позволяет дифференцировать эти виды как внутри комплекса, так и с видами комплекса «*B. ceracia*», у которых отсутствуют гены β-лактамазы семейства Глиоксалазы II и β-лактамазы-оксациллиназы класса D, но имеется ген β-лактамазы семейства β-CASP РНК-метаболизирующие гидролазы.
10. Выбранные генетические мишени являются видо- и группоспецифическими для *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*, имеют всеобщую распространенность среди штаммов этих видов, входят в состав структурно стабильных областей основного генома определяемых видов, имеют консервативную нуклеотидную последовательность и стабильно наследуются без селективного давления в течение 69 (ДИ 35–103) лет, что определяет их пригодность для использования в качестве диагностических генетических мишеней. На основании праймеров, разработанных для их детекции, создан и зарегистрирован набор реагентов «АмплигенБуркхольдерии группы «*pseudomallei*» βLB/D - EPh» (РУ № РЗН 2018/7785 от 07.11.2018 г.) с высокой эффективностью идентифицирующий штаммы *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* различного географического проис-

хождения, независимо от срока давности и источника выделения культур, а также штаммы перечисленных видов с измененным уровнем резистентности к β -лактамам.

11. Комплексная оценка результативности методов лабораторной диагностики мелиоидоза на основании собственных экспериментальных исследований и анализа литературных данных показала диагностическую чувствительность метода ПЦР – не менее 99,0 %, бактериологического метода – 60% и неоднозначность отрицательных результатов методов иммунодиагностики – среди бактериологически подтвержденных случаев мелиоидоза результаты РНГА отрицательные в 42 %, ТИФА – в 33 %, НМФА – в 10,5% случаев. В связи с чем в проект Методических Указаний «Лабораторная диагностика мелиоидоза и сапа. Организация и проведение в лабораториях различного уровня» в дополнение к классическим критериям выдачи окончательного положительного ответа предложен пункт, предусматривающий выдачу окончательного положительного ответа «мелиоидоз неуточненный А. 24.3» при наличии положительных результатов ПЦР с использованием не менее двух диагностических наборов, детектирующих отличающиеся видоспецифические мишени, наличии в эпиданамнезе посещения эндемичных по мелиоидозу регионов мира, при отсутствии в парных сыворотках больного нарастания титров специфических антител, отсутствии специфического роста на питательных средах при посеве нативного материала.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в реферируемых научных журналах

1. **Захарова, И.Б.** Мелиоидоз в аспектах эпидемиологии, клиники и лабораторной диагностики/ **И.Б. Захарова, А.В. Топорков, Д.В. Викторов**// Инфекция и иммунитет. – 2021. – Т. 11, № 3. – с. 409–422. (**WoSCC, SCOPUS, Импакт-фактор РИНЦ: 0,914**)
2. Прохвятилова, Е.В. Проведение этапов государственной регистрации набора реагентов для обнаружения и дифференциации ДНК буркхольдерий группы "*pseudomallei*" / Е.В. Прохвятилова, Н.Н. Тетерятникова, **И.Б. Захарова**, Л.И. Белицкая, Д.В. Викторов, А.В. Топорков // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – Т. 64, № 3. – С. 180-185. (**SCOPUS, Импакт-фактор РИНЦ: 0,619**)
3. **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. (**WoS и SCOPUS, Импакт-фактор SJR: 1,429**), цит. 8.
4. **Захарова, И.Б.** Актуальные вопросы современной эпидемиологии мелиоидоза: обзор литературы и анализ случаев завоза инфекции в неэндемичные регионы/

- И.Б. Захарова**//Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2018. – Т. 33, №. 3. – С. 126–133 (**Перечень ВАК, Импакт-фактор РИНЦ: 0,636**), цит. 1.
5. Bui, L. A. T. The Complexity of the Identification of *Burkholderia cepacia* Strain Which Caused Septicemia/ Bui, L. A. T., **Zakharova, I.**, Shpak, I., Teteryatnikova, N., Ustinov, D., Kuzyutina, Y., Viktorov, D. //Jundishapur Journal of Microbiology. – 2018. – Vol. 11, №11. – P. e82834 (**WoSCC, WoS и SCOPUS, Импакт-фактор SJR: 1,643**).
 6. **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. (**SCOPUS, Импакт-фактор РИНЦ: 0,512**), цит. 5.
 7. **Zakharova, I.** Development of a multiplex PCR assay for the detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia thailandensis*, and *Burkholderia cepacia* complex/ **I. Zakharova**, N. Teteryatnikova, A. Toporkov, D. Viktorov //Acta tropica. – 2017. – Vol. 174. – P. 1-8. (**SCOPUS, Импакт-фактор SJR: 2.689**), цит. 7.
 8. Лопастейская, Я.А. Применение времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ ионизацией (MALDI-ToF) для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза/ Я.А. Лопастейская, Е.В. Молчанова, Т.Н. Шаров, Ю.А. Кузютина, **И.Б. Захарова**, Д.В. Викторов, А.В. Топорков // Клиническая лабораторная диагностика.– 2016.– № 8 .– С.502-507. (**SCOPUS, Импакт-фактор РИНЦ: 0,619**), цит. 4.
 9. Молчанова, Е.В. Особенности идентификации *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* с помощью микробиологического анализатора VITEK 2 Compact / Е.В. Молчанова, Я.А. Лопастейская, А.В. Незнамова, Ю.А. Кузютина, Н.П. Агеева, **Захарова И.Б.**, Д.В. Викторов, А.В. Топорков // Проблемы особо опасных инфекций.– 2016.– № 3.– С. 57-61. (**SCOPUS, Импакт-фактор РИНЦ: 0,777**), цит. 1
 10. Прохвятилова, Е.В. Сравнительная оценка информативности иммунологических и молекулярно-генетических методов и средств на этапах специфической индикации возбудителя мелиоидоза / Е.В. Прохвятилова, В.А. Антонов, Д.В. Викторов, Н.П. Храпова, Г.А. Ткаченко, В.И. Илюхин, **И.Б. Захарова** и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – Т. 59, № 12. – С. 55-59 (**SCOPUS, Импакт-фактор РИНЦ: 0,619**), цит. 4.
 11. **Захарова, И.Б.** Молекулярное типирование и анализ полиморфизма генов β-лактамаз патогенных видов *Burkholderia* / **И.Б. Захарова**, А.В. Романова, Н.Н. Тетерятникова, В.С. Замараев, Д.В. Викторов // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2012. – № 2 (42). – С. 98-101 (**Перечень ВАК, Импакт-фактор РИНЦ: 0,376**), цит. 3.
 12. Романова, А.В. Конструирование праймеров для детекции и типирования генов β-лактамаз патогенных видов рода *Burkholderia*/ А.В. Романова, **И.Б. Захарова**, В.С. Замараев, Д.В. Викторов // Проблемы особо опасных инфекций.– 2012.– Т. 112, № 2.– С. 59-61. (**SCOPUS, Импакт-фактор РИНЦ: 0,777**), цит. 3.
 13. Антонов, В.А. Современные подходы к диагностике сапа и мелиоидоза. идентификация и типирование *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* / В.А. Антонов, В.И. Илюхин, Н.П. Храпова, Прохвятилова Е.В., Д.В. Викторов, Т.В. Сенина, А.А. Будченко, Г.А. Ткаченко, В.В. Алексеева, **Захарова И.Б.** и др.// Проблемы особо опасных инфекций.–2012.– Т.112, № 2 .– С. 46-50. (**SCOPUS, Импакт-фактор РИНЦ: 0,777**), цит. 8.

14. 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. (**SCOPUS, Импакт-фактор SJR: 2,339**), цит. 34.
15. Викторов, Д.В. Свойства инсерционных мутантов *Burkholderia pseudomallei*, дефектных по продукции белков клеточных мембран/ Д.В. Викторов, Л.К. Меринова, В.В. Алексеев, **И.Б. Захарова** и др.// Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.–2005.–№ 4. – С.17-20. (**WoS и SCOPUS, Импакт-фактор РИНЦ: 0, 0,913**) цит. 1.
16. Викторов, Д.В. Молекулярное типирование штаммов *Burkholderia pseudomallei* с различной чувствительностью к антибиотикам/ Д.В. Викторов, **И.Б. Захарова**, Л.К. Меринова, В.В. Алексеев // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.– 2006.– № 1.– С.7-11. (**WoS и SCOPUS, Импакт-фактор РИНЦ: 0,913**), цит. 3.

Монографии и практические руководства

17. **Захарова, И.Б.** Мелиоидоз во Вьетнаме. Актуальные вопросы мониторинга *Burkholderia pseudomallei*/ **Захарова И.Б.**, Вуй Т. Lan Anh, Шпак И.М. и др. // В кн.: Актуальные направления и перспективы Российско-Вьетнамского сотрудничества в сфере обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия. Ред: Попова А.Ю., Топорков А.В. Волгоград: ООО «Издательство «Волга-Пресс», 2019. 400 с. – С.70-94 ISBN978-5-9908533-6-2
18. **Захарова, И.Б.** Лабораторный скрининг и идентификация *Burkholderia pseudomallei*: практическое руководство/ **Захарова И.Б.**, Шпак И.М., Тетерятникова Н.Н., Кузютина Ю.А., Вуй Т. Lan Anh и др. / Практическое руководство. Под редакцией А.В. Топоркова, А.Н. Кузнецова, Х. Зы Нгуен; Волгогр. научно-исслед. противочум. ин-т, Российско-Вьетнамский Тропич. научно-исслед. и технол. центр. – Волгоград: Волга-Пресс, 2018. – 96 с.
19. Мелиоидоз и сап / А.В. Топорков, 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/ Под редакцией д. м. н. А. В. Топоркова. - Волгоград: Волга-Пресс, 2016.– 400 с. Цит. 9.
20. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство. Издание 2-е, дополненное, переработанное / Онищенко Г.Г., Брагина И.В., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Шеенков Н.В., Кутырев В. В., Щербакова С.А., Шарова И.Н., Осина Н.А., Казакова Е.С., Красовская Т.Ю., Уткин Д.В., Самойлова Л.В., Куклев В.Е., Портенко С.А., Гаранина С.Б., Найденова Е.В., Касьян И.А., Билько Е.А., Бугоркова Т.В., Пионтковский С.А., Осин А.В., Абдрашитова А.С., Кузнецов О.С., Смирнова Н.И., Ерошенко Г.А., Карнаухов И.Г., Грачева И.В., Безсмертный В.Е., Иванова С.М., Куличенко А.Н., Лямкин Г.И., Рязанова А.Г., Василенко Н.Ф., Еременко Е.И., Буравцева Н.П., Котенев Е.С., Головнева С.И., Русанова Д.В., Самарина И.В., Чеботарева Е.Н., Цыганкова О.И., Цыганкова Е.А., Аксенова Л.Ю., Головинская Т.М., Волынкина А.С., Горобец Е.А., Заикина И.Н., Заревина Л.И., Антонов В.А., Илюхин В. И., Липницкий А.В., Храпова Н.П., Викторов Д.В., Смелянский В.П., Путинцева Е.В., Ткаченко Г.А., Гришина М.А., Алексеева В.В., Савченко С.С., Зинченко О.В., Сенина Т.В., **Захарова И.Б.** и др.; под редакцией академика РАМН Г.Г.Онищенко, академика

РАМН В.В.Кутырева. Изд. 2-е, переработанное и дополненное. – М.: ЗАО «Шико», 2013. – 560 с. Цит. 23.

Патенты и базы данных

21. Патент на изобретение RU 2728356 С1 Набор олигонуклеотидных праймеров для выявления вариантных штаммов *Burkholderia thailandensis*, содержащих высоко гомологичный *Burkholderia pseudomallei* кластер генов биосинтеза капсульного полисахарида/ Васильева К.В., **Захарова И.Б.**, заявитель и патентообладатель ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – Заявка: 2019122908 от 16.07.2019; опублик. 29.07.2020 Бюл. №22
22. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2016620345. Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I-II групп патогенности для программы MALDI Biotyper / А.С. Абдрашитова, Н.Е. Щербакова, А.Н. Спицын, Ж.А. Касьян, А.М. Сеничкина, С.А. Портенко, В.Е. Куклев, Д.В. Уткин, Н.А. Осина, С.А. Щербакова, В.В. Воропаев, Е.А. Котенева, Е.И. Еременко, Л.Ю. Аксенова, А.Г. Рязанова, О.И. Цыганкова, Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, С.В. Писаренко, А.А. Худолеев, А.А. Хачатурова, Н.В. Жаринова, Г.И. Лямкин, А.Н. Куличенко, М.В. Афанасьев, Л.В. Миронова, А.С. Остяк, Г.В. Вдовиченко, Е.Г. Токмакова, Е.С. Куликалова, С.А. Татарников, Е.А. Басов, С.В. Балахонов, О.С. Чемицова, М.М. Сагакянц, М.В. Полеева, К.В. Детушев, Д.В. Русанова, С.А. Благодарских, А.В. Топорков, Д.В. Викторов, Т.Н. Шаров, Я.А. Лопастейская, Е.В. Молчанова, **И.Б. Захарова**, А.М. Маркин. Регистрация в Реестре баз данных 15.03.2016
23. Патент на изобретение RU 2474614 С1 Олигонуклеотидные праймеры для детекции и типирования генов β -лактамаз патогенных буркхольдерий / Д. В. Викторов, А. В. Романова, **И. Б. Захарова**, заявитель и патентообладатель ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – Заявка: 2001100888/14 от 09.01.200; опублик. 10.02.2013, Бюл. № 4., цит. 3.
24. Патент на изобретение RU 2458117 С1 Мутантный штамм *Burkholderia cepacia* KM196, дефектный по продукции порина OprP1, для исследования молекулярных механизмов множественной резистентности к антибиотикам у патогенных буркхольдерий/ Л.К. Меринова, Е.В. Молчанова, О.А. Меринова, Д.В. Викторов, **И.Б. Захарова**, Н.П. Агеева, Е.А. Товба, М.В. Подшивалова, заявитель и патентообладатель ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – Заявка: 2011106729/10 от 22.02.2011; опублик. 10.08.2012, Бюл. № 22
25. Патент на изобретение RU 2413763 С1 Инсерционный мутант *Burkholderia pseudomallei* - модельный штамм для молекулярно-генетического анализа механизмов формирования множественной антибиотикорезистентности у патогенных буркхольдерий/ Д.В. Викторов, Л.К. Меринова, **И.Б. Захарова**, Н.П. Агеева, А.В. Романова, О.А. Меринова, Е.В. Калинин, В.С. Замараев, В.В. Алексеев, заявитель и патентообладатель ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – Заявка: 2009141036/10 от 05.11.2009; опублик. 10.02.2011, Бюл. № 7.

Подписано в печать

Формат 60×84 1/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Объем 2,0 усл. п.л. Тираж 100 экз. Заказ №

Типография «»