

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

На правах рукописи

ЗАХАРОВА ИРИНА БОРИСОВНА

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

1.5.11 – Микробиология

Диссертация

на соискание учёной степени доктора биологических наук

Научный консультант:
Доктор медицинских наук,
доцент А. В. Топорков

Волгоград 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 6 |
| ГЛАВА 1. Биологическое разнообразие, сравнительная геномика и филогения рода <i>Burkholderia</i> | 25 |
| 1.1 Биологическое разнообразие и таксономия рода <i>Burkholderia</i> | 25 |
| 1.2 Таксономия комплекса <i>Burkholderia cepacia</i> | 30 |
| 1.3 Таксономия комплекса <i>Burkholderia pseudomallei</i> | 32 |
| 1.4 Филогения и геномика видов комплекса <i>Burkholderia pseudomallei</i> | 35 |
| 1.4.1 Филогеография и структура глобальной популяции <i>Burkholderia pseudomallei</i> | 35 |
| 1.4.2 Анализ аллельного полиморфизма и структуры вьетнамской популяции <i>Burkholderia pseudomallei</i> | 37 |
| 1.4.2.1 Алгоритм и методы анализа | 38 |
| 1.4.2.2 Анализ территориального распределения сиквенс-типов <i>Burkholderia pseudomallei</i> по регионам Вьетнама | 38 |
| 1.4.2.3 Молекулярно-эпидемиологическое расследование случаев мелиоидоза животных | 44 |
| 1.4.3 Филогения комплекса <i>Burkholderia pseudomallei</i> | 46 |
| 1.4.4 Структурная геномика видов комплекса <i>Burkholderia pseudomallei</i> ... | 47 |
| 1.4.5 Сравнительная геномика видов комплекса <i>Burkholderia pseudomallei</i> | 49 |
| 1.4.6 Анализ дивергенции между видами <i>Burkholderia pseudomallei</i> и <i>Burkholderia thailandensis</i> по признаку основных факторов вирулентности | 53 |
| 1.4.6.1 Алгоритм и инструменты анализа | 53 |
| 1.4.6.2 Результаты анализа | 54 |
| 1.4.7 Функциональная геномика адаптации <i>Burkholderia pseudomallei</i> к стрессовым факторам внешней среды | 61 |
| 1.4.7.1 Алгоритм поиска и результаты анализа литературных данных | 61 |
| 1.5 Эволюционная геномика видов комплекса <i>Burkholderia pseudomallei</i> ... | 64 |
| ГЛАВА 2. Актуальные аспекты эпидемиологии мелиоидоза на современном этапе | 68 |
| 2.1 Пути передачи и факторы предрасположенности к мелиоидозу..... | 70 |
| 2.2 Глобальное распространение мелиоидоза | 71 |

| | |
|---|-----|
| 2.3 Заболеваемость мелиоидозом в эндемичных регионах | 74 |
| 2.4 Выживаемость <i>Burkholderia pseudomallei</i> за пределами традиционных эндемичных регионов в экстремальных условиях | 77 |
| 2.4.1 Ретроспективное исследование генетического родства штаммов возбудителя мелиоидоза, выделенных во Франции в период эпизоотии «L’Affaire du Jardin des Plantes» | 81 |
| 2.4.1.1 Алгоритм и инструменты анализа | 81 |
| 2.4.1.2 Филогенетический анализ штаммов <i>Burkholderia pseudomallei</i> , выделенных в период эпизоотии мелиоидоза во Франции | 82 |
| 2.4.2 Изучение устойчивости <i>Burkholderia pseudomallei</i> к воздействию низких температур | 84 |
| 2.4.2.1 Штаммы и методы исследования | 85 |
| 2.4.2.2 Выживание возбудителя мелиоидоза при низких положительных температурах | 86 |
| 2.4.2.2 Выживание возбудителя мелиоидоза при замораживании | 90 |
| 2.4.2.3 Морфологическая изменчивость возбудителя мелиоидоза в условиях холодового стресса | 91 |
| 2.5 Проблема мелиоидоза в неэндемичных регионах | 93 |
| 2.5.1 Ретроспективный анализ особенностей влияния предрасполагающих факторов на риск развития мелиоидоза у посетителей эндемичных регионов в сравнении с коренными жителями | 94 |
| 2.5.1.1 Поиск и критерии отбора данных | 94 |
| 2.5.1.2 Анализ клинико-демографических данных заболевших | 95 |
| 2.5.1.3 Анализ связи между трендом развития международного туризма и динамикой случаев заноса мелиоидоза | 102 |
| ГЛАВА 3. Проблемы и пути совершенствования фенотипических методов идентификации буркхольдерий комплекса <i>Burkholderia pseudomallei</i> | 107 |
| 3.1 Классический микробиологический метод идентификации буркхольдерий комплекса <i>Burkholderia pseudomallei</i> | 109 |
| 3.1.1 Морфологическая характеристика клеток <i>Burkholderia pseudomallei</i> из различных вариантов колоний | 116 |
| 3.1.1.1 Алгоритм и методы исследования | 116 |
| 3.1.1.2 Микроморфология <i>Burkholderia pseudomallei</i> | 117 |
| 3.1.1.3 Ультрамикроморфология <i>Burkholderia pseudomallei</i> | 118 |
| 3.1.2 Биохимическая идентификация буркхольдерий комплекса <i>Burkholderia pseudomallei</i> | 119 |

| | |
|---|-----|
| 3.2 Особенности применения автоматизированных биохимических систем для идентификации буркхольдерий комплекса <i>Burkholderia pseudomallei</i> | 122 |
| 3.2.1 Оценка характеристик систем биохимической идентификации в аспекте их пригодности для идентификации возбудителей мелиоидоза и сапа | 123 |
| 3.3 Анализ биохимических профилей коллекционных штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа | 129 |
| 3.3.1 Штаммы и методы исследования | 129 |
| 3.3.2 Результаты идентификации коллекционных штаммов <i>Burkholderia</i> spp. системой Vitek 2 GN | 131 |
| 3.3.3 Непараметрический многомерный анализ биохимических профилей коллекционных штаммов <i>Burkholderia</i> spp. | 133 |
| 3.3.4 Определение влияния морфологической variability колоний на корректность биохимической идентификации | 141 |
| 3.4 Идентификация буркхольдерий комплекса <i>Burkholderia pseudomallei</i> методом масс-спектрометрии | 145 |
| 3.4.1 Оптимизация протокола времяпролетной масс-спектрометрии для идентификации буркхольдерий II группы патогенности и формирование референтных масс-спектров общеклеточных белков штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа | 146 |
| ГЛАВА 4. Особенности иммунодиагностики мелиоидоза | 156 |
| 4.1 Выявление антител | 156 |
| 4.2 Обнаружение антигенов | 163 |
| ГЛАВА 5. Молекулярно-генетические методы идентификации и дифференциации видов комплекса <i>Burkholderia pseudomallei</i> | 167 |
| 5.1 Молекулярно-генетические основы резистентности <i>Burkholderia pseudomallei</i> к β -лактамам | 174 |
| 5.2 Исследование потенциала генов β -лактамаз классов А, В и D для использования в качестве диагностических мишеней | 182 |
| 5.2.1 Алгоритм и методы проведения анализа | 182 |
| 5.2.2 Конструирование олигонуклеотидных праймеров | 189 |
| 5.2.3 Экспериментальная оценка распространенности генетических мишеней и анализ видоспецифичности разработанных праймеров | 190 |
| 5.2.4 Анализ распространенности выбранных генетических мишеней в мировой популяции <i>B. pseudomallei</i> , <i>B. mallei</i> и <i>B. thailandensis</i> биоин- | 193 |

| | |
|---|-----|
| форматическими методами | |
| 5.2.5 Оценка уровня межштаммовой гомологии паралога β -лактамаз молекулярных классов В и D и структурной стабильности прилегающих к ним фрагментов генома | 205 |
| 5.2.5.1 Анализ стабильности нуклеотидной последовательности амплифицируемых фрагментов у мутантных штаммов <i>Burkholderia</i> spp | 213 |
| 5.2.6 Оценка видоспецифичности олигонуклеотидных праймеров биоинформатическими методами | 217 |
| 5.3 Применение набора реагентов для идентификации клинических штаммов и при проведении мониторинговых исследований мелиоидоза на территории Вьетнама | 224 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 228 |
| ВЫВОДЫ | 259 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ | 264 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 266 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень разработанности проблемы

Род *Burkholderia* отличается разнообразием входящих в его состав видов бактерий, одним из общих свойств которых является поразительный адаптационный потенциал, обеспечиваемый высокой пластичностью генома, благодаря чему подавляющее число видов рода способны к одинаково успешному существованию в широком круге сред обитания. Микроорганизмы рода формируют несколько филогенетически связанных групп: виды комплексов «*Burkholderia cepacia*» (Всс), «*Burkholderia pseudomallei*» (Врс) и группы «*Burkholderia glumae-gladioli*» [Coenye et al., 2001; Limmathurotsakul et al., 2010; Sawana et al., 2014].

Среди достаточно представительного перечня клинически значимых микроорганизмов рода два вида – *B. pseudomallei* и *B. mallei* – занимают особое место, являясь возбудителями тяжелых инфекционных заболеваний с высокой летальностью – мелиоидоза и сапа, соответственно. *B. mallei* и *B. pseudomallei* филогенетически очень близки, предполагают, что *B. mallei* эволюционировала в строгий патоген из *B. pseudomallei* путем редукции генома в процессе приспособления к паразитированию в организме млекопитающих [Godoy et al., 2003; Nierman et al., 2004] и утратила способность размножаться вне теплокровного хозяина [Dvorak and Spickler, 2008]. Сап – высоко контагиозный антропозооноз, чаще всего поражает непарнокопытных (лошади, ослы, мулы), а также значительное число других видов животных, в том числе кошек и собак. Заражение людей чаще всего происходит при контакте с больными животными. Заболевание имеет высокую летальность – до 95% в отсутствии специфического лечения и до 50% – при антибиотикотерапии [Spickler et al., 2008].

B. thailandensis до ее выделения в отдельный вид считалась практически авирулентным Ara⁺ биотипом *B. pseudomallei*, поскольку в большинстве диагностических тестов она имеет практически полное сходство с *B. pseudomallei*, за исключением способности ассимилировать арабинозу [Smith et al., 1995, 1997]. Пер-

вые штаммы бактерии были выделены из почвы, однако периодически у людей регистрируются отдельные случаи инфекции, обусловленные *B. thailandensis* [Lertpatanasuwan et al., 1999; Zueter et al., 2016; Gee et al., 2018].

B. pseudomallei – сапрофит по своей природе и в естественных условиях входит в состав микробиоты влажных почв и застойных вод эндемичных регионов мира. Кроме того, микроб успешно выживает в клетках ряда видов свободноживущих простейших, таких как *Acanthamoeba* и *Dinoflagellata* [Sprague and Neubauer, 2004; Inglis and Sagripanti, 2006]; в спорах микоризного гриба *Gigaspora decipiens* [Levy et al., 2003]; способен колонизировать растения [Kaestli et al., 2012]; вызывать инфекцию у многочисленных видов домашних [Parkes et al., 2009; Tonpitak et al., 2014; Hellebuyck et al., 2018; Ryan et al., 2018], а также диких животных (млекопитающих, рептилий, птиц, рыб) [Choy et al., 2000; Hampton et al., 2011; Höger et al., 2016; Kasantikul et al., 2016; Shima et al., 2019] и мелиоидоз – у человека [Wiersinga et al., 2018 и др.].

Диагностика мелиоидоза на основании анализа симптомокомплекса весьма сложна в связи с полиморфностью проявлений заболевания, дифференциация между мелиоидозом и другими острыми и хроническими бактериальными инфекциями часто невозможна [Inglis et al., 2009]. Больным нередко диагностируют вирусные лихорадки, туберкулез, онкологические и другие заболевания. Летальность при мелиоидозе зависит от многих факторов (инфицирующей дозы и свойств штамма, общего состояния организма, своевременной диагностики и лечения) и варьирует от 90% при отсутствии или неадекватной терапии, в случаях септического шока до 80% даже при соответствующем лечении, до практически нулевой при вовремя диагностированных кожных формах. Средние показатели летальности варьируют от 10% до 50%, в зависимости от уровня диагностических возможностей и доступности интенсивной терапии [Currie, 2015; Wiersinga et al., 2018].

Ключевое значение в патогенезе мелиоидоза имеет способность *B. pseudomallei* проникать, выживать и размножаться в клетках млекопитающих, что определяет особенности инфекции, включая сложность ее лечения, латентную

форму и высокую частоту рецидивов [Lazar Adler et al., 2009; Allwood et al., 2011; Wiersinga et al., 2012; Meraj et al., 2019]. Рецидив инфекции спустя месяцы или даже годы после успешного курса лечения наблюдается у 5–28% пациентов [Cheng and Currie, 2005; Hayden et al., 2012]. Причем методами молекулярного типирования показано, что большинство случаев являются не реинфицированием, а именно рецидивом, вызванным исходным штаммом [Maharjan et al., 2005; Chusri et al., 2012; Chetchotisakd et al., 2014]. Возможно, столь высокая частота рецидивов обусловлена наличием внутри основной популяции возбудителя изогенных персистирующих субпопуляций, уровень которых превышает таковые у *Pseudomonas aeruginosa* в 100–500 раз [Nierman et al., 2015].

Благодаря внушительному набору факторов патогенности *B. pseudomallei* устойчива к воздействию комплемента, а также лизосомальным дефензинам и катионным пептидам, участвующим в разрушении структуры клеточной мембраны патогена, что способствует выживанию возбудителя в сыворотке крови и в широком диапазоне клеток млекопитающих, в том числе в фагоцитирующих [Lazar Adler et al., 2009; Lazar Adler et al., 2016]. Кроме того, *B. pseudomallei* способна манипулировать сигнальными путями и иммунными реакциями хозяина для уклонения от его иммунного ответа. Получены данные о способности полиморфноядерных нейтрофилов, инфицированных *B. pseudomallei*, значительно ингибировать пролиферацию CD4 + Т-клеток посредством продуцирования IFN-g и увеличением экспрессии регулятора PD-L1 (Programmed death ligand 1), что приводит к снижению уровня антиген-специфических Т-клеток [Buddhisa et al., 2015]. Молекулярные стратегии и механизмы этого явления пока неясны.

Роль гуморального ответа в развитии иммунитета к мелиоидозу неоднозначна, возможны случаи повторного заражения другими штаммами возбудителя даже при наличии высоких уровней антител [Vasu et al., 2003]. В пользу ключевой роли клеточно-опосредованного иммунного ответа для защиты от прогрессирования инфекции и бактериального клиренса у больных мелиоидозом свидетельствует факт обратной корреляции уровня CD4 + CD8 + Т-клеток с уровнем летальности [Barnes et al., 2004; Jenjaroen et al., 2015; Wiersinga et al., 2018].

Неполное понимание патофизиологии инфекционного процесса при мелиоидозе является одной из проблем для создания эффективной вакцины. Несмотря на многочисленные исследования в этом направлении, средства специфической профилактики мелиоидоза и сапа отсутствуют [Wiersinga et al., 2018; Morici et al., 2019]. Аэрогенное заражение, как правило, ведет к фатальному исходу, в связи с чем возбудители мелиоидоза и сапа относятся ко второй группе патогенных для человека микроорганизмов. Высокая вирулентность возбудителей, низкая инфицирующая доза, возможность доставки инфекционных агентов в форме аэрозоля определили включение *B. mallei* и *B. pseudomallei* в категорию «В» потенциальных средств биотерроризма [Онищенко и др., 2016; Gilad et al., 2007].

Ранняя диагностика инфекции в случае мелиоидоза и, соответственно, назначение специфического лечения в значительной степени определяют прогноз заболевания. Неверный или отсроченный диагноз может иметь тяжелые последствия, так как большинство антибиотиков, обычно используемых для лечения септицемии, неэффективны против *B. pseudomallei* [Thibault et al., 2004; Sadiq et al., 2016; Cummings and Slayden, 2017]. Так, значительное снижение летальности мелиоидоза в Австралии (с 30% до 9%) связывают с возросшей осведомленностью о большей эффективности лечения больных цефтазидимом или меропенемом и хорошо налаженной лабораторной диагностикой инфекции [Cheng et al., 2004; Currie et al., 2010].

Особенности биологических свойств возбудителя, такие как способность 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; Austin et al., 2015; Shea et al., 2017], а также невысокая скорость роста значительно затрудняют распознавание патогена при исследовании нестерильного в норме материала, особенно при

отсутствии соответствующего опыта. Широкий диапазон внутривидовой вариабельности целого ряда биохимических признаков и высокий уровень сходства с непатогенными и оппортунистическими бургхольдериями являются причиной ошибок идентификации *B. pseudomallei* коммерческими биохимическими анализаторами приблизительно в 15% исследований [Glass and Popovic, 2005; Kiratisin et al., 2007; Weissert et al., 2009; Zong et al., 2012; Podin et al., 2013].

Для быстрого определения видовой принадлежности выделенных культур весьма перспективно использование метода масс-спектрометрического профилирования [Inglis et al., 2012; Suttisunhakul et al., 2017]. Однако референтные масс-спектры для бургхольдерий комплекса «*B. pseudomallei*» в коммерческих базах данных либо отсутствуют, либо представлены рибосомальными белками. Для обеспечения точной идентификации и дифференциации видов внутри комплекса существует потребность в расширении имеющихся баз данных дополнительными эталонными спектрами, представляющими штаммы из различных регионов мира.

Полимеразная цепная реакция широко используется для идентификации возбудителя мелиоидоза, но высокая частота рекомбинации и геномная гетерогенность [Spring-Pearson et al., 2015; Nandi et al., 2015; Price et al., 2017] штаммов не исключают вероятности получения ложных результатов даже при использовании лучших на сегодняшний день тест-систем.

Перечисленные факты свидетельствуют, что, несмотря на многообразие методов лабораторной диагностики мелиоидоза, существует проблема выявления и надежной дифференциации *B. pseudomallei* от других видов бургхольдерий, а разработка новых инструментов для быстрой и точной идентификации *B. pseudomallei* остается актуальной, что и определило цель представляемой работы.

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

Задачи исследования:

1. Проанализировать актуальные аспекты геномики и филогении 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 комплекс 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 исполь-

зования 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 патоген-

ность 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.TM 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 высокоиммуногенных 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 воз-

будителей 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», представлены 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 биохимического профилирования 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 «металло-гидролазы / 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. ceracia* (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 исследований, 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 морфологические варианты колоний возбудителя мелиоидоза могут отличаться по спектрам биохимической активности, что оказывает влияние на корректность видовой идентификации системой Vitek 2 GN. Колонии *B. pseudomallei* мор-

- фотипа 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, 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 диагностических генетических мишеней, детекция которых в формате мультиплексной ПЦР обеспечивает идентификацию и дифференциацию видов комплекса «*B. pseudomallei*». Созданный набор реагентов «АмплигенБуркхольдерии 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 и исследовательского проекта «Молекулярные механизмы формирования множественной лекарственной резистентности у *Burkholderia pseudomallei* и близкородственных видов» (грант РФФИ 07-04-01568).

Основные результаты исследований изложены в 121 опубликованной работе, из них 25 – в рецензируемых периодических изданиях, входящих в перечень ВАК; 4 – в зарубежных журналах, индексируемых Web of Sciences Core Collections (WoSCC), Web of Sciences (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 международном конгрессе «Vaccine & Immunization» (Manchester, 1999 г.), международной конференции «Problems of biological and ecological safety» (Оболенск, 2000 г.), международных конференциях «Natural infectious diseases» (Ulaan Baator, 2001, 2002, 2003 гг.), IV и V межгосударственных научно-практических конференций «Современные технологии в диагностике особо опас-

ных инфекционных болезней» (Саратов, 2003, 2004 гг.), VI Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ «Санитарная охрана территорий государств-участников СНГ: проблемы биологической безопасности и противодействия биотерроризму в современных условиях» (Волгоград, 2005 г.), VII Межгосударственной научно-практической конференции «Чрезвычайные ситуации международного значения в общественном здравоохранении в решениях Санкт-Петербургского саммита «Группы восьми» и санитарная охрана территорий государств-участников Содружества Независимых Государств» (Оболensk, 2006), VIII Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ «Международные медико-санитарные правила и реализация глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями в государствах-участниках СНГ» (Саратов, 2007 г.), VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Генодиагностика инфекционных болезней – 2007» (Москва, 2007 г.), IX Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ «Современные технологии в реализации глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями на территории государств-участников Содружества Независимых Государств» (Волгоград, 2008 г.), X Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ «Актуальные проблемы предупреждения и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения государств-участников СНГ» (г. Ставрополь, 2010 г.), I-ой, II-ой и III-й Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (г. Ставрополь, 2012, 2017, 2019 гг.), XI Межгосударственной научно-практической конференции «Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера» (г. Саратов, 2012), XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения» (г. Санкт-Петербург, 2017), XIV Межго-

сударственной научно-практической конференции «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ» (г. Саратов, 2018), IV, VI и IX всемирных конгрессах по мелиоидозу The 4th, the 5th and the 9th World Melioidosis Congresses, (Perth, Australia, 2001; Khon Kaen, Thailand, 2007; Hanoi, Vietnam, 2019), IV Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» в составе XIII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (г. Москва, 2021), XV Межгосударственной научно-практической конференции «Актуальные вопросы обеспечения эпидемиологического благополучия в трансграничных природных очагах чумы и других опасных инфекционных болезней» (г. Иркутск, 2021), I и II Международных научно-практических конференциях по вопросу противодействия новой коронавирусной инфекции и другим инфекционным заболеваниям (г. Саратов, 2020; г. Санкт-Петербург, 2021).

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 экспериментальные, аналитические и *in silico* исследования, а также анализ и интерпретация полученных результатов. 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 (Социалистическая Республика Вьетнам, 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.

ГЛАВА 1. БИОЛОГИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ, СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНОМИКА И ФИЛОГЕНИЯ РОДА *BURKHOLDERIA*

1.1 Биологическое разнообразие и таксономия рода *Burkholderia*

Род *Burkholderia* включает в себя большое количество разнообразных видов, в числе которых присутствуют сапрофиты, патогены человека и животных, а также фитопатогены. Представители рода – грамотрицательные палочки, спор не образуют, аэробные или микроаэрофильные хемоорганотрофные бактерии, способные использовать в качестве единственного источника углерода и энергии различные моносахара, дисахариды и многоатомные спирты. Большинство из них подвижны – моно- или лофотрихи, однако, отдельные виды жгутики утратили, например, *B. mallei*.

Как самостоятельный таксон род *Burkholderia* был образован в 1992 году Yabuuchi с соавторами [Yabuuchi et al., 1992]. Первоначально в него вошли 7 видов II группы рРНК-ДНК гомологии рода *Pseudomonas* [Palleroni et al., 1973; Palleroni, 1984]: *P. cepacia*, *P. mallei*, *P. pseudomallei*, *P. caryophylli*, *P. gladioli*, *P. pickettii* и *P. solanacearum*. Два из этих видов – *B. pseudomallei* и *B. mallei* – высокопатогенны для животных и человека, *B. cepacia* и *B. pickettii* – оппортунистические патогены, *B. caryophylli*, *B. gladioli* и *B. solanacearum* – фитопатогены. Вид *B. cepacia*, получивший статус типового вида рода, описан в 1950 г. как возбудитель гнили лука американским бактериологом W. H. Burkholder, в честь которого род и получил свое название.

Практически сразу после образования род претерпел существенную ревизию: виды *B. pickettii* и *B. solanacearum* были перенесены в новый род *Ralstonia* [Yabuuchi et al., 1995]. На сегодняшний день, согласно «Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea, Release 7.7» [Garrity et al., 2007], род *Burkholderia* принадлежит семейству *Burkholderiaceae*, входящему в порядок *Burkholderiales* класса *Be-*

taproteobacteria, и включает в себя 90 зарегистрированных видов и несколько кандидатных, всего более 100 видов [<http://www.bacterio.net/burkholderia.html>].

Виды *Burkholderia* распространены повсеместно и занимают самые разнообразные экологические ниши как во внешней среде, так и в организмах-хозяевах [Coenye and Vandamme, 2003]. Причем, взаимоотношения хозяин-бактерия охватывают большинство видов симбиоза в широком смысле: паразитизм, мутуализм, эндосимбиоз и др.

В 2001 году опубликованы две работы, сообщающие о способности буркхольдерий к азотфиксации и образованию клубеньков у растений семейства бобовых [Estrada-de los Santos et al., 2001; Moulin et al., 2001]. Ранее считалось, что свойство образовывать клубеньки у бобовых культур присуще исключительно альфа-протеобактериям. За последние несколько лет количество новых видов *Burkholderia*, ассоциированных с растениями значительно возросло. Некоторые свободно обитают в ризосфере, другие проявляют эндофитный образ жизни, образуя облигатный симбиоз с растением-хозяином [Weisskopf et al., 2011; Bulgari et al., 2014; Carrell et al., 2015; Vanik et al., 2016]. Наиболее изученным эндосимбиотом растений является *B. phytofirmans* PsJN, которая первоначально была выделена из корней лука, а позже и у других растений. Показана ее способность защищать растения от патогенов (механизм этого феномена пока неясен), а также повышать стрессоустойчивость растений, особенно в отношении низких температур, высокой концентрации соли, и засухи [Compant et al., 2005; Sheibani-Tezerji et al., 2015; Pinedo et al., 2015]. Некоторые из растений семейства Мареновых имеют клубеньки, образованные отдельными видами буркхольдерий (*B. caledonica*, *B. graminis*, *B. phenoliruptrix* и ряда *Burkholderia* spp.). Это уникальное объединение является примером облигатного симбиоза (мутуализма) – оба партнера не в состоянии существовать вне симбиотической ассоциации. Недавно было показано, что бактериальный симбионт производит большое количество вторичных метаболитов, которые защищают растения от травоядных. Бактерии, как полагают, передаются потомству с помощью колонизации развивающихся семян [Lemaire et al., 2012; Verstraete et al., 2013].

Многие виды *Burkholderia* могут образовывать либо антагонистические, либо мутуалистические взаимоотношения с грибами. Антагонизм обусловлен способностью буркхольдерий продуцировать разнообразные антимикотические соединения [Vial et al., 2007]. Примером мутуализма может служить *B. rhizoxinica*, которая инфицирует гифы гриба *Rhizopus microsporus* – возбудителя фитофтороза рассады риса. Симбионт синтезирует антимитотический токсин ризоксин, блокирующий деление растительных клеток. Воспроизводство хозяина стало полностью зависимым от бактерий *B. rhizoxinica*, которые обеспечивают очень мощный токсин для защиты среды обитания гриба и доступа питательных веществ из разлагающихся растений. В отсутствие эндосимбионта гриб оказывается не в состоянии формировать спорангии и споры [Partida-Martinez et al., 2007].

И, наконец, накоплена достаточная доказательная база о наличии симбиотических отношений между буркхольдериями и насекомыми [Kikuchi et al., 2005; 2011]. Более того, у насекомых обнаружен неизвестный ранее специальный орган для симбионтов [Ohbayashi et al., 2015].

К настоящему времени стало очевидным, что виды этого рода обладают огромным биотехнологическим потенциалом благодаря способности синтезировать разнообразные коммерчески важные гидролитические ферменты и биологически активные вещества, а также наличие потенциал для биodeградации трудноутилизуемых веществ. Например, *B. xenovorans* LB400 является одним из наиболее эффективных деструкторов полихлорированных бифенилов [Chain et al., 2006]. В качестве яркого примера таких бактерий продуцентов и биодеструкторов можно привести *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) – группа из 20 тесно связанных видов. Практически все виды Bcc были выделены из окружающей среды: из образцов почвы или из ризосферы различных растений [Peeters et al., 2013; DeSmet et al., 2015], однако они являются оппортунистическими патогенами, способными вызвать серьезные инфекции у больных муковисцидозом и иммунодефицитами, что ограничивает их биотехнологическое использование. Тем не менее, некоторые штаммы *B. cepacia* привлекли внимание в качестве антагонистов почвенных патогенов растений [Holmes et al., 1998; Lipuma et al., 1999], а также

продуцентов факторов роста, которые могут колонизировать ризосферу экономически важных культур и тем самым повышать урожайность [Bowers and Parke, 1993]. Исключительный метаболический потенциал этой бактерии, позволяющий использовать компоненты сырой нефти и гербициды в качестве источника углерода, можно было бы применять в биорекультивации ксенобиотиков [Folsom et al., 1990; Krumme et al., 1993]. Большинство уже используемых для биоконтроля или биоремедиации или находящихся в стадии разработки штаммов буркхольдерий являются плохо охарактеризованными таксономически, и их потенциальная опасность остается неясной [Eberl and Vandamme, 2016]. В связи с этим, их сельскохозяйственное и промышленное использование строго ограничено из-за потенциальной угрозы для здоровья человека [Mahenthiralingam et al., 2005].

Филогения и таксономия рода *Burkholderia* первоначально были основаны на анализе последовательностей 16S рРНК [Yabuuchi et al., 1992; Palleroni, 2005; Yarza et al., 2008]. Полученные данные позднее были подтверждены другими филогенетическими методами, в том числе базирующимися на анализе последовательностей генов: *recA* [Payne et al., 2005] и *acdS* [Onofre-Lemus et al., 2009], ДНК-ДНК гибридизации [Gillis et al., 1995], анализе спектров жирных кислот [Stead, 1992], мультилокусном сиквенс-типировании [Tayeb et al., 2008; Spilker et al., 2009; Estrada-de los Santos et al., 2013], анализе приобретения-потери генов [Zhu et al., 2011] и полногеномном филогенетическом анализе [Ussery et al., 2009; Segata et al., 2013].

За все время существования рода, и особенно в последнее десятилетие, его численный состав значительно пополнился как за счет открытых новых видов (*B. tropica*, *B. unamae*, *B. caballeronis*, *B. aspalathi*, *B. dipogonis*, *B. cordobensis* и др.), так и вследствие реклассификации уже известных, например, *B. phenazinium*, *B. pyrrocinia*, *B. glathei* и др. Как уже упоминалось выше, в настоящее время в состав рода входят более 100 видов, хотя и не все они подтверждены в International Committee on Systematics of Prokaryotes of the International Union of Microbiological Societies. Филогенетический анализ, проведенный в последние годы несколькими независимыми исследовательскими группами [Estrada-de los Santos et al., 2001;

Caballero-Mellado et al., 2004; Reis et al., 2004; Perin et al., 2006; Suarez-Moreno et al., 2012; Estrada-de los Santos et al., 2013; Sawana et al., 2014; Zuleta et al., 2014], показал существование внутри рода двух крупных филогенетических кластеров и нескольких отдельных клад. Разные авторы присвоили им отличающиеся названия: Clade I и Clade II [Sawana et al., 2014] и Group B и Group A [Estrada-de los Santos et al., 2015]. Для удобства изложения далее будет использована номенклатура, предложенная А. Sawana.

Clade I включает патогенных для человека, животных и растений представителей рода: виды *B. ceracia* complex (Clade Ia), *B. pseudomallei* complex (Clade Ib) и Clade Ic – *B. gladioli*, *B. plantarii*, *B. glumae*.

В Clade II вошли непатогенные свободноживущие или ассоциированные с растениями буркхольдерии, так называемая PBE (plant-beneficial-environmental) группа [Suarez-Moreno et al., 2012].

Кроме того, выделены 2 переходные группы и отдельная клада *B. andropogonis* [Estrada-de los Santos et al., 2016].

В недавнее время шла оживленная дискуссия о целесообразности выделения видов PBE в отдельный род с предлагаемыми названиями *Paraburkholderia* [Sawana et al., 2014] или *Caballeronia* [Estrada-de los Santos et al., 2015]. Высказывались мнения, что выделение отдельного рода *Paraburkholderia* несколько преждевременно и этот вопрос требует дополнительных исследований [Estrada-de los Santos et al., 2015]. И, несмотря на это, новый род *Paraburkholderia* был валидирован и теперь имеет официальный статус в бактериальной номенклатуре [Oren and Garrity, 2015]. Кроме того, выделены род *Caballeronia* [Dobritsa et al., 2016] и *Robbsia* [Lopes-Santos et al., 2017]. В настоящее время в LPSN (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature, Bergey's Taxonomic Outlines) [<http://www.bacterio.net/-classifphyla.html>] представлены старый род *Burkholderia* (*sensu lato*), а также обновленный род *Burkholderia* (*sensu stricto*), включающий *B. ceracia* complex, *B. pseudomallei* complex и фитопатогенные виды, близкие *B. gladioli*, и роды *Paraburkholderia*, *Caballeronia*, *Robbsia* и *Pararobbsia*,

1.2 Таксономия комплекса *Burkholderia ceracia*

Как и многие другие буркхольдерии, *B. ceracia* была первоначально известна как фитопатогенная псевдомонада [Burkholder, 1950]. *Pseudomonas ceracia* была описана Буркхольдером в 1950 году как возбудитель бактериальной гнили лука. В 1970-е годы было установлено, что *P. ceracia*, почвенная бактерия *P. multivorans* и оппортунистический патоген *P. kingii* представляют собой один и тот же вид [Ballard et al., 1970; Snell et al., 1972; Sinsabaugh et al., 1975], за которым было закреплено название «*P. ceracia*». Уже в начале 1970-х было очевидно, что *P. ceracia*, естественным резервуаром которого являются вода и почва, одновременно является фитопатогеном и оппортунистическим патогеном человека.

В середине 1990-х годов была показана неоднородность штаммов *B. ceracia* [Simpson et al., 1994; Tabacchioni et al., 1995; Yohalem et al., 1994]. И, к началу 2000-х годов, было установлено, что штаммы, идентифицированные как *B. ceracia*, на самом деле представляют собой комплекс тесно связанных между собой геномоваров, составляющих *B. ceracia* complex (Всс) [Coenye et al., 2001c]. Термин «геномовар» был введен для обозначения фенотипически идентичных видов [Ursing et al., 1995]. На тот момент Всс содержал, по меньшей мере, девять геномоваров со степенью гомологии 16S рДНК 98-100% внутри Всс и 97 % и менее – с другими видами *Burkholderia* [Coenye et al., 2001f], с высоким сходством последовательностей гена *recA* (94-95%) и умеренным уровнем ДНК-ДНК гибридизации (30–50%) [Vandamme et al., 1997; 2000; 2002; 2003; Coenye et al., 2001d; 2001e].

К 2004 году 9 геномоваров Всс получили видовой статус: *B. ceracia* [Vandamme et al. 1997] – I геномовар; *B. multivorans* [Vandamme et al., 1997] – II геномовар; *B. cenocercacia* [Vandamme et al., 2003] – III геномовар; *B. stabilis* [Vandamme et al., 2000] – IV геномовар; *B. vietnamiensis* [Gillis et al., 1995; Vandamme et al., 1997] – V геномовар; *B. dolosa* [Vermis et al., 2004] – VI геномовар; *B. ambifaria* [Coenye et al., 2001a] – VII геномовар; *B. anthina* [Vandamme et al., 2002] – VIII геномовар и *B. pyrrocinia* [Vandamme et al., 2002] – IX геномовар.

К. Vermis предложил *B. ubonensis* в качестве X геномовара Всс [Vermis et al., 2002], что было подтверждено при помощи филогенетического анализа гена 16S рРНК [Coenye and Vandamme, 2003]. В 2005 году среди уже описанных видов были выявлены еще 4 гесА-филотипа, обозначенных *B. seracia* group К, *B. seracia* group AW, ВСС1 и ВСС2 [Payne et al., 2005]. Мультилокусное сиквенс-типирование (MLST) подтвердило наличие этих групп, а также определило новые филогенетические кластеры [Baldwin et al. 2005; Mahenthiralingam et al., 2006; Dalmastri et al., 2007], на основании чего было предложено дополнить видовой состав Всс семью MLST группами: Всс group К, Всс1, Всс2, Всс3, Всс4, Всс5 и Всс6.

К настоящему времени Всс состоит уже из 20 близкородственных видов буркхольдерий (Таблица 1).

Таблица 1 – Виды комплекса *Burkholderia seracia*

| Вид | Геномовар | Ссылка |
|-----------------------------|-----------|--|
| <i>B. seracia</i> | I | [Vandamme et al. 1997] |
| <i>B. multivorans</i> | II | [Vandamme et al. 1997] |
| <i>B. cenocepacia</i> | III | [Vandamme et al. 1997] |
| <i>B. stabilis</i> | IV | [Vandamme et al. 2000] |
| <i>B. vietnamiensis</i> | V | [Gillis et al. 1995; Vandamme et al. 1997] |
| <i>B. dolosa</i> | VI | [Vermis et al. 2004] |
| <i>B. ambifaria</i> | VII | [Coenye et al. 2001a] |
| <i>B. anthina</i> | VIII | [Vandamme et al. 2002] |
| <i>B. pyrrocinia</i> | IX | [Vandamme et al. 2002] |
| <i>B. ubonensis</i> | X | [Vermis et al. 2002] |
| <i>B. latens</i> | XI | [Vanlaere et al. 2008] |
| <i>B. diffusa</i> | XII | [Vanlaere et al. 2008] |
| <i>B. arboris</i> | XIII | [Vanlaere et al. 2008] |
| <i>B. seminalis</i> | XIV | [Vanlaere et al. 2008] |
| <i>B. metallica</i> | XV | [Vanlaere et al. 2008] |
| <i>B. contaminans</i> | XVI | [Vanlaere et al. 2008] |
| <i>B. lata</i> | XVII | [Vanlaere et al. 2008] |
| <i>B. pseudomultivorans</i> | XVIII | [Peeters et al. 2013] |
| <i>B. stagnalis</i> | XIX | [DeSmet et al. 2015] |
| <i>B. territorii</i> | XX | [DeSmet et al. 2015] |

Представители комплекса «*serasia*» являются возбудителями потенциально летальных легочных инфекций у индивидуумов с ослабленным иммунитетом – больных муковисцидозом, хроническим гранулематозом, иммунодефицитами [Mahenthiralingam et al., 2002, 2005; Biddick et al., 2003; Hauser et al., 2011], а также нозокомиальных инфекций мочевыводящих и дыхательных путей с высокой вероятностью развития бактериемии. Бактерии *Vcc* обладают высокой естественной резистентностью к антибактериальным препаратам и дезинфектантам [Mahenthiralingam et al., 2008; Sousa et al., 2010].

Исследования последнего десятилетия показали идентичность между штаммами *Vcc*, выделенными из разнообразных экологических ниш (вода, почва, ризосфера растений, госпитальные принадлежности, фармацевтические растворы, косметика и др.) и клиническими изолятами, демонстрируя, что способность обитать во внешней среде и вызывать оппортунистические инфекции – это естественное свойство видов *Vcc* [Mahenthiralingam et al., 2008].

1.3 Таксономия комплекса *Burkholderia pseudomallei*

Комплекс *Burkholderia pseudomallei* (*Vrc*) в настоящее время представлен восемью видами, четыре из которых имеют фенотипическое, биохимическое, антигенное и генетическое сходство – *B. mallei*, *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* [Brett et al., 1998] и *B. humptydoensis* [Tuanyok et al., 2017], а также *B. oklahomensis* [Glass et al., 2006], *B. singularis* [Vandamme et al., 2017], *B. mayonis* sp. nov. и *B. savannae* sp. nov. [Hall et al., 2021].

B. pseudomallei – сапрофит по своей природе, способная инфицировать широкий круг видов одно- и многоклеточных животных, а также растений. *B. mallei* является облигатным патогеном и не может существовать вне организма теплокровного хозяина. *B. mallei* и *B. pseudomallei*, как известно, филогенетически очень сходны. Более того, предполагают, что *B. mallei* эволюционировала в строгий патоген из *B. pseudomallei* под воздействием селективного давления в организме хозяина путем редукции генома [Godoy et al., 2003; Nierman et al., 2004].

Многие гены, предположительно необходимые для выживания во внешней среде, были утрачены, тогда как гены, обеспечивающие успешное паразитическое существование были сохранены [Nierman et al., 2004]. Тем не менее, уровень гомологии между геномами *B. mallei* и *B. pseudomallei* составляет ~ 99,5% [Lin et al., 2008] и генетически оба возбудителя относятся к одному виду. *B. mallei* выделена в отдельный вид лишь вследствие своей более высокой эпидемической значимости [Yabuuchi et al., 1992b].

B. thailandensis – сапрофит, занимающий те же экологические ниши, что и возбудитель мелиоидоза и имеющий сходную с *B. pseudomallei* область распространения. Эта бактерия была впервые выделена из почвы на северо-востоке Таиланда и некоторое время считалась практически авирулентным Ara^+ биотипом *B. pseudomallei* [Smith et al., 1995, 1997]. В 1998 году вид *B. thailandensis* получил официальный статус [Brett et al., 1998].

Клинический изолят «Oklahoma» был выделен в 1973 году из раневой инфекции фермера, травмированного в результате аварии в штате Оклахома, США. Штамм был идентифицирован как *Pseudomonas* (ныне *Burkholderia*) *pseudomallei*. Сразу же были выделены два идентичных штамма из почвы с места инцидента [McCormick et al., 1977]. Аналогичный штамм был выделен в штате Джорджия в 1977 году из язвы глаза пострадавшего в аварии мужчины [Nussbaum et al., 1980]. Штамм «Georgia» также был идентифицирован как *B. pseudomallei*. Проведенные дополнительно биохимические тесты, МФА, биопроба и анализ жирных кислот показали, что штамм «Oklahoma» может представлять собой вариант *B. pseudomallei* или потенциально новый вид. Дополнительные исследования в независимых лабораториях также показали противоречивые результаты. Стандартные микробиологические тесты, а также ДНК-ДНК гибридизация и секвенирование гена 16S рРНК показали, что штамм «Oklahoma» относится к виду *B. pseudomallei* [Yabuuchi et al., 1992a]. Позже D. Godoy, используя мультилокусное секвенс-типирование, показал, что исследованные изоляты отличаются от штаммов *B. pseudomallei* и предположил, что штаммы «Oklahoma» могут быть новым видом [Godoy et al., 2003]. Дополнительный комплексный анализ штаммов

«Oklahoma» и «Georgia», проведенный М. В. Glass окончательно подтвердил, что они представляют отдельный вид буркхольдерий, названный *B. oklahomensis* [Glass et al., 2006].

Виды *B. thailandensis* и *B. oklahomensis* обычно считаются авирулентными для млекопитающих [DeShazer, 2007]. Однако описаны отдельные случаи инфекций разной степени тяжести, обусловленные этими бактериями [McCormick et al., 1977; Nussbaum et al., 1980; Lertpatanasuwan et al., 1999; Dharakul et al., 1999; Glass et al., 2006; Zueter et al., 2016; Chang et al., 2017; Gee et al., 2018].

Первый *B. thailandensis*-подобный штамм *Burkholderia* sp. MSMB43 был выделен совместно с *B. pseudomallei* в ходе планового эпидемиологического обследования окрестностей г. Дарвин (высокоэндемичный по мелиоидозу штат Северная Территория Австралии) [Gee et al., 2008]. Отрицательный результат ПЦР, специфичной одному из локусов T3SS-3 *B. pseudomallei* [Novak et al., 2006], а также отсутствие роста при 42°C предполагали, что исследуемый изолят не является *B. pseudomallei*. Стандартные биохимические тесты, включая ассимиляцию арабинозы, идентифицировали штамм MSMB43 как *B. thailandensis*, а проведенное мультилокусное сиквенс-типирование показало отличия и от *B. pseudomallei*, и от *B. thailandensis*. Расширенный молекулярный анализ наглядно показал, что штамм MSMB43 и подобные ему MSMB121 и MSMB122 принадлежат к новому виду *Burkholderia*, для которого предложено название *Burkholderia humptydoensis* по названию местности HumptyDoo, где впервые обнаружили этот штамм [Price et al., 2016; Tuanyok et al., 2016]. *B. humptydoensis*, *B. mayonis* sp. nov. и *B. savan-nae* sp. nov. при подкожном заражении в дозе 1×10^6 КОЕ авирулентны для белых мышей [Tuanyok et al., 2016; Hall et al., 2021].

Понимание вирулентности, геномики и филогении видов Врс важно для определения надежных диагностических мишеней, специфичных для *B. pseudomallei*, и понимания эволюции вирулентности возбудителя мелиоидоза.

1.4 Филогения и геномика видов комплекса

Burkholderia pseudomallei

1.4.1 Филогеография и структура глобальной популяции

Burkholderia pseudomallei

Первое филогенетическое исследование происхождения *B. pseudomallei* было проведено в 2009 году Т. Pearson [Pearson et al., 2009]. Авторы на основании данных филогеномного анализа предложили теорию австралийского происхождения *B. pseudomallei*. На территорию Юго-Восточной Азии микроб был занесен гораздо позднее, во время последнего ледникового периода. Последующие геномные исследования, в которых использовались более представительные и глобально разнообразные наборы штаммов, подтверждают первоначальную гипотезу о том, что *B. pseudomallei* развился от австралийского предка [Price et al., 2016; Chewapreecha et al., 2017].

К настоящему времени установлено, что глобальная популяция *B. pseudomallei* состоит из двух крупных субпопуляций – Юго-Восточной Азии и Австралазийской, разделенных биогеографической границей по Линии Уоллеса (Рисунок 1); *B. pseudomallei* имеет австралийское происхождение с последующей передачей в Юго-Восточную Азию и далее по миру.

Данные филогенетического анализа свидетельствуют, что имело место единственное событие передачи возбудителя из Австралии в Юго-Восточную Азию и несколько независимых событий передачи из Юго-Восточной в Южную и Восточную Азию. Изоляты из Африки и Центральной и Южной Америки образуют единый байесовский кластер с африканским корнем для этой группы, что подразумевает африканское происхождение американских изолятов [Chewapreecha et al., 2017]. Считается, что центральную роль в передаче *B. pseudomallei* между континентами сыграл антропогенный фактор. Весьма вероятно, что глобальное распространение мелиоидоза было опосредовано исключительно человеком [Sarovich et al., 2016].

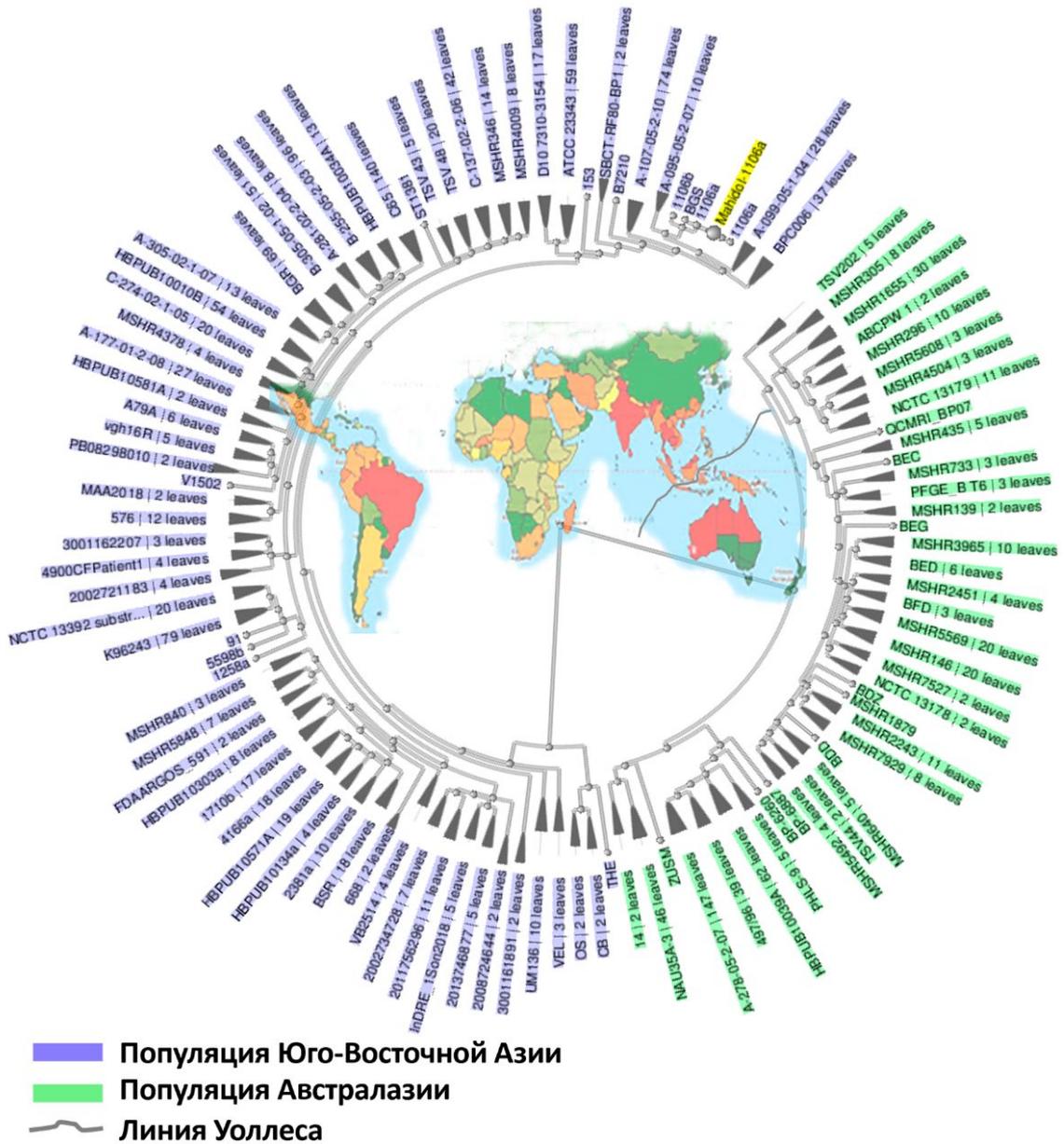


Рисунок 1 – Разделение глобальной популяции *B. pseudomallei*. Филогенетическое дерево, основанное на анализе полногеномных последовательностей, выполнено с использованием данных и инструментария GenBank NCBI

Австралийская популяция как более древняя обладает более высоким аллельным разнообразием, по сравнению с более молодой Юго-Восточной Азии (ЮВА), в которой генетическое разнообразие ограничено эффектами основателя. В субпопуляции ЮВА присутствует меньшее количество аллелей генов схемы

MLST, но количество сиквенс-типов больше за счет высокого распространения одно-, двух- и трех-локусных вариантов ST (SLV, DLV, TLV, соответственно). Между разделившимися популяциями Юго-Восточной Азии и Австралии обнаружено и разделение сиквенс-типов (ST) при отдельных случаях гомоплазии [Pearson et al., 2009; Chewapreecha et al., 2017].

Возбудитель мелиоидоза обладает одним из самых больших и разнообразных бактериальных геномов: в масштабах вида размер варибельной части генома превышает основную более, чем в 2,5 раза. Это обусловлено двумя основными взаимосвязанными механизмами – способностью возбудителя естественным путем поглощать, включать и экспрессировать экзогенную ДНК и высокой частотой рекомбинационных процессов, что позволяет микробу успешно адаптироваться к самым разнообразным экологическим нишам. В результате отбора в разных условиях образуются геномные клады, имеющие специфические рекомбинационные паттерны, причем межкладовые обмены ограничиваются на эпигенетическом уровне – разными профилями метилирования. То есть, разные условия внешней среды предполагают различные наборы рекомбинационных гаплотипов и случайное распределение штаммов по биогеографическим нишам.

1.4.2 Анализ аллельного полиморфизма и структуры вьетнамской популяции *Burkholderia pseudomallei*

Вьетнам расположен на стыке нескольких природных зон и обладает значительным разнообразием природно-климатических условий, что предполагает неравномерное распространение и адаптивную диверсификацию *B. pseudomallei* внутри страны, но этот вопрос до проведения данного исследования оставался неизученным.

1.4.2.1 Алгоритм и методы анализа

Исследованы 31 клинический и 24 почвенных изолята, а также 4 штамма *B. pseudomallei* от животных, выделенных в центральном и северном макрорегионах Вьетнама в 2015–2021 гг., из коллекции Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра (г. Ханой, СРВ) (Таблица 2). Шотган полногеномные сиквенсы (WGS) определяли на платформе Illumina MiSeq (Illumina, США). Мультилокусное сиквенс-типирование (MLST) проводили по схеме D. Godoy [Godoy et al., 2003] с модификациями E. Price [Price et al., 2016]. Аллели исследуемых локусов идентифицировали сравнением с последовательностями, представленными в базе данных *Burkholderia pseudomallei* MLST Data bases (<https://pubmlst.org/bpseudomallei/>). Мультилокусное сиквенс-типирование ядра генома (cgMLST) осуществляли путем анализа 4274 локусов основного видового генома по схеме, предложенной Д.В. Устиновым и И.М. Шпаком [Устинов Д.В. и др., 2020]. Филогенетический анализ проводили на основании данных MLST и cgMLST с выводом деревьев по алгоритмам FastME (алгоритм расстояния – BioNJ, уточнение дерева – обмены ближайших соседей (NNI), бутстреп 100) и goeBurst [Francisco et al., 2009], соответственно.

1.4.2.2 Анализ территориального распределения сиквенс-типов *Burkholderia pseudomallei* по регионам Вьетнама

Мультилокусное сиквенс-типирование показало, что в выборке исследованных штаммов присутствует 28 сиквенс-типов (ST), в числе которых 20 известных сиквенс-типов и обнаружено 8 новых, так называемых «молодых» ST (Таблица 2). Пяти вновь обнаруженным сиквенс-типам в базе данных PubMLST присвоены номера ST1650, ST1915, ST1923, ST1924 и ST1925, еще три находятся в процессе присвоения номеров. Все «молодые» ST представляли собой новые комбинации известных аллелей и являлись SLV и DLV ST, обнаруженных ранее во Вьетнаме

(ST41, ST85, ST157, ST201 и ST541), Камбодже и Китае (ST945, ST849, ST693 и ST68), что соответствует современным представлениям о характере формирования генетического разнообразия *B. pseudomallei* в субпопуляции ЮВА и свидетельствует о ведущей роли гомологичной рекомбинации в процессах адаптивной эволюции возбудителя мелиоидоза.

Таблица 2 – Результаты мультилокусного сиквенс-типирования вьетнамских штаммов *B. pseudomallei*

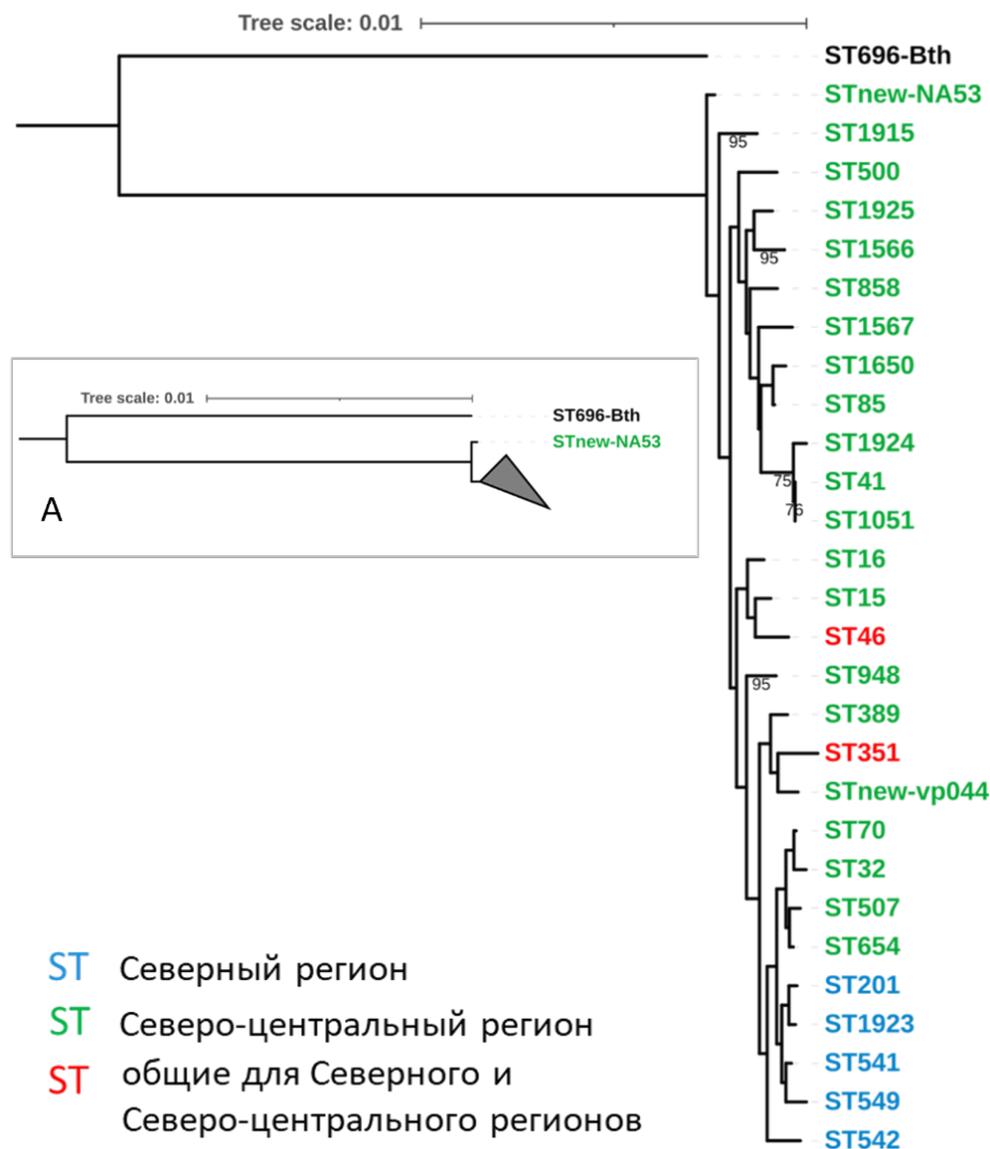
| Номер штамма | ST | MLST | | | | | | | cgST |
|---------------------------|-----------------|------|------|------|------|------|------|-----|------|
| | | ace | gltB | gmhd | lepA | lipA | nark | ndh | |
| <i>Клинические штаммы</i> | | | | | | | | | |
| V1501 | 85 | 4 | 12 | 14 | 1 | 1 | 2 | 1 | н/о |
| V1502 | new 1915 | 4 | 1 | 3 | 3 | 1 | 19 | 3 | 140 |
| V1503 | 389 | 3 | 1 | 11 | 1 | 1 | 4 | 1 | н/о |
| V1504 | new 1650 | 4 | 12 | 14 | 1 | 1 | 19 | 1 | 141 |
| V1505 | 1566 | 1 | 26 | 3 | 1 | 5 | 22 | 1 | н/о |
| V1606 | 41 | 1 | 12 | 6 | 1 | 5 | 2 | 1 | 145 |
| V1607 | 948 | 1 | 1 | 2 | 2 | 5 | 29 | 1 | 146 |
| V1608 | 1566 | 1 | 26 | 3 | 1 | 5 | 22 | 1 | 147 |
| V1609 | 41 | 1 | 12 | 6 | 1 | 5 | 2 | 1 | 148 |
| V1610 | new 1923 | 1 | 12 | 6 | 1 | 5 | 1 | 1 | 149 |
| V1611 | new 1924 | 3 | 12 | 6 | 1 | 5 | 2 | 1 | н/о |
| V1512 | 70 | 3 | 4 | 11 | 3 | 5 | 4 | 6 | 142 |
| V1513 | 1051 | 1 | 12 | 6 | 1 | 1 | 2 | 1 | 143 |
| V1514 | 41 | 1 | 12 | 6 | 1 | 5 | 2 | 1 | 144 |
| V1615 | 1567 | 4 | 4 | 6 | 1 | 1 | 1 | 1 | н/о |
| V1616 | 1567 | 4 | 4 | 6 | 1 | 1 | 1 | 1 | н/о |
| V1617 | new 1925 | 4 | 26 | 3 | 2 | 1 | 22 | 1 | н/о |
| V1618 | 858 | 1 | 12 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | н/о |
| V1701 | 46 | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 | 3 | 3 | н/о |
| 16YB01 | 46 | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 | 3 | 3 | 158 |
| 17VP01 | 351 | 3 | 4 | 4 | 1 | 5 | 4 | 1 | 7 |
| 17VP02 | 541 | 3 | 4 | 2 | 3 | 5 | 4 | 1 | 150 |
| 17VP03 | 549 | 3 | 12 | 2 | 3 | 5 | 4 | 1 | 151 |
| 17VP07 | 541 | 3 | 4 | 2 | 3 | 5 | 4 | 1 | 154 |
| 20VP2k | 549 | 3 | 12 | 2 | 3 | 5 | 4 | 1 | 157 |
| PT03 | 541 | 3 | 4 | 2 | 3 | 5 | 4 | 1 | 139 |
| 15NA19 | 46 | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 | 3 | 3 | 135 |
| 17NA02 | new | 1 | 2 | 13 | 3 | 1 | 2 | 1 | 136 |
| 17NA07 | 500 | 1 | 4 | 13 | 1 | 1 | 4 | 3 | 137 |
| 17NA16 | 70 | 3 | 4 | 11 | 3 | 5 | 4 | 6 | 6 |
| 17NA19 | 507 | 3 | 1 | 11 | 3 | 5 | 4 | 6 | 138 |

Таблица 2 (Продолжение)

| Номер штамма | ST | MLST | | | | | | | cgST |
|---------------------------|------------|------|------|------|------|------|------|-----|------|
| | | ace | glfB | gmhd | lepA | lipA | nark | ndh | |
| <i>Почвенные штаммы</i> | | | | | | | | | |
| 4811 | 46 | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 | 3 | 3 | 4 |
| 4811R | 46 | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 | 3 | 3 | н/о |
| 4802 | 46 | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 | 3 | 3 | 2 |
| 4802R | 46 | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 | 3 | 3 | н/о |
| 4702 | 46 | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 | 3 | 3 | 125 |
| 4822 | 46 | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 | 3 | 3 | 126 |
| 1112 | 16 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 10 | 1 | 117 |
| 1182 | 654 | 3 | 2 | 11 | 3 | 5 | 4 | 6 | 118 |
| 128 | 351 | 3 | 4 | 4 | 1 | 5 | 4 | 1 | 119 |
| 7400 | 201 | 3 | 4 | 11 | 3 | 5 | 4 | 3 | 127 |
| 7403 | 201 | 3 | 4 | 11 | 3 | 5 | 4 | 3 | 128 |
| 7801 | 542 | 3 | 1 | 11 | 3 | 6 | 22 | 3 | 129 |
| 7803 | 541 | 3 | 4 | 2 | 3 | 5 | 4 | 1 | 130 |
| 8400 | 201 | 3 | 4 | 11 | 3 | 5 | 4 | 3 | 131 |
| 9500 | 541 | 3 | 4 | 2 | 3 | 5 | 4 | 1 | 132 |
| 9501 | 541 | 3 | 4 | 2 | 3 | 5 | 4 | 1 | 133 |
| 9601 | new | 3 | 4 | 2 | 3 | 5 | 4 | 3 | 134 |
| 1610 | 541 | 3 | 4 | 2 | 3 | 5 | 4 | 1 | н/о |
| 2001 | 541 | 3 | 4 | 2 | 3 | 5 | 4 | 1 | н/о |
| 2125 | 70 | 3 | 4 | 11 | 3 | 5 | 4 | 6 | 122 |
| 2800 | 70 | 3 | 4 | 11 | 3 | 5 | 4 | 6 | н/о |
| 2119 | 1566 | 1 | 26 | 3 | 1 | 5 | 22 | 1 | н/о |
| 284 | 15 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 3 | 1 | 123 |
| 28B | 70 | 3 | 4 | 11 | 3 | 5 | 4 | 6 | 124 |
| <i>Штаммы от животных</i> | | | | | | | | | |
| vp044 | new | 3 | 4 | 11 | 1 | 1 | 4 | 6 | 152 |
| vp069 | new | 3 | 4 | 11 | 1 | 1 | 4 | 6 | 153 |
| vp161 | 541 | 3 | 4 | 2 | 3 | 5 | 4 | 1 | 155 |
| vp200 | 541 | 3 | 4 | 2 | 3 | 5 | 4 | 1 | 156 |
| н/о – не определяли | | | | | | | | | |

Мультилокусное сиквенс-типирование ядра генома 45 штаммов, для которых были определены шотган полногеномные последовательности, выявило 45 cgST, то есть каждый из исследованных штаммов оказался уникальным.

Филогенетический анализ исследованной выборки на основании данных MLST и cgMLST в обоих случаях показал распределение штаммов по двум кластерам, соответствующим северному и северо-центральному регионам происхождения изолятов (Рисунки 2 и 3).



A – коллапс узлов с бутстреп-поддержкой ниже 70

Рисунок 2 – Распределение штаммов возбудителя мелиоидоза по регионам Вьетнама, филогенетический анализ конкатенированных последовательностей 7 генов схемы MLST, вывод дерева по алгоритму FastME

При этом следует отметить, что кластеризация по генам схемы MLST не имела значимой бутстреп-поддержки, что свидетельствует о филогенетической близости штаммов из обоих регионов.

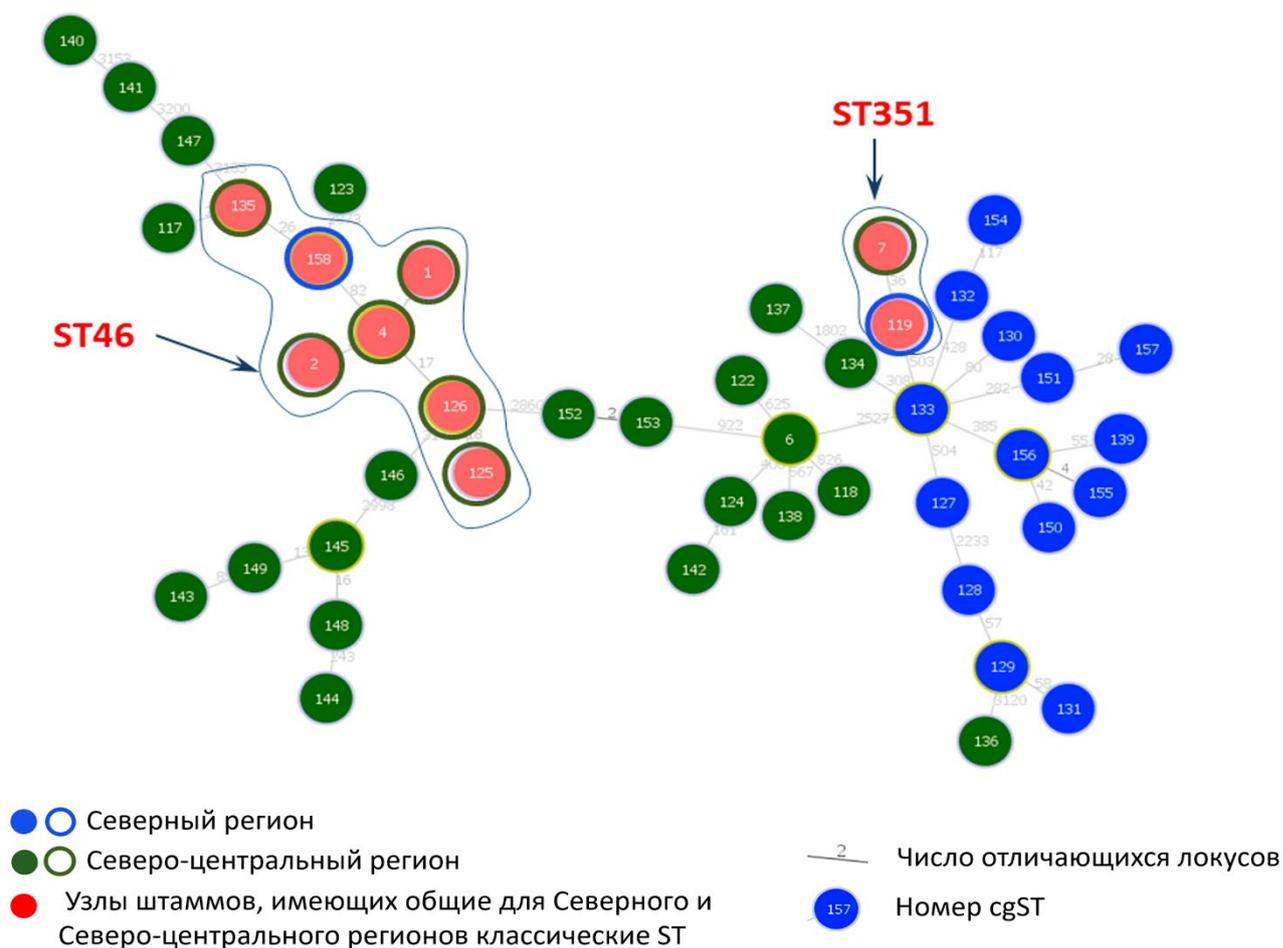
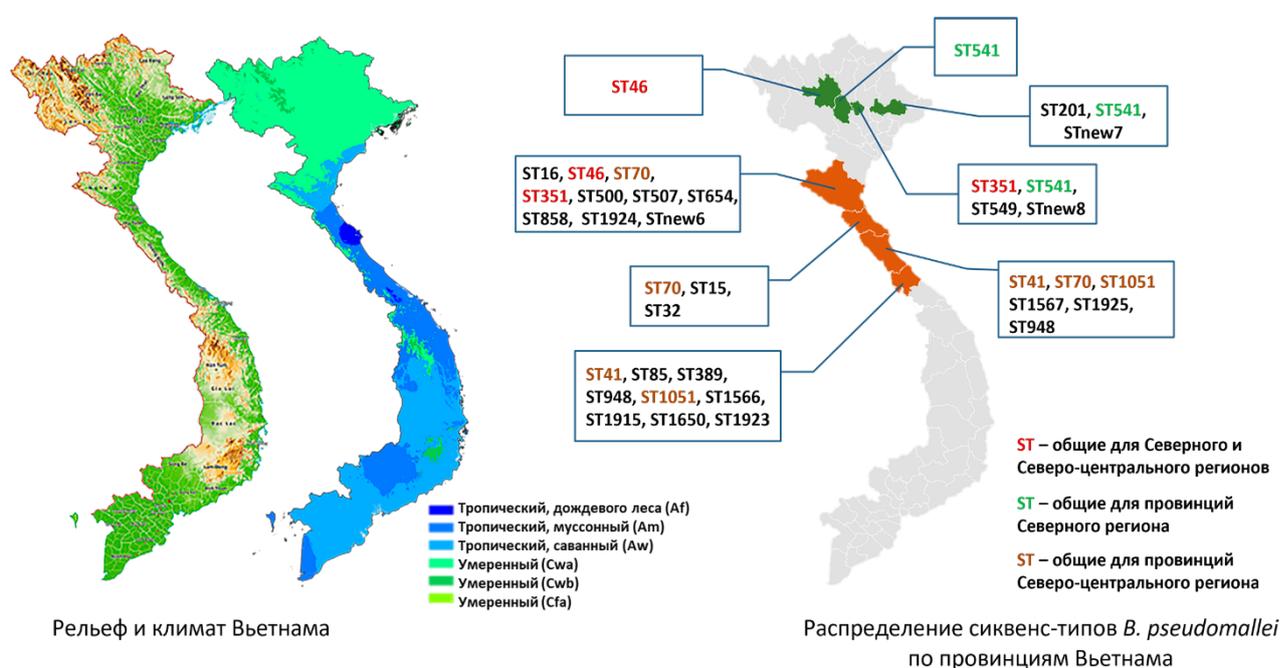


Рисунок 3 – Распределение штаммов возбудителя мелиоидоза по регионам Вьетнама, филогенетический анализ конкатенированных последовательностей 4274 локусов по схеме cgMLST, вывод дерева по алгоритму goeBurst

Интересно, что оба общих для двух регионов классических ST группировались в северо-центральной кластере, тогда как клада cgST двух штаммов ST351 переместилась на границу между кластерами, при сохранении топографического положения на кладограмме cgST клады штаммов ST46. Тем не менее дендрограммы, полученные с использованием двух наборов данных и разных алгоритмов вывода деревьев, имеют сходную общую топологию, что свидетельствует о

неслучайном расселении *B. pseudomallei* и наличии в северном и северо-центральном регионах Вьетнама отдельных субпопуляций возбудителя.

Композиции сиквенс-типов по провинциям внутри обоих макрорегионов также были индивидуальными, при наличии отдельных общих для разных провинций ST: в северо-центральном регионе это ST41, ST70, ST1051; и ST541 – на севере Вьетнама (Рисунок 4). В центральном Вьетнаме на 1 сиквенс тип в среднем приходится 2 штамма *B. pseudomallei*, тогда как в северной части страны это соотношение составляет 1 ST на 2,6 штамма, что свидетельствует о более высоком уровне генетического разнообразия возбудителя в северо-центральном регионе.



Физическая и климатическая карты, представленные на рисунке использованы в соответствии с политикой конфиденциальности правообладателей, источники: <http://www.maphill.com/vietnam/maps/physical-map/single-color-outside/> и Beck et al. Present and future Köppen-Geiger climate classification maps at 1-km resolution. Sci Data 5: 180214 doi:10.1038/sdata.2018.214 (2018).

Рисунок 4 – Экологические условия и композиции сиквенс-типов *B. pseudomallei* в провинциях северного и северо-центрального регионов Вьетнама

Обнаруженное разделение вьетнамской популяции *B. pseudomallei* на отдельные субпопуляции, вероятно, обусловлено адаптацией возбудителя

к экологическому окружению, значительно отличающемуся в разных регионах страны (Рисунок 4).

Полученные данные могут быть использованы в целях молекулярно-эпидемиологического расследования случаев мелиоидоза.

1.4.2.3 Молекулярно-эпидемиологическое расследование случаев мелиоидоза животных

Проведено молекулярно-эпидемиологическое расследование случаев мелиоидоза животных во Вьетнамском Центре спасения медведей (VBRC), расположенном в заповеднике Tam Đảo (провинция Vĩnh Phúc), в котором в течение двух месяцев с признаками бактериального сепсиса погибли 4 черных азиатских медведя. Погибшие медведи V069 Blue (самец) и V044 Leila (самка) обитали в одном вольере, V161 Hercules (самец) и V200 Precious (самка) – в другом. Все четыре животных были зрелого возраста (от 17 до 19 лет), то есть присутствовал один из предрасполагающих развитие мелиоидоза факторов. Бактериальная культура от первого погибшего животного в лаборатории центрального госпиталя провинции была идентифицирована автоматическим анализатором Vitek 2 как *B. cerasia*, штаммы от остальных – как *B. pseudomallei*. Патоморфологическая картина у всех погибших животных была сходной – множественные абсцессы печени, селезенки, гнойный перикардит, легочное кровотечение, что характерно для мелиоидоза. Необходимо отметить, что в течение двух лет после описанных случаев мелиоидоза у других животных в VBRC, включая содержавшихся в этих же вольерах, признаков инфекции не наблюдалось.

Проведенная нами верификация видовой принадлежности выделенных штаммов методом ПЦР показала, что все 4 штамма являются *B. pseudomallei*. Данные MLST показали, что медведи V069 Blue и V044 Leila были инфицированы штаммами *B. pseudomallei* с идентичным сиквенс-типом, содержащим ранее описанные аллели MLST, но принадлежали к новому ST (Таблица 2), нигде ранее не

обнаруженному и представляющему собой SLV ST693 (однонуклеотидная замена в *gltB*) и DLV ST70 (однонуклеотидные замены в *lerA* и *lipA*). ST693 был представлен в базе данных PubMLST единственным штаммом, который был изолирован в 2007 году от пациента в Камбодже. Экологические штаммы, принадлежащие к ST70, широко распространены во Вьетнаме, Лаосе, Таиланде и Китае. Изоляты от Precious (V200) и Hercules (V161) также имели общий сиквенс-тип – ST541, который часто встречается среди штаммов, выделенных в северном горном регионе Вьетнама. Провинция Vĩnh Phúc, где расположен VBRC, также относится к этому региону. Филогенетический анализ конкатенированных последовательностей 7 генов домашнего хозяйства изолятов от медведей по алгоритму MLST, штаммов из коллекции Вьетнамско-Российского тропического центра (Ханой, Вьетнам) и базы данных PubMLST (ST693) показал, что ST штаммов VP069 (Blue) и VP 044 (Leila) группировались в один кластер с ST693. Штаммы VP200 (Precious) и VP161 (Hercules), кластеризовались с 10 клиническими и почвенными штаммами *B. pseudomallei*, выделенными в этой же или соседних провинциях (ST541, ST549, ST201) (Рисунок 2).

Данные MLST убедительно свидетельствовали о том, что инфекции у медведей из разных вольеров не связаны. Ближайшим филогенетическим соседом штаммов от медведей V069 Blue и V044 Leila является штамм ST693 из Камбоджи. Весьма вероятно, что Лейла была инфицирована в южной провинции Vinh Duong откуда она прибыла в VBRC с латентным мелиоидозом. В случае с Precious (V200) и Hercules (V161) по данным MLST оставалось место инфицирования животных и клональность штаммов оставались неясными. Оба медведя привезены из северных провинций, где широко распространены штаммы *B. pseudomallei*, относящиеся к ST541.

Данные молекулярного типирования штаммов с использованием схемы cgMLST показали, что штаммы VP069 (cgST153) и VP044 (cgST152) отличаются всего по двум аллелям, а штаммы VP161 (cgST155) и VP200 (cgST156) – по четырем, что доказывает идентичность штаммов внутри каждого вольера. Соседство на кладограмме штамма VP161 со штаммом cgST150, выделенным от больного в

провинции Vĩnh Phúc, с различием по 42 аллелям и маргинальное положение cgST156 свидетельствует о том, что первым был инфицирован Hercules (V161) (Рисунок 3).

Таким образом, 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 характер клональности случаев мелиоидоза и регион происхождения штаммов возбудителя.

1.4.3 Филогения комплекса *Burkholderia pseudomallei*

Филогенетический анализ на основании мультилокусного сиквенс-типирования полногеномных последовательностей *B. pseudomallei* и близкородственных видов, предпринятый международной группой исследователей [Price et al., 2016], показал, что комплекс «*B. pseudomallei*» состоит, по меньшей мере, из восьми видов, сгруппированных в 7 клад (Рисунок 5).

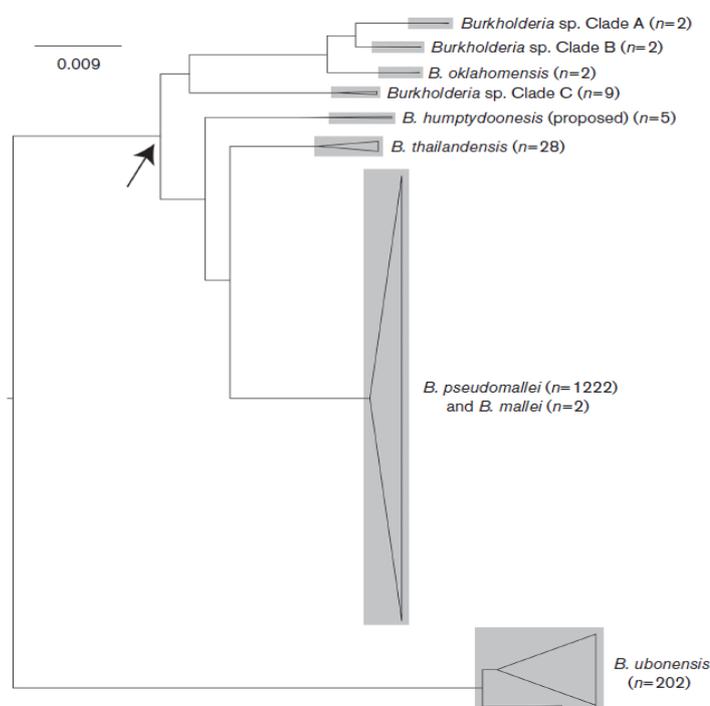


Рисунок 5 – Филогенетические взаимоотношения видов Врс, группирование методом neighbour-joining по данным MLST [Price et al., 2016]

Четыре клады представлены 5 известными видами – *B. pseudomallei*/*B. mallei*, *B. thailandensis* и *B. oklahomensis* и *B. humptydoensis*. Остальные три клады (А, В и С), филогенетически близкие *B. oklahomensis*, видовых названий пока не имеют и группируются в пределах Врс [Price et al., 2016]. Эти три клады представлены исключительно штаммами из внешней среды, выделенными в северной Австралии [Price et al., 2016].

1.4.4 Структурная геномика видов комплекса *Burkholderia pseudomallei*

Геномика буркхольдерий, как область научных знаний об особенностях структуры геномов данных микроорганизмов и закономерностях их функционирования, начала формироваться с 2000-х годов на базе первых результатов определения полных нуклеотидных последовательностей геномов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* [Miller and Mahenthiralingam, 2003; Nierman et al., 2004; Holden et al., 2004].

Исследование структуры генома *B. pseudomallei* в рамках проекта Siriraj *Burkholderia pseudomallei* Genome Project показало, что геном штамма *B. pseudomallei* K96243 общим размером 6,5 м. п. н. состоит из двух кольцевых репликонов размером 3,6 и 2,9 м. п. н., каждый из которых несет гены рибосомальных РНК [Songsivilai and Dharakul, 2000].

Позднее, в итоге выполнения проекта по секвенированию и аннотации генома *B. pseudomallei* (координатор Wellcome Trust Sanger Institute, Великобритания), было установлено, что геном *B. pseudomallei* K96243 имеет суммарный размер 7,24 м. п. н. и состоит из двух кольцевых репликонов размером 4,07 м. п. н. и 3,17 м. п. н. (European Molecular Biology Laboratory ac № BX571965 и BX571966), обозначенных как хромосома 1 и хромосома 2 и несущих 3460 и 2395 кодирующих последовательностей (CDS), соответственно [Holden et al., 2004].

Распределение кодирующих последовательностей с различной функциональной значимостью на обеих хромосомах *B. pseudomallei* носит выраженный дифференциальный характер. Хромосома 1 содержит большее число генов, ответ-

ственных за основные стороны жизнеобеспечения клетки (биосинтез белков и нуклеотидов, метаболизм аминокислот, синтез кофакторов и транспортных молекул, хемотаксис, подвижность). Тогда как хромосома 2 содержит большую долю генов с различными вспомогательными функциями (адаптация к атипичным условиям существования, осмопротекция, транспорт и утилизация железа, вторичный метаболизм, регуляция) и большее число последовательностей, полученных, предположительно, в результате горизонтального переноса. По сравнению с хромосомой 1, заметная доля CDS данного репликона соответствует либо гипотетическим протеинам, либо протеинам, не имеющим значимого сходства с известными на сегодняшний день [Holden et al., 2004].

Проект по секвенированию генома *B. mallei* штамм ATCC 23344 осуществлялся в The Institute for Genomic Research (Rockville, США) – TIGR, и в 2004 г. результаты работ были представлены в печати [Nierman et al., 2004]. Показано, что геном *B. mallei* состоит из двух кольцевых хромосомных репликонов 3,5 м. п. н. и 2,3 м. п. н., на которых идентифицировано 5535 кодирующих последовательностей: 3344 – на большой хромосоме и 2091 – на малой.

Годом позже, в 2005 году, в TIGR был реализован сиквенс и аннотация генома *B. thailandensis* – третьего представителя Врс [Kim et al., 2005]. Геномная организация *B. thailandensis* оказалась идентичной таковой у *B. pseudomallei* и *B. mallei*. Две кольцевые хромосомы 1 и 2, содержащие 3,8 м. п. н. и 2,9 м. п. н., соответственно, размером немного больше, чем у *B. mallei*, но меньше, чем у *B. pseudomallei*. В общей сложности аннотировано 5645 кодирующих последовательностей: 3282 на хромосоме 1 и 2363 на хромосоме 2 [Kim et al., 2005].

Область начала репликации хромосомы 1 у всех трех видов представлена характерными для хромосом прокариот генами *dnaA* и *dnaN*. У хромосомы 2 система репликации является плазмидоподобной и содержит гомологи генов *parA* и *parB*, однако присутствие коровых генов, схожее с основной хромосомой GC содержание и координированная репликация свидетельствуют о принадлежности данного репликона к хромосомам [Holden et al., 2004; Nierman et al., 2004; Kim et al., 2005].

1.4.5 Сравнительная геномика видов комплекса *Burkholderia pseudomallei*

Общий размер геномов представителей *Brc* намного превышает среднестатистический прокариотический геном. Так, геном *B. pseudomallei* является одним из самых больших секвенированных геномов прокариот на сегодняшний день, и сопоставим с размерами генома эукариотического организма *Saccharomyces cerevisiae*.

Идентифицировано 2590 ортологичных генов, консервативных для видов *Brc* и *B. ceracia* [Lin et al., 2007]. Причем, оказалось, что они распределены между двумя хромосомами неравномерно: количество метагенов, локализованных на хромосоме 1 значительно превышает таковое на хромосоме 2. Более того, уровень среднего сходства ортологов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* и *B. ceracia* для хромосомы 1 оказался выше, чем для меньшей хромосомы (Таблица 3).

Таблица 3 – Уровень консервативности ортологичных генов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* и *B. ceracia* на хромосомах 1 и 2 [Lin et al., 2007]

| | Bc/Bp (%) | Bt/Bp (%) | Bm/Bp (%) |
|-------|------------------|------------------|------------------|
| Chr 1 | 83.57 | 95.28 | 99.56 |
| Chr 2 | 78.18 | 93.95 | 99.46 |

Для нуклеотидных последовательностей, связанных с жизнеобеспечением клетки, характерен высокий уровень консервативности, а потенциальные гены вирулентности гораздо менее консервативны или даже отсутствуют у *B. thailandensis*. Это согласуется с данными М. Т. Holden о функциональном разделении хромосом *B. pseudomallei* [Holden et al., 2004]. Установлено, что на большей хромосоме преимущественно находятся гены жизнеобеспечения, а на меньшей – гены, расширяющие адаптационный потенциал и обеспечивающие выживание в стрессовых условиях внешней среды. Возможно, что хромосомы 1 и 2 были приобретены предком видов *Brc* в разное время. Предполагается, что хромосома 1 представляет истинную предковую хромосому и на ней локализована большая часть консервативных метагенов, тогда как хромосома 2, возможно, была приоб-

ретенена позднее, что также может вносить вклад в различия в распределении метаболов между хромосомами [Lin et al., 2007].

B. pseudomallei, *B. mallei* и *B. thailandensis* также имеют высокое сходство аминокислотных последовательностей предсказанных ортологов: совпадение протеома *B. pseudomallei* с протеомами *B. mallei* и *B. thailandensis* составило 96,3% и 72,1%, соответственно, по меньшей мере, на уровне 80% идентичности и более чем на 80% длины выравнивания. Ортологичные белки *B. pseudomallei* и *B. mallei* имели высокие средние значения идентичности (98,8%) и совпадения длин (99,7%), а между *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* различия оказались несколько выше: средняя идентичность – 94,0% и среднее совпадение длин – 99,5% [Kim et al., 2005].

Среди всех трех микроорганизмов отмечаются хромосомные перестройки, делеции или инсерции больших сегментов ДНК относительно друг друга. Такие модификации генома более распространены между *B. pseudomallei* и *B. mallei*, чем между *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* [Kim et al., 2005]. Количество IS-элементов у *B. thailandensis* и *B. pseudomallei* ниже, чем у *B. mallei* (102 и 48 и 171, соответственно), и большинство синтенных фрагментов *B. thailandensis* и *B. pseudomallei* не фланкированы IS элементами, как в случае с *B. mallei*, что указывает на значительно меньшую роль IS элементов в геномных модификациях *B. thailandensis* и *B. pseudomallei* [Nierman et al., 2004, Kim et al., 2005].

Сравнительный анализ геномов *B. mallei* и *B. pseudomallei* показал, что у *B. mallei* имеется значительная пролиферация, по сравнению с *B. pseudomallei*, трех типов элементов: ISBma1, ISBma2 и IS407A. Установлено, что IS407A и ISBma2 ассоциированы почти со всеми крупными делециями и геномными перестройками в штаммах *B. mallei*. Третий из элементов – ISBma1 – с геномными реаранжировками и делециями напрямую не связан, однако, как минимум 35% его копий служат вторичными точками инсерций для IS407A [Song et al., 2010].

Используя технологию ДНК-микрочипов в сочетании со сравнительной геномикой С. Ong с соавторами, обнаружили, что *B. mallei* и *B. thailandensis* имеют сопоставимое количество удаленных по сравнению с *B. pseudomallei* генов (344 и

304, соответственно), однако физическое распределение делеций в геномах этих бактерий качественно отлично. У возбудителя сапа утрачены или имеют структурные дефекты свыше 1400 генов, организованные у возбудителя мелиоидоза в протяженные кластеры размером до 150 т. п. н., и, предположительно, ответственные за адаптацию и выживание во внешней среде [Ong et al., 2004; Nierman et al., 2004]. Тогда как у *B. thailandensis* делеции меньшего размера и равномерно распределены по всему геному [Ong et al., 2004].

Для геномов *B. mallei*, *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* характерно высокая распространенность SSR повторов (Simple Sequence Repeat). В пределах 3752 генов (68 % кодирующей емкости генома) и в промоторных областях 179 генов сапного микроба локализовано более 12000 SSRs. 86,8 % идентифицированных SSRs содержат три и более повторяющиеся единицы и потенциально могут опосредовать мутации типа сдвига рамки считывания. Всего в геноме *B. mallei* идентифицированы 76 генов, содержащие сдвиг рамки считывания, в сравнении с ортологичными последовательностями *B. pseudomallei*, и в 37 из них данный сдвиг обусловлен различным числом SSRs [Nierman et al., 2004].

Вероятно, что горизонтальный перенос ДНК является важной, если не важнейшей, чертой эволюции генома *B. pseudomallei*. Значительные участки обеих хромосом микроорганизма – геномные острова (GI) [Holden et al., 2004], заметным образом отличаются от остальных последовательностей генома по GC-составу, частотам встречаемости динуклеотидов и ряду других характеристик. Обнаруженные GI содержат также последовательности, сходные с генами различных мобильных элементов – IS-последовательностей, бактериофагов, плазмид. На хромосоме 1 идентифицировано 12 GI (7,6 % репликона), 4 GI обнаружено на хромосоме 2 (4,2 % репликона) [Holden et al., 2004].

Из всех идентифицированных геномных островов *B. pseudomallei* в геноме *B. mallei* были обнаружены только фрагменты GI 7. Предполагается, что сходный остров присутствовал у предкового для *B. mallei* штамма. Отсутствие GI в составе генома возбудителя сапа предполагает, что приобретение генов не играет столь

значительной роли в генетической изменчивости этого вида, как у *B. pseudomallei* [Holden et al., 2004].

В геноме *B. thailandensis* было обнаружено не менее пятнадцати регионов, имеющих либо нетипичное содержание GC, либо последовательности бактериофаг-ассоциированных генов и фагоподобных интеграз, охватывающих в совокупности 5% от всего генома, и названных Bt-геномными островами (Bt-GI) [Yu et al., 2006]. Последовательности, гомологичные Bt-GI в геномах *B. pseudomallei* и *B. mallei* обнаружены не были, что говорит об их приобретении *B. thailandensis* уже после дивергенции с *B. pseudomallei*. Интересно, что три из 15 геномных островов – Bt-GI 8, Bt-GI 9 и Bt-GI 10 – имеют такую же хромосомную локализацию, как GIs *B. pseudomallei*. Наличие различных горизонтально передаваемых последовательностей у родственных видов в идентичных областях генома показывает, что эти места являются геномными горячими точками интеграции [Yu et al., 2006].

Геномные сравнения между патогенными микроорганизмами и близкородственными непатогенными видами сыграли важную роль в выявлении механизмов, ответственных за приобретение вирулентности. Примечательно, что геномы *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* высоко синтены, всего с четырьмя крупными инверсиями, и более 85% генов являются консервативными. Основной пул видоспецифичных генов этих двух видов обеспечивают геномные острова [Holden et al., 2004].

Для эволюционирования в качестве успешного патогена, вирулентные бактерии нуждаются в использовании как наступательных (например, адгезия, инвазия, токсины, секреторные системы), так и оборонительных стратегий (например, антифагоцитоз, антипротеолиз, фазовые и антигенные вариации). Возбудитель мелиоидоза и считающаяся непатогенной *B. thailandensis* разделяют значительную часть детерминант (приблизительно 71%) и наступательных, и оборонительных факторов вирулентности [Yu et al., 2006].

1.4.6 Анализ дивергенции между видами *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia thailandensis* по признаку основных факторов вирулентности

1.4.6.1 Алгоритм и инструменты анализа

Для сравнения были выбраны генетические детерминанты основных факторов вирулентности, роль которых в патогенезе мелиоидоза доказана. В качестве референтных использовали последовательности типового штамма *B. pseudomallei* K96243. Поиск ортологов осуществляли с использованием баз данных Nucleotide collection (nr/nt) и Non-redundant protein sequences (nr), в поисковое окно «Organism» вводили «*Burkholderia thailandensis*». Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили при помощи инструмента Nucleotide BLAST GenBank NCBI с оптимизацией «схожие последовательности» (blastn), аминокислотных – Protein BLAST по алгоритму «blastp» (protein-protein BLAST). Показателями наличия ортологичного гена считали идентичность не менее 80% при выравнивании не менее 80% длины последовательностей. Вирулентность штаммов *B. thailandensis* оценивали на модели экспериментальной инфекции сирийских золотистых хомяков и беспородных белых мышей, зараженных подкожно 24-часовыми культурами 7 штаммов *B. thailandensis* (Таблица 5) из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Для инокуляции использовали по 0,1 мл разведений культур на изотоническом растворе (10^8 – 10^4 КОЕ/мл), 5 животных на разведение, контрольной группе вводили изотонический раствор. Наблюдение проводили в течение 7 суток. Величины LD50 определяли по методу Kärber в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева. Скрининг вариантных штаммов *B. thailandensis* проводили с использованием специально разработанного набора праймеров для экспресс-оценки методом ПЦР наличия в геноме штаммов *B. thailandensis* Vp-like CPS кластера генов биосинтеза капсульного полисахарида (Патент на изобретение RU 2728356 С1).

1.4.6.2 Результаты анализа

Из 16 проанализированных генов факторов вирулентности возбудителя мелиоидоза, локализованных на хромосоме 1, у *B. thailandensis* отсутствуют гены *bpaC* и *boaB*, детерминирующие автотранспортеры T5SS, участвующие в адгезии у *B. pseudomallei*. Подавляющее большинство детерминант с установленной функцией участия во внутриклеточном выживании (девять из одиннадцати) находятся на первой хромосоме, причем продукты семи из этих генов идентичны между двумя видами в интервале 95 – 99,2% (Таблица 4), что значительно выше среднего значения (72,1%) совпадения протеома *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* и несколько выше средней идентичности (94,0%) ортологов.

Таблица 4 – Факторы вирулентности *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*

| Ген Вр Локус | Среднее сходство белка | Ортолог Vt Локус | Антиген | Функция | Ссылка* |
|-------------------------|------------------------|------------------|---------------------------------|---|---|
| <i>Адгезия</i> | | | | | |
| <i>pilA</i> BPSL0782 | 82,1% | VTH_I0649 | Субъединица PilA пилина типа IV | · Температурно-зависимая адгезия и формирование микроколоний · Внутриклеточная подвижность | [Allwood et al., 2011] |
| <i>boaA</i> BPSS0796 | – | нет | Адгезин | · T5SS автотранспортер · Роль в прикреплении к клеткам и, возможно, внутриклеточной репликации | [Balder et al., 2010] |
| <i>boaB</i> BPSL1705 | – | нет | | | [Lazar Adler et al., 2015] |
| <i>bpaC</i> BPSL1631 | – | нет | Адгезин | · T5SS автотранспортер · Защита от комплемента · Участвует в прикреплении к клеткам | [Lazar Adler et al., 2015] |
| <i>fliC</i> BPSL3319 | 91,2% | VTH_I3196 | Структурный белок жгутика | · Не зависящая от температуры подвижность · Участие в адгезии | [Chua et al., 2003] |
| <i>Инвазия</i> | | | | | |
| <i>bopE</i> BPSS1525 | 95,5% | VTH_II0848 | Фактор обмена гуанина | · T3SS-3 эффектор · Реорганизация актина | [Vander Broek and Stevens, 2017; Srisanga et al., 2019] |
| <i>bipB</i> BPSS1532 | 90,65% | VTH_II0841 | Транслокатор | · T3SS-3 компонент · Избегание эндоцитоза · Участие в инвазии | |

Таблица 4 (Продолжение)

| Ген Вр Локус | Среднее сходство белка | Ортолог Вт Локус | Антиген | Функция | Ссылка* |
|--|------------------------|--|--|--|----------------------------------|
| <i>bipC</i> BPSS1531 | 86,2% | VTH_П084 2 | Эффектор | | |
| <i>bipD</i> BPSS1529 | 89,7% | VTH_П084 3 | Транслокатор | | |
| Избегание эндоцитоза | | | | | |
| <i>bopA</i> BPSS1524 | 90,4% | VTH_П084 9 | Эффекторный белок T3SS-3 | · Участие в разрушении мембраны лизосом и предотвращение аутофагии | [Vander Broek and Stevens, 2017] |
| <i>bsaQ</i> BPSS1543 | 97,7% | VTH_П083 0 | T3SS-3 структурный компонент | · Избегание эндоцитоза, инвазия, бляшкообразование | |
| <i>bsaZ</i> BPSS1534 | 80,8% | VTH_П083 9 | T3SS-3 структурный компонент | · Избегание эндоцитоза · внутриклеточная репликация | |
| <i>bsaU</i> BPSS1539 | 87,5% | VTH_П083 4 | T3SS-3 структурный компонент | · Избегание эндоцитоза, активация апоптоза (путь каспазы 1) макрофагов | [Bast et al., 2014] |
| <i>CHBP</i> ¹ BPSS1385 | – | нет | Эффекторный белок T3SS, кодируется вне локуса T3SS | · Задерживает созревание клеток-хозяев, останавливает цикл в G2-M и препятствует апоптозу | [Yao et al., 2009] |
| Секреция | | | | | |
| Кластер генов T3SS-1 BPSS1390 - BPSS1410 | – | нет | 19 различных антигенов | · Мутанты показывают снижение внутриклеточной выживаемости | [D’Cruze et al., 2011] |
| Кластер генов T3SS-2 BPSS1610 - BPSS1629 | 74,3% | Кластер генов VTH_П074 2- VTH_П075 9 | 19 различных антигенов | Неизвестна | [Vander Broek and Stevens, 2017] |
| Кластер генов T3SS-3 BPSS1516 - BPSS1554 | 82,6% | Кластер генов VTH_П082 1- VTH_П083 0 | 39 различных антигенов | · Участие в инвазии · Избегание эндоцитоза · Внутриклеточное размножение · Требуется для полной вирулентности для хомяков и мышей | [Vander Broek and Stevens, 2017] |

Таблица 4 (Продолжение)

| Ген Вр Локус | Среднее сходство белка | Ортолог Вт Локус | Антиген | Функция | Ссылка* |
|---|------------------------|-----------------------|---|---|---------------------------------|
| Внутриклеточное выживание | | | | | |
| <i>purM</i> BPSL2818 | 98,5% | <i>purM</i> ВТН_I1317 | Фосфорибозилформилглицинамидинциклолигаза | · Путь биосинтеза пуринов · Внутриклеточная репликация | [Allwood et al., 2011] |
| <i>purN</i> BPSL0908 | 96,82% | ВТН_I0772 | Фосфорибозилформилглицинамидинформилтрансфераза | | |
| <i>sodC</i> BPSL1001 | 97,21% | ВТН_I0859 | Супероксиддисмутаза | · Устойчивость к окислительному стрессу | [Vanaporn et al., 2011] |
| <i>katG</i> BPSL2865 | 94,99% | ВТН_I1282 | Каталаза-пероксидаза | | |
| <i>rpoE</i> BPSL2436 | 100% | ВТН_I1723 | σ-фактор РНК полимеразы RpoE | · Формирование биопленки, · Ответ на тепловой, окислительный и осмотический стресс · Мутанты демонстрируют снижение внутриклеточной выживаемости в макрофагах | [Korbsrisate et al., 2005] |
| <i>virAG</i> <i>BPSS1494- BPSS1495</i> | 94.2% | ВТН_II1497 | 2-компонентная регуляторная система. Активирует гемолизин-корегулируемый белок – ключевой эффектор T6SS | · Регулирует транскрипцию T6SS · Сенсор содержания железа и гистидинкиназы · Усиление процесса секреции T6SS при кислом pH | [Willcocks S. J. et al., 2016] |
| <i>rpoS</i> BPSL1505 | 96,14% | ВТН_I2226 | σ-фактор РНК полимеразы RpoS | · Подавляет активность iNOS путем активизации цитокинов SOCS3 и CIS · Может играть роль в регуляции генов, участвующих в слиянии макрофагов | [Utai-incharoen et al., 2006] |
| BPSL0791 | 98,1% | ВТН_I0658 | Липополисахариды | · Устойчивость к лизосомальным дефензинам · Снижение минимальной пирогенной летальной токсичности и активации макрофагов | [Anuntagool et al., 1998; 2006] |
| BPSL0919 | 99,2% | ВТН_I0783 | | | |
| Актин-зависимая подвижность | | | | | |
| <i>bimA</i> BPSS1492 | – | нет | T5SS автотранспортер | · Избегание фагосом и формирование актинового хвоста | [Sarovich et al., 2014] |
| <i>bimC</i> BPSS1491 | 89.64% | ВТН_II0876 | Автотранспортер (О-гептозилтрансфераза) | · BimC необходим для внутриклеточного выживания <i>B. pseudomallei</i> и образования MNGC ² | [Srinon V. et al., 2019] |

Таблица 4 (Продолжение)

| Ген Вр Локус | Среднее сходство белка | Ортолог Вт Локус | Антиген | Функция | Ссылка* |
|---|------------------------|-------------------------------|---|--|---|
| Формирование гигантских многоядерных клеток | | | | | |
| <i>vgrG5</i> BPSS1503 | 90,08% | BTH_П0863 | Rhs элемент белка Vgr (valine-glycine repeat protein G) | · T6SS Эффектор · Образование MNGC | [Toesca et al., 2014; Schwarz et al., 2014] |
| Разное | | | | | |
| <i>wcb operon</i> BPSL2787 – BPSL2810 | 96,23% | WI24_03650 – WI24_03745 | Биосинтез капсульных полисахаридов | · Защита от С3b-комплемента и нормальной сыворотки человека · Защита от экологических опасностей · Производство биопленки, способствующее хронической и латентной инфекции | [Yu et al., 2006. Mongkolroby et al., 2015] |
| BPSL0791 | 98,1% | BTH_I0658 | Биосинтез липополисахаридов | · Устойчивость к нормальной сыворотке человека и катионным пептидам · Снижение минимальной пирогенной летальной токсичности (показатель воспалительной реакции) и активации макрофагов · Длина, количество и положение жирных ацильных цепей могут влиять на биоактивность LPS и варьируют у штаммов с разной вирулентностью | [Anuntagool et al., 1998] |
| BPSL0919 | 99,2% | BTH_I0783 | | | |
| <i>BLF1</i> BPSL1549 | 85,31% | CO709_28610 | <i>Burkholderia</i> летальный фактор 1 | · Глутаминдеамидаза, подобная цитотоксическому некротизирующему фактору <i>Escherichia coli</i> · Необратимо препятствует инициации транслокации, инактивируя EIF4A · Изменение клеточного цитоскелета и гибель клеток в концентрации $2,5 \times 10^{-7}$ М | [Cruz-Migoni et al., 2011] |
| <p>Вр – <i>B. pseudomallei</i> Вт – <i>B. thailandensis</i> * – приведены ссылки на работы, описывающие функциональную роль белков <i>B. pseudomallei</i> в патогенезе мелиоидоза ¹CHBP – <i>cif</i> homolog of <i>Burkholderia pseudomallei</i> – гомолог гена <i>cify</i> <i>Burkholderia</i> ²MNGC – multinucleated giant cells – многоядерные гигантские клетки</p> | | | | | |

B. thailandensis содержит высокоомологичный с *B. pseudomallei* ген σ -фактора РНК полимеразы RpoE (идентичность нуклеотидной последовательности 97,7 - 98,8%, длина выравнивания – 99-100%) при 100% гомологии белкового продукта (Таблица 4). Штаммы *B. pseudomallei*, мутантные по *rpoE*, обладают повышенной чувствительностью к тепловому, оксидативному и осмотическому

стрессам, а также сниженной способностью к формированию биопленки и выживанию в макрофагах [Korbsrisate et al., 2005].

Наиболее высокая идентичность белковых продуктов среди ортологичных генов первой хромосомы (98,1% и 99,2%) обнаружена у детерминант, ответственных за биосинтез липополисахаридов (локусы BPSL0791 и BPSL0919) (Таблица 4), представляющих один из основных факторов вирулентности и являющихся медиаторами сепсиса.

Одним из общепризнанных факторов, необходимых для способности возбудителя мелиоидоза инфицировать млекопитающих, является кластер генов биосинтеза капсульного полисахарида (*wcb* оперон) [DeShazer et al., 2001; Kim et al., 2005; Mongkolrob et al., 2015], который, как считалось, сильно отличается у *B. thailandensis*, что справедливо для типового штамма вида *B. thailandensis* E264T. Однако в 2010 году были опубликованы данные об обнаружении вариантного штамма *B. thailandensis* E555, у которого присутствовал кластер генов биосинтеза капсульного полисахарида (Bp-like CPS) с высоким уровнем сходства с ортологичным кластером *B. pseudomallei* (идентичность нуклеотидной и аминокислотной последовательностей – 94,4% и 96%, соответственно). На модели инфекции у мышей BALB/c штамм *B. thailandensis* E555 индуцировал образование антител, обеспечивавших частичную защиту от мелиоидоза, но был авирулентен при интраназальном заражении в дозе до 10^6 м.к. [Sim et al., 2010]. Подобные штаммы были обнаружены во внешней среде ряда стран Юго-Восточной Азии, в том числе и нами во Вьетнаме (*B. thailandensis* 2.1, GenBank ac. No. PHRD00000000.1) и обозначены BTCV (*Burkholderia thailandensis* capsular variant). Кроме того, *wcb* оперон, аналогичный E555, был обнаружен у трех штаммов, выделенных от больных с тяжелыми формами инфекции в США [Glass et al., 2006; Gee et al., 2018]. Средняя идентичность нуклеотидной и аминокислотной последовательностей *wcb* оперона возбудителя мелиоидоза BTCV штаммов – 94,33% и 96,23%, соответственно, при 99% длины выравнивания (Таблица 4).

Необходимо отметить, что BTCV штаммы не являются редкостью. Так, проведенный скрининг 89 штаммов *B. thailandensis*, выделенных из почвы южно-

го и центрального Вьетнама, показал, что 11 из исследованных штаммов (12%) содержат полный кластер генов *Vp-like CPS*. Данные ПЦР были подтверждены секвенированием полного генома четырех штаммов (GenBank NCBI ac. PHRD00000000.1 WOXA00000000.1, WOWZ00000000.1).

Также на первой хромосоме локализован ген *BLF1*, детерминирующий *Burkholderia* летальный фактор 1, который блокирует инициацию транскрипции у клетки-хозяина, инактивируя эукариотический фактор инициации EIF4A. В базах данных NCBI мы обнаружили всего три штамма *B. thailandensis*: FDAARGOS426 (почвенный изолят, Аризона), MSMB121 и MSMB43 (изоляты из почвы и воды, Австралия), в геноме которых присутствуют гомологичные *BLF1* гены с идентичностью нуклеотидной и аминокислотной последовательностей – 85,2% и 85,3%, соответственно, при 100% длины выравнивания (Таблица 4).

Подавляющее большинство детерминант установленных факторов вирулентности у *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* локализованы на второй хромосоме.

У *B. thailandensis* отсутствует большая часть кластера генов T3SS-1 [Rainbow et al., 2002]. Кроме того, отсутствуют гены эффекторных белков T3SS и T6SS – *CHBP* и *Hcp1*, соответственно, а также ортологи генов BPSS0796, являющегося фактором адгезии, и *bimA* (*Burkholderia intracellular motility A*), опосредующего актин-зависимую подвижность [Yu et al., 2006]. Тем не менее, *B. thailandensis* имеет ген *bimA* и обладает способностью к актин-зависимой внутриклеточной подвижности, но, в отличие от *B. pseudomallei*, полимеризация мономеров актина у *B. thailandensis* является зависимой от клеточного комплекса Arp2 / 3 [Stevens et al., 2005]. Интересно, что гомологи *VimA* *B. pseudomallei* и *B. mallei* заметно отличаются по аминокислотной последовательности как между собой, так и от *VimA* *B. thailandensis*.

Средний показатель сходства белковых продуктов генов факторов вирулентности, присутствующих у обоих видов на второй хромосоме, составил 89,25 %, что, как и в случае проанализированных детерминант, расположенных на первой хромосоме, выше среднего показателя сходства протеомов между этими видами. Более того, два вида полностью разделяют известные детерминанты, от-

ветственные за инвазию, с высоким уровнем идентичности белковых продуктов (86,2–95,5%) и четыре из пяти, обеспечивающих избегание эндоцитоза, с гомологией продуктов 80,8–97,7% (Таблица 4).

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 (Таблица 5).

Таблица 5 – Оценка вирулентности штаммов *B. thailandensis*

| Штамм | LD ₅₀ (КОЕ) | |
|-----------------------------|------------------------|----------------------|
| | Белые мыши | Золотистые хомяки |
| <i>B. thailandensis</i> 251 | >10 ⁷ | 1,4x10 ⁶ |
| <i>B. thailandensis</i> 264 | 1,3x10 ⁶ | 3,5x10 ⁵ |
| <i>B. thailandensis</i> 265 | >10 ⁷ | 1,2x10 ⁶ |
| <i>B. thailandensis</i> 295 | >10 ⁷ | 2,4x10 ⁵ |
| <i>B. thailandensis</i> 299 | 2,7x10 ⁶ | 5,3x10 ⁵ |
| <i>B. thailandensis</i> 382 | >10 ⁷ | 6,2x10 ⁵ |
| <i>B. thailandensis</i> 2.1 | 4,8 x10 ⁶ | 7,3 x10 ⁴ |

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 того, в видовом пангеноме *B. thailandensis* детерминанты факторов вирулентности представлены значительно разнообразнее, чем считалось ранее. И, наконец, регулярные сообщения об инфекциях различной степени тяжести, включая сепсис и летальный исход [Chang et al., 2017], по нашему мнению, свидетельствуют, что сапрофитический по своей природе *B. thailandensis* нельзя продолжать считать авирулентным видом.

1.4.7 Функциональная геномика адаптации *Burkholderia pseudomallei* к стрессовым факторам внешней среды

B. pseudomallei обладает способностью выживать в неблагоприятных условиях, в частности, при ограничении питательных веществ [Pumpuang et al., 2011], недостатке кислорода, под воздействием высоких концентраций солей и окислителей [Hamad et al., 2011], а также ряда других стрессов. Большая часть популяции возбудителя оставалась жизнеспособной до недели в анаэробных условиях, а персистирующая субпопуляция *B. pseudomallei* (приблизительно 0,1% от исходного количества клеток) – как минимум, в течение года. При этом на первом этапе гипоксии вся популяция возбудителя продемонстрировала устойчивость к обычно эффективным при мелиоидозе антибактериальным препаратам и чувствительность к производным нитроимидазола, которые обычно используются для лечения анаэробных бактериальных и амёбных инфекций, а персистирующая часть – толерантность ко всем протестированным антибиотикам [Hamad et al., 2011]. Также было установлено, что адаптация к условиям повышенной солености обеспечивает перекрестную защиту от оксидативного и теплового стрессов, а также повышенную способность *B. pseudomallei* к образованию биопленки и бляшкообразованию [Pumirat et al., 2017].

Появляется все больше данных об участии путей адаптации к стрессовым условиям внешней среды в выживании *B. pseudomallei* в организме хозяина. В связи с чем нами был проведен анализ литературных источников с целью обобщения информации о генетических детерминантах, задействованных в адаптации *B. pseudomallei* к стрессовым факторам химической природы, схожих при инфекции и существовании во внешней среде.

1.4.7.1 Алгоритм поиска и результаты анализа литературных данных

Поиск проводили в базе данных медицинских и биологических публикаций PubMed Национального центра биотехнологической информации (NCBI)

США в несколько этапов: широкий поиск по ключевым словам «*Burkholderia pseudomallei*» и «stress», результате чего обнаружено 85 работ. Затем среди полученных результатов проверяли наличие ключевых слов «oxidative», «salt», «iron» и «anaerobic» – 33 работы. Из обнаруженных работ было выделено 15, посвященных анализу транскриптома штаммов *B. pseudomallei*, выращенных в условиях воздействия осмотического и оксидативного стрессов, при повышенном и пониженном содержании железа, а также при недостатке кислорода.

Обобщенные результаты проведенного поиска генетических детерминант, дифференциально экспрессирующихся в условиях стрессовых воздействий представлены в Таблице 6.

Таблица 6 – Гены стрессового ответа на воздействие химических факторов

| Вид стресса | Ген/локус | Функция/ продукт | Ссылка |
|--------------|---|--|----------------------------------|
| Осмотический | ацил-КоА-дегидрогеназы | Регулирование липидного состава бактериальной мембраны, изменение типов жирных кислот и структуры фосфолипидов | [Pumirat et al., 2010] |
| | <i>(cyaB)</i> | Аденилатциклаза, осмосенсор | [Pumirat et al., 2010] |
| | короткоцепочечной дегидрогеназы / оксидоредуктазы (SDO) | NADPH-зависимое восстановление многих соединений, таких как сахара, альдегиды и кетоны | [Pumirat et al., 2014] |
| | <i>bipD</i> | Транслокатор, T3SS-3 компонент | [Vander Broek and Stevens, 2017] |
| | <i>borE</i> | Фактор обмена гуанина, T3SS-3 эффектор | |
| | <i>rpoE</i> | σ-фактор РНК полимеразы RpoE, контроль экспрессии T3SS в условиях высокой солености | [Korbsrisate et al., 2005] |
| | <i>groEL</i> <i>htpG</i> | Белки теплового шока | [Pumirat et al., 2009] |
| Оксидативный | <i>rpoS</i> | σ-фактор РНК полимеразы RpoS, транскрипция генов каталаз KatG и KatE <i>B. pseudomallei</i> под воздействием H ₂ O ₂ | [Jangiama et al., 2008] |
| | <i>dpsA</i> | ДНК-связывающий белок DpsA, активатор транскрипции гена каталазы-пероксидазы <i>katG</i> и ряда белков оксидативного стресса | [Loprasert et al., 2003] |
| | <i>rpoE</i> | σ-фактор РНК полимеразы RpoE, транскрипция генов <i>SpeG</i> | [Jitprasutwit et al., 2014] |
| | <i>speG</i> | Ацетилтрансфераза <i>SpeG</i> , поддержание уровня спермидина | [Jitprasutwit et al., 2014] |
| | <i>sodB</i> | Супероксиддисмутаза, устойчивость к перекиси водорода | [Intarak et al., 2014] |
| | <i>bpsRI</i> | BpsR / C8-HSL-зависимая регуляция DpsA. | [Lumjiaktase et al., 2006] |

Таблица 6 (Продолжение)

| Вид стресса | Ген/локус | Функция/ продукт | Ссылка |
|---|---|---|--|
| Концентрация железа | <i>fur</i> | Регуляторный белок Fur (регулятор поглощения железа), подавляет транскрипцию регулируемых железом промоторов в ответ на повышенную внутриклеточную концентрацию железа. | [Loprasert et al., 2000] |
| | T6SS-1 | Железо и цинк отрицательно регулируют экспрессию этой системы секреции | [Burtnick and Brett, 2013] |
| | <i>BPSS0240-BPSS0244</i> | Система гемопоглощения <i>Bhu</i> / <i>Hmu</i> , активируется в условиях низкого содержания железа. | [Tuanyok et al., 2005] |
| | <i>BPSS0495</i> | Нитроредуктаза (метаболизм азотных соединений), экспрессия повышается в условиях ограниченного содержания железа. | [Tuanyok et al., 2005] |
| Низкий уровень содержания кислорода | <i>atpA</i> и <i>atpD</i> | АТФ-синтазы | [Hamad et al., 2011; Price et al., 2018] |
| | оперон <i>arcABCD</i> | Импорт и ферментация аргинина, в ответ на гипоксию экспрессия повышается | |
| | <i>aceE</i> и <i>adhA</i> | анаэробный метаболизм пирувата – индуцируются в ответ на гипоксию | |
| | <i>BPSS1945</i> - <i>BPSS1953</i> | Оперон АТФ-синтазы – индуцируются в ответ на гипоксию | |
| | 22 гена, ответственных за транспорт электронов | Индуктируется экспрессия оперона <i>cydAB</i> (<i>BPSL0501</i> и <i>BPSL0502</i>), кодирующего цитохром <i>bd</i> хинолоксидазу (цитохромоксидаза с повышенным сродством к кислороду), а также экспрессия некоторых генов биогенеза цитохрома C | |
| | <i>BPSS2288</i> | Белок теплового шока семейства альфа-кристаллических протеинов HSP20 /Acr | |
| | <i>BPSS0032</i> , <i>BPSS0836</i> , <i>BPSS0838</i> , <i>BPSS1140</i> , <i>BPSS1934</i> | Универсальные стрессовые белки (<i>Usp</i>) индуцируются в ответ на несколько стрессовых состояний | |
| | <i>BPSL2863</i> | Ферритин-подобный ДНК-связывающий белок, высокоиндуцирован гипоксией | |
| | <i>clpAB</i> | Протеаза ClpAB - протеаза, используемая для разрушения белков, экспрессируемых в аэробных условиях | |
| <i>flgA</i> , <i>flgC</i> , <i>flgK</i> , <i>flgM</i> , <i>fliF</i> , <i>fliJ</i> , <i>fliK</i> , <i>pilT</i> | Гены, кодирующие опосредованную жгутиками подвижность | | |

Возбудитель мелиоидоза одинаково успешен как в качестве свободноживущего сапрофита, так и при паразитическом образе существования, сталкиваясь при этом с различного рода стрессовыми воздействиями, часто общими для разных сред обитания. Например, в фагосоме происходит закисление среды, синтез токсических радикалов кислорода и азота, антимикробных пептидов, дефицит

железа; абсцессы, являющиеся обычным патологическим явлением при мелиоидозе, могут быть полностью лишены кислорода. В то же время почвы могут иметь низкий pH, низкое содержание доступного железа, глубоко во влажной почве практически отсутствует кислород, то есть ряд тех же факторов, с которыми возбудитель сталкивается в процессе инфекции.

Проведенный анализ литературных источников показал, что адаптация *B. pseudomallei* к выживанию в различных экологических нишах представляет собой сложный многофакторный процесс, включающий модуляцию экспрессии генов метаболизма, транспортных систем и факторов вирулентности. *B. pseudomallei* обладает несколькими механизмами, с помощью которых он распознает источники стресса в окружающей среде или в хозяине и адаптируется к воздействию путем изменения экспрессии определенного набора генов, в зависимости от типа стресса. Причем, при адаптации к определенному типу воздействия может возрастать устойчивость и к другим видам стресса. Интересно, что в стрессовом ответе при сапрофитном существовании задействован целый ряд генов, для продуктов которых доказана функция факторов вирулентности, например T3SS, σ -фактор РНК полимеразы RpoE, флагеллярные гены.

1.5 Эволюционная геномика видов комплекса *Burkholderia pseudomallei*

В отношении происхождения и эволюционных отношений между видами *Brc* наиболее распространенным является мнение, что они разошлись от общего предка: сначала *B. thailandensis* и *B. pseudomallei*-*B. mallei*, с последующей дивергенцией между *B. pseudomallei* и *B. mallei* [Godoy et al., 2003; Kim et al., 2005; Pearson et al., 2009].

Единого мнения о временных рамках дивергенции *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* от общего предка нет. На основании анализа сходства последовательностей гена 16S рРНК, а также *groEL* – другого высококонсервативного гена домашнего хозяйства, Y. Yu с соавторами предполагают, что два вида разошлись около 47 миллионов лет назад [Yu et al., 2006]. По данным анализа ортологичных

SNP, проведенного Т. Pearson с соавторами, дивергенция между *B. thailandensis* и *B. pseudomallei* происходила в интервале от 307 тысяч до 4,27 миллионов лет назад [Pearson et al., 2009].

Проведенные исследования по ДНК-ДНК гибридизации [Ramisse et al., 2003], мультилокусному сиквенс-типированию [Godoy et al., 2003; Price et al., 2016] и типированию ITS (16S-23S internal transcribed spacer) [Liguori et al., 2011] продемонстрировавшие высокую степень близости геномов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, подтверждают предположения о том, что возбудитель сапа, по сути, является клоном *B. pseudomallei* и имеет сравнительно небольшой исторический возраст. *B. mallei*, как полагают, произошла от предка *B. pseudomallei* вследствие редуктивной эволюции, включающей потерю несущественных в принимающей среде бактериальных генов, в первую очередь кодирующих аналоги продуктов, производимых хозяином, которые могут быть использованы бактерией [Wixon, 2001]. Описан интересный факт, дающий более полное представление о дивергенции *B. mallei* от ее предкового штамма *B. pseudomallei*. Сравнительный полно-геномный анализ штаммов *B. pseudomallei* MSHR6686 и *B. pseudomallei* MSHR6686 P314, выделенных с промежутком 139 месяцев от пациента, хронически колонизированного *B. pseudomallei*, показал утрату 285 т. п. н. в четырех разных локусах исходного штамма. В результате почти 12-летней адаптации к человеческому организму делеции составили около 4% размера генома, что привело к потере 221 гена, локализованных исключительно на хромосоме 2 и кодирующих в основном вторичные метаболические пути, важные для бактерии во внешней среде. Причем, выявлена существенная параллель между MSHR6686 P314 и *B. mallei*: ~ 141 т. п. н. (49,5%) утраченных MSHR6686 P314 локусов также отсутствуют и у *B. mallei* [Price et al., 2013].

Размер генома *B. mallei* на 20% меньше, чем у *B. pseudomallei*, но сохраняет высокую тождественность нуклеотидной последовательности (99%) [Nierman et al., 2004; Song et al., 2010] и все гены *B. mallei* имеют своих ортологов у *B. pseudomallei* [Losada L. et al., 2010; Majerczyk et al., 2014]. Экспансия IS элементов привела к эволюционной редукции генома *B. mallei* в результате крупных делеций

[Losada et al., 2010]. Предположительно, многие гены, ответственные за выживание во внешней среде, были утрачены [Nierman et al., 2004]. У *B. mallei* обнаружено большое количество генов, нарушенных в результате сдвига рамки считывания, обусловленной SSR. По-видимому, после крупных редукций генома дальнейшая дивергенция между *B. pseudomallei* и *B. mallei* осуществлялась за счет изменения у ортологов числа SSR [Kim et al., 2005]. Этот процесс происходил, очевидно, под воздействием селективного давления в организме хозяина и благодаря значительной пластичности генома *B. mallei*. В настоящее время геном возбудителя сапа сохраняет структурную гибкость в отношении делеций, но стал менее гибкий в отношении геномных реаранжировок, что, в конечном счете, приведет к снижению размера генома в результате нуклеотидной эрозии. Это может означать, что геномная эволюция *B. mallei* движется к стадии, в которой крупномасштабные геномные изменения сводятся к минимуму, а наиболее важными становятся изменения на уровне нуклеотидов [Song et al., 2010].

Таким образом, в становлении видов комплекса – *B. mallei*, *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* – задействовано несколько различных эволюционных механизмов.

Основными эволюционными драйверами в случае *B. pseudomallei* являются горизонтальный перенос и аккумуляция генов, генные мутации и делеции, а другие возможные механизмы эволюции патогена, в том числе хромосомный реаранжемент и бактериофаг-опосредованная рекомбинация, возможно, играют менее важную роль в его эволюции [Yu et al., 2006]. По-видимому, гены, полученные *B. pseudomallei* в результате горизонтального переноса и аккумулярованные, в основном, на второй хромосоме, значительно расширили его адаптационный потенциал и позволили успешно вести как сапрофитическое, так и паразитическое существование. Существует гипотеза, что *B. pseudomallei* является так называемым «случайным патогеном» и его адаптационный потенциал для выживания в естественной среде (почве и населяющих ее одноклеточных, например, амебах) также обеспечивает возможность успешно колонизировать млекопитающих [Casadevall and Pirofski 2007; Nandi et al., 2010]. Генетическое сходство клинических изолятов возбудителя мелиоидоза, штаммов от животных и из окружающей

среды повышает вероятность справедливости тезиса, что штаммам из внешней среды не требуются дополнительные генетические изменения, чтобы успешно вызвать инфекцию человека [Nandi et al., 2015; Chewapreecha et al., 2019].

Эволюция *B. mallei* шла по пути IS-опосредованной редукции и нуклеотидной эрозии генома, как адаптации к внутриклеточному паразитированию [DeShazer et al., 2001; Yu et al. 2006; Losada et al., 2010].

В процессе адаптации к различным нишам обитания представители комплекса *Burkholderia pseudomallei*, несмотря на различные эволюционные механизмы, сохранили высокую консервативность генов, ответственных за коровые функции клеток. Тогда как гены, обеспечивающие выживание *in vivo*, достаточно консервативные между возбудителями сапа и мелиоидоза, более дивергентны у *B. thailandensis*.

Результаты сравнительной геномики видов рода *Burkholderia* имеют важное значение как для фундаментальных исследований, связанных с изучением эволюционных связей, так и в прикладной области, являясь основой для поиска новых диагностических мишеней, целей терапевтического воздействия, а также вакцинопрофилактики.

ГЛАВА 2. АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ЭПИДЕМИОЛОГИИ МЕЛИОИДОЗА НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

Среди достаточно представительного перечня клинически значимых микроорганизмов рода *Burkholderia* два вида – *B. pseudomallei* и *B. mallei* – занимают особое место, являясь возбудителями тяжелых инфекционных заболеваний с высокой летальностью: мелиоидоза и сапа, соответственно. *B. mallei* является облигатным патогеном. *B. pseudomallei* по своей природе сапрофит и ее естественная среда обитания – почва и стоячие воды влажных тропических и субтропических регионов [Wiersinga et al., 2012]. Помимо этого, недавно показано, что *B. pseudomallei*, как и многие другие буркхольдерии, успешно колонизирует ризосферу и надземные части растений [Kaestli et al., 2012].

Для мелиоидоза характерен первичный или вторичный сепсис и множественные абсцессы внутренних органов. Инфекция может проявляться как в локальных формах, включая пневмонию при аэрогенном заражении, так и в виде генерализованной инфекции. В отсутствии или неправильном лечении активная локализованная инфекция может перейти в системную или сепсис. Например, кожная форма может привести к развитию легочного мелиоидоза, наиболее распространенного проявления заболевания. Артриты, остеомиелиты, скелетно-мышечный и неврологический мелиоидоз являются другими локализованными проявлениями заболевания. Пневмония возникает в 51% случаев, бактериемия – у 50% и сепсис – у 20% заболевших [Currie et al., 2010]. Мелиоидоз может протекать как в виде острой, так и хронической инфекции. Хронический мелиоидоз определяется как симптоматическая инфекция, которая длится более 2 месяцев и может иметь локальные и / или системные проявления. Большинство случаев хронического мелиоидоза были представлены в течение влажного сезона, причем среди пациентов с хронической формой заболевания процент больных с диабетом был значительно ниже, чем среди пациентов с острыми формами [Currie et al., 2010; Vidyalakshmi et al., 2012].

Появляется все больше данных, подтверждающих участие в патогенезе инфекции путей адаптации возбудителя к стрессовым факторам внешней среды. В организме хозяина дополнительно присутствует иммунный пресс, и возбудитель использует механизмы включающие, в том числе, функциональную модуляцию генов факторов вирулентности [Willcocks et al., 2016; Moule et al., 2016]. Кроме того, *B. pseudomallei* обладает способностью использовать доступные питательные вещества хозяина для своей собственной пролиферации [Duangurai et al., 2018]. Такой широкий арсенал адаптационных возможностей обеспечивает способность патогена размножаться макрофагах и клетках лимфоретикулярной системы или находиться в латентном состоянии в течение многих лет [Wiersinga, 2018].

Летальность при мелиоидозе зависит от многих факторов (инфицирующей дозы и свойств штамма, общего состояния организма, своевременной диагностики и лечения) и варьирует от 90% при отсутствии или неадекватной терапии, в случаях септического шока до 80% даже при соответствующем лечении, до практически нулевой при вовремя диагностированных кожных формах. Средние показатели летальности варьируют от 10% при доступности надлежащей интенсивной терапии до 50% в регионах с недостаточно развитой системой здравоохранения [Currie et al., 2010; Currie, 2015; Wiersinga et al., 2012]. Схема лечения включает 10–14-дневные курсы внутривенного введения цефтазидима или карбапенемов, с последующей эрадикацией возбудителя назначением антибактериальных пероральных препаратов, таких как триметоприм/сульфаметоксазол, доксициклин или амоксициллин/клавуланат [Wiersinga et al., 2012; Chetchotisakd et al., 2014; Currie, 2015]. Рецидив инфекции спустя месяцы или даже годы после успешного курса лечения наблюдается у 5–28% пациентов [Cheng and Currie, 2005; Hayden et al., 2012].

2.1 Пути передачи и факторы предрасположенности к мелиоидозу

Исторически считалось, что мелиоидоз передается алиментарным и водным путями при употреблении в пищу загрязненных продуктов и воды. Причем, по мнению А. Whitmore (1913), источником инфекции являются больные люди, выделяя возбудитель в большом количестве с мочой и, возможно, с мокротой. Спустя 20 лет А.Т. Stanton и W. Fletcher (1932) сделали аналогичный вывод, но они предполагали зоонозный резервуар инфекции [Dance, 2000]. Первые данные о вероятном сапрофитном существовании *B. pseudomallei* были получены М. Vaucel в Ханое. В 1937 году он показал развитие мелиоидоза у морских свинок после кожного заражения водой из пруда в Тонкине (ныне Северный Вьетнам). В 1956 году L. Chambon выделил возбудитель из воды рисовых полей в Южном Вьетнаме, а годом позже Н. LeClerc и Р. Sureau в застойных водах вблизи Ханоя обнаружили бактериофаги, лизировавшие палочку Уитмора [Dance, 2000].

В настоящее время принято считать, что основными механизмами передачи мелиоидоза являются контактный, аэрогенный и фекально-оральный [Currie, 2015], в том числе с питьевой водой [Inglis et al., 1999; Limmathurotsakul et al., 2014]. Необходимо отметить, что применительно к мелиоидозу понятие «механизм передачи» в достаточной степени условное, поскольку *B. pseudomallei* является сапрофитом и объекты внешней среды нельзя рассматривать в качестве факторов передачи, так как в них происходит естественное обитание и накопление возбудителя. Наиболее часто инфицирование связано с проникновением возбудителя через поврежденные кожные покровы. Однако, во время таких природных явлений, как тропические муссонные бури, тайфуны, ураганы или цунами, возможно, преобладающим механизмом становится аэрогенный [Cheng et al., 2005; Ko et al., 2007; Lo et al., 2009; Allworth, 2005].

Описаны передача заболевания с грудным молоком от матерей с мелиоидозным маститом [Thatrimontrichai and Maneenil, 2012], половой путь передачи [Webling, 1980], заражение людей при контакте с больными животными [Choy et

al., 2000], а также нозокомиальные случаи передачи инфекции [Douglas et al., 2004].

Среди предрасполагающих к развитию мелиоидоза факторов самыми распространенными являются сахарный диабет (присутствовал у 23–60% заболевших), хронический алкоголизм (в 12–39% случаев), хронические заболевания легких, почек (до 27% случаев), талассемия (7%), терапия глюкокортикоидами (<5%), онкологические заболевания (<5%) [Wiersinga et al., 2012].

2.2 Глобальное распространение мелиоидоза

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в понимании биологии и патогенеза *B. pseudomallei*, истинный масштаб глобального распространения возбудителя остаётся неполным, поскольку мелиоидоз: а) в большинстве стран считается экзотической инфекцией, информированность о которой у клиницистов практически отсутствует, что, соответственно, отражается на качестве диагностики; б) не является заболеванием, подлежащем обязательному официальному уведомлению.

Мелиоидоз является прекрасным примером распространения заболевания в двух аспектах: расширение ареала – возбудитель впервые обнаружен в окружающей среде целого ряда стран, в которых он ранее не выявлялся, с одной стороны, и, с другой, – все чаще стали поступать сообщения о завозных случаях мелиоидоза в страны умеренного климатического пояса. Очевидно, что наблюдаемый в последние годы прогрессивный рост показателей заболеваемости мелиоидозом в разных странах мира связан не только с расширением области распространения этой инфекции в мире, но и с растущей информированностью о заболевании клиницистов и специалистов лабораторной службы.

На протяжении многих лет считалось, что эндемичный по мелиоидозу регион ограничен странами Юго-Восточной Азии и Северной Австралии. В настоящее время наблюдается явная тенденция к значительному расширению эндемичного по мелиоидозу ареала [Currie, 2015].

Исследования последних лет показали, что границы распространения *B. pseudomallei* значительно шире и охватывают территории между 30-ми параллелями северной и южной широт. Заболевание встречается в тропических и субтропических зонах Южной и Юго-Восточной Азии, Западной и Центральной Африки, Южной и Центральной Америки, а также в Северо-Восточной Австралии, т. е., во влажных тропических и субтропических зонах всех континентов.

Описаны случаи автохтонного мелиоидоза в Восточной Африке [Katangwe et al., 2013], островах Индийского Океана Маврикий и Мадагаскар [Issack et al., 2005; Garin et al., 2014], странах Карибского бассейна, Центральной и Южной Америки [Rolim et al., 2005; Doker et al., 2015; Montúfar et al., 2015]. В результате этих исследований были зарегистрированы новые эндемические очаги в нескольких регионах Африки и Пуэрто-Рико [Schweizer et al., 2014].

Эндемичными по мелиоидозу в настоящее время признаны 47 стран (Таблица 7), помимо этого, для еще 34 стран, в которых мелиоидоз никогда ранее не регистрировался, весьма высока вероятность наличия возбудителя в экосистемах (Рисунок 6) [Limmathurotsakul et al., 2016].

Согласно опубликованным в 2016 г. результатам аналитических исследований международной группы экспертов, включающей специалистов Департамента ВОЗ по пандемическим и эпидемическим болезням, а также ряда университетов и исследовательских центров, Япония и США, где к настоящему времени *B. pseudomallei* в естественной среде не выявлялся, имеют районы, климатические условия которых благоприятны для сапрофитического существования возбудителя мелиоидоза. К ним относятся территории, охватывающие южные районы Флориды, Луизианы и Техаса в США и префектуры Окинава и Кагосима в Японии. Эти районы имеют сходные природно-климатические характеристики с Карибскими островами и Тайванем, соответственно, где мелиоидоз является эндемичным [Limmathurotsakul et al., 2016].

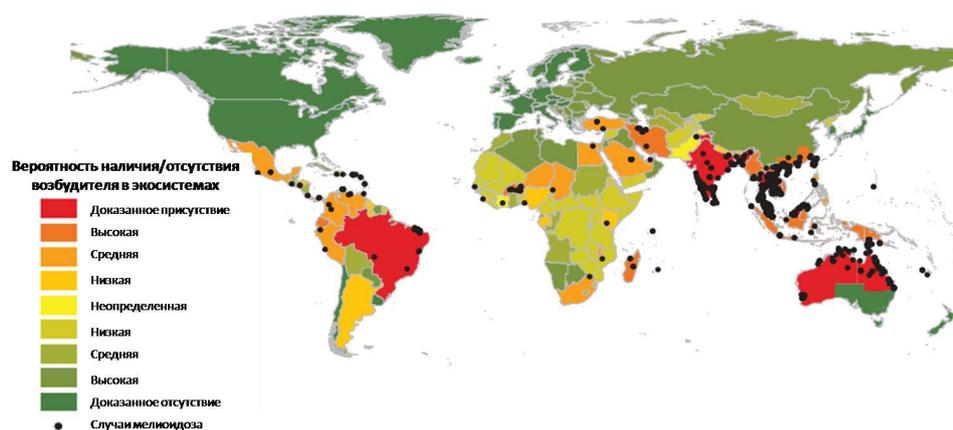


Рисунок 6 – Распространенность мелиоидоза (по Limmathurotsakul et al., 2016)
[Limmathurotsakul et al., 2016]

Таблица 7 – Регионы и страны мира, эндемичные по мелиоидозу

| № | Страна / территория | № | Страна / территория |
|--|-------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| Юго-Восточная Азия | | 24 | Самоа |
| 1 | Мьянма | 25 | Тонга |
| 2 | Вьетнам | Африка | |
| 3 | Гонконг | 26 | Гамбия |
| 4 | Индонезия | 27 | Демократическая Республика Конго |
| 5 | Камбоджа | 28 | Маврикий |
| 6 | Лаос | 29 | Мадагаскар |
| 7 | Малайзия | 30 | Нигерия |
| 8 | Сингапур | 31 | Уганда |
| 9 | Таиланд | 32 | Чад |
| 10 | Тайвань | 33 | Кения |
| 11 | Филиппины | Центральная Америка | |
| Южная Азия | | 34 | Гватемала |
| | | 35 | Гондурас |
| 12 | 36 | 36 | Коста-Рика |
| 13 | 37 | 37 | Мексика |
| 14 | 38 | 38 | Никарагуа |
| 15 | 39 | 39 | Сальвадор |
| 16 | Бутан | 40 | Панама |
| 17 | Непал | Карибский регион | |
| 18 | Пакистан | 41 | Гаити |
| Восточная Азия | | 42 | Пуэрто-Рико |
| 19 | Китайская Народная Республика | Южная Америка | |
| Австралия и Азиатско-Тихоокеанский регион | | 43 | Бразилия |
| 20 | Австралия | 44 | Венесуэла |
| 21 | Микронезия | 45 | Колумбия |
| 22 | Новая Зеландия | 46 | Суринам |
| 23 | Папуа-Новая Гвинея | 47 | Эквадор |

Возможно, что *B. pseudomallei* присутствует в окружающей среде в США и Японии, но еще никогда не выявлялся [Limmathurotsakul et al., 2016]. Данное предположение косвенно подтверждается фактом трех лабораторно установленных случаев мелиоидоза у граждан США, никогда не посещавших эндемичные регионы (1 случай) и вообще не покидавших пределы страны (2 случая) [Engelthaler et al., 2011; Doker et al., 2014], что не исключает инфицирование *B. pseudomallei* в неустановленных местах, локализованных непосредственно на территории Соединенных Штатов Америки [Benoit et al., 2015].

2.3 Заболеваемость мелиоидозом в эндемичных регионах

Официальная статистика заболеваемости мелиоидозом отсутствует, поскольку в подавляющем большинстве стран мира мелиоидоз не входит в список заболеваний, подлежащих обязательному уведомлению, за исключением Таиланда и Сингапура, а также трех административно-территориальных субъектов Австралии (Западная Австралия, Северная Территория и Квинсленд).

Уровень заболеваемости мелиоидозом в мире оценивается в количестве 165 000 (ДИ 68 000–412 000) случаев мелиоидоза в год, из которых 89 000 (ДИ 36 000–227 000) – смертельных, что сравнимо с летальностью от кори [Limmathurotsakul et al., 2016]. Необходимо отметить, что только в Австралии, Брунее и Сингапуре данные национального эпиднадзора о заболеваемости мелиоидозом сопоставимы с оценочными.

В высокоэндемичном регионе Северная Территория Австралии уровень заболеваемости мелиоидозом колеблется от 5,4 до 50,2 случаев на 100 000 населения. Во время муссонных дождей 2009–2010 гг., с количеством осадков выше среднего, заболеваемость увеличилась до 102,4 случаев на 100 000 населения [Smith et al., 2018]. В эндемичных районах северного Квинсленда – от 0,4 до 42,4 случаев на 100 000 населения. При этом средний уровень заболеваемости для аборигенов и жителей островов Торресова пролива за пятилетний период был в 14,3 раза выше, чем для некоренных жителей Квинсленда (<https://www.health>.

qld.gov.au/___data/assets/pdf_file/0026/671183/melioidosis-qld-2012-2016.pdf). Самый низкий уровень заболеваемости мелиоидозом среди трех эндемичных субъектов страны наблюдается в штате Западная Австралия и варьирует от 0,1 до 0,3 случаев на 100 000 населения (https://ww2.health.wa.gov.au/Articles/N_R/Notifiable-infectious-disease-report?report=melioidosis).

В Брунее уровень заболеваемости в 2015–2016 гг. составил 11–16 случаев на 100 000 населения с летальностью 27% [Pande et al., 2018].

В Сингапуре в 2016 г. было зарегистрировано 58 случаев лабораторно подтвержденного мелиоидоза, 5 из которых были классифицированы как импортированные; 2017 г. – 52 случая, один из которых смертельный. В официальном отчете Министерства здравоохранения Сингапура приведен настораживающий факт о значительно возросшей доле больных с бактериемией: от 41,2% в 2013 г. до 70,8% в 2017 г. [<https://www.moh.gov.sg/docs/librariesprovider5/diseases-updates/other-diseases-2017d69dda98dbcb4a92acf79f2e4060e767.pdf>]. За последние годы в клиниках Сингапура мелиоидоз стал хорошо известным заболеванием с ранней диагностикой инфекции и применением адекватного лечения, что значительно снизило уровень летальности [Sim S. et al., 2018].

Официальные данные по заболеваемости в Таиланде (3439) за 2017 год, в два раза ниже, чем оценочные – 7572 (ДИ 3396–17685), но попадают в доверительный интервал, а по смертности значительно ниже оценочных. При этом в официальном сообщении указывается, что причины такого расхождения обусловлены смертью пациентов до установления диагноза, а также ошибочной диагностикой инфекции, вследствие неверной идентификации патогена, все еще распространенной за пределами высоко эндемичного северо-восточного Таиланда [Annual Epidemiological Surveillance Report 2017, Thailand]. Недооценка в Национальной статистике мелиоидоза как причины смерти отмечалась D. Limmathurotsakul еще 2010 году с пояснениями, что половина смертей из-за мелиоидоза происходит в течение первых 48 часов после поступления в больницу, когда истинный диагноз еще неизвестен и, соответственно, не указан в свидетельстве о смерти [Limmathurotsakul et al., 2010a].

Заболеваемость мелиоидозом на северо-востоке Таиланда в период с 1997 по 2006 год в среднем составила 12,7 случаев мелиоидоза на 100 000 человек в год, при постепенном увеличении уровня с 8,0 (ДИ 7,2 – 10,0) в 2000 году до 21,3 (ДИ 19,2 – 23,6) случаев на 100 000 человек в 2006 году, при среднем уровне летальности от мелиоидоза за указанный период 42,6% (смертность – 8,63 на 100 000 человек) [Limmathurotsakul et al., 2010a].

За последние три года, по данным Национального бюро эпидемиологического надзора Таиланда (Bureau of National disease surveillance, MoPH, Thailand), в стране значительно вырос уровень заболеваемости и смертности от мелиоидоза. В провинциях высокоэндемичного по мелиоидозу северо-востока Таиланда заболеваемость в 2016 году составила 26,23 (ДИ 11,16–41,29), в 2017 – 36,25 (ДИ 13,37–59,12) на 100 000 человек. При этом в официальном отчете за 2017 год подчеркивается, что представленные сведения не являются полными.

В последние годы наблюдается тенденция к прогрессивному увеличению числа случаев заболевания практически во всех известных на сегодняшний день эндемичных регионах [Pande et al., 2018; Dance et al., 2018; Corea et al., 2018; Bory et al., 2018; Sanchez-Villamil et al., 2018; Nathan et al., 2018; Hsueh et al., 2018; Smith et al., 2018; Win et al., 2018; Rakotondrasoa et al., 2018; Sim et al., 2018; Tauran et al., 2018; Warner et al., 2018; Hinjoy et al., 2018; Trinh et al., 2018; Chowdhury et al., 2018; Mukhopadhyay et al., 2018; Rolim et al., 2018; Steinmetz et al., 2018; Lui et al., 2018; SanMartin et al., 2018; Zheng et al., 2018].

Основными причинами, влияющими на рост заболеваемости мелиоидозом считаются: глобальное потепление климата; рост распространенности сахарного диабета (важный фактор риска развития мелиоидоза) и увеличение среднего возраста сельского населения; увеличение площади орошаемого земледелия, а также истощение почв. Последние два пункта также могут способствовать распространению *B. pseudomallei* в окружающей среде. Необходимо отметить, что помимо объективных факторов, возрастание количества диагностированных случаев инфекции, по мнению практически всех перечисленных в предыдущем абзаце авторов, также связано с ведущейся в ряде эндемичных стран работе по повышению

информированности клиницистов в отношении мелиоидоза и проводимыми тренингами по лабораторной диагностике инфекции.

2.4 Выживаемость *Burkholderia pseudomallei* за пределами традиционных эндемичных регионов в экстремальных условиях

К настоящему времени получены убедительные доказательства высокого потенциала сохранения *B. pseudomallei* в окружающей среде далеко за пределами традиционных эндемичных регионов в климатических зонах, значительно отличающихся от влажных тропиков.

Возбудитель способен выживать даже в суровых пустынных условиях. В засушливых районах внутренней Австралии после широкомасштабного наводнения было диагностировано 6 случаев мелиоидоза у лиц, не имевших истории посещения других регионов. Для этого засушливого региона Австралии, известного как «Красный Центр», характерны пустынная среда и часто пересыхающие реки, что вызывало определенные сомнения в местном происхождении инфекции. Но из окружающей среды были выделены культуры возбудителя, имевшие уникальные сиквенс-типы, ранее нигде не обнаруженные, что окончательно подтвердило эндемическое присутствие *B. pseudomallei* в этой пустынной местности и его способность переживать длительные засухи [Yip et al., 2015].

Кроме того, при ретроспективном анализе происхождения эпизоотий, произошедших в период с 1966 по 1991 год в районе долины Эйвон (30-32° ю. ш.) на юго-западе Западной Австралии, далеко за пределами обычных широт эндемичности *B. pseudomallei*, было показано, что период, в течение которого возбудитель сохранялся в неблагоприятном для этой бактерии климате, составляет не менее полувека. Возникшая после сильных дождей эпизоотия подтвердила гипотезу, что экстремальные погодные явления могут реактивировать латентную популяцию *B. pseudomallei*.

Для обозначения территорий, климат которых не благоприятствует существованию возбудителя, но где с той или иной периодичностью регистрируются

вспышки инфекции, Stephanie N. J. Chapple с соавторами предложили термин «регион с низкой распространенностью *B. pseudomallei*» [Chapple et al., 2016].

Потенциал выживания *B. pseudomallei* в окружающей среде в условиях умеренного климата продемонстрировала эпизоотия мелиоидоза «L’Affaire du Jardin des Plantes» (1975–78 гг.) во Франции. И, поскольку это единственная до настоящего времени описанная вспышка инфекции в неэндемичном регионе, считаем уместным привести ее основные характеристики.

В 1975 г. от павшей лошади Пржевальского, содержащейся в зверинце ботанического сада Парижа (Jardin des plantes de Paris), была выделена культура возбудителя мелиоидоза. Позже погибло множество других животных, от которых также были выделены культуры бациллы Уитмора (*B. pseudomallei*). Несмотря на проведенную дезинфекцию, положительными на *B. pseudomallei* оказались образцы почвы и воздуха, отобранные как в вольерах павших животных, так и на расстоянии нескольких сотен метров от них. Более того, возбудитель был выделен из образцов внешней среды на территориях ботанического сада (площадь 23,5 га) за пределами зверинца и Венсенского зоопарка, расположенного на расстоянии 4 км от ботанического сада на другом берегу реки Сена. При исследовании 296 образцов сывороток животных 56 (34,8%) оказались положительными с титром, превышающим 1/80 [Dodin and Galimand, 1986; Mollaret, 1988].

После официального объявления о наличии мелиоидоза на территории Франции, возбудитель был выделен из почвы зоологического и ботанического парка г. Мюлуз, а также от лошадей и объектов окружающей среды конезаводов по всей Франции (Рисунок 7) [Dodin and Galimand, 1986; Mollaret, 1988].

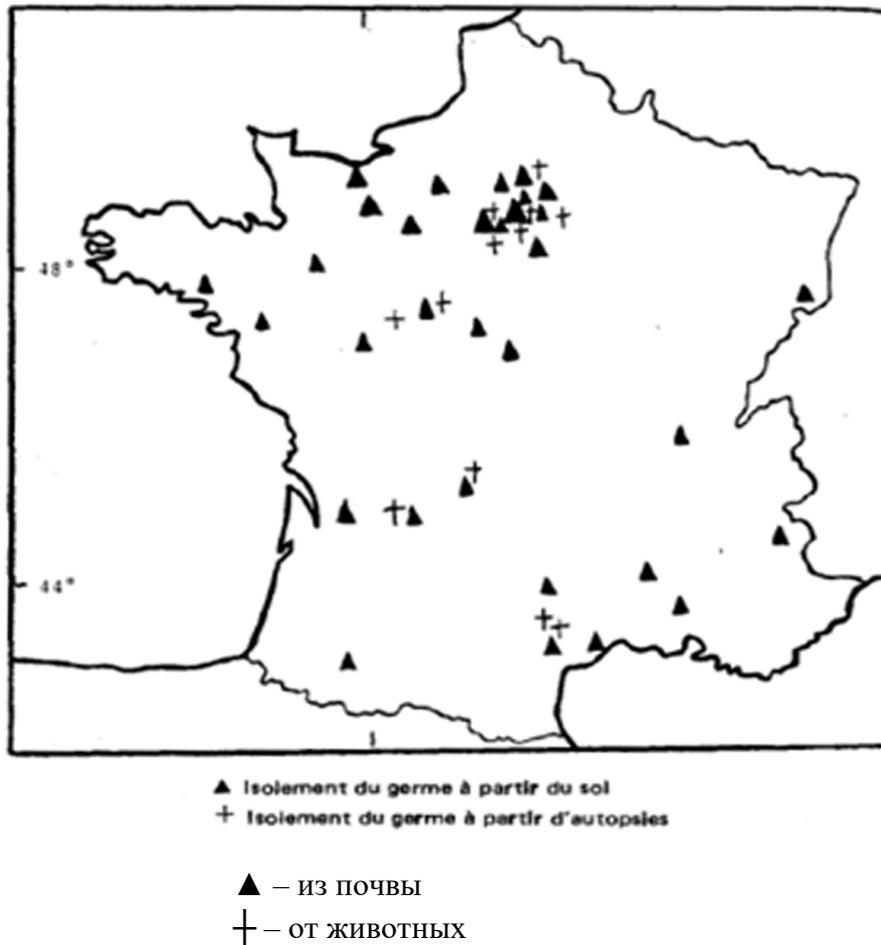


Рисунок 7 – Места выделения *B. pseudomallei* во Франции в период с 1976 по 1986 гг. по Dodin and Galimand, 1986, цитируется по Mollaret, 1988 [Dodin and Galimand, 1986; Mollaret, 1988]

В период активной эпизоотии с 1976 по 1978 гг. было зарегистрировано 3 случая мелиоидоза у людей, в том числе 2 летальных. Серологические исследования, проведенные для всего персонала ботанического сада и Венсенского зоопарка, выявили, что 21,6% сотрудников являются позитивными в отношении мелиоидоза, и среди них присутствовали не только лица, напрямую контактировавшие с животными, но и сотрудники офисов. Кроме того, у двоих из обследованных клинически здоровых людей была выделена гемокультура *B. pseudomallei* [Dodin and Galimand, 1986; Mollaret, 1988].

Изучение реестров животных, импортированных в зверинец ботанического сада Парижа, начиная с 1971 года, не выявило фактов ввоза из тропических регионов, что не исключало экземпляров, изъятых на таможне или приобретенных без

указания происхождения. Ретроспективное бактериологическое исследование законсервированных образцов и замороженных трупов животных, умерших в 1974–1975 гг. до гибели лошади Пржевальского, обнаружило *B. pseudomallei* в законсервированных останках 4 животных (зебра, черепаха, бинтуронг и исландский пони), а также в замороженных трупах панды, газели и шимпанзе.

Кроме того, из навоза, вывезенного из зверинца Парижского ботанического сада и Венсенского зоопарка в 1972-1973 гг. в дендрарий Шеврелу, расположенный в департаменте Ивелин, также была выделена *B. pseudomallei*, что доказывало наличие возбудителя в этих зоопарках, по меньшей мере, в течение двух-трех лет до гибели лошади Пржевальского в ноябре 1975 года [Mollaret, 1988].

Было выдвинуто несколько гипотез об источнике возбудителя инфекции. Наиболее вероятной, по мнению Н. Н. Mollaret, причиной возникновения эпизоотии была одна из пары панд, подаренных Президенту Ж. Помпиду Председателем КНР Мао Цзэдуном в декабре 1973 г. Животное содержалось в Венсенском зоопарке и погибло через четыре месяца после прибытия. Анатомо-патологическое исследование показало диффузный склероз большинства внутренних органов (поджелудочной железы, почек, миокарда, привратника желудка и легких) неясной этиологии. Бактериологическое исследование замороженного трупа было проведено спустя 20 месяцев и культуру *B. pseudomallei* выделили из медуллярного канала [Mollaret, 1988]. Про вторую панду из подаренной пары информация отсутствует. По другой версии, источником инфекции были две лошади, подаренные иранским шахом мадам Помпиду, которые были привезены в Париж в октябре 1971 года и несколько месяцев содержались в ботаническом саду. Однако, никаких фактов в пользу этой гипотезы, кроме наличия мелиоидоза лошадей в Иране не приводится. Также предполагали, что инфекция была занесена с перелетными птицами или с импортированными грызунами [Mollaret, 1988]. Однако источник инфекции достоверно определен так и не был.

2.4.1 Ретроспективное исследование генетического родства штаммов возбудителя мелиоидоза, выделенных во Франции в период эпизоотии «L’Affaire du Jardin des Plantes»

2.4.1.1 Алгоритм и инструменты анализа

Ретроспективное исследование генетического родства штаммов возбудителя мелиоидоза, выделенных во Франции в период эпизоотии мелиоидоза проводили методами биоинформатического анализа с использованием сведений и инструментария базы данных PubMLST (<https://pubmlst.org/>) с выводом филогенетического дерева по алгоритму eBurst [Jolley et al., 2018]. Набор штаммов для анализа формировали на основании информации, размещенной в разделе *B. pseudomallei* MLST (<https://pubmlst.org/bpseudomallei/>). В анализируемую выборку включали штаммы, выделенные в период активной эпизоотии (1975–1978 гг.) из объектов внешней среды или от животных. Штаммы, выделенные от людей, не учитывали по причине отсутствия истории посещения эндемичных регионов и возможности завозного происхождения инфекции. Характеристики отобранных штаммов представлены в Таблице 8.

Таблица 8 – Перечень штаммов возбудителя мелиоидоза, выделенных во Франции в период эпизоотии мелиоидоза

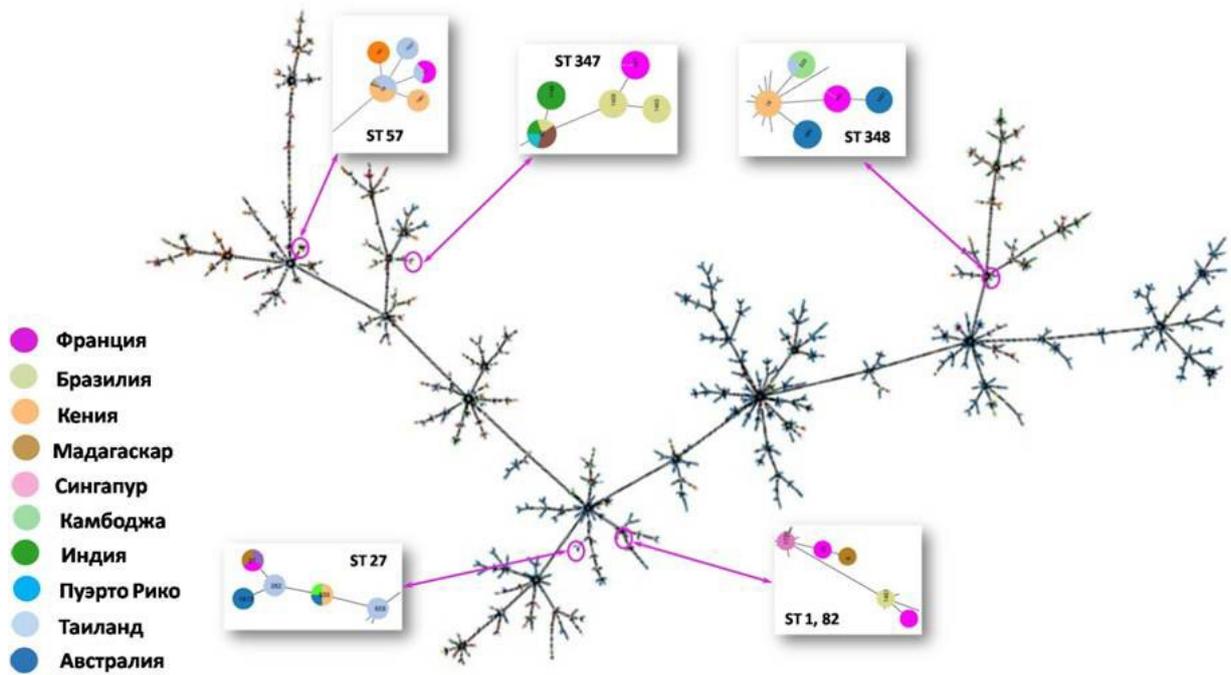
| Штамм | Источник выделения | Год выделения | Сиквенс тип |
|--------------------------------------|--------------------|---------------|-------------|
| <i>B. pseudomallei</i> 7641 | лошадь | 1976 | 1 |
| <i>B. pseudomallei</i> 7605 | внешняя среда | 1976 | 57 |
| <i>B. pseudomallei</i> 2002721630 | внешняя среда | 1976 | 57 |
| <i>B. pseudomallei</i> 2002721620 | животное | 1976 | 82 |
| <i>B. pseudomallei</i> MSHR7781 | почва | 1978 | 27 |
| <i>B. pseudomallei</i> 035/97 (NT16) | почва | нет данных | 347 |
| <i>B. pseudomallei</i> 040/97 (W5) | вода | нет данных | 348 |

Анализ клоальности французских штаммов путем сравнения аллельных профилей сиквенс-типов (ST) всех штаммов возбудителя мелиоидоза из базы данных MLST *B. pseudomallei* по алгоритму eBURST. Визуализацию дерева с минимальным остовом осуществляли при помощи инструмента PhyloViz Online (<https://online.phyloviz.net/>).

2.4.1.2 Филогенетический анализ штаммов *Burkholderia pseudomallei*, выделенных в период эпизоотии мелиоидоза во Франции

Проведенный нами анализ сведений, размещенных в PubMLST, показал, что штаммы, выделенные во Франции от животных, из почвы и воды в период вспышки, представлены, как минимум, четырьмя сиквенс-типами: ST1, ST57, ST82 и ST27. Кроме того в PubMLST представлены еще два французских изолята из почвы и воды, для которых отсутствуют данные по году выделения, относящиеся к ST347 и ST348. Причем, четыре ST из шести являются уникальными (ST 1, 82, 347 и 348) и до настоящего времени нигде более не обнаружены. Сиквенс-типы французских штаммов, выделенных от животных в период вспышки (ST1, ST82), на популяционной кладограмме кластеризуются в пределах одного узла, тогда как ST экологических штаммов – распределены по отдаленным ветвям филогенетического дерева (Рисунок 8).

Интересно, что штаммы неуникальных французских сиквенс-типов были выделены из почвы на Мадагаскаре и в Камбодже (ST 27), ST 57 – от животного на Филиппинах. Уникальные ST французских штаммов от входят в состав клоальных комплексов, содержащих ST почвенных штаммов с Мадагаскара и из Бразилии. То есть прослеживается связь изолятов, выделенных во Франции в период вспышки, со штаммами, выделенными на территориях бывших французских колоний или сопредельных (Рисунок 9).



Клональные комплексы, содержащие ST анализируемых штаммов показаны на выносах

Рисунок 8 – Распределение на кладограмме штаммов *B. pseudomallei* сиквенс типов французских изолятов от животных и из внешней среды, выделенных в период эпизоотии мелиоидоза «L’Affaire du Jardin des Plantes», кладограмма построена по алгоритму eBURST на основании различий в нуклеотидных последовательностях семи консервативных генов, входящих в схему MLST

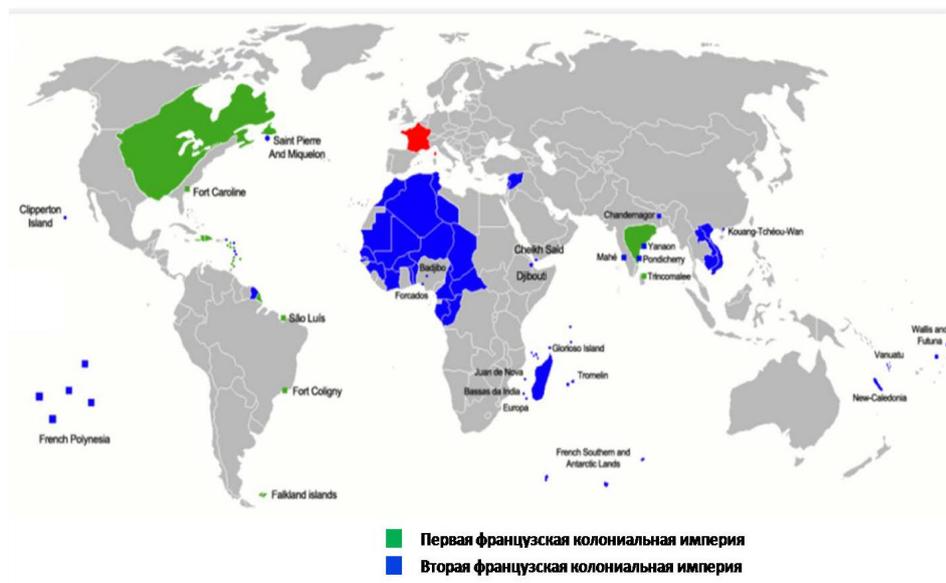


Рисунок 9 – Французская колониальная империя 1546 – 1939 гг.

Уникальность французских ST и их маргинальное положение на филогенетических линиях предполагают неопределенный срок давности заноса возбудителя, а распределение по популяционной кладограмме – неоднократность такого события и различное происхождение штаммов, что и определило невозможность выявления единственного источника инфекции эпизоотии мелиоидоза.

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

2.4.2 Изучение устойчивости *Burkholderia pseudomallei* к воздействию низких температур

Способность *B. pseudomallei* переживать экстремальные условия просто поразительна: микроб выжил в течение шестнадцатилетней инкубации в дистиллированной воде при 25 °С. Количество выживших бактерий составило 0,13% от первоначальной популяции, 0,0001% – перешли в жизнеспособное, но некультивируемое состояние [Pumruang et al., 2011]. Более того, возбудитель активно размножался при полном отсутствии питательных веществ, при этом время удвоения популяции в бидистиллированной воде превышало таковое в питательном бульоне всего в 2 раза [Ларионов и др., 1995]. *B. pseudomallei* способна быстро адаптироваться к неблагоприятным экологическим условиям, включающим недостаток кислорода [Hamad et al., 2011], осмотический и оксидативный стрессы [Pumirat et al., 2017], а также воздействие антимикробных препаратов [O'Rourke et al., 2017].

Показано, что возбудитель сохраняет жизнеспособной часть клеточной популяции после 28-дневной инкубации при 2 °С и даже способен делиться при 4 °С [Chen et al., 2003; Robertson et al., 2010]. Однако, потенциал выживания *B. pseudomallei* при низких температурах к настоящему времени изучен недостаточно полно. В связи с чем мы провели изучение устойчивости *B. pseudomallei* к воздействию низких температур, включая отрицательные.

2.4.2.1 Штаммы и методы исследования

Для исследования были выбраны три штамма *B. pseudomallei* трех различных сиквенс-типов, исходно отличавшиеся по степени морфологической диссоциации, перечисленные в Таблице 9.

Способы полногеномного секвенирования и мультилокусного сиквенс-типирования описаны в разделе 1.4.2.1. Сиквенс-тип штамма *B. pseudomallei* 4811 определяли методом амплификации целевых генов с последующим секвенированием полученных ампликонов при помощи генетического анализатора ABI Prism 3130 (Applied biosystems, США); штаммов *B. pseudomallei* 1512 и 4811 – путем анализа WGS исследованных штаммов (NZ_PHRB00000000.1 и NZ_QLUX00000000.1) с использованием инструментария базы данных PubMLST (<https://pubmlst.org/bpseudomallei/>).

Для каждого штамма готовили бактериальную взвесь в стерильном солевом растворе (0,45 % раствор NaCl, pH 4,5–7,0, CareFusion, Mexico) плотностью приблизительно 1×10^{10} м.к./мл. Затем определяли число КОЕ/мл исходных взвесей путем подсчета числа колоний, выросших при посеве на L агар аликвот из разведений 10^{-3} и 10^{-4} исходной взвеси, с последующим вычислением среднего значения. Выживание штаммов *B. pseudomallei* контролировали в течение 90-дневного периода в интервале температур от 15 до минус 18 °С. Контрольные высевы проводили на агар Эшдауна с интервалом 3–5 дней из разведений 10^{-3} и 10^{-5} . Исследуемые культуры сразу после очередного контрольного посева помещались в последующие температурные условия (Таблица 10). Статистические расчеты были выполнены с использованием инструментов «регрессия» и «парный двухвыборочный t-тест» пакета анализа данных Microsoft Excel 2013.

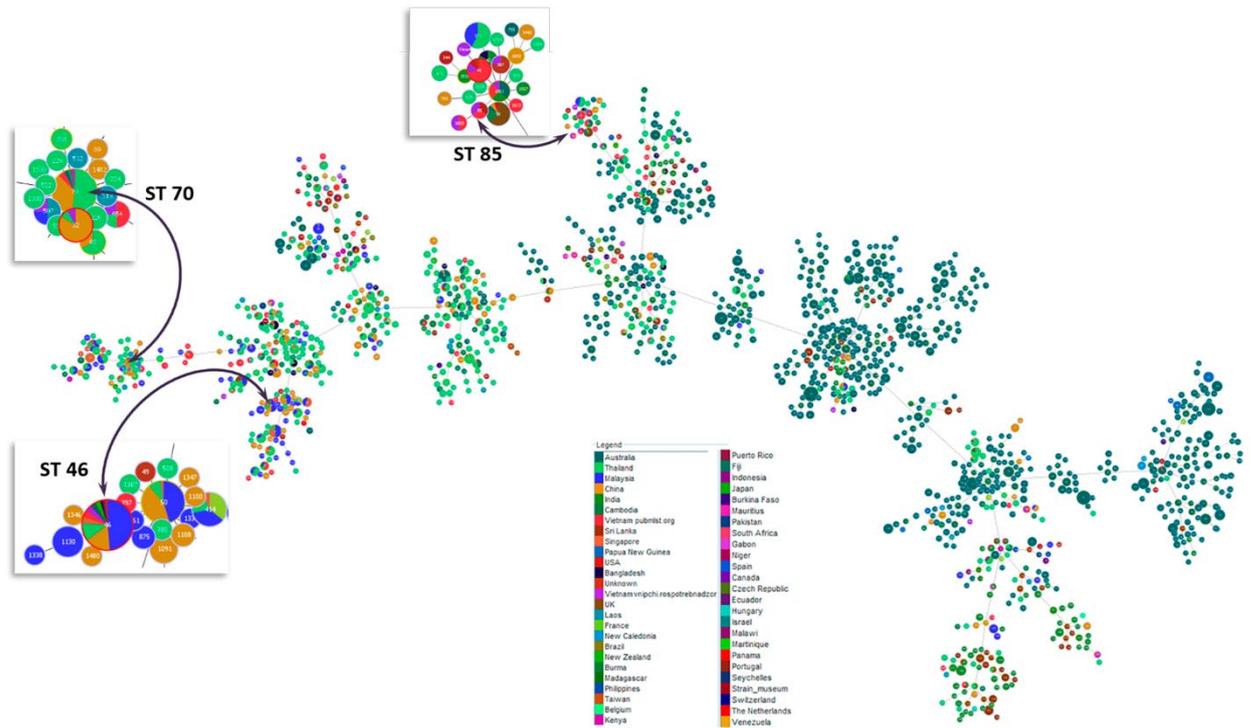
2.4.2.2 Выживание возбудителя мелиоидоза при низких положительных температурах

Первым критерием выбора штаммов для проведения исследования была их принадлежность к различным сиквенс-типам. На основании этого признака были выбраны штаммы *B. pseudomallei* трех ST с различной частотой встречаемости и расположенных на отдаленных друг от друга ветвях кладограммы ST *B. pseudomallei*. Штаммы ST 46 являются наиболее распространенными и обнаружены на территориях Южной, Юго-Восточной, Восточной Азии и Австралии. Штаммы ST 70 широко распространены в субрегионе бассейна реки Меконг, Китае и Австралии. Штаммы ST 85 являются редкими и на момент выполнения работы было известно только о 4-х штаммах, выделенных во Вьетнаме, Индии и в США (заносной случай). Еще одним критерием отбора штаммов было отличие по степени морфологической диссоциации (Таблица 9, Рисунок 10).

Таблица 9 – Характеристика исследованных штаммов

| Штамм | Количество морфотипов | Сиквенс-тип |
|-----------------------------|-----------------------|-------------|
| <i>B. pseudomallei</i> 1501 | микрocolонии | ST 85 |
| <i>B. pseudomallei</i> 1512 | 6 | ST 70 |
| <i>B. pseudomallei</i> 4811 | 2 | ST 46 |

После 65-суточной инкубации при пониженных температурах, включая 32 дня при 1°C, наблюдали статистически недостоверное изменение числа КОЕ/мл для всех трех штаммов ($t = 0,15 < t_{кр} = 2,447$): снижение в 3,4 и 1,2 раза для штаммов 4811 и 1501, соответственно, и увеличение в 1,6 раза для *B. pseudomallei* 1512. При этом на фоне общей тенденции снижения количества культивируемых клеток в зоне положительных температур отмечены статистически достоверные ($t = 5,3 > t_{кр} = 4,3$) неоднократные локальные увеличения числа КОЕ/мл с последующим его снижением (Рисунок 11, Таблица 10).



Клональные комплексы, содержащие ST анализируемых штаммов показаны на выносах

Рисунок 10 – Локализация ST исследованных штаммов на кладограмме клональных комплексов мировой популяции *B. pseudomallei*, кладограмма построена по алгоритму eBURST на основании различий в нуклеотидных последовательностях семи консервативных генов, входящих в схему MLST

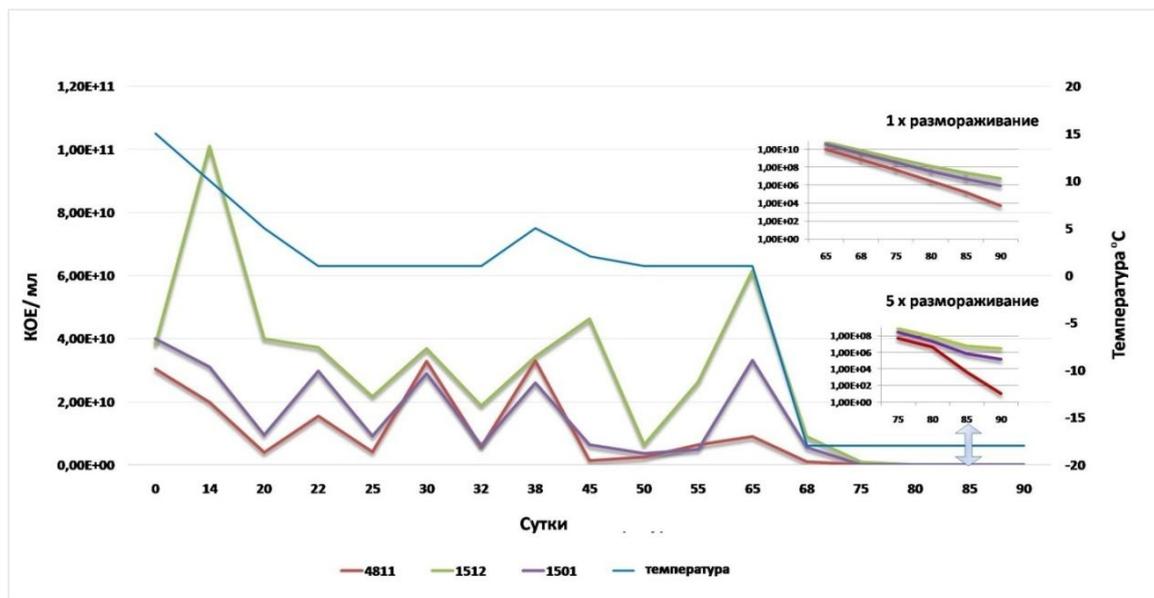


Рисунок 11 – Динамика изменения числа КОЕ/мл у штаммов *B. pseudomallei* при пониженных температурах

Таблица 10 – Показатели выживаемости *B. pseudomallei* при пониженных температурах

| Температура (°C) | Срок высева (сутки) | Штамм | КОЕ/мл | Количество размораживаний |
|------------------|---------------------|-----------------------------|----------------|---------------------------|
| 25 | 0* | <i>B. pseudomallei</i> 4811 | 3,03E+10 | 0 |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1501 | 3,99E+10 | |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1512 | 3,82E+10 | |
| 15 | 10 | <i>B. pseudomallei</i> 4811 | не исследовали | 0 |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1501 | | |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1512 | | |
| 10 | 15 | <i>B. pseudomallei</i> 4811 | 1,98E+10 | 0 |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1501 | 3,10E+10 | |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1512 | 1,01E+11 | |
| 5 | 20 | <i>B. pseudomallei</i> 4811 | 3,84E+09 | 0 |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1501 | 9,42E+09 | |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1512 | 4,00E+10 | |
| 1 | 22 | <i>B. pseudomallei</i> 4811 | 1,54E+10 | 0 |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1501 | 2,96E+10 | |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1512 | 3,72E+10 | |
| 1 | 25 | <i>B. pseudomallei</i> 4811 | 4,02E+09 | 0 |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1501 | 9,03E+09 | |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1512 | 2,17E+10 | |
| 1 | 30 | <i>B. pseudomallei</i> 4811 | 3,27E+10 | 0 |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1501 | 2,89E+10 | |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1512 | 3,69E+10 | |
| 1 | 32 | <i>B. pseudomallei</i> 4811 | 5,64E+09 | 0 |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1501 | 6,08E+09 | |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1512 | 1,87E+10 | |
| 5 | 38 | <i>B. pseudomallei</i> 4811 | 3,29E+10 | 0 |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1501 | 2,60E+10 | |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1512 | 3,43E+10 | |
| 2 | 45 | <i>B. pseudomallei</i> 4811 | 1,32E+09 | 0 |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1501 | 6,25E+09 | |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1512 | 4,63E+10 | |
| 1 | 50 | <i>B. pseudomallei</i> 4811 | 2,33E+09 | 0 |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1501 | 3,56E+09 | |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1512 | 6,39E+09 | |
| 1 | 55 | <i>B. pseudomallei</i> 4811 | 6,20E+09 | 0 |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1501 | 4,78E+09 | |
| | | <i>B. pseudomallei</i> 1512 | 2,63E+10 | |

Таблица 10 – Продолжение

| Температура (°С) | Срок высева (сутки) | Штамм | КОЕ/мл | Количество размораживаний |
|---|---------------------|---|----------------------------------|---------------------------|
| 1 | 65 | <i>B. pseudomallei</i> 4811 <i>B. pseudomallei</i> 1501 <i>B. pseudomallei</i> 1512 | 8,83E+09 3,31E+10 6,16E+10 | 0 |
| -18 | 68 | <i>B. pseudomallei</i> 4811 <i>B. pseudomallei</i> 1501 <i>B. pseudomallei</i> 1512 | 9,23E+08 5,43E+09 8,88E+09 | 1 |
| -18 | 75 | <i>B. pseudomallei</i> 4811 <i>B. pseudomallei</i> 1501 <i>B. pseudomallei</i> 1512 | 4,67E+07 2,60E+08 7,84E+08 | 2 |
| -18 | 80 | <i>B. pseudomallei</i> 4811 <i>B. pseudomallei</i> 1501 <i>B. pseudomallei</i> 1512 | 4,34E+06 1,95E+07 8,52E+07 | 3 |
| -18 | 85 | <i>B. pseudomallei</i> 4811 <i>B. pseudomallei</i> 1501 <i>B. pseudomallei</i> 1512 | 4,18E+03 1,35E+05 5,54E+06 | 4 |
| -18 | 90 | <i>B. pseudomallei</i> 4811 <i>B. pseudomallei</i> 1501 <i>B. pseudomallei</i> 1512 | 1,00E+01 6,44E+05 2,68E+06 | 5 |
| -18 | 90 | <i>B. pseudomallei</i> 4811 <i>B. pseudomallei</i> 1501 <i>B. pseudomallei</i> 1512 | 4,82E+03 8,32E+05 5,54E+06 | 1** |
| * Исходные культуры | | | | |
| ** Образцы культур в течении 25 суток находились в замороженном состоянии | | | | |

Интересно, что локальное увеличение численности бактерий только в одном случае совпадает с повышением температуры, в других – либо с понижением, либо с периодом поддержания постоянной температуры. Подобный зигзагообразный график динамики снижения численности культивируемых клеток *B. pseudomallei* при 28-дневной инкубации при постоянной температуре 2 °С ранее наблюдали J. Robertson с соавторами, причем число КОЕ/ мл к концу срока наблюдения снизилось для всех трех исследованных штаммов в 10^2 - 10^3 раз [Robertson et al., 2010]. Можно предположить, что различия в полученных ранее и в настоящей работе результатах обусловлены отличиями в дизайне эксперимента. В частности, в цитируемом исследовании бактерии сразу инкубировались при 2 °С, то есть были подвергнуты холодовому шоку. Тогда как в настоящей работе

температура опускалась постепенно, что давало возможность бактериям адаптироваться к пониженной температуре. Тем не менее, несмотря на частные отличия, в главном – *B. pseudomallei* выживает при близких к нулю температурах и уровень устойчивости отличается у разных штаммов – наши результаты подтверждают полученные ранее данные.

2.4.2.2 Выживание возбудителя мелиоидоза при замораживании

Адаптированные к холоду бактерии были разделены на аликвоты и заморожены при минус 18 °С. Далее одна из аликвот каждого штамма неоднократно размораживалась при комнатной температуре, производились контрольные посеvy, затем образец замораживали повторно. Вторая аликвота сохранялась в замороженном состоянии 25 суток и была высеяна в конце срока наблюдения. Все три штамма сохранили жизнеспособность части популяции как после 25-дневного непрерывного замораживания, так и после 5 раундов замораживания-оттаивания (Таблица 10). При этом наблюдалось статистически достоверная зависимость снижения количества культивируемых клеток от времени воздействия температурного фактора для всех трех штаммов. По окончании наблюдения число КОЕ/мл *B. pseudomallei* 4811 статистически достоверно снизилось в 10^9 раз от исходного количества при многократном замораживании-оттаивании и в $6,3 \times 10^6$ раз при однократном размораживании на завершающем этапе опыта ($t = 4,836, p = 0,0002$), для *B. pseudomallei* 1501 – в $6,2 \times 10^4$ и $4,8 \times 10^4$ раза ($t = 5,654, p < 0,0001$), а для *B. pseudomallei* 1512 – в $1,4 \times 10^4$ и $4,8 \times 10^3$ раза ($t = 5,391, p < 0,0001$).

Полученные данные не являются исчерпывающими, так как мы подсчитывали только культивируемые формы, в то время как известно, что *B. pseudomallei* способен образовывать значительную субпопуляцию жизнеспособных, но некультивируемых клеток, высокотолерантных к неблагоприятным факторам. Кроме того, в лаборатории невозможно полностью имитировать природные условия, в ко-

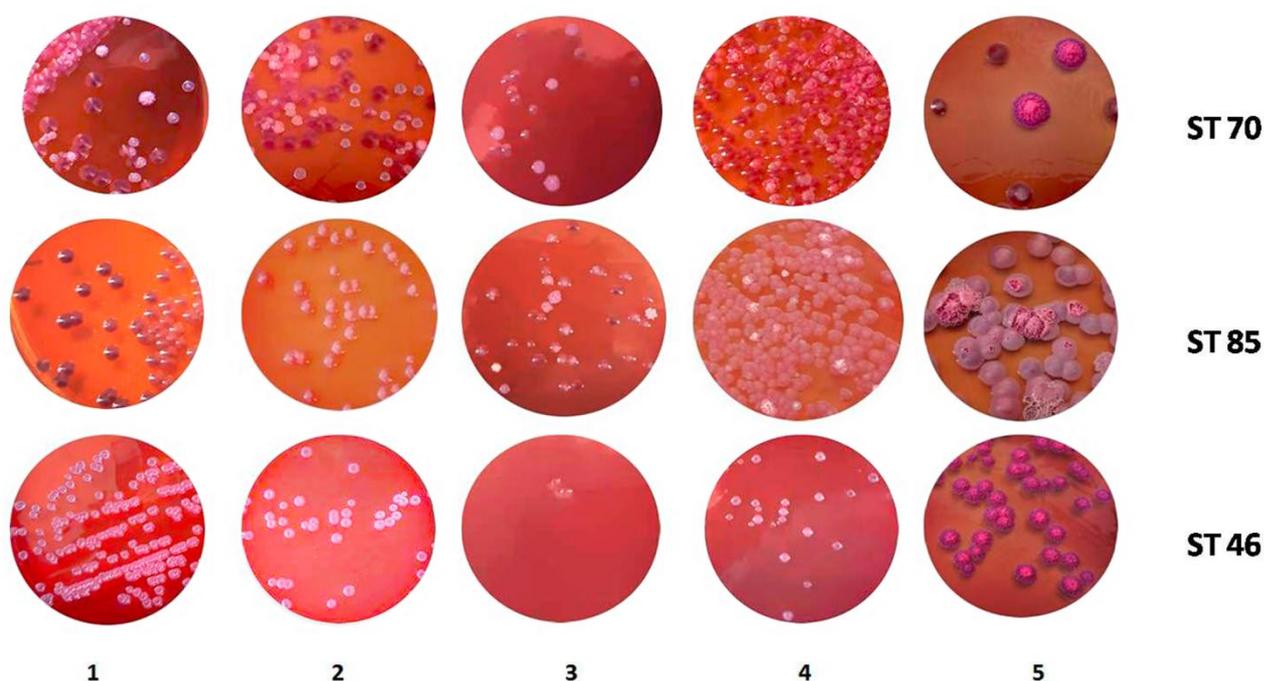
торых возбудитель избегает резкого изменения температуры, перемещаясь в глубокие слои почвы.

2.4.2.3 Морфологическая изменчивость возбудителя мелиоидоза в условиях холодового стресса

Известно, что способность *B. pseudomallei* к образованию колоний различных морфотипов – это один из механизмов адаптации патогена к конкретным условиям окружающей среды [Austin et al., 2015; Shea et al., 2017]. В связи с этим для исследования выживаемости возбудителя мелиоидоза в условиях холодового стресса были выбраны штаммы, отличающиеся по морфологии роста на агаре Эшдауна. Штамм *B. pseudomallei* 1501 (ST 85) изначально рос в виде едва заметных микроколоний, при пересевах образовывал единообразные гладкие конусовидные колонии. *B. pseudomallei* 4811 (ST 46) показывал умеренную морфологическую диссоциацию с преимущественным образованием колоний в R-форме в виде плоских пуговиц и редкими колониями в S-форме в виде слегка ребристого, окаймленного конуса. *B. pseudomallei* 1512 (ST 70) образовывал, по меньшей мере, 6 морфотипов, из которых 4 были в R-форме («пуговицы», два вида «гвоздик» и «блинчики»), один – в S-форме и еще один представлял промежуточную форму колоний – сухая и складчатая середина с гладкой каймой.

В процессе адаптации к пониженным температурам у всех морфотипов исследованных штаммов наблюдалось снижение насыщенности окраски колоний. Также была выявлена отчетливая тенденция трансформации всех плоских R-форм («пуговиц») в гладкие объемные колонии, по форме похожие на эритроциты, с полной элиминацией исходной формы к концу срока наблюдения. После второго размораживания у исследованных штаммов все выросшие колонии находились в S-форме, а после пятого – у штаммов 1501 и 1512 появились R-формы, причем, как упоминалось выше, у штамма 1501 ранее морфологическая диссоциация колоний не наблюдалась. Можно предположить, что зигзагообразный график динамики изменения числа КОЕ/мл у штаммов *B. pseudomallei* в течение инкубации

при температурах в интервале 1–5 °С связан с естественной селекцией изогенных клонов, наиболее адаптированных для данных условий, что фенотипически выражается в изменении морфологии колоний. У всех исследованных штаммов морфология роста на агаре Эшдауна по окончании срока наблюдения значительно отличалась от исходной, причем появилось межштаммовое сходство, особенно заметное на 9-суточных культурах (4 суток при 37 °С, далее – при комнатной температуре) (Рисунок 12).



Культуры, показанные на линиях 1–4 выращивали при 37 °С, 4 суток. Линии: 1 – исходные культуры, 2 – после 10 суток инкубации при 1 °С, 3 – после 25 суток при минус 18 °С и пяти размораживаний, 4 – после 25 суток при минус 18 °С и однократного размораживания, 5 – культуры линии 4 после дополнительной инкубации (5 суток) при комнатной (около 25 °С) температуре

Рисунок 12 – Изменение морфологии колоний *B. pseudomallei* при воздействии низких температур

Результаты проведенного исследования доказывают возможность выживания *B. pseudomallei* (и в отдельных случаях размножения) не менее 32 суток при 1 °С при незначительных изменениях числа КОЕ. Постепенно адаптированные к холоду штаммы возбудителя переживают не менее 25 суток как при постоянном воздействии температуры минус 18 °С, так и при не менее 5 раундах замораживания-оттаивания. Максимальную устойчивость к воздействию отрицательных температур проявил штамм, обладающий способностью к выраженной морфологической диссоциации колоний.

Очевидно, что знание пределов температурного диапазона выживания возбудителя необходимо для понимания климатических границ потенциального распространения *B. pseudomallei*. Вполне возможно, что область экологической пригодности для сохранения возбудителя в природе гораздо шире, чем прогнозировалось ранее. Толерантность *B. pseudomallei* к длительному воздействию низких температур, в том числе отрицательных, объясняет известные факты локального распространения и длительной персистенции *B. pseudomallei* в регионах с умеренным климатом и свидетельствуют о потенциальной возможности интродукции возбудителя на ряде территорий Российской Федерации.

2.5 Проблема мелиоидоза в неэндемичных регионах

В последние годы интерес к мелиоидозу возрос в связи регулярными заносами инфекции больными людьми или с инфицированными животными, включая домашних, в страны умеренных широт [Elschner et al., 2014; Gauthier et al., 2016, Ryan et al., 2018; Hellebuyck et al., 2018]. До начала 80-х годов прошлого века подавляющее большинство завозных случаев мелиоидоза, по данным GIDEON Informatics (Global Infectious Diseases and Epidemiology Network) было связано с возвращением на родину участников военных конфликтов на эндемичных территориях, позднее – с путешественниками, мигрантами и импортом животных [Berger, 2020].

Впервые завозной мелиоидоз был зарегистрирован в США среди ветеранов войны во Вьетнаме (343 случая) [Gilbert et al., 1968; Brundage et al., 1968]. Серопозитивными оказалось 8,9% (225 000 человек) военного контингента, дислоцированного во Вьетнаме [Clayton et al., 1973]; среди австралийских, новозеландских и британских солдат, служивших в Западной Малайзии, серопозитивными оказалось 2% [Thin, 1976].

2.5.1 Ретроспективный анализ особенностей влияния предрасполагающих факторов на риск развития мелиоидоза у посетителей эндемичных регионов в сравнении с коренными жителями

2.5.1.1 Поиск и критерии отбора данных

С целью определения влияния предрасполагающих факторов на риск развития мелиоидоза после посещения эндемичных регионов мы провели ретроспективный анализ завозных случаев заболевания на неэндемичные территории.

В связи с отсутствием официальной статистики по мелиоидозу в неэндемичных странах, поиск данных проводили по опубликованным источникам с использованием поисковых систем PubMed, ProMED-mail и Google Scholar за пятнадцатилетний период, предшествующий проведению исследования. Поиск проводили по ключевым словам «melioidosis», «*Burkholderia pseudomallei*», «traveler», «tourist», «case report». Критерием отбора публикаций для анализа являлось наличие следующих данных: диагностика инфекции в неэндемичных странах, регион инфицирования, пол и возраст заболевшего, информация о наличии (отсутствии) предрасполагающих факторов, исход. Работы, описывающие случаи мелиоидоза в эндемичных странах и инфекции у иммигрантов из эндемичных стран, в анализируемую выборку не включали.

За период с 2003 г. по апрель 2017 г. обнаружено 76 работ, в которых сообщалось о 121 лабораторно подтвержденных случаях заноса мелиоидоза в страны, расположенные вне зоны эндемичности этой инфекции.

Для выявления тенденции в многолетней динамике заноса мелиоидоза в неэндемичные страны сравнивали усредненные данные по количеству завозных случаев за 4 временных периода.

Статистические расчеты были выполнены с использованием инструментов «корреляция» и «регрессия» пакета анализа данных Microsoft Excel 2013.

2.5.1.2 Анализ клинико-демографических данных заболевших

Основные клинико-демографические и эпидемиологические данные выявленных случаев представлены в Таблице 11.

Анализ клинико-демографических данных заболевших проводили по следующим показателям: возраст, пол, наличие факторов риска. Возрастной диапазон оказался очень широким: от 7 до 90 лет, средний возраст – 52,6 года, что сопоставимо со средним возрастом больных в Таиланде – 52 года [Maude et al., 2012] и несколько выше, чем Австралии – 49 лет [Currie et al., 2010].

Таблица 11 – Основные характеристики лабораторно подтвержденных завозных случаев мелиоидоза в страны умеренного климатического пояса за период с 2003 по апрель 2017 гг.

| Год | Пол, возраст(г) | Регион заражения | Страна диагностики | Факторы риска | Исход | Источник |
|------------|------------------------|---------------------------------|---------------------------|----------------------|--------------|-----------------------------|
| 2003 | М, 47 | Малайзия | Южная Корея | СД | выздоровел | [Lee et al., 2005] |
| 2003 | М, 65 | Таиланд, | Япония | СД | выздоровел | [Shibuya et al., 2007] |
| 2003 | М, 50 | Бразилия | Нидерланды | СД | умер | [Aardema et al., 2005] |
| 2004 | М, 82 | Малайзия, Таиланд, Мьянма | США | СД | выздоровел | [Ngauy et al., 2005] |
| 2004 | М, 50 | Индонезия | Южная Корея | нет | выздоровел | [Lee et al., 2009] |
| 2005 | М, 28 | Колумбия | Испания | нет | выздоровел | [Guzman-Gomez et al., 2015] |

Таблица 11 – (Продолжение)

| Год | Пол, возраст (г) | Регион заражения | Страна диагностики | Факторы риска | Исход | Источник |
|------|------------------|-------------------------------|--------------------|---------------|---------------------------------|------------------------------|
| 2005 | М, 35 | Малайзия | Непал | нет | выздоровел | [Shrestha et al., 2005] |
| 2005 | М 70 | Вьетнам, Камбоджа | Франция | нет | рецидив | [Mandjee et al., 2005] |
| 2005 | Ж, 17 | Таиланд | Финляндия | н/д | выздоровела | [Nieminen et al., 2005] |
| 2005 | М, 47 | Таиланд | Финляндия | н/д | выздоровел | [Nieminen et al., 2005] |
| 2005 | М, 54 | Таиланд | Финляндия | н/д | выздоровел | [Nieminen et al., 2005] |
| 2005 | М, 52 | Мьянма | Франция | нет | выздоровел | [Demar et al., 2005] |
| 2005 | Ж, 50 | Таиланд | Швеция | нет | выздоровела | [Svensson et al., 2006] |
| 2005 | М, 58 | Мадагаскар | Франция | нет | выздоровел | [Borgherini et al., 2006] |
| 2005 | М, 48 | Гондурас | США | СД | выздоровел | [Kite-Powell et al., 2006] |
| 2005 | Ж, 80 | Гондурас | США | н/д | умерла | [Kite-Powell et al., 2006] |
| 2005 | М, н/д | Таиланд | Италия | н/д | н/д | [Ciervo et al., 2006] |
| 2006 | М, 71 | Китай | Сингапур | СД | выздоровел | [Teo et al., 2006] |
| 2006 | Ж, 54 | Китай | Тайвань | СД | выздоровела | [Lee et al., 2006] |
| 2006 | М, 58 | Индонезия, Филиппины | Тайвань | СД, гепатит В | выздоровел | [Lee et al., 2006] |
| 2006 | М, 61 | Таиланд | Тайвань | СД | выздоровел | [Lee et al., 2006] |
| 2006 | М, 52 | Таиланд | Германия | СД | Рецидив через 6 лет, выздоровел | [Vollmar et al., 2014] |
| 2007 | М, 40 | Бруней | Словения | нет | выздоровел | [Miksic et al., 2007] |
| 2007 | Ж, 90 | Бангладеш | Бельгия | СД | выздоровела | [Ezzedine et al., 2007] |
| 2007 | М, 38 | Шри Ланка | Норвегия | СД | выздоровел | [Hesstvedt et al., 2011] |
| 2008 | М, 51 | Таиланд | Англия | н/д | выздоровел | [Lie et al., 2010] |
| 2008 | М, 32 | Не выезжал за пределы США | США | СД | выздоровел | [Stewart et al., 2011] |
| 2008 | М, 58 | Таиланд | Франция | А | выздоровел | [Guilleminault et al., 2010] |
| 2008 | М, 17 | Британские Виргинские острова | США, Канада | нет | выздоровел | [Corral et al., 2008] |
| 2008 | Ж, 62 | Таиланд | Германия | СД | рецидив через 10 лет | [Frangoulidis et al., 2008] |
| 2008 | М, 32 | Таиланд | Израиль | СД | выздоровел | [Cahn et al., 2009] |
| 2008 | М, 35 | Сингапур, Малайзия, Таиланд | Швейцария | нет | выздоровел | [Weissert et al., 2009] |
| 2008 | М, 32 | Таиланд | Южная Корея | СД | умер | [Son et al., 2009] |
| 2008 | М, 47 | Камбоджа | Южная Корея | СД | умер | [Park et al., 2012] |
| 2009 | М, 61 | Вьетнам, Филиппины, Гонконг | США | СД | выздоровел | [Duplessis et al., 2009] |
| 2009 | М, 38 | Таиланд | Норвегия | Астма, ТК | выздоровел | [Hesstvedt et al., 2011] |

Таблица 11 – (Продолжение)

| Год | Пол, возраст (г) | Регион заражения | Страна диагностики | Факторы риска | Исход | Источник |
|------|------------------|---------------------------------------|--------------------|---------------|-------------|---------------------------|
| 2009 | М, 29 | Гамбия, Гвинея-Бисау, Сенегал | Испания | СД | выздоровел | [Cuadros et al., 2011] |
| 2009 | Ж, 70 | Таиланд, Малайзия, Китай | Нидерланды | нет | выздоровела | [Snijders et al., 2010] |
| 2009 | Ж, 69 | Вьетнам, Камбоджа | Дания | нет | выздоровела | [Badran et al., 2010] |
| 2009 | М, 55 | Таиланд | Дания | нет | выздоровел | [Badran et al., 2010] |
| 2009 | М, 53 | Лаос | Дания | А | выздоровел | [Badran et al., 2010] |
| 2009 | М, 62 | Таиланд | Дания | А | выздоровел | [Badran et al., 2010] |
| 2009 | М, 58 | Таиланд | Дания | СД, ХБП | умер | [Badran et al., 2010] |
| 2009 | Ж, 7 | Аруба | США | нет | выздоровела | [O'Sullivan et al., 2011] |
| 2009 | М, 88 | Пуэрто-Рико | США | нет | выздоровел | [Benoit et al., 2015] |
| 2009 | Ж, 44 | Карибские острова, Таиланд | Англия | СД | выздоровела | [Garas et al., 2010] |
| 2010 | М, 50 | Малайзия | Южная Корея | нет | умер | [Hong et al., 2011] |
| 2010 | М, 60 | н/д | Франция | нет | выздоровел | [Amezyane et al., 2010] |
| 2010 | М, 48 | Малайзия | Южная Корея | СД | выздоровел | [Kim et al., 2015] |
| 2010 | М, 30 | Мексика | США | н/д | умер | [Benoit et al., 2015] |
| 2010 | Ж, 27 | Посещений эндемичных регионов не было | США | нет | выздоровела | [Benoit et al., 2015] |
| 2010 | Ж, 42 | Коста-Рика, Мексика | США | нет | выздоровела | [Benoit et al., 2015] |
| 2010 | Ж, 67 | Лаос, Камбоджа | США | СД | выздоровела | [Benoit et al., 2015] |
| 2010 | М, 37 | Сингапур | Италия | нет | выздоровел | [Amadasi et al., 2015] |
| 2010 | М, 35 | Мартиника | Швейцария | нет | умер | [Getaz et al., 2011] |
| 2010 | Ж, 46 | Карибские острова | США | н/д | выздоровела | [Mickail et al., 2012] |
| 2011 | М, 60 | Филиппины | Южная Корея | нет | выздоровел | [Kim et al., 2015] |
| 2011 | Ж, 46 | Нигерия | Англия | СД | н/д | [Salam et al., 2011] |
| 2011 | М, 69 | Таиланд, Малайзия | Иран | СД | выздоровел | [Darazam et al., 2011] |
| 2011 | М, 82 | Филиппины | США | н/д | выздоровел | [Benoit et al., 2015] |
| 2011 | М, 58 | Камбоджа | США | н/д | выздоровел | [Benoit et al., 2015] |
| 2011 | М, 35 | Малайзия | США | н/д | выздоровел | [Benoit et al., 2015] |
| 2011 | М, 69 | Камбоджа | США | СД | выздоровел | [Benoit et al., 2015] |
| 2011 | М, 75 | Филиппины | США | А | умер | [Benoit et al., 2015] |
| 2011 | М, 22 | Мексика | США | А | выздоровел | [Benoit et al., 2015] |
| 2011 | Ж, 10 | Мексика | США | нет | выздоровела | [Benoit et al., 2015] |
| 2011 | Ж, 35 | Мадагаскар, 14 стран Западной Африки | Испания | нет | выздоровела | [Morosini et al., 2013] |
| 2011 | Ж, 62 | Таиланд | Португалия | нет | выздоровела | [Pelerito et al., 2016] |
| 2012 | М, 61 | Камбоджа | Франция | СД | выздоровел | [TanBoun et al., 2012] |

Таблица 11 – (Продолжение)

| Год | Пол, возраст (г) | Регион заражения | Страна диагностики | Факторы риска | Исход | Источник |
|------|------------------|---------------------------|--------------------|---------------|-------------|-------------------------------|
| 2012 | М, 49 | Бангладеш | США | СД | выздоровел | [Christini et al., 2012] |
| 2012 | М, 44 | Таиланд | Швейцария | нет | выздоровел | [Schultze et al., 2012] |
| 2012 | М, 52 | Вьетнам | Австралия | СД | выздоровел | [Jane et al., 2012] |
| 2012 | М, 10 | Вьетнам | США | нет | выздоровел | [Benoit et al., 2015] |
| 2012 | М, 56 | Таиланд | США | СД | выздоровел | [Benoit et al., 2015] |
| 2012 | Ж, 56 | Индия | США | СД | выздоровела | [Benoit et al., 2015] |
| 2012 | М, 47 | Вьетнам | США | нет | выздоровел | [Benoit et al., 2015] |
| 2012 | М, 58 | Тринидад | США | онкология | умер | [Benoit et al., 2015] |
| 2012 | М, 71 | Гватемала | США | СД | выздоровел | [Benoit et al., 2015] |
| 2012 | М, 61 | Китай, Мьянма | США | СД | выздоровел | [Benoit et al., 2015] |
| 2012 | М, 37 | Вьетнам | США | нет | выздоровел | [Benoit et al., 2015] |
| 2012 | М, 60 | Пуэрто-Рико | США | СД | выздоровел | [Dokeret al., 2015] |
| 2012 | М, 42 | Малайзия | Китай | н/д | выздоровел | [Zong et al., 2012] |
| 2012 | Ж, 15 | Гваделупа | Франция | н/д | выздоровела | [Meckenstock et al., 2012] |
| 2012 | М, 54 | Таиланд | Россия | нет | умер | [Лемасова, 2018] |
| 2013 | М, 66 | Таиланд | Англия | нет | умер | [Ismail et al., 2013] |
| 2013 | М, 47 | Таиланд | Южная Корея | СД | выздоровел | [Kim et al., 2015] |
| 2013 | М, 66 | Камбоджа | Южная Корея | СД | умер | [Kim et al., 2015] |
| 2013 | М, 46 | Малайзия | США | нет | выздоровел | [Benoit et al., 2015] |
| 2013 | М, 44 | Не выезжал за пределы США | США | СД | выздоровел | [Benoit et al., 2015] |
| 2013 | М, 81 | Индия | США | нет | выздоровел | [Benoit et al., 2015] |
| 2013 | Ж, 22 | Гватемала | США | нет | выздоровел | [Benoit et al., 2015] |
| 2013 | М, 70 | Лаос, Таиланд | США | нет | выздоровел | [Benoit et al., 2015] |
| 2013 | М, 65 | Таиланд | США | нет | выздоровел | [Benoit et al., 2015] |
| 2013 | М, 70 | Вьетнам, Лаос, Африка | США | нет | выздоровел | [Benoit et al., 2015] |
| 2013 | М, 55 | Камбоджа | Дания | нет | выздоровел | [Subran et al., 2013] |
| 2013 | М, 51 | Вьетнам | Австралия | СД, А | выздоровел | [Lim et al., 2013] |
| 2013 | М, 48 | Таиланд | Франция | Лейкемия | выздоровел | [Rossi et al., 2013] |
| 2013 | М, 64 | Таиланд | Франция | Лейкемия | выздоровел | [Rossi et al., 2013] |
| 2014 | М, 42 | Бангладеш | Кувейт | СД | умер | [AlShatie t al., 2014] |
| 2014 | М, 61 | Вьетнам | Южная Корея | СД | выздоровел | [Kim et al., 2015] |
| 2014 | М, 62 | Таиланд | Южная Корея | нет | выздоровел | [Kim et al., 2015] |
| 2014 | М, 81 | Индия | США | СД | выздоровел | [Shaaban et al., 2014] |
| 2014 | М, 64 | Филиппины | Канада | СД, ХБП, ТК | выздоровел | [Chagla et al., 2014] |
| 2014 | М, 62 | Таиланд | Дания | А | выздоровел | [Leth et al., 2014] |
| 2014 | М, 63 | Таиланд | Дания | нет | выздоровел | Bodilsen et al., 2014 |
| 2014 | М, 46 | Таиланд | Исландия | А | выздоровел | [Gudmundsdottir et al., 2014] |
| 2014 | М, 37 | Таиланд | Исландия | н/д | выздоровел | [Gudmundsdottir et al., 2014] |

Таблица 11 – (Продолжение)

| Год | Пол, возраст (г) | Регион заражения | Страна диагностики | Факторы риска | Исход | Источник |
|------|------------------|--------------------|--------------------|---------------|------------|-------------------------------|
| 2014 | М, 23 | Таиланд | Исландия | нет | выздоровел | [Gudmundsdottir et al., 2014] |
| 2015 | М, 75 | Таиланд | Германия | А | выздоровел | [Starzacher et al., 2015] |
| 2015 | М, 62 | Таиланд | Израиль | ИБС | выздоровел | [Dan et al., 2015] |
| 2015 | М, 63 | Гамбия | Нидерланды | н/д | выздоровел | [Morelli et al., 2015] |
| 2015 | М, 68 | Филиппины | США | СД | выздоровел | [Guo et al., 2015] |
| 2015 | М, 70 | Мексика | США | н/д | выздоровел | [Truong et al., 2015] |
| 2015 | М, 63 | Таиланд, Вьетнам | Германия | н/д | выздоровел | [Monecke et al., 2015] |
| 2016 | Ж, 25 | Таиланд | Франция | н/д | н/д | [Conrad et al., 2016] |
| 2016 | н/д | Эритрея | Израиль | н/д | н/д | [Almoge t al., 2015] |
| 2016 | н/д | Индонезия | Япония | н/д | умер | [Katanami et al., 2016] |
| 2016 | М, н/д | Папуа-Новая Гвинея | Китай | СД | н/д | [Kong et al., 2016] |
| 2016 | М, 28 | Вьетнам | Франция | нет | выздоровел | [Gauthier et al., 2016] |
| 2016 | М, 31 | Вьетнам | Франция | нет | выздоровел | [Gauthier et al., 2016] |
| 2017 | М, 55 | Лаос, Камбоджа | Оман | нет | умер | [Tamtami et al., 2017] |

Сокращения: СД – сахарный диабет, ХБП – хроническая болезнь почек; ХЗЛ – хроническое заболевание легких, ИБС – ишемическая болезнь сердца, ТК – терапия кортикостероидами; А – алкоголизм; н/д – нет данных

Для дальнейшего анализа данных мы посчитали целесообразным выделить 5 возрастных групп: I – дети до 15 лет, II – 16 – 44 года, III – 45 – 54 года, IV – 55 – 64 и V – свыше 65 лет, для 4 случаев данные по возрасту отсутствовали (Таблица 12). Наибольший процент от заболевших путешественников (26,4%) составила группа II со средним возрастом 30 лет, а наименьший среди взрослых (20,7%) – группа V (свыше 65 лет), группа III (45 – 54 года) – 21,5%, группа IV (55 – 64 года) – 25%.

Проведенный регрессионный анализ показал отсутствие статистически достоверной зависимости количества заболевших от возраста ($t = 0,36$, $p = 0,7458$). Это несколько отличается от ситуации непосредственно в эндемичных по мелиоидозу странах. Так, по данным Национального бюро эпидемиологического надзора МЗ Таиланда, наиболее высокий уровень заболеваемости приходится на возрастные группы старше 55 лет.

Таким образом, для людей, посещающих эндемичные регионы, зависимость степени риска развития мелиоидоза от возраста не прослеживается.

Во всех возрастных группах, кроме детской, подавляющее большинство пациентов (около 80%) составили представители мужского пола. Соотношение между заболевшими мужчинами и женщинами среди заболевших путешественников составило приблизительно 4:1 (Таблица 12), что отмечалось и ранее [Saidani et al., 2015; Dan et al., 2015]. Тогда как гендерное соотношение на эндемичных территориях составляет около 3:2 в странах ЮВА [Rammaert et al., 2011; Maude et al., 2012] и 7:3 – в Австралии [Currie et al., 2010].

Таблица 12 – Распределение заболевших (завозные случаи) по возрастным группам и показатели летальности в зависимости от возраста и наличия факторов риска

| Возрастные группы | | Соотношение полов М/Ж (%) | Число заболевших (из них с факторами риска; нет данных) | Доля от общего числа заболевших (%) | Летальность (%) | | | |
|-------------------|--------------|---------------------------|---|-------------------------------------|-----------------|---------------------------|--------------------|------------------------------|
| | | | | | Общая по группе | С наличием факторов риска | Без факторов риска | Нет данных по факторам риска |
| I | До 15 лет | 25/75 | 4(0; 1) | 3,3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| II | 16 – 44 года | 78/22 | 32 (10; 6) | 26,4 | 12,5 | 6,25 | 3,13 | 3,13 |
| III | 45 – 54 года | 84/16 | 26(15; 4) | 21,5 | 15,4 | 11,55 | 3,85 | 0 |
| IV | 55 – 64 года | 90/10 | 30(18; 3) | 24,8 | 10 | 6,7 | 3,3 | 0 |
| V | Свыше 65 лет | 80/20 | 25(13; 3) | 20,7 | 16 | 8 | 4 | 4 |
| Нет данных | | н/д | 4(0; 4) | 3,3 | 25 | н/д | н/д | 25 |
| По всем группам | | 82/18 | 121 (56; 21) | 100 | 13,2 | 6,6 | 4,1 | 2,5 |

Поскольку до 80% пациентов с мелиоидозом в эндемичных регионах имеют один или несколько предрасполагающих факторов риска развития заболевания, высказывались предположения, что мелиоидоз является оппортунистической инфекцией с маловероятным развитием заболевания у ранее здорового человека [Currie et al., 2010]. Однако, следует принимать во внимание, что на этих террито-

риях наряду с *B. pseudomallei* широко распространены сходные по антигенной структуре (по отдельным антигенам идентичные) близкородственные буркхолдерии [Anuntagool et al., 1998]. И у людей, родившихся и выросших в непосредственном контакте с этой микрофлорой, как правило, формируется определенный уровень иммунитета, что подтверждается данными о высокой серопозитивности в отношении *B. pseudomallei* детей в Таиланде [Kanaphun et al., 1993] и недавними данными о перекрестной реактивности сывороток здоровых людей с *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* и BTCV [Rongkard et al., 2020].

В исследуемой выборке предрасполагающие факторы имели 46,3% неавтохтонных заболевших мелиоидозом, а по другим выборкам (1982–2015 гг. и 1968 – 2015 гг.) – эта доля была либо меньше (37,5%) [Dan et al., 2015], либо выше (64,3%) [Saidani et al., 2015], в среднем – 49,4%. Статистически достоверного влияния наличия предрасполагающих заболеваний на риск заражения мелиоидозом, как и в случае возраста, не выявлено ($t = 1,24$, $p = 0,3040$). То есть, риск развития мелиоидоза при посещении эндемичных регионов для имеющих предрасполагающие факторы и здоровых людей равновероятен.

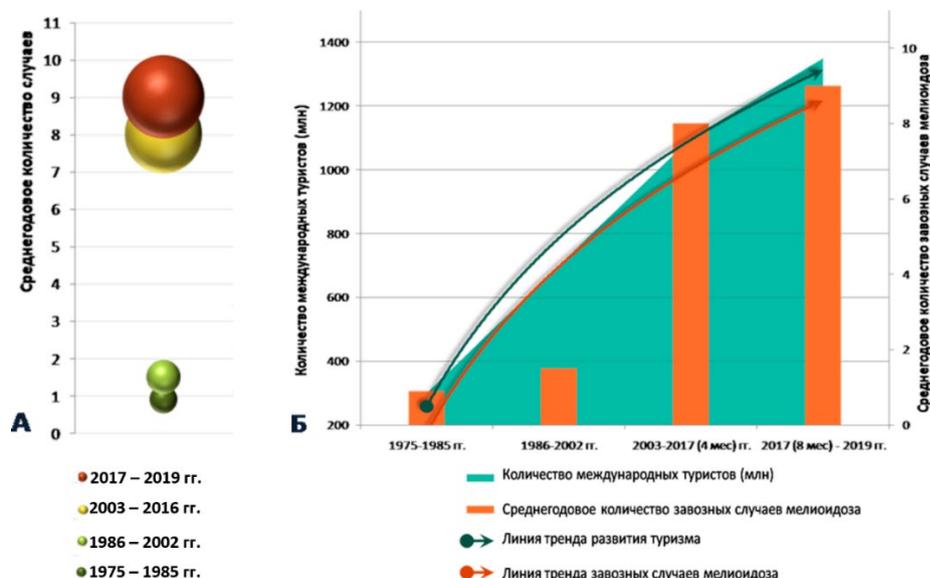
Однако наличие предрасполагающих факторов риска, прежде всего сахарного диабета, значительно влияет на исход заболевания. В нашем исследовании летальность среди пациентов, имевших факторы риска, была в 1,6 раза выше (6,6% против 4,1%), чем среди ранее здоровых, независимо от возрастных групп. Похожее соотношение зафиксировано при анализе влияния факторов риска на летальность от мелиоидоза в Малайзии (41,46% против 23,81%) [Hassan et al., 2010]. Общий показатель летальности в исследованной выборке заболевших составил 13,2%, что значительно ниже среднего уровня летальности от мелиоидоза в Северо-Восточном Таиланде (приблизительно 40%) и сопоставимо с 14% в Австралии [Wiersinga et al., 2012]. Очевидно, что значительно более низкий процент летальности среди путешественников обусловлен доступностью своевременной диагностики и адекватной терапии инфекции.

2.5.1.3 Анализ связи между трендом развития международного туризма и динамикой случаев заноса мелиоидоза

Подавляющее большинство проанализированных случаев заболеваний мелиоидозом в странах умеренного климата являются завозными: только для трех заболевших (США) отсутствует история посещений эндемичных регионов. Интересно отметить, что за последние 15 лет, по сравнению с предшествующим аналогичным периодом, значительно увеличилось количество случаев завоза инфекции (120 случаев). Так, по данным N. Saidani за 1986-2002 годы зафиксировано только 22 случая, среди которых подавляющее большинство (85,7%) имели начало в традиционно эндемичной Юго-Восточной Азии и были отмечены первые случаи заражения на территориях, ранее эндемичными не считавшимися: по одному случаю из Шри-Ланка, Бангладеш, Индии, Карибских островов и Сьерра Леоне [Saidani et al., 2015]. За период с 2017 г. по 2019 г. опубликованы сообщения о 28 завозных случаях мелиоидоза [Katanami et al., 2017; Gylfe et al., 2017; Guzmán et al., 2018; Alwarthan et al., 2018; Lübbert et al., 2018; Yuan et al., 2019; Donahue et al., 2019; Brosh-Nissimov et al., 2019; Meraj et al., 2019; Ebbers et al., 2019; Merrick et al., 2019 и др.], что подтверждает тенденцию к увеличению количества случаев заноса инфекции на неэндемичные территории (Рисунок 13).

Регулярная регистрация завозных случаев мелиоидоза (без учета случаев инфекции среди ветеранов, участвовавших в военных действиях на территории Юго-Восточной Азии) началась с конца 1970-х годов, что совпадает с интенсификацией международного туризма в направлении Азиатско-Тихоокеанского региона. 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. Корреляционный анализ зависимости количества завозных случаев мелиоидоза в разные временные периоды от общего числа международных туристов в эти же периоды с высокой статистической достоверностью (коэффициент корреляции $R = 0,945$) показал связь между трендом развития международного ту-

ризма и возрастающей динамикой случаев заноса мелиоидоза в неэндемичные страны мира (Рисунки 13, 15).



А – среднегодовое количество заноса мелиоидоза в неэндемичные страны мира
Б – динамика развития международного туризма и завозных случаев мелиоидоза

Рисунок 13 – Связь между трендом развития международного туризма и возрастающей динамикой случаев заноса мелиоидоза в неэндемичные регионы

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. По-прежнему нет ни одного зарегистрированного случая импорта инфекции из Австралии (Таблица 13, Рисунок 14).

Таблица 13 – Распределение завозных случаев мелиоидоза по регионам заражения

| Географический регион | Случаи заражения | |
|-------------------------------|------------------|---------------|
| | 2003–2017 гг. | 1986–2002 гг. |
| Юго-Восточная Азия | 75 (62,5 %) | 16 (85,7 %) |
| Восточная Азия | 2 (1,7 %) | – |
| Южная Азия | 7 (5,8 %) | 3 (13,6 %) |
| Северная Америка | 7 (5,8 %) | – |
| Центральная Америка | 4 (3,3 %) | – |
| Карибские острова | 9 (7,5 %) | 1 (4,5 %) |
| Южная Америка | 2 (1,7 %) | – |
| Западная Африка | 5 (4,2 %) | 1 (4,5 %) |
| Восточная Африка и Мадагаскар | 2 (1,7 %) | – |
| Океания | 1 (0,8 %) | – |
| Более одного региона | 5 (4,2 %) | – |
| Нет данных | 1 (0,8 %) | – |

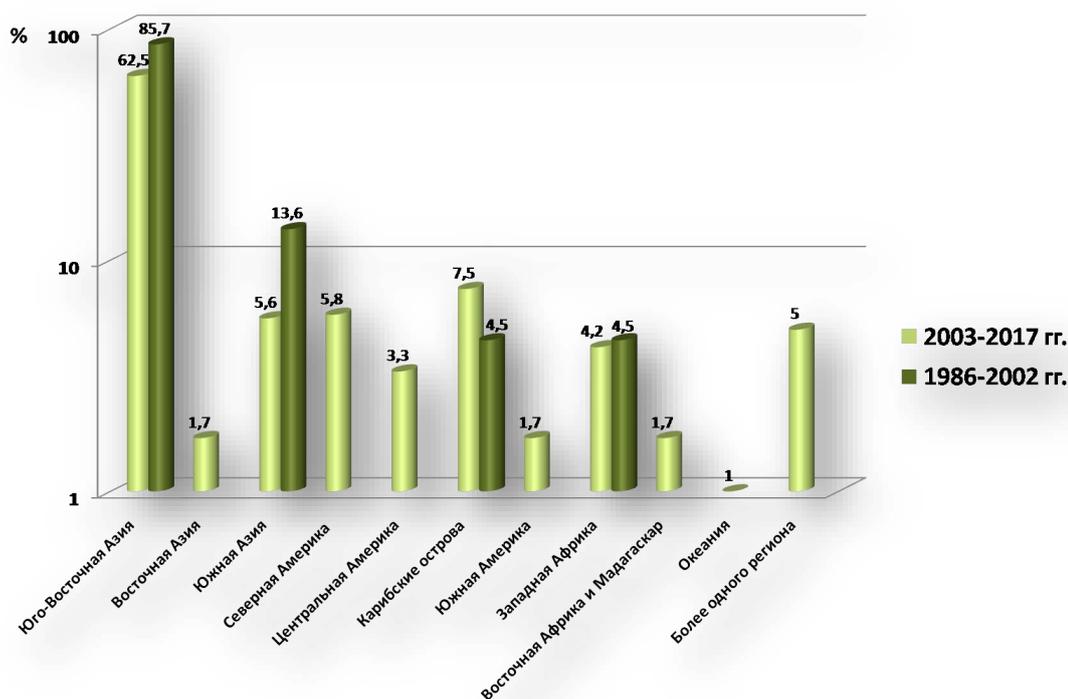


Рисунок 14 – Сравнение долей завозных случаев мелиоидоза по регионам инфицирования за два последовательных 15-летних периода

По долгосрочным прогнозам Всемирной Туристической организации при ООН (ЮНВТО, UNWTO), в мире ожидается значительное увеличение туристических потоков в регионы, эндемичные по мелиоидозу (Рисунок 16).

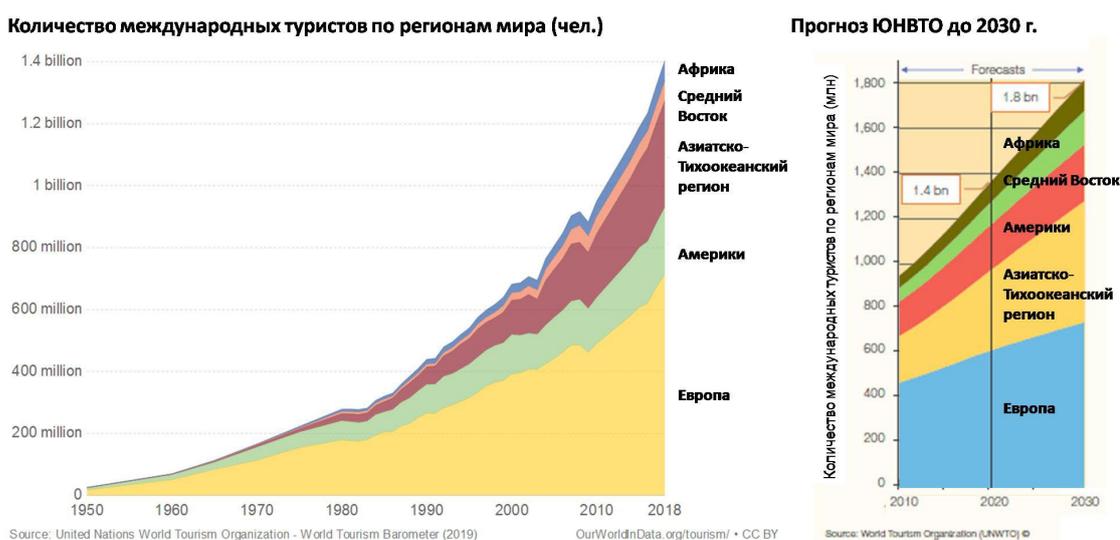


Рисунок 15 – Тенденция развития международного туризма (по данным ЮНВТО)

Эта тенденция наблюдается и в Российской Федерации. Так, по данным Росстата, за последние годы значительно увеличилось количество туристических поездок российских граждан, в том числе и в регионы, неблагополучные по мелиоидозу (Таблица 14). А по числу въезжающих туристов Россия входит в десятку лидеров в мире, при этом наибольший прирост стабильно составляют туристы из Азии и Латинской Америки.

Таблица 14 – Число туристических поездок граждан Российской Федерации в регионы, неблагополучные по мелиоидозу

| Страны | Число туристических поездок граждан РФ (тысяч) | | | | Изменение за 2015–2018 гг. |
|--------------------------|--|---------|---------|---------|----------------------------|
| | 2015 г. | 2016 г. | 2017 г. | 2018 г. | |
| Китай | 1 284 | 1 676 | 2 003 | 2 018 | + 57% |
| Таиланд | 675 | 867 | 1 094 | 1 173 | + 73% |
| Вьетнам | 321 | 392 | 512 | 531 | + 65% |
| Индия | 118 | 169 | 219 | 197 | + 67% |
| Доминиканская Республика | 36 | 132 | 230 | 217 | + 503% |

В связи с активным развитием в нашей стране международного туризма, в том числе и экологического, вероятность завоза в Россию мелиоидоза весьма высока. Однако в России к настоящему времени зарегистрирован единственный случай мелиоидоза, что, на наш взгляд, объясняется отсутствием у клиницистов настороженности в отношении этой инфекции. Как следствие, при дифференциальной диагностике острых лихорадочных состояний мелиоидоз, как правило, не рассматривается, а неправильный диагноз может иметь фатальные последствия для больного. Кроме того, в высокую категорию риска попадают сотрудники клинических лабораторий, поскольку регламентированный для таких лабораторий уровень биологической безопасности не предусматривает работу с возбудителями II группы патогенности (опасности).

Согласно рекомендациям, разработанным в итоге обсуждения проблем диагностики инфекции на 7-м Всемирном конгрессе по мелиоидозу (Бангкок, Таиланд, 2013) [Hoffmaster et al., 2015], диагноз «мелиоидоз» следует рассматривать

для каждого пациента с сепсисом, имеющего в эпидемиологическом анамнезе посещение эндемичных регионов, причем независимо от срока давности, поскольку латентный период инфекции может длиться десятилетиями [Ngauy et al., 2005]. Особенно это важно для лиц, имеющих предрасполагающие заболевания такие, как сахарный диабет, заболевания почек или иммуносупрессии.

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

ГЛАВА 3. ПРОБЛЕМЫ И ПУТИ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ БУРКХОЛЬДЕРИЙ КОМПЛЕКСА *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI*

Клинические проявления мелиоидоза многообразны, инфекция может поражать различные системы органов, имитируя многие другие заболевания [Илюхин В. И., 1983; Беляков В. Д., 1990; Dance, 1991], за что его часто называют «великим имитатором» [Yee et al., 1988]. Признаки и симптомы мелиоидоза могут варьировать и включают один или более из следующих симптомов: лихорадка, головная боль, миалгии, анорексия, грудная боль, абсцессы кожи, язвы, лимфадениты, респираторный синдром, абдоминальный дискомфорт, боли в суставах, абсцессы в легких, печени, селезенке или предстательной железе, неврологические синдромы, потеря веса [Currie, 2015]. Клинические проявления настолько разнообразны, что установить диагноз «мелиоидоз» на основании анализа комплекса симптомов заболевания крайне проблематично даже в эндемичных регионах [Hinjoy et al., 2018; Mukhopadhyay et al., 2018; Tauran et al., 2018; Trinh et al., 2018; Steinmetz et al., 2018; Bory et al., 2018]. Дифференциация между мелиоидозом и другими острыми и хроническими бактериальными инфекциями, включая туберкулез, часто невозможна [Peacock et al., 2008; Kingsley et al., 2016].

Достаточно давно известно, что заболеваемость сапом среди людей носит спорадический характер [Цветков Н. Е., 1947]. Зарегистрированные в последние два десятилетия случаи заболевания имели профессиональное происхождение, связанное с внутрилабораторным заражением. Такой случай описан в 2001 году у военного микробиолога в США. Культура, выделенная из крови и пунктата абсцесса печени, автоматической системой идентификации была определена с низкой дискриминацией между видами *Pseudomonas fluorescens* или *P. putida*. Больной в течение двух месяцев дважды безуспешно прошел курс лечения антибиотиками, неэффективными при сапе. Когда пациент уже находился в тяжелом состоянии на искусственной вентиляции легких, была проведена расширенная идентификация патогена методами газо-жидкостной хроматографии жирных кислот и

секвенирования гена 16S рРНК, что позволило правильно определить вид возбудителя как *B. mallei*. Назначение адекватной этиотропной терапии имипенемом и доксициклином привело к значительному улучшению состояния пациента [Srinivasan, 2001].

В странах умеренного климата сап является «забытой» инфекцией, а мелиоидоз все еще можно относить к «неизвестным», вследствие чего в клиниках нет настороженности в отношении данных заболеваний. В связи с этим, ключевую роль в установлении и (или) подтверждении диагнозов «сап» и «melioidosis» играет лабораторная диагностика.

В настоящее время диагностическим стандартом сапа и мелиоидоза у людей и животных продолжает оставаться выделение культуры.

В клинических случаях возбудитель может быть выделен из крови, мокроты, зева, поражений кожи, мочи, тканей и раневого экссудата. *B. pseudomallei* часто выявляют в мазках из зева и пробах мочи даже при отсутствии соответствующих симптомов. Для повышения вероятности выделения возбудителя рекомендуется проводить отбор нескольких разных проб, а не ограничиваться образцами из явного или предполагаемого очага инфекции.

Лабораторная диагностика заболевания сочетает применение разнообразных методов анализа фенотипических и молекулярно-генетических особенностей возбудителя. Стандартная схема лабораторной диагностики мелиоидоза и сапа, принятая в Российской Федерации (МУ 4.2.2787-10, МУ 4.2.2831-11), предусматривает проведение ускоренной диагностики, выделение возбудителей из объектов исследования (либо выявление специфических антигенов) и определение специфических антител в крови людей и животных (Рисунок 16).

Хотя выделение культуры и является диагностическим стандартом, необходимо принимать во внимание, что чувствительность культурального метода может быть ниже 60%, что, прежде всего, определяется свойствами штамма, а также зависит от метода отбора проб, используемых питательных сред и квалификации персонала [Limmathurotsakul et al., 2010; Hoffmaster et al., 2015].

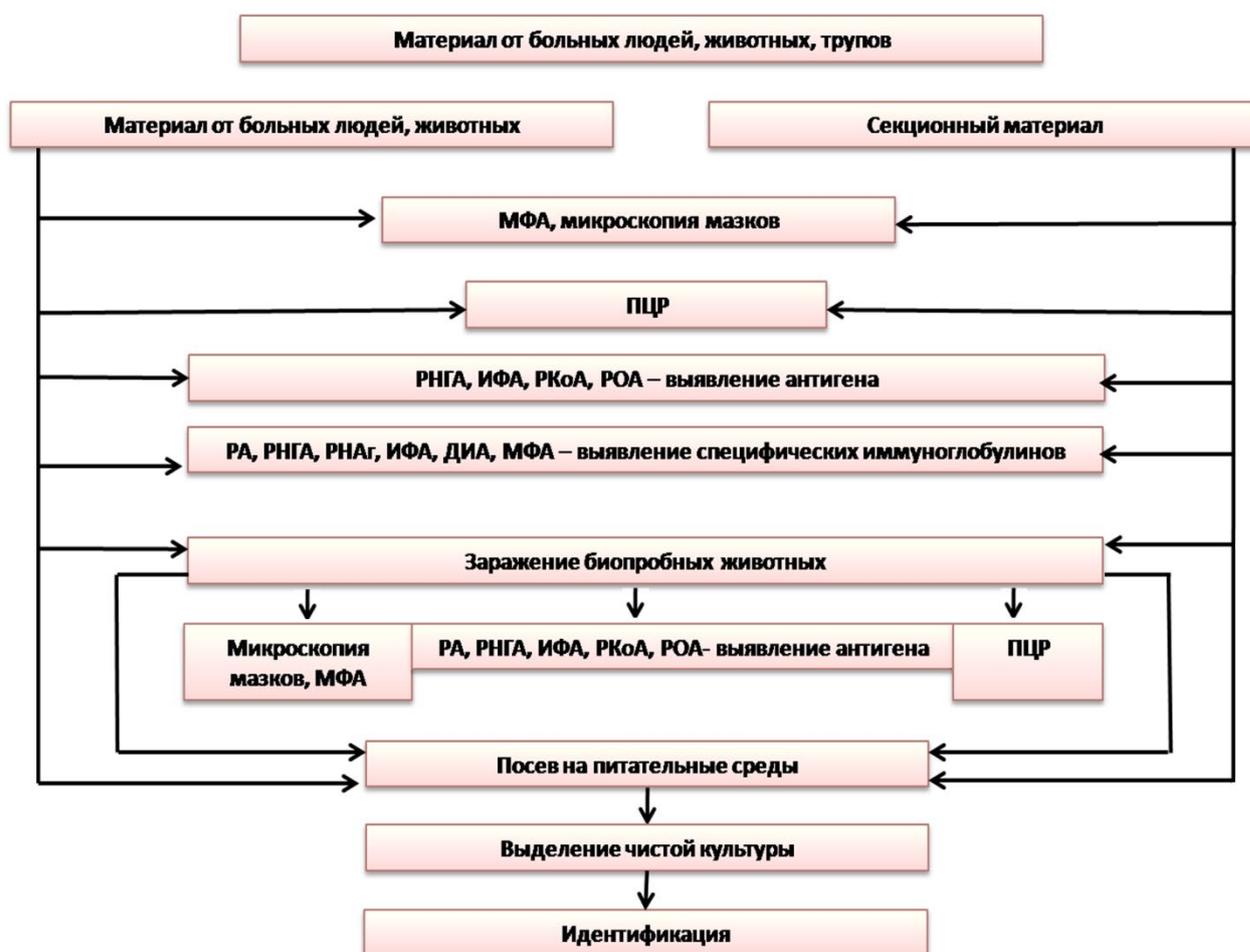


Рисунок 16 – Схема лабораторной диагностики мелиоидоза.

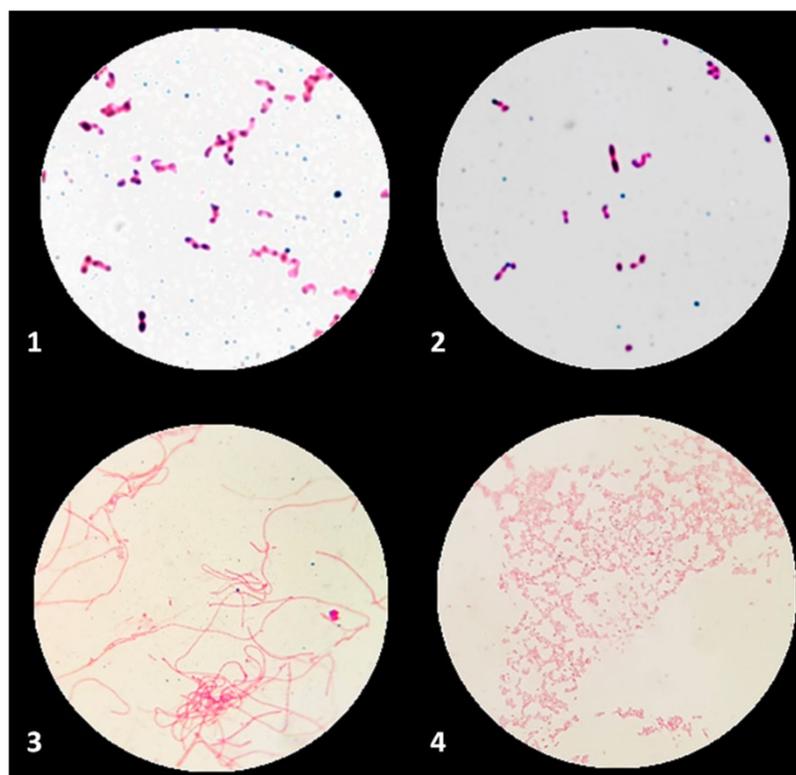
3.1 Классический микробиологический метод идентификации буркгольдерий комплекса *Burkholderia pseudomallei*

По морфологическим и биохимическим свойствам филогенетически близкие бактерии комплексов «*B. pseudomallei*» и «*B. cepacia*» обладают значительным сходством, что существенно затрудняет их дифференциацию классическими микробиологическими методами.

B. pseudomallei представляет собой прямые или слегка изогнутые грамотрециательные палочки с биполярным окрашиванием от 2 до 5 мкм в длину и от 0,4 до 0,8 мкм в диаметре. Форма клеток может варьировать от коккобацилл до нитевидных филаментов у штаммов, с повышенной резистентностью к беталактамам (Рисунок 17). В мазках непосредственно из клинического материала часто встре-

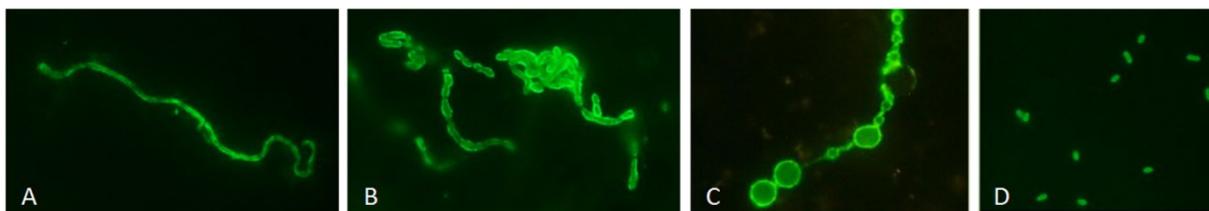
чаются нетипичные клетки, причем форма бактерий может отличаться в разных клинических образцах (Рисунок 18).

Известно, что биполярное окрашивание определяется накоплением крупных гранул полигидроксибутирата, уплотняющих цитоплазму на полюсах клетки, и у бактерий после длительного недостатка питательных веществ, а также у клеток из молодых культур биполярная морфология может отсутствовать. Ранее во всех русскоязычных руководствах постулировалось, что биполяры наблюдаются только в мазках непосредственно из клинического материала. Однако наши наблюдения и литературные данные показывают, что клинические, равно как и почвенные, штаммы возбудителя мелиоидоза имеют биполярную окраску и после длительного поддержания на полноценных питательных средах. Биполярность может быть не выражена или отсутствовать у клеток молодых культур или старых культур, культивированных при дефиците питательных веществ.



1 – типичная морфология, 2 – изогнутые,
3 – нитевидные, 4 – коккобациллярные формы микроба

Рисунок 17 – Световая микроскопия мазков *B. pseudomallei*, окрашенных по Граму (Фото автора)



А – гной, В – мокрота, С – моча, D – агаровая культура (для сравнения)

Рисунок 18 – Нетипичная морфология клеток *B. pseudomallei* в мазках из клинических образцов, окрашенных флюоресцирующими моноклональными антителами, по S. Tandhavanant [Tandhavanant et al., 2013]

Хронологически первым критерием оценки принадлежности культуры к роду *Burkholderia* является характер роста на плотных питательных средах. Возбудитель мелиоидоза хорошо растет на большинстве стандартных сред, издавая характерный запах затхлой земли (иногда его ассоциируют с запахом трюфелей).

В настоящее время отсутствуют коммерческие селективные среды, предназначенные специально для выделения *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Поскольку возбудитель сапа чувствителен к гентамицину, перечисленные ниже селективные среды, за исключением *B. ceracia*-агара, для его изоляции непригодны. Сравнительный анализ эффективности коммерческой среды *B. ceracia*-агар (MastDiagnosticsLtd., Reinfeld, Germany) и некоммерческих селективных сред Эшдауна (триптиказосоевый агар, содержащий 4 % глицерина, 4 мг/л гентамицина, 5 мг/л кристаллвиолета и 50 мг/л нейтрального красного) [Ashdown, 1979] и *B. pseudomallei* селективного агара (BPSA, Nileblueagar) (Standard Methods Agar (Tryptone Glucose Yeast Agar), мальтоза 4 г/л, нейтральный красный 100 мг/л, гентамицин 20 мг/л, нильский голубой 0,2 г/л) [Howard and Inglis, 2003] показал эквивалентную чувствительность всех трех сред для выделения *B. pseudomallei* [Peacock et al., 2005]. Ни одна из перечисленных сред не обладает специфичностью в отношении *B. pseudomallei*, что ожидаемо для среды *B. ceracia*-агар. По данным разработчиков, BPSA ингибирует неферментирующие нецелевые микроорганизмы такие, как *P. aeruginosa*, а также бактерии Всс [Howard and Inglis, 2003], по независимым данным, на этом агаре наблюдается рост штаммов *P.*

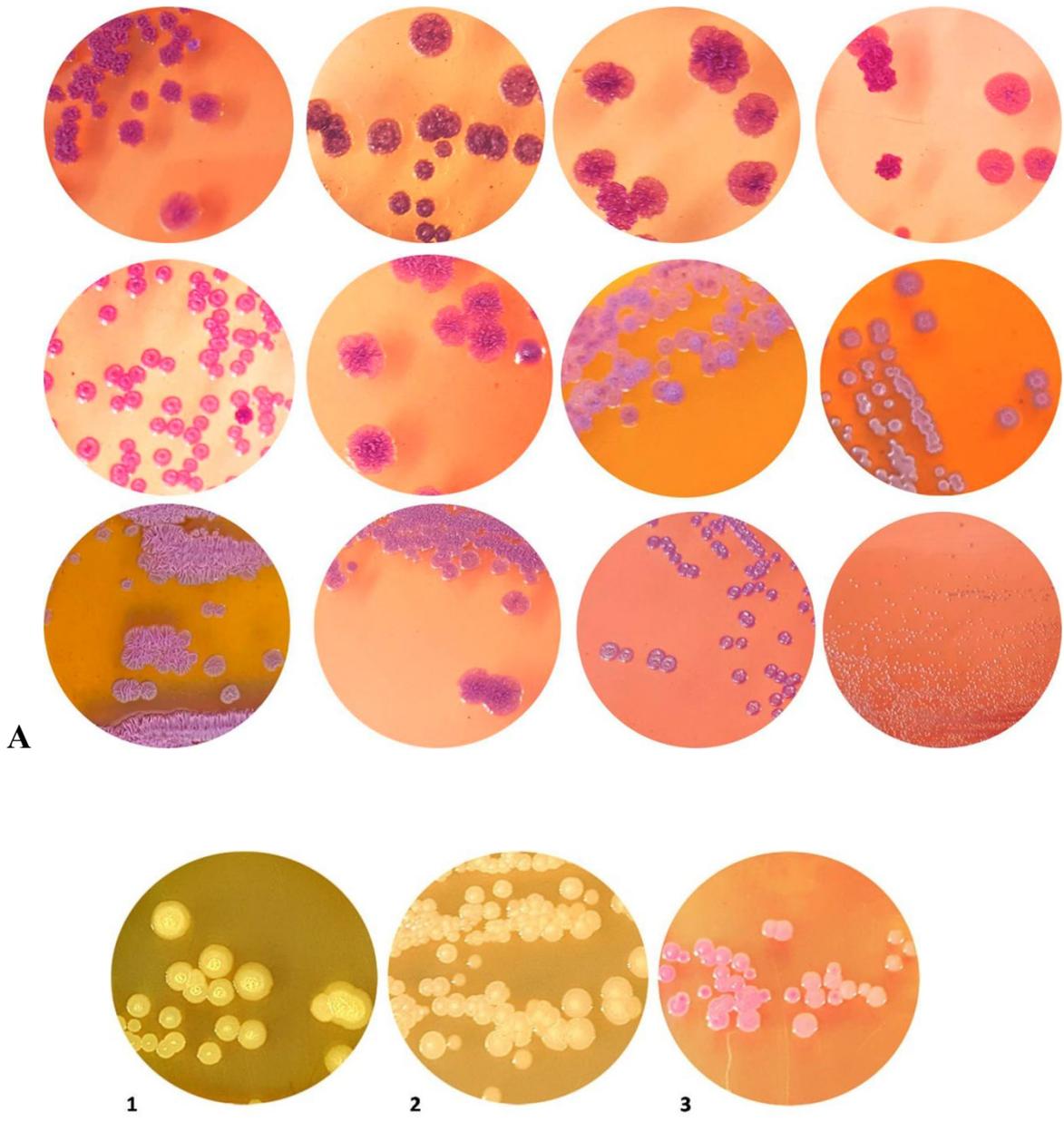
aeruginosa и *B. cepacia* [Peacock et al., 2005; Edler et al., 2017]. Агар Эшдауна, в отличие от двух других селективных сред, ингибирует рост микроскопических грибов [Peacock et al., 2005] и, в целом, обладает более высокой чувствительностью [Glass et al., 2009].

Селективные среды весьма полезны для выделения и предварительной идентификации *B. pseudomallei*. Но, принимая во внимание их ограничения в чувствительности, чтобы не пропустить культуру возбудителя, в исследование подозрительного материала следует включать использование неселективных сред.

На кровяном агаре, колумбийском агаре, L-агаре, агаре Мюллера-Хинтона, триптиказо-соевом агаре *B. pseudomallei* образует небольшие, гладкие полупрозрачные кремовые колонии, к 48 часам инкубации они достигают диаметра 1–3 мм и начинают диссоциировать (теряют прозрачность, становятся серовато-белыми с металлическим блеском, поверхность - шероховатая) (Рисунок 19 Б). В отдельных случаях появляются мукоидные колонии, иногда образуются микроколонии. При сливном росте наблюдается гладкий, слизистый, блестящий, непрозрачный налет, приподнимающийся над поверхностью агара, к концу вторых суток инкубации приобретающий шероховатость. R-форма – серовато-желтые непрозрачные колонии диаметром 2–4 мм с морщинистой поверхностью и неровным зубчатым краем. На агаре МакКонки колонии бесцветные или бледно-розовые, по мере старения культуры окраска становится более интенсивной (Рисунок 19 Б). Часто присутствует землистый запах.

Характерная, причем, весьма разнообразная (R-, S-, M- и переходные формы) морфология колоний возбудителя мелиоидоза, как и близкородственных буркхольдерий, на агаре Эшдауна редко формируется раньше третьих суток инкубации. Через 24 часа колонии мелкие, бледно-розовые; на вторые сутки розовато-фиолетовые, плоские; на третьи-четвертые сутки наблюдается прогрессия к образованию R-форм (сухие и морщинистые, сиренево-фиолетовые колонии). Для *B. pseudomallei* характерно присутствие на одной чашке разных морфотипов колоний: гладкие и блестящие, слизистые, обычно округлые с ровным краем или сухие с различными оттенками фиолетового цвета, имеющие разнообразные при-

чудливые формы (Рисунок 19 А). Все морфотипы колоний имеют металлический блеск разной интенсивности. Штаммы возбудителя с повышенной резистентностью к беталактамам на агаре Эшдауна могут образовывать медленно растущие микроколонии (менее 0,5 мм) (Рисунок 19 А).



Б

1

2

3

А. 96-часовые культуры, выращенные при 37°C на агаре Эшдауна;

Б. 72-часовые культуры, выращенные при 37°C: 1 – на триптиказо-соевом агаре, 2 – агаре Колумбия, 3 – агаре МакКоя

Рисунок 19 – Морфология роста штаммов *B. pseudomallei* (Фото автора)

Феномен морфологической диссоциации колоний у возбудителя мелиоидоза описан еще L. Nicholls в первой трети прошлого века [Nicholls, 1930]. Некоторые клинические штаммы, особенно выделенные из мокроты, демонстрировали значительные колониальные вариации, создавая впечатление смешанной культуры, однако все типы колоний имели типичный биохимический профиль возбудителя мелиоидоза [Dance et al., 1989]. К настоящему времени показано, что клинические штаммы *B. pseudomallei* способны образовывать несколько обратимых типов колоний, что связывают с адаптацией возбудителя к неблагоприятным условиям окружающей среды, в числе которых голодание, ограничение железа, дефицит кислорода, кислая среда, а также воздействие антибиотиков *in vivo* [Chantratita et al., 2009; Tandhavanant et al., 2010; Chantratita et al., 2011; Austin et al., 2015]. Интересно, что штаммы, способные формировать микроколонии, обладают повышенной адгезивностью к эукариотическим клеткам *in vitro* [Boddey et al., 2006].

Наиболее распространенные варианты колоний в R-форме имеют вид, нетипичный для грамотрицательных бактерий, вследствие чего *B. pseudomallei* может быть принята за постороннюю микрофлору. Это особенно актуально для микробиологических лабораторий эндемичных регионов, где отсутствует настороженность по отношению к этому возбудителю, а персонал не имеет соответствующего практического опыта [Hoffmaster et al., 2015].

Согласно классификации морфотипов колоний *B. pseudomallei*, предложенной N. Chantratita [Chantratita et al., 2007] на основании анализа морфологии роста штаммов, выделенных на высокоэндемичной территории Северо-Восточного Таиланда, выделено 7 основных морфотипов колоний, обозначенных римскими цифрами. По нашему мнению, такое обозначение неудобно в использовании, поскольку номер не дает представления о морфологии колоний. Кроме того, данная классификация не охватывает всего морфологического разнообразия *B. pseudomallei*. Так, при анализе вьетнамских штаммов мы обнаружили не описанный ранее морфотип, широко распространенный во вьетнамской популяции возбудителя мелиоидоза. В связи с этим 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 20). 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 C (“carnation”, «гвоздики») – складчатые колонии неправильной формы, возвышающиеся над агаровой поверхностью, похожие на махровые цветы; группа B (“button”, «пуговицы») – округлые, непрозрачные колонии с валиком по окружности, в отдельных случаях валик сегментирован; группа P (“pancake”, «блинчики») – округлые, тонкие, плоские, полупрозрачные колонии с центром разной степени выраженности или без него.

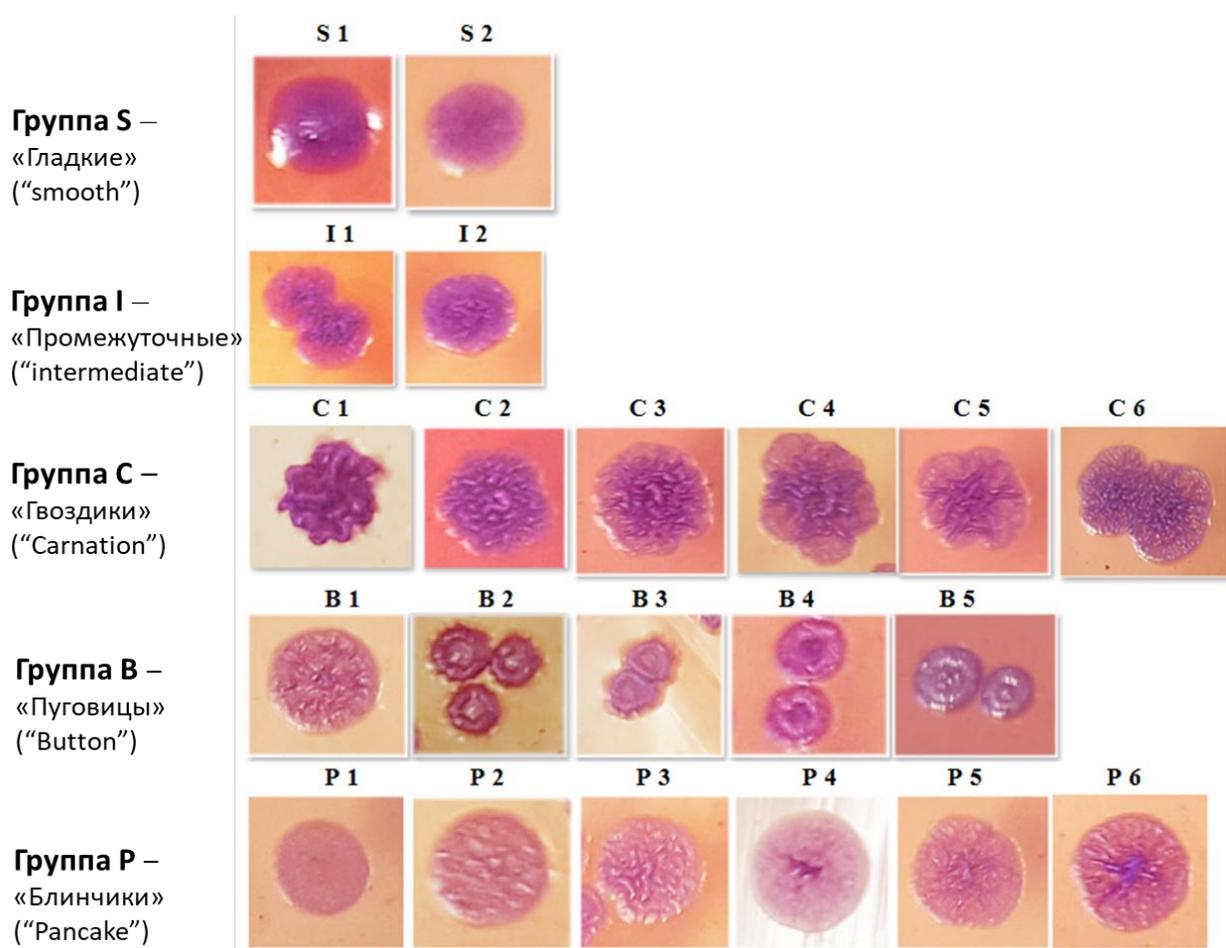


Рисунок 20 – Основные группы морфотипов *B. pseudomallei* (Фото автора)

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.

3.1.1 Морфологическая характеристика клеток Burkholderia pseudomallei из различных вариантов колоний

3.1.1.1 Алгоритм и методы исследования

Морфологические характеристики *B. pseudomallei* оценивали методами световой и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Препараты готовили из отличающихся по морфологии вариантов колоний: S – гладкие колонии, I – колонии промежуточного типа, P – «блинчики», B – «пуговицы» и C – «гвоздики».

Мазки для световой микроскопии обрабатывали стандартным способом и окрашивали по Граму. Для СЭМ взвеси бактериальных клеток предварительно инактивировали добавлением формальдегида до конечной концентрации 4% и последующей 24-часовой инкубацией при 37° С. Контроль на стерильность проводили высевом обработанных образцов на L агар и в L бульон (инкубация 48 часов при 37° С). Проба признавалась стерильной при отсутствии специфического роста по окончании срока инкубации. Обеззараженные взвеси троекратно отмывали от формалина 0,9% раствором NaCl. Подготовку инактивированных клеток *B. pseudomallei* для сканирующей электронной микроскопии проводили методом обезвоживания этанолом с последующей сушкой в критической точке без напыления токопроводящим слоем. Образцы просматривали на сканирующем электронном микроскопе с катодом с полевой эмиссией MIRA 3 LMH (Tescan, Brno, Czech Republic).

3.1.1.2 Микроморфология *Burkholderia pseudomallei*

Клетки колоний разных морфотипов выглядели полиморфными грамотрицательными палочками с биполярным окрашиванием, объединенные внеклеточным матриксом в цепочки различной длины. Интересно, что в мазках из гладких вариантов колоний цепочки были короче, чем у промежуточных и шероховатых вариантов. Также у S-форм присутствовало наибольшее количество отдельных клеток по сравнению с другими морфологическими вариантами, за исключением С1, у которого количество объединенных и свободных клеток было сопоставимым с S-формами (Рисунок 21). Возможно, это обусловлено более высокой чувствительностью внеклеточного матрикса гладких колоний к механическому воздействию при приготовлении мазков.

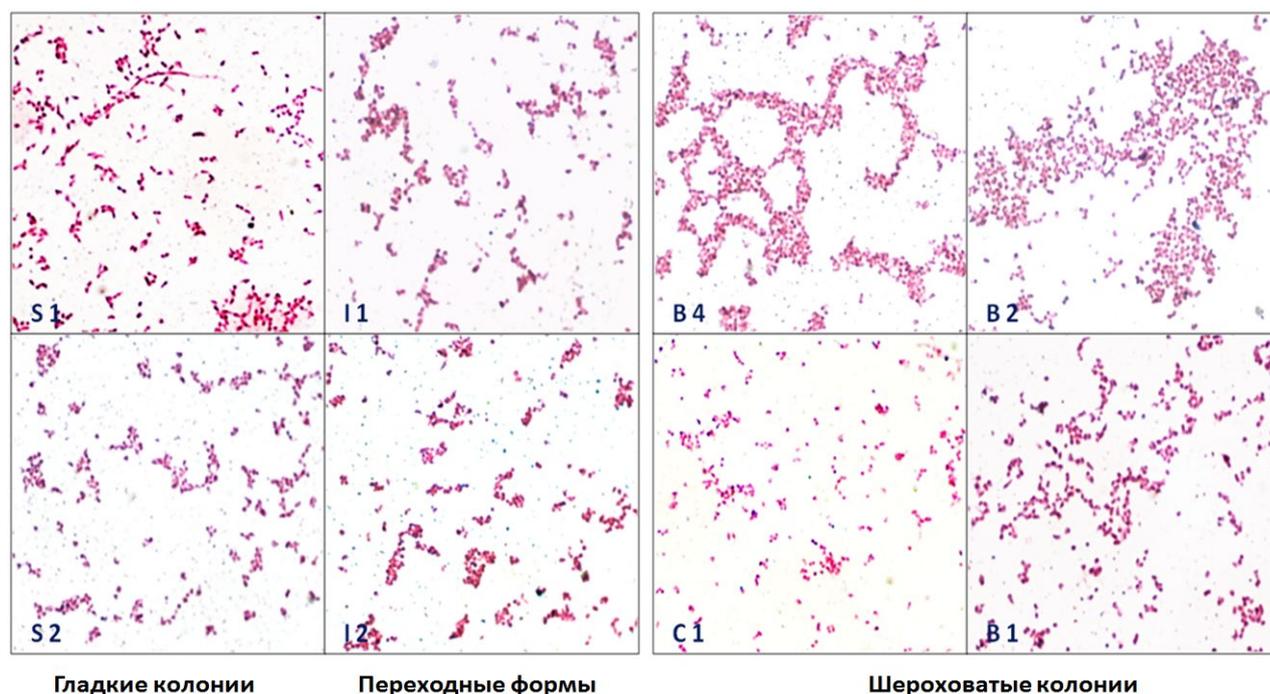
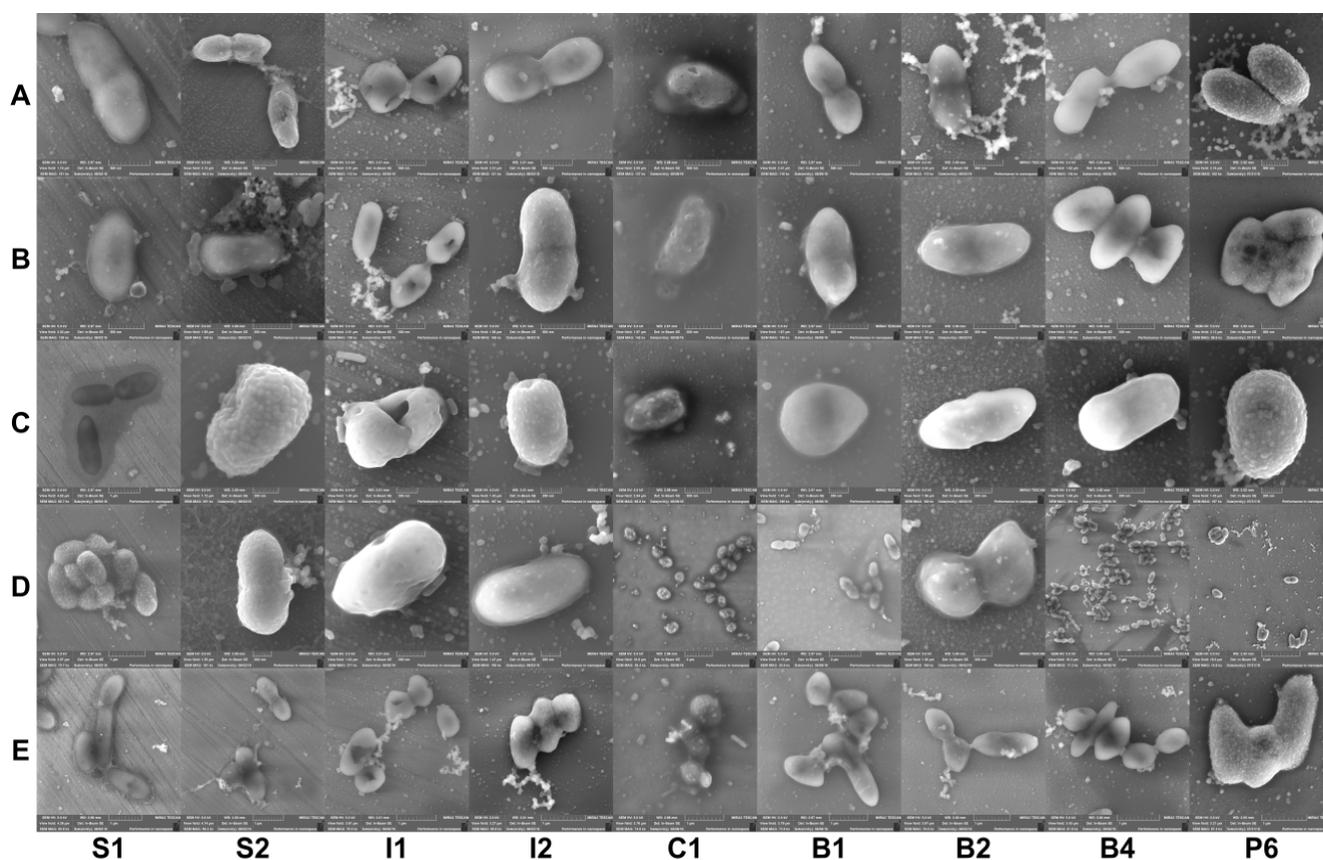


Рисунок 21 – Световая микроскопия мазков из колоний *B. pseudomallei* различных морфотипов, окраска по Граму (Фото автора)

3.1.1.3 Ультрамикроморфология *Burkholderia pseudomallei*

Для визуализации на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) отображали часть тех же колоний, что и для мазков по Граму. Результаты сканирующей электронной микроскопии показали значительное разнообразие клеточной морфологии по форме, структуре клеточной поверхности, размерам клеток как между разными, так и внутри одного морфотипа (Рисунок 22).



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

Рисунок 22 – Ультрамикроморфология клеток *B. pseudomallei* колоний различных морфотипов.

Клетки колоний морфотипов С1 и Р6, в отличие от остальных, оказались чувствительными к воздействию пучка электронов, что выражается в образовании темных вогнутых пятен на поверхности клетки (Рисунок 22, С1 – D, E; Р6 – B, E), увеличивающихся при экспозиции. Инвагинации клеточной поверхности в других случаях не являются таким артефактом, поскольку вид клеток при увеличении экспозиции не изменялся.

Способность *B. pseudomallei* к образованию колоний различных морфотипов считают одним из адаптивных механизмов минимизации рисков при изменении условий внешней среды за счет фенотипической гетерогенности внутри изогенной популяции бактерий.

Результаты сканирующей электронной микроскопии показали вполне ожидаемые отличия в морфологии клеток колоний различных морфотипов, но, что более интересно, клетки значительно отличаются между собой и внутри одной колонии. Присутствие в генетически идентичном потомстве единственной бактерии 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.

3.1.2 Биохимическая идентификация буркхольдерий комплекса *Burkholderia pseudomallei*

B. pseudomallei и *B. mallei* обладают каталазной активностью; цитохромоксидаза у *B. pseudomallei* всегда положительна, у *B. mallei* – варьирует; при 42 °С *B. mallei* не растет, *B. pseudomallei* растет, как и большинство штаммов *B. ceracia* и *Ralstonia*; *B. mallei* – неподвижен, *B. pseudomallei* – подвижен. Все виды буркхольдерий, включая *B. pseudomallei*, глюкозу окисляют, но не ферментируют.

Видовую идентификацию культур, обладающих признаками рода *Burkholderia*, проводят в соответствии с действующими МУ 4.2.2787-10, оценивая признаки, перечисленные в Таблице 15.

Таблица 15 – Биохимические признаки, оцениваемые для видовой идентификации патогенных буркхольдерий

| Тесты | <i>B. pseudomallei</i> | <i>B. thailandensis</i> | <i>B. mallei</i> | <i>B. cepacia</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
|---|------------------------|-------------------------|------------------|-------------------|----------------------|
| Окисление: глюкозы | + | + | + | + | + |
| фруктозы | + | + | + | + | + |
| ксилозы | + | + | - | + | + |
| лактозы | + | + | + | + | - |
| мальтозы | + | + | + | + | - |
| Аргининдигидролаза | + | + | + | - | + |
| Лизиндекарбоксилаза | - | - | - | + | - |
| Орнитиндекарбоксилаза | - | - | - | ± | - |
| Желатиназа | + | + | + | ± | + |
| Денитрификация | + | + | + | - | ± |
| Гидролиз эскулина | ± | ± | - | - | - |
| Число жгутиков | ≥1 | ≥1 | - | ≥1 | 1 |
| Рост при 42 °С | + | + | - | ± | + |
| Полимиксин | R | R | R | R | S |
| Гентамицин | R | R | S | R | S |
| Рост при 2,5% NaCl | - | - | - | + | + |
| Ассимиляция L-арабинозы | - | + | - | + | - |
| Наличие пигмента | - | - | - | ± | + |
| Г+Ц моль% | 69 | 68 | 69 | 67 | 67 |
| R-колонии на агаре | ± | - | - | - | - |
| Вирулентность для з/х | + | - | + | - | - |
| Примечание: (+) и (-) наличие или отсутствие признака у 90% и более штаммов данного вида. | | | | | |

Штаммы *B. pseudomallei* способны расти в анаэробных условиях в присутствии нитрата; окисляют, но не ферментируют глюкозу; обладают аргининдигидролазной активностью, не способны к декарбоксилированию лизина и орнитина; устойчивы к 50 мкг/мл полимиксина В и 4 мкг/мл гентамицина. Необходимо принимать во внимание, что резистентность к гентамицину присуща не всем штаммам возбудителя мелиоидоза [Simpson et al., 1999; Trunck et al., 2009]. Около 80% клинических штаммов из штата Саравак (Малазийское Борнео) чувствительны к гентамицину [Podin et al., 2014]. По нашим данным, часть штаммов *B. pseudomallei*, выделенных от больных в провинциях Quảng Bình и Quảng Trị Вьетнама были в разной степени чувствительны к гентамицину (из 18 протестированных штаммов один – чувствительный, два – умеренно чувствительны).

Ключевое значение для идентификации возбудителя мелиоидоза имеет тест на ассимиляцию L-арабинозы, которую *B. pseudomallei* не усваивает в отличие от близкородственного вида *B. thailandensis*, а также *B. ceracia*.

В 1989 году D. Dance предложил простую систему презумптивной идентификации клинических изолятов *P. pseudomallei* (*B. pseudomallei*), включающую оценку морфологии роста на агаре Эшдауна, клеток при окраске по Граму, чувствительности к гентамицину и колистину, тест на цитохромоксидазу, показавшую 100% специфичность на исследованном наборе штаммов [Dance et al., 1989]. Однако в то время еще не был выделен отдельный вид *B. thailandensis*, который данная схема не дифференцирует от *B. pseudomallei*. Позже K. Hodgson предложил для дифференциации от штаммов комплекса «*ceracia*» вместо колистина использовать амоксициллин-клавуланат, к которому *B. pseudomallei*, за редким исключением, чувствительна, а большая часть штаммов *B. ceracia* устойчивы [Hodgson et al., 2009]. В настоящее время для презумптивной идентификации возбудителя в эндемичных регионах рекомендована и широко используется комбинированная схема, включающая тестирование чувствительности к гентамицину, колистину и амоксициллин-клавуланату [Trinh et al., 2018].

Как описанная выше презумптивная идентификация, так и коммерческие биохимические тесты не дифференцируют виды *B. thailandensis* и *B. pseudomallei*.

3.2 Особенности применения автоматизированных биохимических систем для идентификации буркхольдерий комплекса «*Burkholderia pseudomallei*»

Активное использование в лабораторной практике полуавтоматических и автоматических биохимических анализаторов и систем идентификации типа Vitek, API и ряда других значительно расширило возможности классического бактериологического метода идентификации культур возбудителей.

Учитывая длительность и сложность обычной бактериологической идентификации *B. pseudomallei*, возможность использования различных коммерческих биохимических тестов с этой целью изучается достаточно давно. Необходимо отметить, что при рассмотрении пригодности тех или иных полу- и автоматизированных систем биохимической идентификации следует учитывать ряд принципиальных моментов: возможность их эксплуатации в соответствии с требованиями биологической безопасности, определенными действующими санитарно-эпидемиологическими правилами; наличие в базе данных референтных биохимических профилей для объектов идентификации; информацию о вероятности ошибочного определения видовой принадлежности возбудителя. Неверная идентификация *B. pseudomallei* или *B. mallei* как бактериальных видов III группы патогенности является серьезной проблемой, представляя угрозу для жизни больного, а также создавая значительный риск непреднамеренного заражения лабораторного персонала.

Идентификационные системы с открытыми реакционными лунками типа API (bioMérieux) или RapID (Remel, в настоящее время – ThermoScientific) достаточно давно вызывают определенное беспокойство в плане опасности образования аэрозоля [Inglis et al., 1998; Glass and Popovic, 2005], но, поскольку эти системы предусматривают визуальный учет результатов, эта проблема снимается при использовании бокса безопасности III класса. Наиболее безопасной, на наш взгляд, является автоматизированная система Vitek 2 (bioMérieux): заполнение карт происходит за счет плавного повышения давления в камере, что исключает

образование аэрозоля, герметизация карты происходит в этой же камере. Стенки камеры металлические и доступны для обработки дезинфектантами, в камеру может быть помещен переносной УФ-облучатель.

3.2.1 Оценка характеристик систем биохимической идентификации в аспекте их пригодности для идентификации возбудителей мелиоидоза и сапа

Оценку характеристик наиболее распространенных систем биохимической идентификации на наличие в перечне определяемых видов микроорганизмов возбудителей сапа и мелиоидоза проводили по опубликованным источникам. Результаты поиска приведены в Таблице 16.

Таблица 16 – Наличие идентификационных профилей для возбудителей сапа и мелиоидоза в базах данных систем идентификации

| Система | Производитель | Наличие в базе данных | |
|---------------------------|---------------------|----------------------------|----------------------------------|
| | | <i>Burkholderia mallei</i> | <i>Burkholderia pseudomallei</i> |
| API 20E | bioMerieux | - | + |
| API 20NE | bioMerieux | - | + |
| Crystal E/NF | BD, BectonDickinson | - | + |
| GEN III MicroLog M System | Biolog | + | + |
| RapID™ NF PLUS System | ThermoScientific | - | + |
| Автоматические системы | | | |
| Phoenix NID | BD, BectonDickinson | - | - |
| Vitek GNI | bioMerieux | + | + |
| Vitek 2 GN | bioMerieux | + | + |

Анализ литературы показал, что ни одна из имеющихся в настоящее время систем биохимической идентификации не обладает в отношении возбудителей сапа и мелиоидоза 100%-й специфичностью. Буркхольдерии комплекса «*B. pseu-*

domallei» обладают значительной внутривидовой вариабельностью целого ряда биохимических признаков, что является причиной их ошибочной идентификации приблизительно в 14%. Часть штаммов *B. pseudomallei* ошибочно идентифицируются как *B. cepacia* [Zong et al., 2012; Podin et al., 2013], *Chromobacterium violaceum* [Inglis et al., 1998; Glass and Popovic, 2005; Amornchai et al., 2007], *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. alcaligenes* [Glass and Popovic, 2005; Amornchai et al., 2007] или *Aeromonas salmonicida*, *Shewanella putrefaciens*, *Comamonas testosteroni* [Glass and Popovic, 2005]; а *B. mallei* – как *B. cepacia* и *Stenotrophomonas maltophilia* [Glass and Popovic, 2005]; а около 30% штаммов *B. cepacia* – как *B. pseudomallei* [Kiratisin et al., 2007]. Обобщенные данные о корректности определения видовой принадлежности возбудителя мелиоидоза наиболее распространенными коммерческими системами биохимической идентификации приведены в Таблице 17.

Следует учитывать, что исследования, в которых число корректно идентифицированных системами API штаммов приближается к 100%, проводились на уже идентифицированных штаммах с неоднократным повторением тестов в сомнительных случаях [Dance et al., 1989; Amornchai et al., 2007]. При намеренном однократном тестировании процент корректно идентифицированных коллекционных штаммов снижался [Glass and Popovic, 2005]. Высказывались мнения, что межлабораторные расхождения в результатах эффективности идентификации *B. pseudomallei* обусловлены значительной вариабельностью биохимических профилей у штаммов различного географического происхождения, а также сложностью интерпретации результатов тестов ассимиляции сахаров. Причем, для возбудителя сапа последнее особенно актуально: вследствие его замедленного роста имеются проблемы при оценке утилизации сахаров, декарбоксилазной активности и гидролиза ряда субстратов [Glass and Popovic, 2005].

Таблица 17 – Корректность идентификации *B. pseudomallei* при помощи различных коммерческих систем

| Система | Происхождение штаммов | Число (доля) корректно идентифицированных штаммов/число протестированных | Источник |
|----------------------------|------------------------|--|---------------------------|
| API 20 NE | Таиланд | 390(98%)/400 | [Dance et al., 1989] |
| API 20 NE | Австралия | 101(98%)/103 | [Lowe et al., 2002] |
| API 20 NE | Австралия | 102(99%)/103 | [Lowe et al., 2002] |
| API 20 NE | Австралия | 26(70%)/ 37 | [Inglis et al.,2005] |
| API 20 NE | различное | 35(60%)/58 | [Glass and Popovic, 2005] |
| API 20 NE | Таиланд/различное | 792(99%)/800 | [Amornchai et al.,2007] |
| API 20 NE | Сингапур | 52(87%)/60 | [Deepak et al., 2008] |
| RapID NF Plus | различное | 0(0%)/58 | [Glass and Popovic, 2005] |
| RapID NF Plus ¹ | Австралия | 189(99.47%)/190 | [Maloney et al., 2014] |
| Phoenix | Сингапур | 0(0%)/47 | [Koh et al., 2003] |
| Phoenix | Таиланд | 0(0%)/1 | [Weissert et al.,2009] |
| Vitek 2 ID-GNB | Австралия | 19(19%)/103 | [Lowe et al., 2002] |
| Vitek 2 GN | Австралия | 102(99%)/103 | [Lowe et al., 2006] |
| Vitek 2 GN | Сингапур | 47(78%)/60 | [Deepak et al., 2002] |
| Vitek 2 GN | Австралия | 146(98%)/149 | [Podin et al., 2013] |
| Vitek 2 GN | Малайзия, штат Сабах | 22(88 (+4)* %)/25 | [Podin et al., 2013] |
| Vitek 2 GN | Малайзия, штат Саравак | 23(53 (+12)* %)/43 | [Podin et al., 2013] |

¹ RapID NF Plus с обновленной базой данных
 (+N)* - процент штаммов, идентифицированных с низкой дискриминацией между *B. serasia* и *B. pseudomallei* и не включенных авторами в число корректно идентифицированных

При исследовании обширной коллекции клинических и экологических штаммов из разных регионов с использованием API 20 NE было идентифицировано 16 биохимических профилей возбудителя мелиоидоза, причем подавляющее большинство штаммов представлены двумя – 1156576 (453 изолятов) и 1156577 (264 изолятов), далее по распространенности – профили 1556576, 1156574 и 1556577 (39, 11 и 10 изолятов, соответственно), остальные профили в этом исследовании были представлены 1-3 штаммами [Amornchai et al., 2007].

Примечательно, что, несмотря на наличие в панели API 20 NE теста на утилизацию арабинозы, 32% штаммов *B. thailandensis* были идентифицированы как *B. pseudomallei* [Amornchai et al., 2007], несмотря на то, что *B. pseudomallei* и *B. mallei*, в отличие *B. thailandensis*, не способны к ассимиляции L-арабинозы – ключевой признак, дифференцирующий эти виды. В связи с этим, учитывая вероятность ошибочной идентификации возбудителя мелиоидоза, а также ошибочного определения *B. thailandensis* как *B. pseudomallei*, результаты биохимической идентификации изолятов *Burkholderia* spp., полученные с помощью API 20 NE, необходимо верифицировать.

Исследование возможности использования биохимической системы RapID NF Plus для идентификации *B. pseudomallei*, проведенное специалистами CDC (США), показало ее непригодность для этих целей [Glass and Popovic, 2005]. Однако в 2013 году был обновлен электронный справочник ERIC (версия 1.0.771, 0613) и добавлены профили для идентификации *B. pseudomallei*. Тестирование австралийских штаммов возбудителя мелиоидоза, проведенное S. Maloney при помощи набора RapID NF Plus, показало хороший результат, идентифицировав 99,47% известных штаммов как *B. pseudomallei* в качестве первого (из 190 штаммов 60 идентифицированы как виды *B. pseudomallei* и *B. ceracia*, 2 – как *B. pseudomallei* и *Shewanella putrefaciens*) или единственного варианта [Maloney et al., 2014].

Среди полностью автоматизированных идентификационных систем наиболее распространенной и исследованной в отношении эффективности определения *B. pseudomallei* является Vitek 2. Ранее использовавшиеся для идентификации

возбудителя мелиоидоза карты ID-GNB с флюорометрической детекцией имели неудовлетворительные результаты по этому показателю – 19% [Lowe et al., 2002]. Введение в практику идентификационных карт GN с колориметрическим методом детекции в комплексе с обновлением программного обеспечения системы Vitek 2 привело к определенному повышению эффективности идентификации в пределах 53-98%. Это подтверждает предположение P. Lowe, что низкий процент корректно идентифицированных штаммов *B. pseudomallei* изначально был связан с особенностями программного обеспечения системы Vitek 2, определяющего несовершенный способ дискриминации [Lowe et al., 2002].

Интересно, что пограничные значения эффективности идентификации возбудителя мелиоидоза на Vitek 2 были получены в одном исследовании, проведенном интернациональным коллективом из Австралии и Малайзии. В трех исследованных группах 98% австралийских штаммов и 88% штаммов из штата Сабах (Малазийское Борнео) были идентифицированы корректно, тогда как корректная идентификация штаммов, выделенных в штате Саравак (Малазийское Борнео) составила 53%. Часть малазийских штаммов из обеих групп (4 и 12%, соответственно) были идентифицированы с низкой дискриминацией между *B. ceracia* и *B. pseudomallei*. Эти штаммы авторы, в отличие от S. Maloney и других, не включили в процент идентифицированных. Остальные штаммы были определены как *B. ceracia* [Podin et al., 2013].

Необходимо отметить, что 80% штаммов из Саравак имеют генетические особенности, фенотипически выражающиеся в отсутствии признака, считающегося видовым – резистентности к гентамицину, причем все гентамицин-чувствительные штаммы, за одним исключением, относятся к сиквенс-типу ST881 [Podin et al., 2014], уникальному для малазийских штаммов [<https://pubmlst.org/bpseudomallei/>]. Ранее штамм, относящийся к ST881, был выделен в Китае от больного, работавшего перед этим в Малайзии, и также был ошибочно определен системой Vitek 2 GN как *B. ceracia* [Zong et al., 2012; Podin et al., 2014]. Поэтому неудивительно, что в исследовании, описанном Y. Podin, программное обеспечение системы Vitek 2 выполнило идентификацию с перемен-

ным успехом [Podin et al., 2014], в зависимости от степени представленности в базе данных тех или иных атипичных вариантов биохимических профилей штаммов *B. pseudomallei*.

В целом процент корректной идентификации возбудителя мелиоидоза системами API 20 NE и Vitek 2 GN является сопоставимым и составляет в среднем 87 и 86%, соответственно.

B. pseudomallei обладает обширным внутривидовым генетическим разнообразием, что отражается на фенотипах штаммов. Достаточно давно показано, что ряд признаков, имеющих диагностическое значение, в частности окисление рамнозы, ксилозы, целлобиозы, реакция денитрификации, продукция уреазы и гидролиз эскулина характеризуются заметной вариабельностью [Илюхин, 1983; Илюхин, 2012; Palleroni, 1984]. Так, способность к денитрификации отсутствует у 14 % штаммов возбудителя мелиоидоза, а к гидролизу эскулина – у 43% [Gillard, 1968], у 43 % штаммов выявлена уреазная активность [Gillard, 1976].

Как упоминалось выше, при помощи системы API 20 NE, включающей 20 тестов, у разных штаммов возбудителя было выявлено 16 вариантов биохимических профилей. Карты GN для Vitek 2 содержат 64 теста, что значительно увеличивает число вариантов профилей. Вероятно, что эффективность идентификации возбудителя мелиоидоза в значительной степени зависит от полноты представленности в идентификационных базах данных редких биохимических профилей атипичных штаммов. Так, Y. Podin показала, что биохимические профили корректно идентифицированных системой Vitek 2 GN штаммов статистически достоверно отличаются от таковых у штаммов, идентифицированных как *B. ceracia*, в частности, по активности β -N-ацетилглюкозаминидазы (тест BNAG) и β -N-ацетил-галактозаминидазы (тест NAGA): 88% правильно идентифицированных изолятов *B. pseudomallei* показали положительный тест BNAG, тогда как среди ошибочно идентифицированных – только 13% (показатели по тесту NAGA авторы не привели) [Podin et al., 2013]. То есть большинство малазийских штаммов из штата Саравак имели нераспространенные среди ранее исследованных штаммов

возбудителя биохимические особенности, что отразилось на корректности определения их видовой принадлежности.

Таким образом, проблема точной идентификации атипичных штаммов возбудителя мелиоидоза, а также его дифференциация от филогенетически близких представителей рода по-прежнему актуальна.

3.3 Анализ биохимических профилей коллекционных штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа

3.3.1 Штаммы и методы исследования

С целью совершенствования схемы лабораторной диагностики мелиоидоза и сапа нами был проведен анализ особенностей биохимических профилей коллекционных штаммов *Burkholderia* spp., влияющих на корректность видовой идентификации буркхольдерий комплекса «*B. pseudomallei*».

Было исследовано 13 штаммов *B. mallei* и 41 штамм *B. pseudomallei* из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Штаммы культивировали на агаре Luria (HiMedia, Индия) и триптиказосоевом агаре – ТСА (HiMedia, Индия) при 37° С.

Идентификацию бактерий проводили на автоматическом бактериологическом анализаторе Vitek 2 Compact с использованием карт GN, предназначенных для идентификации клинически значимых ферментирующих и неферментирующих грамотрицательных бактерий (bioMérieux, Франция). Подготовку культур для идентификации проводили в соответствии с инструкцией производителя с использованием реагентов и оборудования, поставляемого компанией bioMérieux.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета PRIMER v. 7.0.10 (Primer-E, Великобритания) с использованием алгоритмов непараметрического многомерного анализа [Clarke, 1993].

Группирование штаммов проводили методом неметрического многомерного шкалирования (nMDS – non-metric multidimensional scaling) евклидовых расстояний матриц сходства биохимических профилей. Достоверность отличий между группами оценивали по показателю стресса: $\leq 0,05$ – очень высокая степень достоверности, 0,1 – высокая, 0,2 – хорошая, 0,3 – недостоверное отличие между анализируемыми группами.

Статистическую значимость различий биохимических профилей исследованных штаммов оценивали методом непараметрического анализа сходства (ANOSIM), на основании вычисления показателя «ANOSIM statistic R» – различие средних рангов между группами (r_B) и внутри групп (r_W) по формуле: $R = (r_B - r_W) / (N(N-1) / 4)$. Значение R, близкое к 1, означает высокую степень отличия оцениваемых параметров, R, близкое к 0, – сходство. Статистическую значимость показателя R дополнительно оценивали с помощью показателя P, определяемого при помощи перестановочного теста – случайного распределения выборочных результатов по группам и вычисления показателя R-статистики для каждой перестановки. P-значение – это доля R-статистик перестановочных групп, которые равны или больше исходной R-статистики. Значение P менее 0,05 свидетельствует о статистической значимости различий.

Средний вклад каждого теста в общее отличие биохимических профилей между кластерами исследованных штаммов определяли путем анализа процента подобия (SIMPER). Алгоритм SIMPER позволяет оценить средний процент влияния индивидуальных переменных на общее несходство между объектами в матрице несходства Брея-Кертиса (количественная оценка разницы между образцами, вычисляемая по формуле $d_{ij} = \sum (x_{ik} - x_{jk}) / \sum (x_{ik} + x_{jk})$, где i и j – объект, k – признак). Алгоритм SIMPER позволяет идентифицировать основные факторы различий между кластерами, обнаруженные методом ANOSIM.

3.3.2 Результаты идентификации коллекционных штаммов *Burkholderia* spp. системой Vitek 2 GN

Проведенная идентификация 41 коллекционного штамма *B. pseudomallei* и 13 штаммов *B. mallei* показала результаты, сопоставимые с ранее опубликованными, определив 36 штаммов (90%) возбудителя мелиоидоза как *B. pseudomallei* и 12 штаммов (92%) возбудителя сапа как *B. mallei* в качестве первого или единственного варианта с варьирующей степенью достоверности (Таблица 18). Вероятность идентификации для большинства штаммов *B. pseudomallei* составила 90–99% (31 штамм), 5 штаммов были идентифицированы с низкой дискриминацией между *B. pseudomallei* и видами комплекса *B. ceracia* с примечанием в протоколе «высоковирулентный организм». Последнее, по нашему мнению, очень важно при идентификации неизвестных изолятов, поскольку персонал лаборатории будет информирован о возможном присутствии в пробе высокопатогенного возбудителя. Остальные 4 штамма были отнесены к видам комплекса *B. ceracia* с достоверностью «отличная» (3 штамма) и «очень хорошая идентификация» (1 штамм) (Таблица 18), что в клинических случаях создает реальную угрозу жизни больного, а также безопасности работников лабораторной службы.

Восемь штаммов *B. mallei*, выделенных в странах Восточной Европы, Индии и Индонезии, были идентифицированы с вероятностью 90–99%, четыре штамма из Югославии (2), Монголии (1) и неизвестного происхождения система VITEK 2 GN определила с низкой дискриминацией между видами *B. mallei* и *Sphingomonas paucimobilis*, еще один монгольский штамм идентифицирован некорректно как *B. pseudomallei* (Таблица 18).

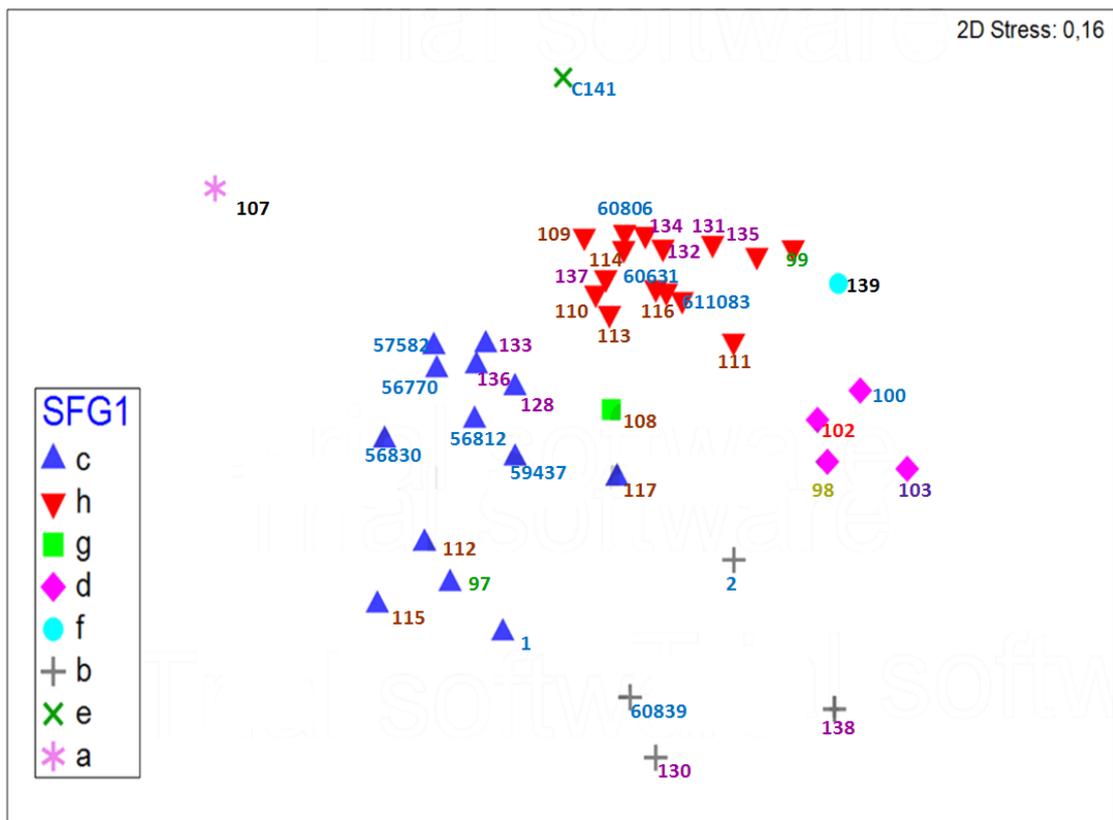
Таблица 18 – Распределение штаммов *Burkholderia* spp. в соответствии с уровнем вероятности идентификации анализатором Vitek 2

| Штамм | Число штаммов | Место выделения | Источник выделения | Вероятность идентификации (%), вид |
|---|---------------|-----------------|------------------------------|---|
| <i>B. pseudomallei</i> | | | | |
| 1, 2, C-141, 56770, 56812, 56830, 57576, 57582, 59437, 60631, 60806, 611083 | 12 | Вьетнам | Клинический изолят | 95-99 <i>B. pseudomallei</i> |
| Tchad 97 | 1 | Чад | | 99 <i>B. pseudomallei</i> |
| Iran Terre 98 | 1 | Иран | | 93 <i>B. pseudomallei</i> |
| Ward 108, Roos 109, Pearce 110, Mahek 111, Coopek 112, Skanmandri 113, Snider 114 | 7 | Австралия | | 90-99 <i>B. pseudomallei</i> |
| 12/115, 13/116 | 2 | Австралия | почва | 96-98 <i>B. pseudomallei</i> |
| Goat isolate 17/117 | 1 | Австралия | изолят от животного | 98 <i>B. pseudomallei</i> |
| 128, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 139 | 8 | Таиланд | клинический изолят | 97-99 <i>B. pseudomallei</i> |
| Niamay 99 | 5 | Нигер | клинический изолят | Низкая дискриминация <i>B. pseudomallei</i> / <i>B. cepacia</i> |
| Dalat 100 | | Вьетнам | | |
| Shigan 102 | | Китай | | |
| 135 | | Таиланд | | |
| Cheval du jardin 103 | | Франция | изолят от животного | |
| PJ 54/107 | 4 | нет данных | нет данных | Отличная / очень хорошая <i>B. cepacia</i> group |
| 130, 138 | | Таиланд | клинический изолят | |
| 60839 | | Вьетнам | клинический изолят | |
| <i>B. mallei</i> | | | | |
| «Иванович», P-1 | 4 | Югославия | Лошадь | 99 <i>B. mallei</i> |
| «Будапешт» | | Венгрия | | |
| 5584 | | Россия | | |
| 11, 8 | 2 | Польша | | 95-96 <i>B. mallei</i> |
| | | нет данных | | |
| Bogor-37 | 2 | Индонезия | | 90-91 <i>B. mallei</i> |
| Mukuwar-11 | | Индия | | |
| «Zagreb», Z-12 | 2 | Югославия | | Низкая дискриминация <i>B. mallei</i> / <i>S. paucimobilis</i> |
| Ц-5 | 2 | Монголия | | |
| 10230 | | нет данных | | |
| Ц-4 | 1 | Монголия | 90 <i>B. pseudomallei</i> | |

3.3.3 Непараметрический многомерный анализ биохимических профилей коллекционных штаммов *Burkholderia* spp.

С использованием метода nMDS выявлена явная дистанция между ошибочно и корректно идентифицированными штаммами (показатель стресса 0,16) и исследованные штаммы распределились *B. pseudomallei* по 8 кластерным группам (Рисунок 23).

Кластеры А, F, E и G содержали по одному штамму. В кластер В вошли три неверно идентифицированных как *B. serapia* штамма (2 из Таиланда и 1 из Вьетнама) и один корректно идентифицированный вьетнамский штамм. Кластер С объединил 13 штаммов, представляющих три весьма удаленных друг от друга региона: Центральную Африку (Чад), Австралию и Юго-Восточную Азию (Таиланд и Вьетнам).



Цветом цифр номеров штаммов обозначены регионы их происхождения: **Австралия**, **Вьетнам**, **Таиланд**, **Африка**, **Китай**, **Франция**, **Иран**.

Рисунок 23 – Распределение штаммов *B. pseudomallei* по показателям сходства биохимических профилей

Среди 15 штаммов кластера Н, включающий 12 были идентифицированы как *B.pseudomallei* с вероятностью 98-99%, один – с вероятностью 90% и два штамма с низкой дискриминацией как *B.pseudomallei/B.ceracia*. Этот кластер, также, как и кластер С, оказался неоднородным относительно происхождения штаммов. В кластер D сгруппированы 4 штамма – из Ирана, Вьетнама, Китая и Франции, причем три последних были определены с низкой дискриминацией между видами *B.pseudomallei* и *B.ceracia* (Таблица 19).

Непараметрический анализ сходства (ANOSIM) показал достоверные отличия биохимических профилей между всеми сформированными кластерами (R 0,903, P 0,001), а также между кластерами с преимущественно корректно (С и Н) и ошибочно (В) идентифицированными штаммами (ANOSIM R 0,836, P 0,001).

Средние показатели сходства биохимических профилей штаммов внутри кластеров варьировали от 74,42 до 87,55%. Интересно, что этот показатель оказался выше у кластера Н, содержащего два штамма, определенных с низкой дискриминацией, чем у кластера С, штаммы которого имели среднюю вероятность идентификации более 98%. Ожидаемо самый низкий процент сходства оказался у штаммов кластера В (Таблица 19).

Таблица 19 – Кластерное распределение штаммов *B. pseudomallei* по результатам nMDS анализа сходства биохимических профилей

| № штамма | Место выделения | Идентифицирован как вид(ы) | Достоверность/ Вероятность(%) | Кластер | Среднее сходство внутри кластера (%) |
|----------|-----------------|----------------------------|-------------------------------|---------|--------------------------------------|
| 107 | нет данных | <i>B. ceracia</i> complex | отличная | А | |
| 60839 | Вьетнам | <i>B. ceracia</i> complex | отличная | В | 74,42 |
| 130 | Таиланд | <i>B. ceracia</i> complex | отличная | В | |
| 138 | Таиланд | <i>B. ceracia</i> complex | очень хорошая | В | |
| 2 | Вьетнам | <i>B. pseudomallei</i> | 97 | В | |
| 97 | Чад | <i>B. pseudomallei</i> | 99 | С | 81,01 |
| 112 | Австралия | <i>B. pseudomallei</i> | 99 | С | |

Таблица 19 – (Продолжение)

| № штамма | Место выделения | Идентифицирован как вид(ы) | Достоверность/ Вероятность (%) | Кластер | Среднее сходство внутри кластера (%) |
|----------|-----------------|------------------------------------|--------------------------------|---------|--------------------------------------|
| 115 | Австралия | <i>B. pseudomallei</i> | 96 | C | |
| 117 | Австралия | <i>B. pseudomallei</i> | 98 | C | |
| 128 | Таиланд | <i>B. pseudomallei</i> | 99 | C | |
| 133 | Таиланд | <i>B. pseudomallei</i> | 97 | C | |
| 136 | Таиланд | <i>B. pseudomallei</i> | 99 | C | |
| 1 | Вьетнам | <i>B. pseudomallei</i> | 98 | C | |
| 56770 | Вьетнам | <i>B. pseudomallei</i> | 99 | C | |
| 56812 | Вьетнам | <i>B. pseudomallei</i> | 99 | C | |
| 56830 | Вьетнам | <i>B. pseudomallei</i> | 98 | C | |
| 57582 | Вьетнам | <i>B. pseudomallei</i> | 97 | C | |
| 59437 | Вьетнам | <i>B. pseudomallei</i> | 99 | C | |
| 98 | Иран | <i>B. pseudomallei</i> | 93 | D | 87,23 |
| 100 | Вьетнам | <i>B. pseudomallei/ B. cepacia</i> | низкая дискриминация | D | |
| 102 | Китай | <i>B. pseudomallei/ B. cepacia</i> | низкая дискриминация | D | |
| 103 | Франция | <i>B. pseudomallei/ B. cepacia</i> | низкая дискриминация | D | |
| C-141 | Вьетнам | <i>B. pseudomallei</i> | 95 | E | |
| 139 | Таиланд | <i>B. pseudomallei</i> | 96 | F | |
| 108 | Австралия | <i>B. pseudomallei</i> | 99 | G | |
| 99 | Нигер | <i>B. pseudomallei/ B. cepacia</i> | низкая дискриминация | H | 87,55 |
| 109 | Австралия | <i>B. pseudomallei</i> | 98 | H | |
| 110 | Австралия | <i>B. pseudomallei</i> | 99 | H | |
| 111 | Австралия | <i>B. pseudomallei</i> | 90 | H | |
| 113 | Австралия | <i>B. pseudomallei</i> | 99 | H | |
| 114 | Австралия | <i>B. pseudomallei</i> | 98 | H | |
| 116 | Австралия | <i>B. pseudomallei</i> | 98 | H | |
| 131 | Таиланд | <i>B. pseudomallei</i> | 99 | H | |
| 132 | Таиланд | <i>B. pseudomallei</i> | 99 | H | |
| 134 | Таиланд | <i>B. pseudomallei</i> | 98 | H | |
| 135 | Таиланд | <i>B. pseudomallei/ B. cepacia</i> | низкая дискриминация | H | |
| 137 | Таиланд | <i>B. pseudomallei</i> | 98 | H | |
| 60631 | Вьетнам | <i>B. pseudomallei</i> | 96 | H | |
| 60806 | Вьетнам | <i>B. pseudomallei</i> | 99 | H | |
| 611083 | Вьетнам | <i>B. pseudomallei</i> | 98 | H | |

Результаты оценки среднего вклада отдельных тестов в общее несходство между кластерами штаммов, идентифицированными корректно и с низкой дискриминацией, выявили значительную роль результатов следующих тестов: BNAG, PHOS, dCEL, ProA, TyrA и NAGA, суммарный вклад которых в показатель несходства между кластерами С, Н и D составил 45% (Таблица 20). При этом у штаммов, идентифицированных с низкой дискриминацией между видами *B. pseudomallei* и *B. cepacia*, тесты на активность D-целлобиазы и тирозинариламидазы были положительными в 100% случаев, на активность L-пролинариламидазы – в 80% случаев, при этом в 80 % случаев тесты активности β -N-ацетилгалактозаминидазы и в 60 % случаев β -N-ацетилглюкозаминидазы и фосфатазы были отрицательными. То есть, достоверность идентификации снижалась в случае отсутствия активности фосфатазы, β -N-ацетилглюкозаминидазы, N-ацетилгалактозаминидазы при одновременном присутствии активных D-целлобиазы, тирозинариламидазы и L-пролинариламидазы (Таблица 20).

Таблица 20 – Средний вклад отдельных биохимических тестов в общее несходство биохимических профилей кластеров *B. pseudomallei*

| Тест | Доля вклада (%) | | | | | Число (%) штаммов, показавших | | |
|-----------------------|-------------------------------------|------------------------|-------|-------|------|-------------------------------|----------|---------|
| | С-Н | С-D | Н-D | С-В | Н-В | «+» результат теста | | |
| | | | | | | идентифицированные | | |
| корректно (32 штамма) | с низкой дискриминацией (5 штаммов) | некорректно (4 штамма) | | | | | | |
| PHOS | 3,44 | 7,40 | 9,76 | 8,75 | 6,77 | 25 (78,1%) | 2 (40%) | 1 (25%) |
| dCEL | 4,16 | 7,89 | 6,83 | 10,73 | 5,86 | 10 (31,3%) | 5 (100%) | 3 (75%) |
| NAGA | 4,32 | 5,82 | 7,08 | 7,86 | 5,94 | 24 (75,0%) | 1 (20%) | 0 (0%) |
| BNAG | < 3 | 9,25 | 9,76 | 4,4 | < 3 | 28 (87,5%) | 2 (40%) | 3 (75%) |
| ProA | 7,94 | 8,49 | < 5,5 | < 4,4 | 5,44 | 18 (56,3%) | 4 (80%) | 0 (0%) |
| TyrA | 7,42 | 7,84 | < 5,5 | < 4,4 | 5,44 | 20 (62,5%) | 5 (100%) | 0 (0%) |

Обозначения: PHOS – фосфатаза; dCEL - D-целлобиаза; NAGA - β -N-ацетилгалактозаминидаза; BNAG - β -N-ацетилглюкозаминидаза; ProA - L-пролинариламидаза; TyrA – тирозинариламидаза

Максимальный средний вклад в общий показатель биохимического несходства между корректно и некорректно идентифицированными кластерами штаммов возбудителя мелиоидоза имели три теста: NAGA, PHOS, и dCEL (Таблица 20). При этом сравнительный анализ биохимических профилей внутри кластера В, включающего три ошибочно и один корректно идентифицированный штамм, показал единообразные результаты по указанным тестам как у верно, так и у ошибочно идентифицированных штаммов: все штаммы имели активную D-целлобиазу и не проявляли фосфатазной и β -N-ацетилгалактозаминидазной активностей (Таблица 21).

Несмотря на незначительный вклад в общее несходство между кластерами, внутри кластера В наибольшее влияние на корректность идентификации оказали тесты ProA и TyrA. Все ошибочно определенные штаммы показали по этим тестам отрицательный результат. Тогда как у верно определенного штамма *B. pseudomallei* 2, также, как и у 58% и 64,5% от общего числа штаммов, идентифицированных корректно, имелась активность данных ферментов (Таблица 21).

Результаты тестов BNAG, AGLTr, dMAL, dMAN, dSOR и CIT у некорректно идентифицированных штаммов оказались переменными при отсутствии очевидного влияния на правильность идентификации (Таблица 19).

Таблица 21 – Биохимические особенности штаммов *B. pseudomallei* кластера В

| Штамм | dCEL | NAGA | PHOS | BNAG | AGLTr | dMAL | dMAN | ProA | TyrA | dSOR | CIT |
|---|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|-----|
| <i>B. pseudomallei</i> 2 | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | - |
| <i>B. pseudomallei</i> 138 | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + |
| <i>B. pseudomallei</i> 130 | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>B. pseudomallei</i> 60839 | + | - | - | + | - | + | + | - | - | + | - |
| Обозначения: dCEL - D-целлобиазу; NAGA - β -N-ацетилгалактозаминидаза; PHOS - фосфатаза; BNAG - β -N-ацетилглюкозаминидаза; AGLTr - глутамилариламидаза; dMAL - D-мальтоза; dMAN - D-маннит; ProA - L-пролинариламидаза; TyrA - тирозинариламидаза; dSOR - D-сорбит; CIT - цитрат | | | | | | | | | | | |

Анализ показателей сходства биохимических профилей штаммов *B. mallei* методом nMDS распределил исследованные штаммы *B. mallei* по 6 группам, показатель стресса, равный 0,05, свидетельствовал о значительной дистанции между сформированными группами. Штаммы *B. mallei* «Иванович», P-1, «Будапешт», 5584 и 11 с вероятностью идентификации 96-99% составили одну группу «b»; корректно идентифицированные штаммы Bogor 37, Muksuwar 11 и Ц 5, определенный с низкой дискриминацией между видами *B. mallei* и *S. paucimobilis*, вошли в группу «f»; в группу «c» вошли корректно идентифицированный *B. mallei* 8 и 10230, определенный с низкой дискриминацией. Остальные 3 штамма образовали индивидуальные группы (Рисунок 24).

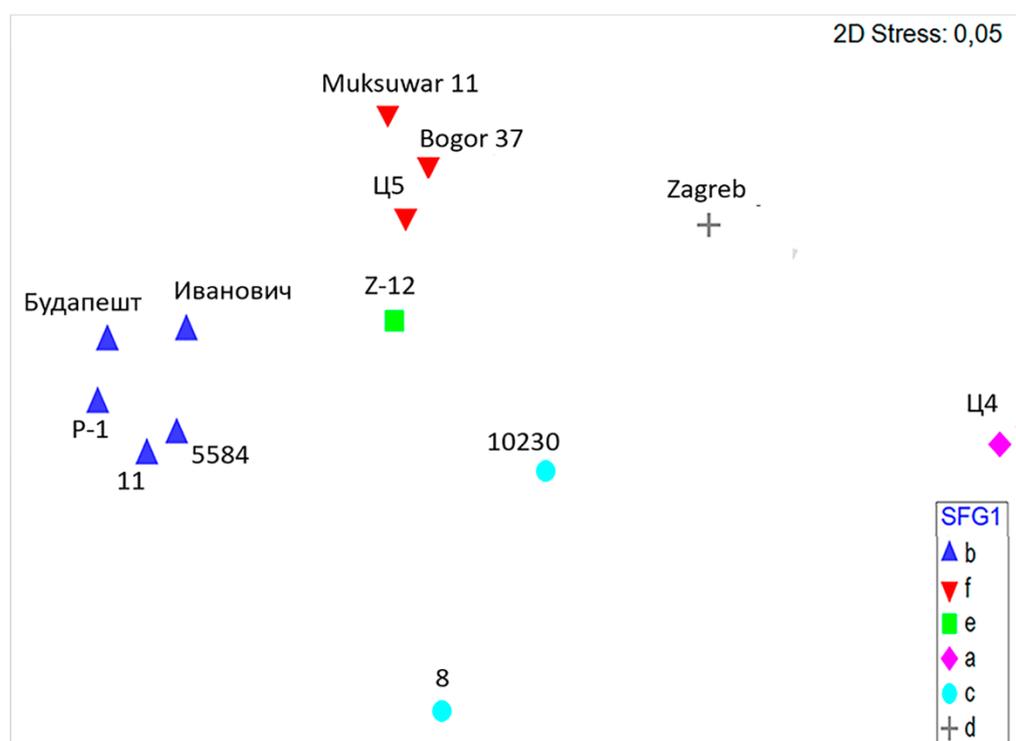


Рисунок 24 – Распределение штаммов *B. mallei* по показателям сходства биохимических профилей.

Непараметрический анализ сходства (ANOSIM) показал очень высокую достоверность (ANOSIM R 0,981, P 0,001) отличий биохимических профилей между всеми сформированными кластерами. Оценка среднего вклада отдельных тестов в общее несходство между кластерами штаммов *B. mallei*, идентифицированных корректно и с низкой дискриминацией выявил значительную роль результатов

следующих тестов: GGT, SAC, dCEL, BNAG, dMNE, ProA и dTRE, суммарный вклад которых в общее несходство составил 54,4%. Интересно, что у 100% корректно определенных штаммов отсутствовала активность фермента гамма-глутамилтрансферазы (GGT), тогда как у всех штаммов, идентифицированных с низкой дискриминацией, этот тест был положительным. Также 100% корректно определенных штаммов не утилизировали сахарозу (SAC), D-трегалозу (dTRE) и D-маннозу (dMNE), а 83,3% (для первых двух сахаров) и 50% (для D-маннозы) штаммов группы сравнения ассимилировали эти сахара. Кроме того, у 83,3% первой группы штаммов не выявлено активностей D-целлобиазы, L-пролинариламидазы и β -N-ацетилглюкозаминидазы, которые присутствовали у 83,3% штаммов, отнесенных одновременно к видам *B. mallei* и *S. paucimobilis*, в случае первых двух ферментов и у 67% штаммов в случае BNAG (Таблица 22). Проведенный анализ показал, что ключевыми особенностями биохимических профилей штаммов *B. mallei*, приводящими к идентификации возбудителя сапа с низкой дискриминацией между видами *B. mallei* и *B. ceracia* является сочетание наличия активности гамма-глутамилтрансферазы и способности утилизировать один или более из сахаров: сахарозу, D-трегалозу и D-маннозу.

Среди исследованной выборки штаммов возбудителя сапа только один штамм *B. mallei* Ц-4 был идентифицирован ошибочно как *B. pseudomallei*. Полагая, что делать какие-либо выводы на этом основании было бы некорректно, далее приводим только полученный фактический материал. Отличия между *B. mallei* Ц-4 и группой корректно идентифицированных штаммов определили 7 тестов (GGT, dMAL, URE, SAC, dMNE, O129R и PHOS), суммарный вклад которых в общее несходство составил 65,8%. Причем положительные результаты тестов на уреазу и устойчивость к вибриостатическому агенту O129 показал единственный идентифицированный как *B. pseudomallei* штамм, в отличие от остальных исследованных, имевших в 100% случаев отрицательные результаты по данным тестам. Кроме того, *B. mallei* Ц-4 не обладал фосфатазной активностью, тогда как 83% корректно определенных штаммов показали активность данного фермента (Таблица 22).

Таблица 22 – Отличия биохимических профилей штаммов *B. mallei*, идентифицированных корректно и с низкой дискриминацией*

| | GGT | SAC | dCEL | BNAG | dMNE | ProA | dTRE | URE | O129R | PHOS |
|------------------------------|-----|-----|------|------|------|------|------|-----|-------|------|
| <i>B. mallei</i> Иванович | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>B. mallei</i> P-1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>B. mallei</i> Будапешт | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>B. mallei</i> 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>B. mallei</i> 5584 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>B. mallei</i> 8 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>B. mallei</i> Bogor-37 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| <i>B. mallei</i> Muksuwar-11 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| <i>B. mallei</i> Z-12 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>B. mallei</i> Ц-5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| <i>B. mallei</i> 10230 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| <i>B. mallei</i> Zagreb | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>B. mallei</i> Ц-4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |

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

Таким образом, проведенная идентификация достаточно представительного набора штаммов и последующий анализ полученных биохимических профилей выявили комбинации ключевых признаков, с высокой статистической достоверностью влияющих на корректность идентификации системой Vitek 2 GN буркхольдерий II группы патогенности. 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*. А 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*.

Установлено, что корректность идентификации штаммов *B. mallei* в значительной степени определяется результатами тестов GGT, SAC, dCEL, ProA, dTRE,

URE, O129R и PHOS. Причем сочетание в биохимических профилях штаммов *B. mallei* таких признаков, как наличие активности гамма-глутамилтрансферазы и способности утилизировать сахарозу, D-трегалозу и D-маннозу приводит к идентификации возбудителя сапа с низкой дискриминацией между видами *B. mallei* и *B. serasia*.

Полученные результаты продемонстрировали прямую зависимость эффективности идентификации *B. pseudomallei* и *B. mallei* от особенностей редко встречающихся биохимических профилей штаммов, что определяет необходимость дальнейшего расширения базы данных Vitek 2 профилями биохимической активности атипичных штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа.

3.3.4 Определение влияния морфологической варибельности колоний на корректность биохимической идентификации

Было исследовано 19 клинических штаммов *B. pseudomallei*, выделенных в 2015–2017 гг. в госпиталях провинций Quảng Trị, Quảng Bình, Nghệ An и Yên Bái из коллекции Института тропической медицины Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра (г. Ханой, СРВ).

Для всех штаммов была предварительно проведена оценка параметра «вероятность идентификации» при оптимальных условиях анализа (36-часовая культура, выращенная на L агаре при 37°C) с использованием биохимической системы Vitek 2 GN. Для дальнейшего анализа были отобраны 6 штаммов, идентифицированных как *B. pseudomallei* с вероятностью не менее 93% и диссоциировавших на агаре Эшдауна [Ashdown, 1979] на два и более морфотипа. На L агаре больше двух морфотипов у одного и того же штамма выявлено не было. Морфотипы на L-агаре полностью формировались на третьей сутки инкубации, на агаре Эшдауна – на четвертые. Для каждого из выбранных для исследования штаммов нами ранее были определены сиквенс-типы (ST). Ни в одном из образцов не обнаружено более 1 ST, что с высокой вероятностью свидетельствует именно о морфологической диссоциации штамма.

Для последующего исследования с целью полного исключения наличия смешанной культуры материал высевали из изолированных колоний разных морфотипов каждого штамма *B. pseudomallei* на агар Эшдауна и L агар. Культивирование проводили 72–96 часов при температуре 37°C до полного формирования морфологически различных колоний. По окончании инкубации каждая снятая с агара единственная колония того или иного морфотипа суспендировалась в 0,85 % растворе NaCl pH 7,0. Оптическая плотность суспензии доводилась до значения 0,50–0,63 с использованием денситометра DensiCHEK™ Plus. Клетки колоний штамма 1513, выращенные на агаре Эшдауна, и штаммов V1514 и V1607, выращенные на L агаре, продемонстрировали выраженную агрегацию, что делало их суспензии непригодными для дальнейшего анализа.

Все колонии в S- и R-формах четырех штаммов (V1609, V1513, V1503 и V1611), выращенных на L агаре были идентифицированы корректно с вероятностью 93-99%, причем у двух штаммов этот показатель был одинаковым и у S- и у R-форм, у одного штамма вероятность идентификации была выше у S-, у другого – у R-формы. Но у пар изогенных морфологических вариантов спектры биохимической активности отличались по трем (V1611) и четырем тестам (V1513 и V1609), а у пары морфологических вариантов штамма V1503 – были идентичны (Таблица 23).

Два морфотипа колоний штамма V1503, выращенного на агаре Эшдауна, также были полностью идентичны по спектру биохимической активности, но отличались от культивированных на L агаре изогенных вариантов этого же штамма по тестам BNAG и NAGA и были идентифицированы как *P. aeruginosa* с вероятностью 94%. Всего из 11 протестированных вариантов колоний 1 тип идентифицирован не был, 5 – определены корректно (вероятность 90-99%) и 5 – как *P. aeruginosa* (вероятность 93-96%). Следует отметить, что у 3 из 5 морфологических вариантов, идентифицированных как *P. aeruginosa*, не наблюдалось активности β -N-ацетилглюкозаминидазы (BNAG), у штамма V1514 присутствовал промежуточный, а у V1611 – положительный результат по этому тесту (Таблица 23). В целом различия в спектрах биохимической активности у трех пар корректно и

ошибочно идентифицированных морфологически отличных изогенных вариантов *B. pseudomallei* были индивидуальными и какой-либо закономерности в сочетании признаков, влияющих на корректность идентификации, нам выявить не удалось.

Таким образом, все исследованные клоны, выращенные на L агаре, несмотря на вариации в биохимических профилях у S- и R-форм изогенных колоний, были идентифицированы корректно. Все колонии *B. pseudomallei*, выросшие на агаре Эшдауна в форме морфотипа В («пуговицы») были идентифицированы ошибочно как *P. aeruginosa*, тогда как другие типы морфологических вариантов этих же штаммов определены корректно как *B. pseudomallei*.

Результаты проведенного исследования показали недопустимость проведения идентификации подозрительных колоний непосредственно с агара Эшдауна, несмотря на то что это сокращает время анализа более чем на сутки.

Обобщая вышеизложенное, необходимо отметить, что возможность ошибки при автоматической биохимической идентификации патогенных буркхольдерий обуславливает необходимость верификации видовой принадлежности штаммов в сомнительных случаях (например, несоответствие морфологических признаков, спектра антибиотикорезистентности штамма виду микроорганизма, определенно-го системой Vitek 2) другими методами.

Одним из перспективных методов, активно внедряемых в практику диагностических исследований, является времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS), дополняющая морфологические, биохимические, и молекулярные методы идентификации особо опасных патогенов [MP 4.2.0089-14, 2014; Афанасьев М.В. и др., 2014; Телесманич Н.Р. и др., 2014; Спицын А. Н. и др., 2016; Шаров Т. Н. и др., 2017; Zhou et al., 2011; Karger et al., 2012].

Таблица 23 – спектры биохимической активности изогенных морфологических вариантов штаммов *B. pseudomallei*

| Штамм | Форма колонии | Среда | Результат на Vitek 2, вероятность | Результаты тестов | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|---------------|-------|-----------------------------------|-------------------|------|------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|------|-----|-------|------|
| | | | | APPA | dCEL | BNAG | AGLTp | dMAL | dMAN | dMNE | BAIap | ProA | TyrA | dSOR | NAGA | CMT | O129R | ELLM |
| 16QT4/V1609 | R | L | <i>B. pseudomallei</i> 94% | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0/1 | 1 | 1 | 1/0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16QT4/V1609 | S | L | <i>B. pseudomallei</i> 99% | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0/1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16QT4/V1609 | C | Э | <i>B. pseudomallei</i> 95% | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16QT4/V1609 | B | Э | <i>P. aeruginosa</i> 95% | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0/1 | 1 | 1 | 1 | 0/1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16QT5/V1611 | R | L | <i>B. pseudomallei</i> 99% | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1/0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16QT5/V1611 | S | L | <i>B. pseudomallei</i> 99% | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 16QT5/V1611 | B | Э | <i>P. aeruginosa</i> 94% | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 16QT5/V1611 | B | Э | неидентифицирован | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16QT5/V1611 | S | Э | <i>B. pseudomallei</i> 99% | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15QB2/V1513 | S | L | <i>B. pseudomallei</i> 93% | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 15QB2/V1513 | R | L | <i>B. pseudomallei</i> 94% | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15QB3/V1514 | P | Э | <i>B. pseudomallei</i> 90% | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 15QB3/V1514 | B | Э | <i>P. aeruginosa</i> 93% | 0 | 0 | 1/0 | 0 | 0 | 0 | 0/1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0/1 | 1 | 1 | 0 |
| 15QT3/V1503 | S | L | <i>B. pseudomallei</i> 94% | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15QT3/V1503 | R | L | <i>B. pseudomallei</i> 94% | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15QT3/V1503 | B | Э | <i>P. aeruginosa</i> 94% | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0/1 | 1 | 0 | 0 |
| 15QT3/V1503 | B | Э | <i>P. aeruginosa</i> 94% | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0/1 | 1 | 0 | 0 |
| 16QT2/V1607 | I | Э | <i>B. pseudomallei</i> 95% | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16QT2/V1607 | P | Э | <i>B. pseudomallei</i> 99% | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Обозначения: S – слизистая форма колоний; R – шероховатая форма колоний; I – промежуточная форма колоний; B, C, P – варианты R-формы; L – агар Луриа; Э – агар Эшдауна. Расшифровка сокращений биохимических тестов приведена в Таблице 21. Серым цветом отмечены ячейки с переменными результатами тестов у разных морфотипов одного штамма при одинаковых условиях культивирования, красным - с переменными результатами тестов одного штамма при разных условиях культивирования

3.4 Идентификация буркхольдерий комплекса *Burkholderia pseudomallei* методом масс-спектрометрии

Впервые масс-спектрометрию для идентификации бактерий предложили J. P. Anhalt и C. Fenselau в 1975 г. с использованием хлороформ-метанольных экстрактов лиофилизированных клеток [Anhalt and Fenselau, 1975]. Полученные ими масс-спектры имели достоверные отличия для представителей различных видов бактерий. Разработанный позже метод MALDI-TOF MS [Despeyroux et al., 1996; Krishnamurthy et al., 1996] обеспечил возможность анализа сложных биоорганических молекул, таких как белки и нуклеиновые кислоты.

В последние годы в мире MALDI-TOF MS является общепринятым инструментом, используемым в клинической диагностике, в различных областях микробиологических исследований, систематике и эпидемиологии. Это связано с тем, что метод обеспечивает высокую эффективность идентификации и имеет ряд преимуществ, обеспечивая быстрый, точный и высокопроизводительный анализ [Niyompanich et al., 2014].

Для идентификации микроорганизмов с использованием метода MALDI-TOF MS наиболее широко используют масс-спектрометры Microflex™ (Bruker) и Axima™ Confidence (Shimadzu, Япония) в комплексе с программным обеспечением MALDI Biotyper (Bruker, Германия) и S.A.R.A.M.I.S.™ (AnagnostecGmbH, Германия), соответственно.

Идентификационные базы данных включают масс-спектры значительного количества разнообразных видов микроорганизмов, что позволяет успешно определять видовую принадлежность большинства клинически значимых грамотрицательных и грамположительных бактерий, мицелиальных и дрожжевых грибов. Однако, референтные масс-спектры высокопатогенных организмов в коммерческих базах данных представлены недостаточно, что является одной из причин ограниченного применения масс-спектрометрии в этой области.

Тем не менее, метод MALDI-TOF MS хорошо зарекомендовал себя для идентификации *B. pseudomallei* при включении в анализ дополнительных супер-

спектров, что повышает точность идентификации возбудителя мелиоидоза и близкородственных видов буркхольдерий [Lau et al., 2012; Karger et al., 2012; Niyompanich et al., 2014; Suttisunhakul et al., 2017].

К настоящему времени показано, что на эффективность идентификации методом масс-спектрометрии могут оказывать значительное влияние ряд факторов: состав среды культивирования, фаза роста бактерий, способ пробоподготовки [Афанасьев М.В. и др., 2014; Valentine et al., 2005; Carbonnelle et al., 2011; Rychert et al., 2015].

3.4.1 Оптимизация протокола времяпролетной масс-спектрометрии для идентификации буркхольдерий II группы патогенности и формирование референтных масс-спектров общеяклеточных белков штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа

Широко используемая в мире идентификационная база MALDI-Biotyper (версия 3.1, Bruker Daltonics, Germany) не содержит референсных спектров для буркхольдерий комплекса «*B. pseudomallei*» [Suttisunhakul et al., 2017]. В опубликованных работах по идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза на масс-спектрометрах линейки Bruker (Bruker Daltonics, Germany) авторы в качестве эталона сравнения использовали собственные базы данных [Lau et al., 2012; Karger et al., 2012; Niyompanich et al., 2014]. В 2017 году опубликована работа, в которой показана возможность успешной дифференциации методом MALDI-TOF MS всех буркхольдерий комплекса «*B. pseudomallei*» – *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. oklahomensis* и *B. humptydooensis* с использованием полученных авторами эталонных масс-спектров [Suttisunhakul et al., 2017]. Однако такие базы данных являются собственностью разработчиков и недоступны для других диагностических центров. В базе данных S.A.R.A.M.I.S.TM v.3.62 (Anagnostec) для видов *B. pseudomallei* и *B. mallei* референтные спектры присутствуют и представлены масс-спектрами препаратов чистых рибосомальных протеинов. В большинстве случаев это позволяет корректно определить видовую принадлежность штаммов

B. pseudomallei и *B. mallei*, а также провести межвидовую дифференциацию. Однако известно, что состава спектров сравнения может оказывать значительное влияние на эффективность идентификации исследуемых штаммов и их последующую кластеризацию [Karger et al., 2012; Niyompanich et al., 2014; Suttisunhakul et al., 2017].

Поэтому, в связи с отсутствием в коммерческой базе данных S.A.R.A.M.I.S.TM эталонных спектров общеклеточных белков, перед нами встала задача формирования собственного набора референтных масс-спектров для идентификации штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза. Поскольку дезинфекция внутренней рабочей зоны времяпролетных масс-спектрометров не предусмотрена, необходимо было провести выбор оптимального протокола пробоподготовки культур возбудителей мелиоидоза и сапа с учетом соблюдения требований биологической безопасности при работе с ПБА II группы патогенности, а также оценить зависимости качества масс-спектров от метода экстракции белков и среды культивирования микроорганизмов.

Оптимизацию метода времяпролетной масс-спектрометрии для идентификации буркхольдерий II группы патогенности проводили с использованием 33 коллекционных штаммов *B. pseudomallei* и 11 штаммов *B. mallei*, перечисленных в Таблице 24.

Штаммы выращивали на L-агаре и на агаре на основе кислого гидролизата казеина (АГК) 48 часов при 37°C. Для калибровки прибора использовали белковый экстракт контрольного штамма *E. coli* CCUG 10979.

Нами были апробированы два описанных ранее метода экстракции клеточных белков трифторуксусной кислотой [Lash et al., 2008] и с применением муравьиной кислоты и ацетонитрила [Karger et al., 2011]. Белковые экстракты, полученные обоими методами, успешно прошли контроль специфической стерильности, показавший отсутствие специфического бактериального роста после инкубации посевов тестируемых проб на плотную и жидкую питательные среды при 37°C в течение 5 суток.

Таблица 24 – Перечень использованных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*

| Штамм | Число штаммов | Место выделения | Источник выделения |
|---|----------------------|------------------------|---------------------------|
| <i>B. pseudomallei</i> | | | |
| 1, 2, C-141, Dalat 100, 56770, 57582, 59437, 60631, 60839, 61503 | 10 | Вьетнам | клинический ИЗОЛЯТ |
| Tchad 97 | 1 | Чад | |
| Ward 108, Roos 109, Mahek 111, Coopek 112, Skanmandri 113, Snider 114 | 6 | Австралия | |
| 13/116 | 1 | Австралия | почва |
| Iran 101 | 1 | Иран | нет данных |
| 17/117 | 1 | Австралия | животное |
| 131, 134, 135, 137, 138, 139 | 6 | Таиланд | клинический ИЗОЛЯТ |
| Niamay 99 | 1 | Нигер | клинический |
| Shigan 102 | 1 | Китай | ИЗОЛЯТ |
| Cheval du jardin 103 | 1 | Франция | животное |
| PJ 54/107, 125, 127, 130 | 4 | нет данных | нет данных |
| <i>B. mallei</i> | | | |
| «Иванович», «Zagreb», B-120 | 3 | Югославия | лошадь |
| «Будапешт» | 1 | Венгрия | |
| 8, 5584 | 2 | Россия | |
| 11 | 1 | Польша | |
| Muksuwar-11 | 1 | Индия | |
| Ц-4, Ц-5 | 2 | Монголия | |
| 10230 | 1 | нет данных | |

Масс-спектры получали на масс-спектрометре Axima™ Confidence (Shimadzu, Япония) при следующих параметрах: для определения значения массы использовали алгоритм Centroid (порог 25%), пороговое значение показателя сигнал/шум – 5, минимальная интенсивность пика – 100 относительных единиц, ширина пика – 4 m/z, количество пиков – до 200. Масс-спектры регистрировали в линейном режиме в диапазоне 1000—20 000 m/z, для получения каждого использовали 100 импульсов лазера с частотой 60 Гц, без использования рефлектрона. Результирующий спектр составлялся из 6 одиночных масс-спектров одного образца. Качество идентификации оценивали по показателю «score value» – определенное производителем значение $\geq 75\%$ указывало на достоверную идентификацию вида.

Группирование масс-спектров коллекционных штаммов *Burkholderia spp.* осуществляли методом «ближайшего соседа» (Neighbor-Joining) [Saitou and Nei, 1987].

Сравнение качества клеточных масс-спектров, полученных с использованием метода экстракции клеточных белков трифторуксусной кислотой и с применением муравьиной кислоты и ацетонитрила, показало значительное преимущество второго метода пробоподготовки (Рисунок 25).

Анализ влияния среды культивирования на качество результатов масс-спектров штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа не выявил явного преимущества L-агара или АГК. В обоих случаях микроорганизмы были идентифицированы до вида, но масс-спектры штаммов, выращенных на L-агаре, имели более высокие показатели соответствия (score value). Варьирование времени инкубации культур в интервале 18 – 30 часов также не оказывало заметного влияния на характеристики белковых масс-спектров. При дальнейшей инкубации культуры *B. pseudomallei* начинали диссоциировать с образованием R-форм, что в части случаев затрудняло получение пригодной для пробоподготовки гомогенной суспензии.

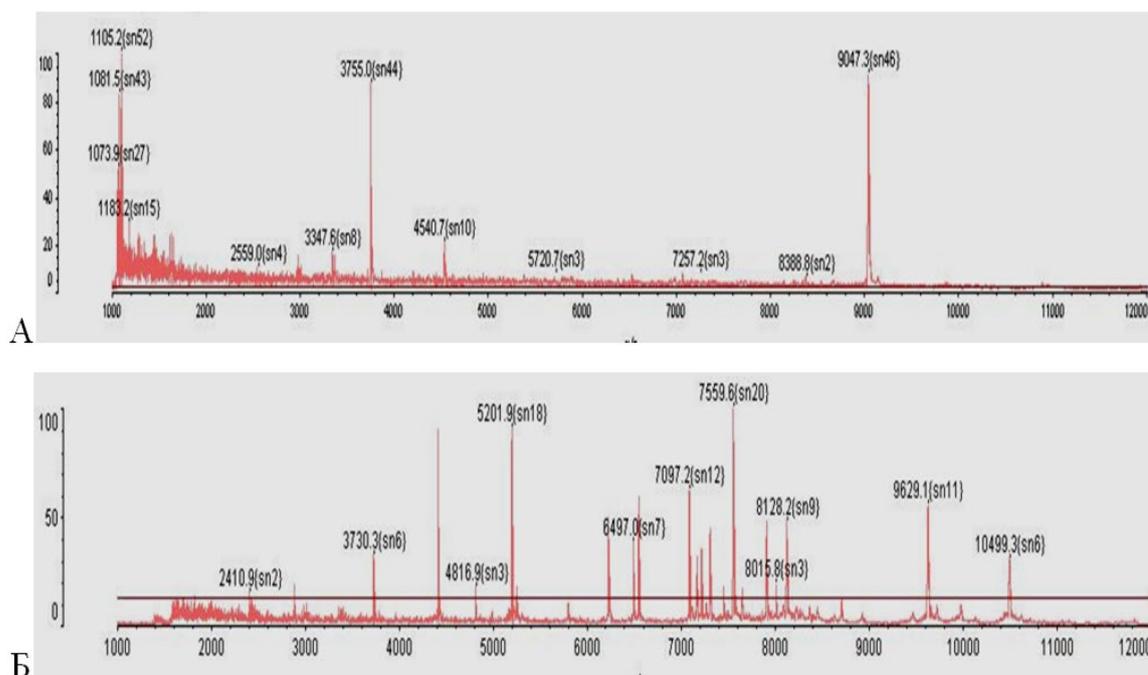


Рисунок 25 – Масс-спектры штамма *B. pseudomallei* C-141 с использованием обработки трифторуксусной кислотой (А) и муравьиной кислоты с ацетонитрилом (Б)

Сопоставление полученных масс-спектров общецелочных белков коллекционных штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа с базой данных масс-спектров S.A.R.A.M.I.S.TM v.3.62 (Anagnostec) позволило ранжировать штаммы по показателям соответствия (score value). При этом для 7 штаммов *B. pseudomallei* и 4 штаммов *B. mallei* идентификация являлась недостоверной (показатель соответствия < 75%), а в отдельных случаях показатели сходства между штаммами разных видов оказались выше, чем среди штаммов внутри вида (Рисунок 26).

Полученные референтные масс-спектры десяти типичных штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа были импортированы в базу данных S.A.R.A.M.I.S.TM, а 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).

Последующую идентификацию коллекционных штаммов *Burkholderia* spp. проводили с использованием базы данных, расширенной референтными масс-

спектрами общеклеточных белков *Burkholderia* spp., что обеспечило корректное определение видовой принадлежности всех исследованных изолятов (показатель соответствия $\geq 75\%$) и распределение полученных масс-спектров по двум кластерам, соответствующим видовой принадлежности исследованных штаммов (Рисунок 27).

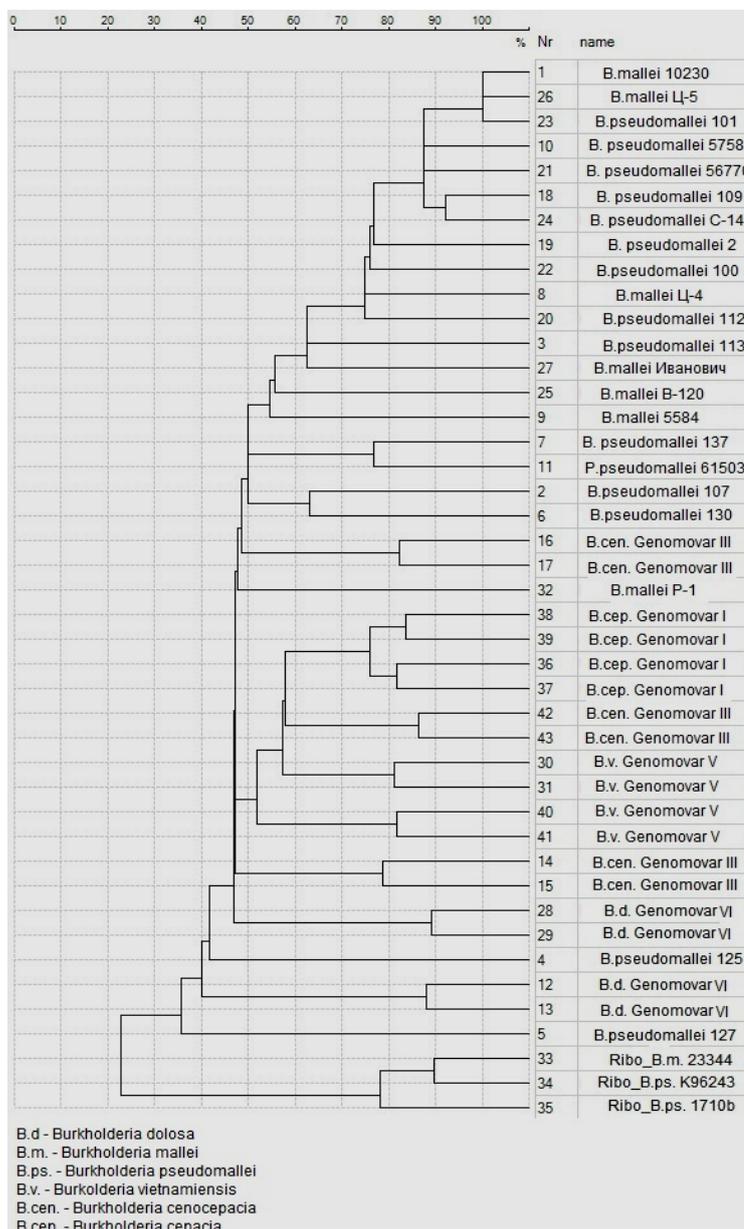
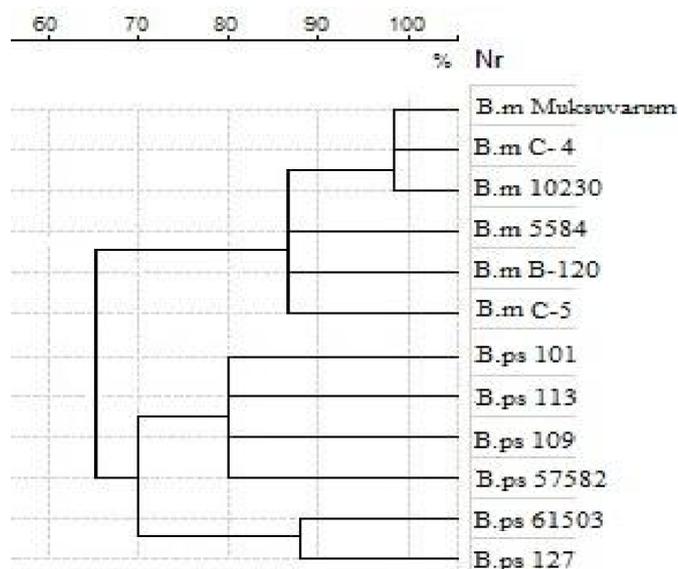


Рисунок 26 – Распределение масс-спектров общеклеточных белков коллекционных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, идентифицированных с использованием набора рибосомальных белков из базы данных S.A.R.A.M.I.S.TM, методом «ближайшего соседа»

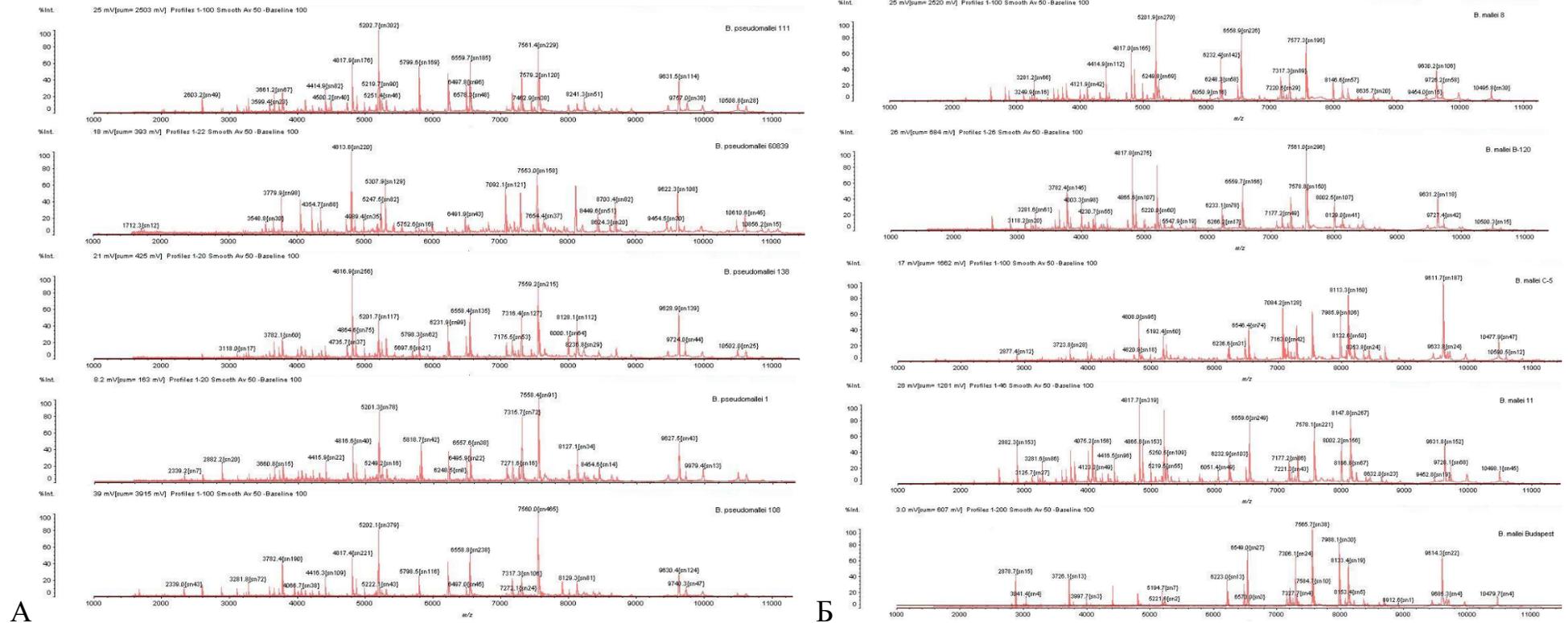


(B.m. – *B. mallei*, B.ps. – *B. pseudomallei*)

Рисунок 27 – Распределение масс-спектров общеклеточных белков коллекционных штаммов *Burkholderia* spp., идентифицированных с использованием расширенной полученными референтными масс-спектрами базы данных, методом «ближайшего соседа»

Анализ полученных референтных масс-спектров выявил 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. Масс-спектры имели выраженные видовые отличия по интенсивности пиков трех белков (6560, 8000, 8127 Da) (Рисунок 28).

Проведенная адаптация метода MALDI-TOF MS для идентификации высокопатогенных возбудителей мелиоидоза и сапа обеспечивает эффективную белковую экстракцию при необходимом уровне биологической безопасности. Расширение базы данных MALDI-TOF спектров S.A.R.A.M.I.S.TM набором референтных масс-спектров общеклеточных белков буркхольдерий II группы патогенности позволяет достоверно определять видовую принадлежность штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*.

Рисунок 28 – Референтные масс-спектры *B. pseudomallei* (А) и *B. mallei* (Б)

Обобщая изложенное выше, хочется отметить достигнутый в последние годы значительный прогресс в развитии методов идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза, основанных на определении фенотипических признаков. Тем не менее, проблема быстрого и надежного способа их фенотипической идентификации стоит достаточно остро.

Ни одна из существующих систем биохимической идентификации не имеет близкой к 100% специфичности, а методы классической бактериологии достаточно трудоемки в исполнении и длительны во времени, тогда как в случае мелиоидоза временной фактор зачастую имеет решающее значение для предотвращения фатального исхода заболевания.

Весьма перспективный для идентификации и межвидовой дифференциации буркхольдерий комплекса «*B. pseudomallei*» метод MALDI-TOF MS в настоящее время находится в стадии лабораторных разработок. Коммерческие базы данных не содержат достаточного количества референтных спектров для *B. pseudomallei* и близкородственных видов. Расширение баз данных дополнительными эталонными спектрами для буркхольдерий комплекса «*B. pseudomallei*» имеет решающее значение для обеспечения их точной идентификации и дифференциации.

Быстрая и точная идентификация бактериальных изолятов является фундаментальной задачей лабораторной диагностики, решение которой обеспечивает представление об этиологии инфекционного заболевания и, как следствие, адекватно назначенное лечение. Хотя обычные фенотипические методы относительно недороги и позволяют идентифицировать возбудителей сапа и мелиоидоза с наиболее распространенными биохимическими профилями, существует проблема идентификации атипичных штаммов, а также дифференциации между близкородственными видами комплекса «*B. pseudomallei*», значительно отличающимися по патогенным свойствам. Кроме того, перечисленные методы требуют предварительного выделения чистой культуры, а эффективность культурального метода не превышает 60% [Limmathurotsakul, 2010]. Соответственно, диагностические проблемы бактериологически неподтвержденных случаев остаются нерешенным.

Принимая во внимание, что ранняя реализация оптимальной для мелиоидоза антибактериальной терапии значительно снижает уровень смертности, для обеспечения быстрой и достоверной лабораторной диагностики используют подходы, направленные на выявление маркеров инфекции (специфические антитела, антигены и нуклеиновые кислоты возбудителя) непосредственно в клинических образцах.

ГЛАВА 4. ОСОБЕННОСТИ ИММУНОДИАГНОСТИКИ МЕЛИОИДОЗА

4.1 Выявление антител

Серологические тесты представляют собой основу лабораторной диагностики многих инфекционных заболеваний. Однако в случае мелиоидоза интерпретация результатов серологических реакций не является однозначной по целому ряду причин. Нет полного понимания временных рамок антительного ответа – период сероконверсии является непредсказуемым, образование антител может не происходить у около 30% пациентов [Cheng et al., 2006]. Также не ясна относительная важность обнаружения IgM и IgG, удивительно, но на ранних стадиях мелиоидоза выявление IgG к *B. pseudomallei* эффективнее, чем IgM [Hii et al., 2017]. Описан феномен серонегативного мелиоидоза, при котором в сыворотках больных с бактериологически подтвержденным диагнозом уровень антител был недостаточно высок для выявления в РНГА [Appassakij et al., 1990; Harris et al., 2011]. Более того, использование экстрактов собственных изолятов *B. pseudomallei* серонегативных пациентов в качестве сенсibiliзирующих антигенов в РНГА с повторными сыворотками этих же больных не повышало чувствительность метода, а в отдельных случаях антитела не выявлялись и более чувствительными EIA (Enzyme immunoassay IgG) [Harris et al., 2011] или ELISA [Woo et al., 2003]. Механизм этого явления до конца неясен, возможно, это отражение состояния иммунитета пациентов. Также не исключена вероятность, что это результат влияния возбудителя на те или иные составляющие иммунного ответа хозяина. Так, относительно недавно опубликованы результаты исследования, показавшие способность полиморфноядерных нейтрофилов, инфицированных *B. pseudomallei*, значительно ингибировать пролиферацию CD4 + Т-клеток посредством продуцирования IFN-g и увеличением экспрессии регулятора PD-L1 (Programmed death ligand 1), что приводит к снижению уровня антиген-специфических Т-клеток [Buddhisa et al., 2015].

Кроме того, в эндемичных регионах присутствует высокий фоновый уровень серопревалентности населения, причем значения фоновых титров различны для разных регионов эндемичного распространения *B. pseudomallei* [Appassakij et al., 1990; Chaowagul, 2007; Cheng et al., 2008; Maude et al., 2012]. Наличие фоновых антител является одним из основных ограничений при расшифровке результатов серологических реакций. В неэндемичных регионах это ограничение не является существенным.

Основными методами иммунодиагностики для выявления антител к антигенам возбудителя мелиоидоза являются реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА) и непрямой метод флуоресцирующих антител (НМФА).

РНГА была и остается основным методом серологического тестирования мелиоидоза на протяжении многих лет, практически не изменившись с тех пор, как была впервые описана более 50 лет назад [Peri, 1965].

Диагностическая чувствительность метода в эндемичных регионах варьирует в пределах 56 - 72% на момент госпитализации, специфичность – 64 - 68%. При повторном тестировании сероконверсия наблюдалась только у 68% изначально отрицательных в РНГА пациентов [Peacock et al., 2011; Suttisunhakul et al., 2015].

Чувствительность метода зависит от клинической формы заболевания и составляет около 66 % у пациентов с острым мелиоидозом, подтвержденным выделением культуры, и около 80% у больных с хронической формой. При острой бактериемии результаты РНГА отрицательные в более, чем в 50% случаев (Таблица 25), что ограничивает информативность этого метода для диагностики тяжелых форм мелиоидоза.

В Российской Федерации зарегистрирован медицинский иммунобиологический препарат (МИБП) «Диагностикум эритроцитарный сапной антигенный жидкий» (Регистрационное удостоверение N 2000/88/2) для выявления антител к возбудителю сапа в реакции непрямой гемагглютинации в сыворотках крови больных (переболевших) людей и животных. Оценка диагностических показателей препарата была проведена на сыворотках экспериментально зараженных и

здоровых животных; здоровых людей, вакцинированных против чумы, туляремии, бруцеллеза, а также больных вирусными гепатитами. Диагностические титры антител (1:320) у зараженных сапом обезьян на 5–7 сутки инфекции присутствовали менее, чем у четверти больных животных, к концу третьей недели – у 100% особей. Тестирование животных с экспериментальным мелиоидозом на 5–7 сутки инфекции показало наличие антител в титре 1:160 в 52% случаев, данных о тестировании в более поздние сроки инфекции авторы не приводят [Патент RU 2 188 036 С1].

Таблица 25 – Информативность РНГА при бактериологически подтвержденном остром мелиоидозе

| Клиническая форма | Диагностический титр | Доля отрицательных в РНГА (%) | Сенситив | Ссылка |
|-------------------|----------------------|-------------------------------|---|----------------------------|
| Австралия | | | | |
| Бактериемия | ≥1:40 | 63 | Суммарный антигенный комплекс пяти штаммов <i>B. pseudomallei</i> | Harris et al., 2009 |
| Все формы | | 49 | | |
| Таиланд | | | | |
| Бактериемия | ≥1:80 | 56 | Суммарный антигенный комплекс двух штаммов <i>B. pseudomallei</i> | Chaichana et al., 2018 |
| Все формы | | 22,5 | | Suttisunhakul et al., 2015 |
| Все формы | | 21,3 | | Rongkard et al., 2020 |
| Все формы | | 42 | | |

При необходимости верификации диагноза «мелиоидоз», в Референс-центре по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза также возможно применение экспериментальных образцов диагностикума эритроцитарного сапного и мелиоидозного антигенного, разработанного специалистами ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Диагностикум создан с использованием общей для *B. pseudomallei* и *B. mallei* гликопротеиновой фракции суммарного антигенного комплекса возбудителя мелиоидоза. Оценка характеристик диагностического препарата с использованием гипериммунных козьих и кроличьих сывороток показала возможность его применения для

определения уровня антител у больных с подозрением на мелиоидоз или сап, диагностический титр 1:160. Специфичность диагностикума авторы оценивали на сыворотках животных, иммунизированных антигенами *B. ceracia*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* и *F. tularensis*, а также в реакциях с коммерческими сыворотками: чумной, бруцеллезной, салмонеллезной и противосибиреязвенными глобулинами. Во всех случаях перекрестных реакций в диагностическом титре не наблюдалось [Патент RU 2 540 902 C1].

Отсутствие в протестированной панели сывороток к *B. thailandensis*, а в первом случае и к *B. ceracia*, не позволяет оценить реальную специфичность описанных диагностикумов. Результаты оценки чувствительности метода в отечественных исследованиях на экспериментальных моделях полностью соответствуют зарубежным литературным данным о невысокой эффективности метода РНГА для диагностики острого мелиоидоза.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА). Иммуноферментные тест-системы предназначены для выявления IgM и IgG в исследуемых сыворотках. Причем IgG является лучшим индикатором для ранней серодиагностики мелиоидоза (чувствительность 85%, специфичность 94%), чем IgM (чувствительность 76%, специфичность 90%) [Hii et al., 2017].

В качестве антигенов используют липополисахарид (ЛПС), экзополисахарид (ЭПС), сочетание ЛПС и ЭПС, экстракт целых клеток, а также аффинно-очищенные рекомбинантные антигены. Однозначного превосходства в диагностической чувствительности метода с использованием какого-либо типа антигена не показано (Таблица 26). Наиболее широко применяется ЛПС, поскольку диагностические системы на его основе имеют более высокие показатели чувствительности и специфичности (71,6% и 95,7%) [Suttisunhakul et al., 2016]. При этом известно, что ЛПС среди клинических штаммов *B. pseudomallei* является неоднородным [Anuntagool et al., 2006], однако влияние этой изменчивости на эффективность ТИФА на основе ЛПС не установлено. К настоящему времени наилучшими показателями чувствительности и специфичности обладает ТИФА, в котором в

качестве антигена используют совместно регулируемый с гемолизином белок Hcp1 [Pumpuang et al., 2017].

Таблица 26 – Сравнение диагностических характеристик ТИФА IgG для серодиагностики мелиоидоза с использованием различных антигенов

| Антиген | Пороговое значение OD | Чувствительность (%) | Специфичность (%) | Ссылка |
|--|-----------------------|----------------------|-------------------|---------------------------------|
| OPS (О-полисахарид) | 0,875 | 71,6 | 95,7 | [Pumpuang et al., 2017] |
| OPS/ Hcp1 (корегулируемый с гемолизином протеин) | 1,125 | 81,6 | 95,2 | |
| LPS (липополисахарид) | 0,87 | 71,6 | 95,7 | [Suttisunhakul et al., 2016] |
| CPS (капсульный полисахарид) | 0,68 | 57,5 | 90,9 | |
| | 1,18 | 43,5 | 95,2 | |
| Суммарный антигенный комплекс | 0,36 | 83,0 | 85,1 | |
| | 0,61 | 74,5 | 90,4 | |
| Культуральный фильтрат | 0,46 | 83,0 | 85,6 | |
| | 0,97 | 66,7 | 95,7 | |
| *LPS (липополисахарид) | 1,01 | 62 | 63,3 | [Anandan et al., 2010] |
| * Суммарный антигенный комплекс | 0,30 | 76,14 | 90,2 | [Hii et al., 2017] |
| Суммарный антигенный комплекс | 0,5 | 84,7 | 93,6 | |
| Рекомбинантные антигены <i>B. pseudomallei</i> | | | | |
| rGroEL (шаперонин) | 0,211 | 92,1 | 88,3 | [Kritsiriwuthinan et al., 2018] |
| rHcp1 (корегулируемый с гемолизином протеин) | 0,109 | 71 | 96 | [Hara et al., 2013] |
| rOmp3/rOmp85/rMprA/rHcp1 | 0,194 | 65 | 99 | |
| rHcp1 (корегулируемый с гемолизином протеин) | 1,165 | 83,0 | 96,3 | [Pumpuang et al., 2017] |
| Рекомбинантные антигены <i>B. thailandensis</i> | | | | |
| FLAG300 (фрагмент флагеллина) | нд | 90,48 | 87,14 | [Wajanarogan a et al., 2016] |
| OmpABT (белок А внешней мембраны) | нд | 80,95 | 89,21 | |
| FLAG300/ OmpABT | нд | 85,71 | 92,95 | |
| * – обнаружение IgM нд – нет данных | | | | |

Вариантом, предполагающим стандартизацию и воспроизводимость метода, является использование очищенных рекомбинантных антигенов. При использовании в качестве антигенов белков наружной мембраны (Omp3, Omp85), эффекторного белка Hcp1 системы секреции VI типа T6SS и сериновой протеазы MprA (smBpF4) *B. pseudomallei* наиболее высокие показатели чувствительности специфичности ТИФА были у Hcp1 – 71-83% и 96%, соответственно [Hara et al., 2013; Pumpuang et al., 2017] (Таблица 26). Использование комбинации этих 4 антигенов показало улучшение специфичности (99%), но снижение чувствительности (65%) [Hara et al., 2013]. Интересно, что ТИФА с использованием рекомбинантных антигенов *B. thailandensis* имел характеристики, сопоставимые (а по чувствительности в большинстве случаев превосходящие) с ТИФА с антигенами непосредственно *B. pseudomallei*.

В лаборатории патогенных буркхольдерий ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора под руководством и непосредственном участии автора настоящей работы получены и запатентованы (RU 2608505 С, RU 2608506 С, RU 2728356 С1, RU 2662957 С2) рекомбинантные штаммы кишечной палочки – *Escherichia coli* BL21(DE3) VpsOmp39 и *E. coli* BL21(DE3)VpsOmpA, – продуцирующие поверхностные антигены возбудителя мелиоидоза Omp38 и OmpA (Рисунок 29), позволяющие в гетерологичной системе экспрессии безопасно получать перспективные для иммунодиагностики мелиоидоза антигены *B. pseudomallei* [Кузютина и др., 2016, 2019].

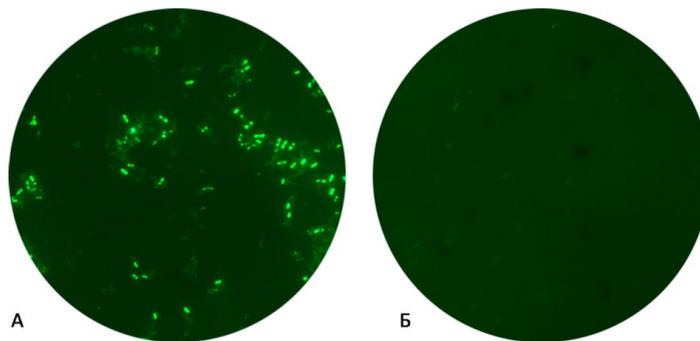


Рисунок 29 – Клетки рекомбинантного штамма *E. coli* BL21(DE3)VpsOmpA (А) и исходного штамма *E. coli* BL21(DE3) (Б), окрашенные флуоресцирующей поликлональной мелиоидозной сывороткой (Фото автора)

Непрямой метод флуоресцирующих антител (НМФА) используют не столь часто, как РНГА и ТИФА. Несомненным достоинством метода является возможность получения информации о наличии в сыворотке крови пациента специфических антител к предполагаемому патогену за относительно короткий промежуток времени (3 часа). Масштабное исследование, проведенное J. Vadivelu и S. Puthuchearу, свидетельствует об эффективности метода не только для диагностики мелиоидоза, но и мониторинга успешности проводимой терапии [Vadivelu and Puthuchearу, 2000]. Чувствительность и специфичность метода составляет 88% и 97% [Kunakorn et al., 1990], по другим данным – 91% и 100% [Vadivelu et al., 1995], что превышает таковые ТИФА.

В последние годы большое внимание уделяется разработке быстрых и простых в исполнении тестов латекс-агглютинации (ЛА) для обнаружения антител к возбудителю мелиоидоза. Оценка иммунодиагностического потенциала тестов, основанных на использовании в качестве антигенов О-полисахарида (OPS) и капсульного полисахарида (CPS) *B. pseudomallei*, в сравнении с РНГА показала преимущество РНГА по показателю специфичности (67,6%) при исследовании сывороток тайских доноров, OPS- и CPS-тесты ЛА имели сравнимую специфичность (56,9% и 63,8%). Тогда как при исследовании сывороток доноров из США все три теста показали специфичность более 97,8% [Suttisunhakul et al., 2015], что свидетельствует о применимости указанных тестов для серодиагностики мелиоидоза в эндемичных областях.

Весьма перспективным инструментом для серологической диагностики мелиоидоза представляются коммерческие иммунохроматографические тесты (ICT). Несомненными достоинствами метода являются его стандартизованность, простота и короткое время выполнения анализа, недостатком – невозможность определения титра антител. Оценка прототипов коммерчески доступных IgM и IgG ICT показала сравнимую с перечисленными выше серологическими методами диагностическую эффективность. Уровень чувствительности в проведенных исследованиях на эндемичных по мелиоидозу территориях колебался в пределах 50-

100% для IgG ICT и 67-93% для IgM ICT, при схожем интервале специфичности в пределах 47-95% [Chuah et al., 2005; Cheng et al., 2006b; Phokrai et al., 2018].

Оценка коммерческого набора «Melioidosis rapid cassette test - kits» (PanBio, Windsor, Queensland, Australia) и его прототипов четырьмя группами исследователей из Малайзии, Австралии (2 группы) и Германии продемонстрировала зависимость показателей диагностической эффективности набора от фоновой серопозитивности здоровых лиц в популяции. Показатели специфичности IgG и IgM тестов для жителей эндемичных по мелиоидозу Юго-Восточной Азии составили 95% для обоих тестов, Австралии – 90/97% и 69/71%, Европы – 98,5% и 99,5%, при чувствительности 100% и 93% [Cuzzubbo et al., 2000], 77/50% и 88/72% [O'Brien et al., 2004; Chuah et al., 2005], 90% и 84% [Spletstoesser et al., 2008], соответственно. Полученные результаты показали, что для диагностики мелиоидоза у населения эндемичной Северной Австралии протестированный набор является ненадежным, но перспективен для презумптивной диагностики мелиоидоза у жителей Юго-Восточной Азии и путешественников с подозрением на мелиоидоз, посещавших эндемичные регионы. При этом необходимо учитывать, что отрицательный результат теста не исключает острой инфекции.

4.2 Обнаружение антигенов

Альтернативным подходом к лабораторной диагностике мелиоидоза является выявление антигенов возбудителя с использованием моноклональных антител различной эпитопной направленности.

Обнаружение специфических антигенов *B. pseudomallei* непосредственно в клиническом материале имеет значительную прогностическую ценность, особенно для быстрого скрининга клинических образцов от тяжелобольных пациентов.

Чувствительность сэндвич-варианта ТИФА с использованием моноклональных антител против эпитопа ЛПС МАb 5F8 *B. pseudomallei* составила 75 %, а специфичность – 98 % [Anuntagool et al., 1996]. Показатели диагностической эффективности МФА на основе моноклональных (Mab IFA) и поликлональных (Pab

IgA) антител оказались сопоставимы: чувствительность 48,4% и 45,3%, специфичность 99,8% и 98,8%, соответственно [Tandhavanant et al., 2013]. Предварительное подращивание гемокультур ожидаемо повысило чувствительность варианта Mab IgA до 97% [Chantratita et al., 2013], что позволяет использовать метод для диагностики мелиоидоза.

Оценка отечественных МИБП для выявления возбудителя мелиоидоза методами РНГА, МФА, ТИФМ (Таблица 27) с использованием зашифрованных проб показала сопоставимые с зарубежными аналогами результаты и подтвердила недостаточную эффективность перечисленных методов. Ни один из протестированных методов не дифференцировал *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*, а РНГА и ТИФМ – не обнаружили *B. pseudomallei* в бактериальных взвесах плотностью менее 1×10^6 м.к./мл, что соответствует заявленной чувствительности методов [Прохватилова и др., 2014].

Для скрининговых исследований подозрительных культур в настоящее время широко используется латекс-агглютинация на основе моноклональных антител против экзополисахарида (ЭПС) [Anuntagool et al., 2000; Wuthiekanun et al., 2002; Duval et al., 2014; Фролов и др., 2019]. Однако показана возможность перекрестной реактивности распространенных коммерческих тестов латекс-агглютинации с вариантными штаммами *B. thailandensis* и отдельными штаммами ряда видов комплекса «*B. cepacia*» (*B. territorii*, *B. pseudomultivorans*, *B. multivorans* и *B. cenosepacia*) [Songsri et al., 2018; Фролов и др., 2019].

Ни одна из перечисленных выше тест-систем для выявления антигенов не позволяет надежно дифференцировать *B. pseudomallei* и филогенетически близкую *B. thailandensis*.

Таблица 27 – Сравнение характеристик серологических методов для выявления антигенов *B. pseudomallei*.

| Метод | Чувствительность | | Специфичность | | Ссылка |
|---|---------------------|--|---------------------|-------------------|-----------------------------|
| | Диагностическая (%) | Аналитическая (КОЕ / мл) | Диагностическая (%) | Аналитическая (%) | |
| ELISA (Маb 5F8) | 75 | $1,8 \times 10^5$ | 98 | 100* | [Anuntagool et al., 1996] |
| ТИФМ (экспериментальные серии флюоресцирующих иммуноглобулинов МКА 3С6 + 5С2 + 2А6 к антигену 200 kDa <i>B. pseudomallei</i> и <i>B. mallei</i>) | 71 | 5×10^6 | нд | 100* | [Замарина и др., 2014] |
| ТИФМ (экспериментальные серии флюоресцирующих иммуноглобулинов МКА 255А6F5 + 255В6Е1) | нд | $0,5 \cdot 10^6$ | нд | 100* | [Кытманов и др., 2018] |
| МФА («Иммуноглобулины диагностические флюоресцирующие мелиоидозные моноклональные» (РУ № ФСР 2011/11615) | нд | 5×10^4 (чистые культуры) 5×10^5 – 1×10^6 (смешанные культуры) | нд | 100* | [Храпова и др, 2014] |
| Маb-IFA (Маb 4В11) | 48,4 | 2×10^3 | 99,8 | 90,0 | [Tandhavanant et al., 2013] |
| Маb-IFA (Маb 4В11)** | 97,4 | нд | 100 | нд | [Chantratita et al., 2013] |
| Раb-IFA | 45,3 | нд | 98,8 | нд | [Tandhavanant et al., 2013] |
| РНГА («Диагностикум эритроцитарный сапной и мелиоидозный иммуноглобулиновый сухой» (РУ № ФСР 2011/11613) | нд | $1,56 \times 10^6$ (макрометод) $3,12 \times 10^6$ (микрометод) | нд | 100* | [Новицкая и др., 2009] |
| * – В панели гетерологичных видов не присутствовала <i>B. thailandensis</i> ** – Тестирование жидких гемокультур после подращивания 1-3 суток нд – нет данных | | | | | |

Таким образом, проведенный анализ литературных данных показал, что результаты серологической диагностики мелиоидоза не являются однозначными. С одной стороны, это связано с серопревалентностью населения эндемичных регионов и возможным отсутствием сероконверсии при тяжелых формах инфекции. С другой, – имеются значительные ограничения, связанные с диагностической эф-

фективностью 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 ТИФМ [Wuthiekanun et al., 2007]. Как зарубежные, так и отечественные иммунодиагностические препараты, направленные на выявление антигенов возбудителя, не обладают достаточными либо чувствительностью, либо специфичностью. 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) показал невысокую диагностическую чувствительность (46,9 %), выявив возбудитель менее, чем у половины больных мелиоидозом, при диагностической специфичности 99,3 %.

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

ГЛАВА 5. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ВИДОВ КОМПЛЕКСА *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI*

Методы и технологии, основанные на анализе структуры генома, достаточно давно успешно используются в диагностике инфекционных болезней, позволяя своевременно определить видовую принадлежность сложно поддающихся идентификации патогенов.

Исторически первые молекулярно-генетические методы, использовавшиеся в исследованиях по таксономии и идентификации *B. mallei* и *B. pseudomallei*, такие, как метод определения процента содержания ГЦ нуклеотидов в бактериальном геноме и метод ДНК-ДНК гибридизации [Palleroni and Doudorff, 1972; Rogul et al., 1970], в последние десятилетия используют, в основном, для сравнения последовательностей отдельных генов или кластеров генов и при возникновении спорных вопросов идентификации микроорганизмов комплекса «*B. pseudomallei*» [Reckseidler et al., 2001; Ramisse et al., 2003].

В настоящее время методы геноидентификации основаны на использовании амплификационных и секвенационных технологий, которые стали активно разрабатываться в начале 90-х годов прошлого века. Высокие показатели чувствительности и специфичности полимеразной цепной реакции (ПЦР), относительная простота исполнения, быстрота получения результата определили ведущую роль этого метода в лабораторной диагностике мелиоидоза, как и других труднодиагностируемых инфекций бактериальной и вирусной природы.

Первые методы для детекции патогенных буркхольдерий, основанные на применении ПЦР, были разработаны с использованием в качестве мишеней консервативных нуклеотидных последовательностей, входящих в кластер генов рибосомальных РНК [Lew and Desmarchelier, 1994; Kunakorn and Markham, 1995; Dharakul et al., 1996; Brook et al., 1997]. Предложенные методы обладали высокой аналитической чувствительностью при тестировании чистых культур (75-300 м.к./мл) [Kunakorn and Markham, 1995]. Однако, вследствие значительного сход-

ства нуклеотидных последовательностей этого региона у *B. pseudomallei* и *B. mallei*, дифференцировать эти виды между собой не удалось. Кроме того выяснилось, что высокой уровень гомологии присутствует не только между возбудителями сапа, мелиоидоза и *B. thailandensis* (98,3-99,8 %), но и с некоторыми штаммами комплекса *B. ceracia* (81,5-86,8 %), что отражалось на специфичности. Для повышения этого показателя диагностической эффективности были предложены такие дополнительные этапы как гибридизация продуктов амплификации с мечеными дигоксигенином ДНК-зондами [Kunakorn and Markham, 1995], «гнездовой» вариант ПЦР [Dharakul et al., 1996] и сочетание реакции амплификации с секвенированием [Woo et al., 2003].

Тестирование диагностической эффективности трех пар праймеров, детектирующих фрагменты гена *16SpPHK* [Dharakul et al., 1996], спейсерной области *16SpPHK-23SpPHK* [Kunakorn and Markham, 1995] и *pKKU-S23 LPS* [Sermswan et al., 1994; Rattanathongkom et al., 1997], непосредственно на клиническом материале выявило низкие показатели чувствительности (41, 35,7 и 31 %) и специфичности (47, 59 и 100 %) [Kunakorn et al., 2000].

Необходимость надежной идентификации возбудителя мелиоидоза и его дифференциации с близкородственными буркхольдериями определило в свое время активный поиск альтернативных мишеней и методов генодиагностики.

Две характерные особенности *B. pseudomallei* – геномная гетерогенность [Nandi et al., 2015; Price et al., 2017] и высокая частота рекомбинации [Spring-Pearson et al., 2015] 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 помимо перечисленных выше. Основными мишенями для выявления *B. pseudomallei* являются – *orf 2* (open reading frame – открытая рамка считывания), входящая в состав кластера генов системы секреции третьего типа (T3SS1) [Winstanley and Hart, 2000; Novak et al., 2006], ген сериновой металлопротеазы (*mprA*) [Neubauer et al., 2007]; ген полигидроксиалканоатсинтазы *phaC* [Merritt et al., 2006], ген структурного белка флагеллярного филамента *fliC*

[Wajanarogana et al., 1999; Tomaso et al., 2006], *orf* BPSS0087 и BPSS0745 [Göhler et al., 2017]; для выявления *B. mallei* – межгенный регион *AraA-AraB* [Moore et al., 2004], псевдоген флагеллина Р (*fliP*::IS407A) [Scholz et al., 2006], *bimA* – ген актин-опосредованной внутриклеточной подвижности [Ulrich et al., 2006] и ряд других. С использованием этих мишеней были разработаны молекулярные методы для идентификации *B. pseudomallei* и *B. mallei* с применением различных технологий: секвенирования, мультиплексной ПЦР, ПЦР в реальном времени. Использование технологии изотермической петлевой амплификации (LAMP) для обнаружения возбудителей мелиоидоза и сапа считается нецелесообразным из-за высокого содержания GC-пар в их геномах (в среднем около 70%). LAMP проводится при невысокой температуре, не обеспечивающей полную денатурацию GC-богатой ДНК, что отражается на аналитических характеристиках реакции и воспроизводимости результатов [Chantratita et al., 2008; Щит и др., 2018]. Технология амплификации, основанной на обратной транскрипции NASBA для патогенных буркхольдерий, находится в стадии оптимизации. Тем не менее, показаны ее высокие чувствительность и специфичность при выявлении 23S рРНК [Леденева и др., 2018].

Наиболее оптимальным для выявления *B. pseudomallei* в мире признан предложенный R. T. Novak метод, основанный на детекции *orf 2* T3SS1 [Novak et al., 2006], продемонстрировавший близкие к 100% чувствительность и специфичность при тестировании сложных клинических и экологических образцов в ряде независимых испытаний [Trung et al., 2011; Kaestli et al., 2007, 2012; Price et al., 2012; Knappik et al., 2015; Göhler et al., 2017].

В исследованиях отечественных авторов, посвященных проблеме идентификации *B. pseudomallei* и *B. mallei*, были разработаны оригинальные олигонуклеотидные праймеры и, в ряде случаев, зонды для детекции ранее хорошо зарекомендовавших в этих целях генетических мишеней. С использованием сконструированных праймеров созданы экспериментальные тест-системы, основанные на выявлении последовательностей генов 23S-рРНК и 16S-рРНК [Ткаченко и др., 2003; Чухланцев и др., 2008], T3SS1 [Зинченко, 2010; Щит и др., 2018; Ветчинин и

др., 2019], флагеллярных генов *fliC* [Алтухова и др., 2007; Зинченко, 2010] и *fliP::IS407A* [Лемасова и др., 2016; Щит и др., 2018], часть из которых официально зарегистрированы в качестве медицинских изделий.

В настоящее время в Российской Федерации для выявления возбудителей мелиоидоза и сапа доступны пять зарегистрированных диагностических наборов производства ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. В их числе два группоспецифических генодиагностических препарата выявляющих, но не дифференцирующих *B. mallei* и *B. pseudomallei*: “Burk 23S-Eph” (РУ № ФСР 2012/13066), основанный на обнаружении гена 23S рРНК [Ткаченко и др., 2003] и “Амплиген Burk” (РУ РЗН 2013/1227), выявляющий последовательность гена *fliC* [Алтухова и др., 2007]. Набор реагентов “Амплиген *Burk-mallei/pseudomallei*-PB”» (РУ 2018/7999), детектирующий псевдоген порообразующего белка системы секреции флагеллина (*fliP::IS407A*) у *B. mallei* и ген ацетилтрансферазы *gp68* – у *B. pseudomallei*, и позволяющий идентифицировать оба вида [Лемасова и др., 2019] и, разработанный при непосредственном участии автора настоящей работы генодиагностический препарат “Амплиген буркхольдерии группы «*pseudomallei*» BLB/D – EPH” (РУ РЗН 2018/7785), идентифицирующий в формате одной реакции три близкородственные буркхольдерии – *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* по индивидуальному для каждого вида набору генов β-лактамаз молекулярных классов В и D. Кроме того, «ЗАО Синтол» производит коммерческий набор реагентов “ОМ-Скрин-Бру/Сап/Мелиоидоз-РВ”(РУ РЗН 2015/2697), выявляющий возбудителей бруцеллеза, мелиоидоза и сапа. Генодиагностические мишени данного набора производителем не раскрываются.

Генотипическое и фенотипическое сходство видов комплекса «*B. pseudomallei*» стимулировали создание ПЦР-систем, предназначенных для их дифференциации за счет выявления двух и более генетических мишеней. Набор праймеров в таких тест-системах, как правило, включает одну пару видоспецифических и дополнительные группоспецифические праймеры. В результате создает-

ся уникальный амплификационный профиль, дифференцирующий виды внутри комплекса.

К настоящему времени разработаны тест-системы, дифференцирующие *B. pseudomallei* и *B. mallei* [U'Ren et al., 2007; Bowers et al., 2010; Лемасова и др., 2019] либо другие комбинации видов внутри *Bps* [Bauernfeind et al., 1998; Thibault et al., 2004; Lee et al., 2005; Wattiau et al., 2007; Ho et al., 2011; Price et al., 2012; Lowe et al., 2016]. Среди разработанных тест-систем для дифференциации отдельных представителей *Bps* и *B. serasia* представлено только два варианта мультиплексной ПЦР [Supriah et al., 2010; Ho et al., 2011] и единственный – для дифференциации трех видов *Bps* и *B. serasia* [Koh et al., 2012].

Несмотря на многообразие существующих методов генодиагностики возбудителя мелиоидоза, проблема надежной идентификации *B. pseudomallei* и его дифференциации от других видов буркхольдерий остается актуальной. Так, процедура выявления *B. pseudomallei* путем детекции *orf 2* T3SS1 [Novak et al., 2006], признанная в ПЦР-диагностике мелиоидоза «золотым стандартом», в отдельных случаях показала ложноотрицательные и ложноположительные результаты при исследовании чистых культур [Trung et al., 2011; Kaestli et al., 2012; Price et al., 2012], инокулированных образцов почвы [Kaestli et al., 2007; Trung et al., 2011], проб окружающей среды [Kaestli et al., 2007; Trung et al., 2011], а также клинических проб [Meumann et al., 2006; Chantratita et al., 2008; Kaestli et al., 2012]. Необходимо отметить, что единственным ложноотрицательным при исследовании очищенной ДНК чистых культур был почвенный штамм *B. pseudomallei* SBCT-RF80-BP1 с частично редуцированным геномом, в котором отсутствовали некоторые локусы, в том числе гены кластера T3SS1, включая *orf2* [Price et al., 2012].

Адаптация бактерий окружающей среды к существованию в организме хозяина обычно приводит к редуктивной эволюции, т. е. утрате несущественных генов или фрагментов генома, тем самым уменьшая метаболические затраты и увеличивая селективное преимущество бактерии [Losada et al., 2010]. Установлено, что при хроническом течении мелиоидоза в геноме *B. pseudomallei* могут происходить делеции, порой весьма значительные (до 309 т.п.н.) [Trunck et al., 2009;

Török et al., 2012; Price et al., 2013; Bugrysheva et al., 2015; Viberg et al., 2017]. Причем, от 50 до 100% генов, утраченных *B. pseudomallei*, также отсутствуют и у *B. mallei*, демонстрируя, что эти регионы не нужны для длительного выживания в организме млекопитающих [Nierman et al., 2004; Price et al., 2013; Viberg et al., 2017]. Этот факт весьма примечателен, поскольку в качестве ДНК-мишеней для идентификации и дифференциации возбудителей мелиоидоза и сапа, как правило, выбирают гены, присутствующие у *B. pseudomallei* и утраченные в процессе эволюции *B. mallei*.

Исследование геномов парных штаммов *B. pseudomallei*, выделенных от больных с кистозным фиброзом и хронической формой мелиоидоза показало наличие инделов в гене *wcbR* оперона, кодирующего биосинтез капсульного полисахарида. Обнаружены инделы в четырех локусах (*wbiH*, *wbiI*, *oacA* и BPSL1120) и миссенс мутации в различных локусах ЛПС, обуславливающие его утрату, что имеет решающее значение для уклонения от иммунного пресса и долговременного выживания *B. pseudomallei* в макроорганизме [Price et al., 2013; Viberg et al., 2017]. Кроме того, у клинических штаммов описаны мутации в генах систем секреции III и VI типов, а также делеции, затрагивающие данные генетические кластеры [Bugrysheva et al., 2015; Viberg et al., 2017]. Изменения в последовательностях диагностических мишеней или их утрата являются причиной получения ложноотрицательных результатов даже с использованием наиболее надежных тест-систем, что имело место в случае вышеупомянутого почвенного изолята SBCT-RF80-BP1.

Принимая во внимание высокую пластичность генома *B. pseudomallei*, а также весьма значительный уровень гомологии хромосомных ДНК у видов *B. p* и *B. m*, идентификация возбудителя, основанная на детекции единственной целевой мишени, содержит определенный риск получения ложных результатов. Для минимизации данного риска рационально параллельно использовать не менее двух вариантов ПЦР-анализа, выявляющих отличные генетические локусы, и, при необходимости, последующую верификацию результатов такими методами генотипирования как анализ нуклеотидной последовательности гена *recA* и MLST. А

для лабораторий, не имеющих такой возможности, оптимально использовать дифференцирующие мультиплексные системы идентификации.

Таким образом, несмотря на разнообразие существующих подходов ПЦР-диагностики, поиск генетических мишеней для выявления возбудителя мелиоидоза и его дифференциации от других клинически значимых буркхольдерий остается актуальным.

Одним из критериев для этого поиска является минимальный риск утраты бактериального гена-мишени в процессе адаптации к макроорганизму. В связи с этим, на наш взгляд, было логично изучить потенциальную возможность использования в этом качестве генов β -лактамаз, широко и разнообразно представленных на обеих хромосомах *B. pseudomallei*. Препаратом выбора для лечения мелиоидоза является цефтазидим, применение которого в отдельных случаях индуцирует возрастание уровня продукции β -лактамаз, в том числе и из-за множественной дупликации их генов [Viberg et al., 2017], что теоретически обеспечивает высокую аналитическую чувствительность за счет увеличения количества целевых мишеней в геноме.

Относительно недавно показана возможность успешной идентификации клинически важных бактерий при помощи ПЦР-анализа, основанного на детекции генов видоспецифических β -лактамаз. Так, для *Acinetobacter baumannii* мультиплексная ПЦР, выявляющая гены blaOXA-51-, blaOXA-23-подобных β -лактамаз и ген интегразы интегрона класса 1, позволяет не только определить видовую принадлежность штамма, но и предсказать его вероятный генотип [Turton et al., 2006]. R. Li с соавторами разработали метод идентификации *Vibrio parahaemolyticus* на основании выявления гена blaCARB-17, показавший 100% специфичность [Li et al., 2016].

В отличие от консервативных генетических мишеней, аналогов использования генов β -лактамаз для идентификации патогенных буркхольдерий в доступной мировой литературе не обнаружено. Принимая во внимание, что детерминанты устойчивости к антибактериальным агентам у большинства бактерий, как правило, относятся к аксессуарной части генома, для оценки потенциала использования

генов β -лактамаз различных молекулярных классов в качестве генодиагностических мишеней было необходимо провести анализ их генетической стабильности при реализации различных механизмов развития резистентности.

5.1 Молекулярно-генетические основы резистентности *Burkholderia pseudomallei* к β -лактамам

К настоящему времени у *B. pseudomallei* описаны практически все известные бактериальные механизмы избегания ингибирующего воздействия антибиотиков: изменение проницаемости внешней мембраны; активное выведение антибиотика из клетки (efflux) [Schweizer, 2012]; энзиматическая инактивация; модификация молекулы-мишени, а иногда даже полная утрата генов целевых белков [Török et al., 2012]. Исследования последних лет показали, что у *B. pseudomallei* доминирующим механизмом, определяющим устойчивость к большинству классов антибиотиков, является именно эффлюкс. Два из трех охарактеризованных в деталях RND насосов – AmrAB-OprA и VpeEF-OprC – обеспечивают у *B. pseudomallei* устойчивость к аминогликозидам, макролидам, хлорамфениколу, фторхинолонам, тетрациклинам, триметоприму, а в некоторых случаях и котримаксазолу [Moore et al., 1999; Viktorov et al., 2008; Podnecky et al., 2013].

Однозначных доказательств устойчивости *B. pseudomallei* к β -лактамам, обусловленной иными, помимо ферментативной инактивации, механизмами, на сегодняшний день нет, однако опубликованы данные, что у мутантных штаммов возбудителя с повышенным уровнем резистентности к фторхинолонам и цефалоспорином возрастает экспрессия эффлюкс-транспортеров суперсемейств RND (resistance, nodulation, cell division) и MFS (major facilitator superfamily) [Viktorov et al., 2008], а уровень экспрессии VpsOmp38 – поринового белка внешней мембраны и мутации в его гене, влияющие на проницаемость, коррелируют с уровнем восприимчивости *B. pseudomallei* к антибиотикам, в том числе к карбапенемам и цефалоспорином [Aunkham et al., 2014]. Недавно было показано, что снижение восприимчивости к меропенему у клинических изолятов часто связано с регуля-

торными мутациями, приводящими к увеличению экспрессии генов эффлюкса семейства RND. Чаще всего затрагивается *amrR* – ген, кодирующий репрессор семейства TetR оперона эффлюкса AmrAB-OprA [Sarovich et al., 2018]. В работе N. Sirijant было установлено возрастание в фазе биопленки экспрессии генов BPSL1661, BPSL1664 и BPSL1665, являющихся ортологами генов эффлюкса в фазе биопленки *P. aeruginosa*, что сопровождалось значительным увеличением МИК для доксициклина, цефтазидима и имипенема по сравнению с планктонными клетками [Sirijant et al., 2016].

Интересно, что *B. pseudomallei* может использовать прямо противоположные стратегии приобретения устойчивости к β -лактамам. У возбудителя мелиоидоза описан ранее неизвестный механизм значительного повышения уровня резистентности к цефалоспорином за счет утраты целого кластера генов, в числе которых ген пенициллинсвязывающего белка семейства PBP 3 (BPSS1219) – основной мишени цефтазидима [Chantratita et al., 2011; Török et al., 2012]. А не так давно было показано, что при воздействии цефтазидима *in vivo* у *B. pseudomallei* возрастает экспрессия генов PBP, среди которых, помимо PBP 3, были альтернативные пенициллинсвязывающие белки, потенциально компенсирующие эффект инактивации мишени [Cummings and Slayden, 2017], то есть механизмы гиперэкспрессии молекулы-мишени в сочетании с ее имитацией. Однако, по-прежнему принято считать, что основной вклад в резистентность к антибиотикам этого класса остается за β -лактамазами [Livemore et al., 1987; Godfrey et al., 1991; Panya et al., 2016; Bugrysheva et al., 2017].

Во многих случаях устойчивость бактерий к β -лактамам опосредуется мобильными элементами, такими как плазмиды и транспозоны, или интегронами, однако, все гены β -лактамаз, обнаруженные у *B. pseudomallei* имеют хромосомную локализацию. В геноме референтного штамма K96243 присутствуют, по меньшей мере, семь генов β -лактамаз классов А, В и D (по классификации Ambler), включая цефалоспориназы и оксациллиназу (Таблица 28).

Таблица 28 – гены β -лактамаз *B. pseudomallei* K96243

| Локус/Ген | Класс (по Ambler) | Суперсемейство | Семейство |
|---|----------------------|---------------------------------------|---|
| Хромосома I (GenBank NC_006350.1) | | | |
| BPS_RS01970 | B | металло- гидролазы/оксидоредуктазы | Глиоксалазы II Zn-металло- β -лактамазы/ Алкилсульфатазы |
| BPS_RS08290 | B | | Глиоксалазы II Персульфиддигидрогеназы |
| BPS_RS14545 | B | | Глиоксалазы II Zn-металло- β -лактамазы |
| Хромосома II (GenBank NC_006351.1) | | | |
| BPS_RS30385 | B | металло- гидролазы/оксидоредуктазы | Глиоксалазы II |
| BPS_RS29225 | B | | β -CASP РНК-метаболизующие гидролазы |
| BPS_RS23870 (PenA) | A | β -лактамазы/транспептидазы | β -лактамазы/D-ala карбоксипептидазы |
| BPS_RS29690 (OXA) | D | | β -лактамазы/D-ala карбоксипептидазы, оксациллиназы |

Препаратом выбора при лечении мелиоидоза является цефтазидим, резистентность к которому коррелирует с продукцией β -лактамаз. Еще в 1991 году А. J. Godfrey с соавторами описаны три разных фенотипа резистентности к цефтазидиму у клинических изолятов от трех пациентов, получавших терапию данным антибиотиком. Было продемонстрировано три различных механизма развития устойчивости: дерепрессия продукции β -лактамаз, мутации в генах, вызвавшие изменение субстратной специфичности ферментов и нечувствительность к ингибиторам [Godfrey et al., 1991].

Ведущим механизмом ферментативной инактивации β -лактамов у *Burkholderia* spp., по данным последних исследований, является их гидролиз β -лактамазой класса А – PenA (или ее аналогами, например, Bla_{PenA}). PenA – единственный из ферментов, роль которого в развитии резистентности возбудителя мелиоидоза к β -лактамам полностью доказана. Ген *penA* у *B. pseudomallei* локализован на малой хромосоме и кодирует β -лактамазу, восприимчивую к ингибированию клавулановой кислотой, и относится к группе 2e по классификации Bush [Bush et al., 1995]. Ген *penA* был обнаружен у подавляющего большинства штаммов возбудителя мелиоидоза, выделенных от больных людей, животных и из окружающей среды [Cheung et al., 2002; Panya et al., 2016]. Белок, кодируемый этим геном, фактически классифицируется как β -лактамаза расширенного спектра

(ESBL - extended-spectrum- β -lactamase) – PenI [Rholl et al., 2011]. Была показана корреляция между уровнем экспрессии *penA* и уровнем устойчивости к большинству β -лактамов, более того, удаление *penA* приводило к чувствительности ко всем антибиотикам этого класса [Rholl et al., 2011].

Предсказанная последовательность белка содержит все четыре консервативных мотива, характерных для β -лактамаз класса А, а именно: SXXK, SDN, омега (EXXLN) и KTG-мотивы [Joris et al., 1991]. Позже последовательность гена *penA* (*blaA*) была клонирована и секвенирована, что позволило подтвердить наличие в белке этих мотивов и определить их локализацию: 70SXXK73, 130SDN132, 166EXXXN170 и 234KTG236 [Cheung et al., 2002]. Анализ нуклеотидной последовательности выявил *orf* из 888 пар оснований, кодирующую 295-аминокислотную последовательность с предполагаемым сайтом отщепления сигнального пептида в положении 22 N-концевой области. Для предполагаемого зрелого белка из 274 аминокислотных остатков расчетная молекулярная масса составила 29,1 кДа [Cheung et al., 2002]. Зрелый белок имел значительную степень идентичности с известными β -лактамазами: PenA *B. cepacia* (65%), BlaI *Yersinia enterocolitica* (57,1%), CTX-M-18 *Klebsiella pneumoniae* (55,9%), SFO-1 *Enterobacter cloacae* (54,3%), FONTA-4 из *Serratia fonticola* (53,9%) и OXY *Klebsiella oxytoca* (53,3%) [Cheung et al., 2002].

Анализ N-концевой аминокислотной последовательности PenA показал наличие предполагаемой TAT-сигнальной последовательности, указывающей, что это секретируемый белок TAT (twin arginine translocase) [Stanley et al., 2000; Rholl et al., 2011]. Система TAT, помимо того, что играет важную роль в экспорте факторов вирулентности у многих бактерий [DeBuck et al., 2008], требуется для секреции β -лактамазы у *Mycobacterium smegmatis* [McDonough et al., 2005]. Путем удаления оперона *tatABC* и мутации, затрагивающей критический аргининовый остаток предполагаемой TAT-сигнальной последовательности, было показано, что PenA действительно является TAT-секретируемым ферментом [Rholl et al., 2011].

Регуляция экспрессии некоторых β -лактамаз осуществляется регуляторными факторами семейства LysR, вне зависимости от присутствия β -лактамаиндуктора. Представители β -лактамаз группы 2e являются индуцибельными ферментами. Еще в 1997 году было установлено, что экспрессия *penA* *B. ceracia* индуцибельна в присутствии имипенема и регулируется фактором семейства LysR, кодируемым дивергентно транскрибируемым геном *penR* [Trepanier et al., 1997]. Индуцибельность *PenA* *B. pseudomallei* подтверждается данными Р. Panomket с соавторами: терапия цефтазидимом была успешной только для 30,3% пациентов, первичные штаммы которых все были чувствительными к цефтазидиму, но приобрели устойчивость в процессе лечения [Panomket et al., 2011]. Кроме того, было показано, что культивирование штаммов *B. pseudomallei* в присутствии субингибирующих концентраций цефтазидима приводит к повышению их резистентности [Viktorov et al., 2008; Panya et al., 2016].

Ген *penA* *B. pseudomallei* фланкирован двумя генами, гомологичными *penR* *B. ceracia* – BPSS0948 и BPSS0944, причем последний имеет меньшую гомологию нуклеотидной последовательности по отношению к *penR* и отделен от *penA* предполагаемым геном пептидазы. Однако их участия в регуляции экспрессии *penA* у *B. pseudomallei*, по крайней мере, в условиях проведенных исследований, выявить не удалось [Rholl et al., 2011]. Ранее было установлено, что если в бактериальном штамме присутствует несколько β -лактамаз, они могут подвергаться комплексному регулированию, включая корегуляцию с пенициллин связывающими белками. Так, при воздействии цефтазидима *in vivo* у *B. pseudomallei* возрастает экспрессия генов PBP [Cummings and Slayden, 2017].

У клинических штаммов возбудителя мелиоидоза был описан целый ряд мутаций в *penA*, вызывающих замену критических аминокислот в консервативных областях активных центров фермента, вследствие чего меняется его субстратная специфичность: повышается аффинность к цефтазидиму и/или снижается восприимчивость к ингибированию клавулановой кислотой. В частности, замещение С69У приводит к высокому уровню устойчивости к цефтазидиму [Sarovich et al., 2012], замена Р167S – среднему уровню, а S72F обеспечивает резистентность к

клавулановой кислоте [Tribuddharat et al., 2003]. У штамма *B. thailandensis*, устойчивого к цефтазидиму, выявлена делеция кодона для глутамата (Glu168del), затрагивающая функциональную область, называемую омега-петлей. Делеция вызывает нарушение структуры α -спирали, что, в свою очередь, ведет к расширению внутреннего пространства петли и повышает гибкость консервативного мотива 166EXXXN170. Эта мутация представляет альтернативный механический путь к расширению спектра субстратов для PenA, помимо более распространенных мутаций замещения [Yi et al., 2012a]. Мутации замен, как правило, имеют однонаправленный вектор: от исходного спектра – к новому. Н. Yi с соавторами описали интересный механизм обратимого переключения между субстратными спектрами за счет дублирования/вырезания фрагментов ДНК в области омега-петли, опосредованного прямыми повторами [Yi et al., 2014].

Различного рода мутации в гене *penA*, затрагивающие область омега-петли и приводящие к повышению резистентности к цефалоспорином 3-го поколения, одновременно снижают гидролитическую активность фермента в отношении своих предковых мишеней, пенициллинов [Wang et al., 2002] и не обеспечивают резистентности к клавулонату и карбапенемам [Yi et al., 2012b].

До недавнего времени случаи обнаружения устойчивости клинических изолятов *B. pseudomallei* к имипенему были крайне редки, а к меропенему – отсутствовали. Но в последние годы стали появляться сообщения о появлении полирезистентных клинических штаммов возбудителя, устойчивых, в том числе и к карбапенемам [Bugrysheva et al., 2015, 2017; Price et al., 2017].

По данным J. V. Bugrysheva с соавторами (2017), у полирезистентного клинического штамма *B. pseudomallei* Bp1651, устойчивого к нескольким классам антибиотиков, которые обычно эффективны для лечения мелиоидоза, включая тетрациклины, сульфонамиды и β -лактамы (амоксициллин-клавулановая кислота, цефтазидим, имипенем и меропенем), идентифицированы три ранее неохарактеризованных точечных мутации в *penA*, одна из которых – T147A – способствует устойчивости к амоксициллин/клавулановой кислоте и имипенему. Любопытно, что данная мутация не затрагивает консервативных мотивов и расположена меж-

ду 130SDN132 и омега-петлей (166EXXXN170) и механизм расширения спектра субстратной специфичности PenA пока неясен. Тем не менее, эти данные являются первым доказательством того, что мутации в *penA* могут изменять восприимчивость *B. pseudomallei* к карбапенемам [Bugrysheva et al., 2017].

Помимо изменений в структурной части гена *penA*, к повышению устойчивости возбудителя к цефтазидиму могут приводить мутации его промоторной области, сопровождаемые к гиперпродукцией PenA [Yi et al., 2012b].

Обнаруженные у *B. pseudomallei* β -лактамазы класса D в соответствии с субстратной специфичностью относят к оксациллиназам. К настоящему времени в различных штаммах идентифицированы три высокогомологичных фермента (ОХА-42, ОХА-43 и ОХА-57). У резистентных к цефтазимидам штаммов в его присутствии возрастает транскрипция для всех трех идентифицированных форм фермента. Однако их гидролитической активности в отношении данного антибиотика не наблюдалось ни в одном случае [Niumsup and Wuthiekanun, 2002; Keith et al., 2005], вследствие чего авторы предполагают, что избыточная экспрессия этих ферментов вряд ли является причиной устойчивости к цефтазидиму.

Как упоминалось выше, у грамотрицательных неферментирующих бактерий, к которым относится и возбудитель мелиоидоза, достаточно часто причиной резистентности к β -лактамам является продукция металло- β -лактамаз, относящихся к молекулярному классу В (по классификации Амблер). Металло- β -лактамазы представляют собой разнообразный набор ферментов, которые катализируют гидролиз широкого спектра β -лактамных препаратов, включая карбапенемы, вследствие чего их часто называют карбапенемазами.

У *B. pseudomallei* из семи обнаруженных β -лактамаз пять относятся к молекулярному классу В и входят в состав суперсемейства металло-гидролазы/оксидоредуктазы. Гены трех из них (BPS_RS01970, BPS_RS08290, BPS_RS14545) локализованы на хромосоме I, двух (BPS_RS29225 и BPS_RS30385) – на хромосоме II. За исключением металло- β -лактамазы BPS_RS29225, относящейся к семейству β -CASP РНК-метаболизующие гидролазы, они принадлежат к разным группам семейства глиоксалазы II.

Несмотря на присутствие в хромосомах *B. pseudomallei* генов карбапенемаз, имипенем и меропенем успешно использовали для лечения мелиоидоза в качестве «последнего средства» и, до недавнего времени, в подавляющем большинстве случаев резистентности возбудителя к карбапенемам не наблюдали, а функциональная роль металло- β -лактамаз *B. pseudomallei* до настоящего времени неясна.

Интересные факты, касающиеся механизмов резистентности, были получены при изучении экспрессии генов возбудителя в различных условиях. Анализ изогенных мутантов *B. pseudomallei* по генам *bprS* и *bprR* регуляторной системы TCSTS (two-component signal transduction systems) показал, что инактивация каждого из этих генов ведет к аттенуации штаммов за счет снижения вирулентности и уменьшения подвижности, а также к изменению уровня экспрессии широкого диапазона генов [Adler et al., 2016]. В контексте данной работы, привлекает внимание, что при этом значительно возрастает экспрессия генов, обеспечивающих развитие антибиотикорезистентности: *bpeR* (регулятор семейства TetR), *bpeA* и *bpeB*, кодирующие RND-эффлюкс BpeAB-OprA, BPSL 2708, (предполагаемая металло- β -лактамаза) и *penA* (β -лактамаза класса A). Авторы предполагают, что нарушение в одном из компонентов регуляторной системы TCSTS ведет к сопутствующей дисрегуляции других ключевых регуляторных генов [Adler et al., 2016].

Установлено, что если в бактериальном штамме присутствует несколько β -лактамаз, они могут подвергаться комплексному регулированию, включая корегуляцию с пенициллин связывающими белками (PBP) [Naas et al., 1995]. Кроме того, анализ транскрипционного ответа *B. pseudomallei* на присутствие цефтазидима *in vivo* выявил повышенную активность генов, входящих в состав оперона BP1026B П2141-П2142-П2144-П2145. Этот оперон кодирует потенциальный регулятор стрессового ответа и адаптации (BP1026B_П2144), ДНК-связывающий регулятор *irlR2* (BP1026B_П2142) и ген BP1026B_П2145, кодирующий β -лактамазу класса D [Niumsup and Wuthiekanun, 2002; Keith et al., 2005]. Респонс-регулятор *irlR2* относится к семейству TCSTS и осуществляет регуляцию поринового белка OprD, задействованного в проникновении карбапенемов в клетку. Идентификация значительно возрастающей активности *in vivo* генов этого оперона, а также не-

скольких РВР и β -лактамаз предполагает некоторую координацию экспрессии β -лактамаз *B. pseudomallei* и доказывают, по мнению авторов, наличие у *B. pseudomallei* потенциального механизма резистентности, активного исключительно во время инфекции [Cummings and Slayden, 2017]. Данный механизм, возможно, является одной из причин различия в эффективности ряда антибиотиков в отношении возбудителя при тестировании *in vitro* и *in vivo* [Cheng and Currie, 2005].

Перечисленные выше сведения лишь в некоторой степени отражают сложность и неоднозначность механизмов высокой природной и приобретенной устойчивости *B. pseudomallei* к β -лактамам. На сегодняшний день установлена ведущая роль в формировании резистентности к цефалоспорином 3-го поколения и карбапенемам β -лактамазы класса А PenA. Роль собственно карбапенемаз – металло- β -лактамаз, относящихся к классу В, как и оксациллиназы класса D остается неясной.

Как упоминалось выше, описаны эффективные методы идентификации клинически значимых бактерий, основанные на детекции генов видоспецифических β -лактамаз [Turton et al., 2006; Li et al., 2016]. В связи с чем следующей задачей нашей работы было изучение распространенности генов β -лактамаз среди штаммов возбудителя мелиоидоза различного географического происхождения, а также оценка потенциала их использования в качестве генодиагностических мишеней для выявления и дифференциации патогенных буркхольдерий.

5.2 Исследование потенциала генов β -лактамаз классов А, В и D для использования в качестве диагностических мишеней

5.2.1 Алгоритм и методы проведения анализа

С использованием специально сконструированных олигонуклеотидных праймеров, детектирующих гены β -лактамаз классов А, В и D, проведена экспериментальная оценка их распространенности путем исследования широкого набо-

ра коллекционных штаммов видов Врс и Всс, видов отдаленной гетерологии, а также исследование видоспецифичности разработанных праймеров. Полученные экспериментальные результаты были верифицированы биоинформатическими методами. Проведен анализ консервативности нуклеотидных последовательностей выбранных мишеней.

Экспериментальная оценка распространенности генетических мишеней и видоспецифичности разработанных праймеров была проведена в формате монолокусной ПЦР. Исследованы образцы геномной ДНК 96 штаммов коллекционных штаммов *Burkholderia* spp. дикого типа, представленных в Таблице 29, и 3 штамма *V. cholerae* (Таблица 31). Также были исследованы спонтанные и инсерционные мутанты *B. pseudomallei* (10 штаммов), *B. mallei* (8 штаммов), *B. thailandensis* (1 штамм) и *B. cenocepacia* (1 штамм) с измененной резистентностью к фторхинолонам и цефалоспорином из авторской коллекции (Таблица 30). Для контроля видоспецифичности праймеров исследовали штаммы гетерологичных видов (Таблица 31), отобранных по наличию признака резистентности к β -лактамам (получены из ГБУЗ «ВОКБ №1»).

Мутантные штаммы были получены в рамках Государственной НИР 046-3-07 (№ гос. регистрации 01200707220) и при осуществлении исследовательского проекта «Молекулярные механизмы формирования множественной лекарственной резистентности у *Burkholderia pseudomallei* и близкородственных видов» (грант РФФИ 07-04-01568). Селекцию спонтанных мутантов с повышенной резистентностью к цефтазидиму и ряду антибиотиков других классов проводили на плотных питательных средах с постепенным повышением концентрации антибактериального агента, начиная с субъингибирующей с шагом приращения 5 мкг/мл. Штаммы *B. pseudomallei* и *B. mallei* с повышенной чувствительностью к цефтазидиму и фторхинолонам являются Tn5- и Tn9-производными штамма *B. pseudomallei* 57576 T4 (чувствительный к тетрациклину и канамицину мутант из авторской коллекции проф. Мериновой Л.К.) и *B. mallei* 10230 со сниженным уровнем продукции ряда белков наружной мембраны.

Таблица 29 – Коллекционные штаммы *Burkholderia* spp.

| ШТАММ | ШТАММ | ШТАММ |
|---|--|-------------------------------|
| <i>B. mallei</i> Ц – 4 | <i>B. pseudomallei</i> Soil isolate 13 116 | <i>B. pseudomallei</i> 60263 |
| <i>B. mallei</i> Ц – 5 | <i>B. pseudomallei</i> Goat isolate 17 117 | <i>B. pseudomallei</i> 60631 |
| <i>B. mallei</i> 5584 | <i>B. pseudomallei</i> Sheep isolate 118 | <i>B. pseudomallei</i> 60806 |
| <i>B. mallei</i> 8 | <i>B. pseudomallei</i> Dallachu119 | <i>B. pseudomallei</i> 60839 |
| <i>B. mallei</i> В - 120 | <i>B. pseudomallei</i> 125 | <i>B. pseudomallei</i> 60913 |
| <i>B. mallei</i> 11 | <i>B. pseudomallei</i> 127 | <i>B. pseudomallei</i> 61503 |
| <i>B. mallei</i> Z – 12 | <i>B. pseudomallei</i> 128 | <i>B. pseudomallei</i> 611083 |
| <i>B. mallei</i> «Zagreb» | <i>B. pseudomallei</i> 129 | <i>B. pseudomallei</i> VPA |
| <i>B. mallei</i> «Иванович» | <i>B. pseudomallei</i> 130 | <i>B. pseudomallei</i> Vang |
| <i>B. mallei</i> P – 1 | <i>B. pseudomallei</i> 131 (7) | |
| <i>B. mallei</i> «Будапешт» | <i>B. pseudomallei</i> 132 (8) | <i>B. thailandensis</i> E 251 |
| <i>B. mallei</i> Muksuwar – 11 | <i>B. pseudomallei</i> 133 (9) | <i>B. thailandensis</i> E 264 |
| <i>B. mallei</i> Bogor – 37 | <i>B. pseudomallei</i> 134 (10) | <i>B. thailandensis</i> 265 |
| <i>B. mallei</i> 10230 | <i>B. pseudomallei</i> 135 (11) | <i>B. thailandensis</i> 295 |
| | <i>B. pseudomallei</i> 136 (12) | <i>B. thailandensis</i> 299 |
| <i>B. pseudomallei</i> 1 | <i>B. pseudomallei</i> 137 (13) | |
| <i>B. pseudomallei</i> 2 | <i>B. pseudomallei</i> 138 (16) | <i>B. cepacia</i> 122 |
| <i>B. pseudomallei</i> Tchad 97 | <i>B. pseudomallei</i> 139 (17) | <i>B. cepacia</i> 323 |
| <i>B. pseudomallei</i> Iran Terre 98 | <i>B. pseudomallei</i> 140 (18) | <i>B. cepacia</i> 506 |
| <i>B. pseudomallei</i> Niamay 99 | <i>B. pseudomallei</i> C-141 (CIP 6068) | <i>B. cepacia</i> 1934 |
| <i>B. pseudomallei</i> Dalat 100 | <i>B. pseudomallei</i> CCEB-860 | <i>B. cepacia</i> 3189 |
| <i>B. pseudomallei</i> Crachat d Iran 101 | <i>B. pseudomallei</i> BKM-900 | <i>B. cepacia</i> 8235 |
| <i>B. pseudomallei</i> Shigan 102 | <i>B. pseudomallei</i> 56738 | <i>B. cepacia</i> 8237 |
| <i>B. pseudomallei</i> Cherol du jurdin 103 | <i>B. pseudomallei</i> 56770 | <i>B. cepacia</i> 8240 |
| <i>B. pseudomallei</i> PI 54 107 | <i>B. pseudomallei</i> BKM-900 | <i>B. cepacia</i> 25416 |
| <i>B. pseudomallei</i> Ward 108 | <i>B. pseudomallei</i> 56738 | |
| <i>B. pseudomallei</i> Roos 109 | <i>B. pseudomallei</i> 56770 | |
| <i>B. pseudomallei</i> Pearce 110 | <i>B. pseudomallei</i> 57576 | |
| <i>B. pseudomallei</i> Mahen 111 | <i>B. pseudomallei</i> 57582 | |
| <i>B. pseudomallei</i> Coopek 112 | <i>B. pseudomallei</i> 59214 | |
| <i>B. pseudomallei</i> Skanmandri 113 | <i>B. pseudomallei</i> 59361 | |
| <i>B. pseudomallei</i> Snider 114 | <i>B. pseudomallei</i> 59426 | |
| <i>B. pseudomallei</i> Soil isolate 12 115 | <i>B. pseudomallei</i> 59437 | |

Таблица 30 –Штаммы *Burkholderia* spp. с измененным уровнем резистентности

| Штамм | Тип штамма | Характеристика штамма |
|---|---------------------|--|
| <i>B. pseudomallei</i> 56770 | Дикий тип | Cfz ^S Pfx ^S |
| <i>B. pseudomallei</i> 56770 SMCP | Спонтанный мутант | Cfz ^R Pfx ^R |
| <i>B. pseudomallei</i> 56770 SMPC | Спонтанный мутант | Cfz ^R Pfx ^R |
| <i>B. pseudomallei</i> 56770 SMOC | Спонтанный мутант | Cfz ^R Pfx ^R |
| <i>B. pseudomallei</i> 57576 | Дикий тип | Cfz ^S Pfx ^S |
| <i>B. pseudomallei</i> 57576 SMCP | Спонтанный мутант | Cfz ^R Pfx ^R |
| <i>B. pseudomallei</i> 57576 SMPC | Спонтанный мутант | Cfz ^R Pfx ^R |
| <i>B. pseudomallei</i> 57576 SMCO | Спонтанный мутант | Cfz ^S Pfx ^S |
| <i>B. pseudomallei</i> 57576 SMRT21 | Инсерционный мутант | (chr::Tn9) Bor ⁻ Tet ^S Kan ^S Cfz ^S Pfx ^R |
| <i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM6 | Инсерционный мутант | (chr::Tn5) Bor ⁻ Cfz ^S Pfx ^S |
| <i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM7 | Инсерционный мутант | (chr::Tn5) Bor ⁻ Cfz ^S Pfx ^S |
| <i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM9 | Инсерционный мутант | (chr::Tn5) Bor ⁻ Cfz ^S Pfx ^S |
| <i>B. mallei</i> Ц-5 | Дикий тип | Cfz ^S Pfx ^S |
| <i>B. mallei</i> Ц-5 SMP-150-2 | Спонтанный мутант | Cfz ^S Pfx ^R |
| <i>B. mallei</i> Ц-5 SMC | Спонтанный мутант | Cfz ^R Pfx ^S |
| <i>B. mallei</i> Ц-5 TTM418 | Инсерционный мутант | (chr::Tn5) Bor ⁻ Cfz ^S Pfx ^S |
| <i>B. mallei</i> Ц-5 TTM419 | Инсерционный мутант | (chr::Tn5) Bor ⁻ Cfz ^S Pfx ^S |
| <i>B. mallei</i> Ц-5 TTM474 | Инсерционный мутант | (chr::Tn5) Bor ⁻ Cfz ^S Pfx ^S |
| <i>B. mallei</i> 10230 | Дикий тип | Cfz ^S Pfx ^S |
| <i>B. mallei</i> 10230 TTM8 | Инсерционный мутант | (chr::Tn5) Bor ⁻ Cfz ^S Pfx ^S |
| <i>B. mallei</i> 10230 TTM43 | Инсерционный мутант | (chr::Tn5) Bor ⁻ Cfz ^S Pfx ^S |
| <i>B. mallei</i> 10230 TTM44 | Инсерционный мутант | (chr::Tn5) Bor ⁻ Cfz ^S Pfx ^S |
| <i>B. thailandensis</i> E264 | Дикий тип | Cfz ^S Pfx ^R |
| <i>B. thailandensis</i> E264 SMPC | Спонтанный мутант | Cfz ^R Pfx ^R |
| <i>B. cepacia</i> 25416 | Дикий тип | Cfz ^R Pfx ^R |
| <i>B. cepacia</i> 25416 NSP | НГ мутант | Bor ⁻ Cfz ^S Pfx ^S |
| Обозначения: Cfz – цефтазидим, Pfx – пefлоксацин, Bor ⁻ – инсерционные мутанты с пониженной продукцией мембранных протеинов НГ – нитрозогуанидин | | |

Таблица 31 – Штаммы гетерологичных видов микроорганизмов, устойчивых к β -лактамам антибиотикам

| Вид | Количество штаммов | Спектр резистентности к бета-лактамам |
|-----------------------------|--------------------|---|
| <i>Klebsiella spp.</i> | 1 | цефтазидим |
| <i>Klebsiella spp.</i> | 1 | ампициллин, амоксициллин/клавуланат |
| <i>Klebsiella spp.</i> | 2 | ампициллин, амоксициллин/клавуланат, пиперациллин, цефепим |
| <i>Klebsiella spp.</i> | 1 | амоксициллин/клавуланат, ампициллин, цефепим, цефтриаксон |
| <i>Klebsiella spp.</i> | 2 | амоксициллин/клавуланат, ампициллин, цефепим, цефоперазон, цефтазидим |
| <i>E. coli</i> | 2 | ампициллин, амоксициллин/клавуланат |
| <i>E. coli</i> | 3 | амоксициллин/клавуланат, ампициллин, цефепим |
| <i>E. coli</i> | 2 | амоксициллин/клавуланат, ампициллин, цефоперазон |
| <i>E. coli</i> | 2 | амоксициллин/клавуланат, пиперациллин, цефепим, цефтриаксон, цефтазидим |
| <i>E. coli haemolyticus</i> | 2 | амоксициллин/клавуланат, ампициллин, пиперациллин, цефтриаксон, цефтазидим |
| <i>P. mirabilis</i> | 1 | ампициллин, цефтазидим, цефтриаксон |
| <i>P. mirabilis</i> | 1 | амоксициллин/клавуланат, ампициллин, пиперациллин |
| <i>Acinetobacter</i> | 1 | имипенем, меропенем, пиперациллин, цефоперазон, цефтазидим |
| <i>Acinetobacter</i> | 1 | пиперациллин, цефоперазон, цефтазидим |
| <i>P. aeruginosa</i> | 2 | амоксициллин, ампициллин |
| <i>P. aeruginosa</i> | 3 | пиперациллин, цефепим, цефоперазон, цефтазидим |
| <i>P. aeruginosa</i> | 2 | оксациллин, цефазолин |
| <i>P. aeruginosa</i> | 2 | амоксициллин/клавуланат, ампициллин, цефепим, цефоперазон, имипенем |
| <i>S. aureus</i> | 2 | оксациллин, цефазолин, цефепим, цефтазидим |
| <i>S. aureus</i> | 1 | амоксициллин/клавуланат, оксациллин |
| <i>S. aureus</i> | 2 | амоксициллин, оксациллин |
| <i>S. aureus</i> | 1 | амоксициллин/клавуланат, ампициллин, цефоперазон |
| <i>S. aureus</i> | 2 | амоксициллин, оксациллин, цефазолин, цефепим, цефоперазон, цефтазидим, имипенем |
| <i>S. epidermidis</i> | 3 | амоксициллин/клавуланат, оксациллин |
| <i>S. epidermidis</i> | 2 | амоксициллин/клавуланат, оксациллин, цефепим, цефтазидим |
| <i>V. cholerae O139</i> | 1 | пиперациллин, цефазолин |
| <i>V. cholerae O1</i> | 3 | ампициллин, амоксициллин |
| <i>V. cholerae O1</i> | 2 | амоксициллин/клавуланат |

Инсерционный мутагенез проводили путем конъюгационного переноса «суицидной» (pSUP5011::Tn5) и температурочувствительной (RP1::Tn9 Rep^{ts})

плазмид от донорных штаммов *E. coli* по методике передачи R-плазмид Р1 группы несовместимости в *B. pseudomallei* и *B. mallei* [Меринова и др., 1997]. Для контрселекции донорных штаммов *E. coli* в среду добавляли полимиксин (1000 мкг/мл), трансконъюганты отбирали по маркерам плазмидных векторов.

Чувствительность к антибиотикам у мутантных штаммов буркхольдерий оценивали методом серийных разведений в соответствии с МУК 4.2.2495-09 «Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам».

Штаммы культивировали на L-агаре, при 37 °С в течение 24-48 ч. Для выделения ДНК бактериальные суспензии инактивировали в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Геномную ДНК выделяли тремя методами, позволяющими получить препараты ДНК разной степени очистки. Неочищенный лизат получали методом протеиназного лизиса. Очищенную ДНК получали с применением коммерческих наборов «РИБО-сорб» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) и «GeneJET Genomic DNA Purification Kit («Thermo Scientific», Литва) в соответствии с прилагаемыми инструкциями.

ПЦР проводили на термоциклере C1000™ (BioRad) с использованием следующей программы амплификации для всех праймеров в моно- и мультиплексном формате: денатурация при 94 °С в течение 5 минут, 35 реакционных циклов (94 °С - 30 секунд, 59,9 °С - 30 секунд, 72 °С - 45 секунд) и финальная элонгация при 72 °С в течение 2 мин. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле. Результаты документировали при помощи системы «GelDoc» («BioRad», США).

Набор последовательностей генетических мишеней для выявления видов *Brc* формировали с использованием инструмента Nucleotide BLAST GenBank NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE>) с оптимизацией «схожие по-

следовательности» (blastn). Сиквенсы известных генов бактериальных β -лактамаз сравнивали с аннотированными геномами *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* (Genbank CP000010, CP000011, CP000545, CP000546, CP000547, CP000548, CP000525, CP000526, CP000572, CP000573, CP000124, CP000125, CP000570, CP000571, BX571965, BX571966, CP000085, CP000086, CM000775, CM000774), а также 12 неаннотированными геномами данных видов микроорганизмов, представленных в GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) и базе данных J. Craig Venter Institute (<http://gsc.jcvi.org/projects>).

Для анализа распространенности генетических мишеней также использовали Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE>) с оптимизацией «высокое сходство последовательности» (megablast). Поиск дискриминирующих регионов с консервативными сайтами отжига праймеров проводили с использованием алгоритма CLUSTALW [Thompson et al., 1994].

Дизайн праймеров выполняли с использованием процедуры «multi-locus PCR primers» программы Fast PCR v.6.1.72 (Primer Digital Ltd).

Белковые продукты обнаруженных генов были проверены на наличие консервативных аминокислотных мотивов, характерных для β -лактамаз классов А, В и D [Ambler, 1980], при помощи инструмента InterProScan (www.ebi.as.uk/Tools/InterProScan).

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей генов-мишеней и его визуализацию проводили при помощи программного пакета Unipro UGENE вер. 29 [Okonechnikov et al., 2012]. Для множественного выравнивания протяженных фрагментов хромосом и его визуализации применяли инструмент NCBI Multiple Sequence Alignment Viewer, Version 1.14.0 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/msviewer/>).

Для определения GC-состава фрагментов хромосомы использовали инструмент GC Content Calculator (Biologics International Corp, Indianapolis, USA) (<https://www.biologicscorp.com/tools/GCContent/index>). Процент содержания GC в ДНК вычислялся как количество (G + C) / количество (A + T + G + C) x 100.

Виртуальный анализ специфичности праймеров проводили с использованием инструмента Primer BLAST GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Сравнение проводили со всеми геномами, представленными в базе данных «NR» на момент проведения исследования, для чего поля «Organism» и «Entrez query» оставляли незаполненными.

Анализ филогенетических связей между паралогами β -лактамаз *B. pseudomallei* проводили с использованием веб-сервиса NGPhylogeny.fr (<https://ngphylogeny.fr>) методом FastME (версия 2.1.6.1_1) с использованием эволюционной модели Tamura-Nei (TN93) [Tamura and Nei, 1993] и дополнительным бутстрэп-анализом 100 случайных выборок. Визуализацию дендрограммы проводили с помощью сервиса iTOL (<https://itol.embl.de/tree/>).

5.2.2 Конструирование олигонуклеотидных праймеров

Методами биоинформатического анализа у *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* было обнаружено 118 кандидатных CDS. Виртуально транслированные белковые продукты выявленных CDS распределились по 9 группам гомологии, относящихся к 2 суперсемействам β -лактамазы/транспептидазы и металлогидролазы/оксидоредуктазы и принадлежали к β -лактамазам молекулярных классов А, В и D по классификации Ambler.

Выбор потенциальных генетических мишеней Врс определялся следующими критериями: принадлежность к различным молекулярным классам, наличие высокой степени внутригрупповой гомологии с одновременным присутствием вариабельных участков, дающих дополнительную возможность как для межвидовой дифференциации, так и для внутривидового типирования. В результате были отобраны 5 групп хромосомных локусов, к последовательностям которых сконструированы 5 пар праймеров, детектирующих гены β -лактамаз *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* классов А, В и D. Структура и характеристики разработанных праймеров представлены в Таблице 32.

Таблица 32 – Праймеры для детекции генов β -лактамаз *Burkholderia* spp.

| Праймер | Последовательность, 5' – 3' | Генетическая мишень (локус) | Размер п.н. | Температура отжига праймеров (°C) |
|--|---|--|-------------|-----------------------------------|
| <i>bm1F1</i> <i>bm4R1</i> | TTCCCGCGATCCGCCTGATGA CTTGTTGCCGAGCATCCATGC | β -лактамаза класса А (BMA10247_A1040 / BPS_RS23870) | 680 | 59,9 |
| <i>bm1F2</i> <i>bm14R2</i> | ACGTTTCCTCGGCGCGACGGAAAC CCGGATGATGTTTCGAGTAGCCGTG | β -лактамаза класса В (BMAA0168 / BPS_RS29225) | 352 | 59,8 |
| <i>bps1F3</i> <i>bps1R3</i> | ACGGCAATTCCTCCATTGCGA CTCGTCAGGTTGCGTCCGGAGT | β -лактамаза класса В (BURPS1106B_2313 / BPS_RS30385) | 727 | 59,9 |
| <i>bps1F4</i> <i>bps8R4</i> | CGCATTCGTTTTGCTGGGTTGCAT TCTGCAGCGACGAGCCGATCCA | β -лактамаза класса D (BURPS1106B_2455 / BPS_RS29690) | 440 | 60,0 |
| <i>bps3F5</i> <i>bps8R5</i> | TCTGTGGCTGCTGCGCGACGAGAT GCACAGCCAGTTCGCGAGTCCGA | β -лактамаза класса В (BURPS1106B_A3704 / BPS_RS01965) | 190 | 59,9 |
| <u>Примечание</u> Приведены локусы оригинальных генетических мишеней / ортологичные локусы типового штамма <i>B. pseudomallei</i> K96243 (NCBI Reference Sequences: NC_006351.1 и NC_006350.1) для унификации | | | | |

5.2.3 Экспериментальная оценка распространенности генетических мишеней и анализ видоспецифичности разработанных праймеров

Проведенная экспериментальная оценка распространенности генетических мишеней и видоспецифичности разработанных праймеров показала присутствие последовательности металло- β -лактамазы класса В (локус BPS_RS29225 у *B. pseudomallei* K96243) у всех исследованных коллекционных штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* и *B. ceracia* и ее отсутствие у исследованных видов отдаленной гетерологии (Рисунок 30). Из чего следует, что пара праймеров *bm1F2/bm14R2* является группоспецифичной для видов Врс и Всс.

Обнаружено наличие гена β -лактамазы класса А (BPS_RS23870) в геномах штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. ceracia* и его отсутствие у *B. thailandensis* и исследованных видов отдаленной гетерологии (Рисунок 30), то есть, пара праймеров *bm1F1/bm4R1* позволяет дифференцировать перечисленные виды буркхольдерий и *B. thailandensis*.

формате мультиплексной ПЦР может обеспечить дифференциацию видов буркхольдерий как внутри комплекса «*B. pseudomallei*», так и с *B. ceracia* (Таблица 33). Однако, на основании литературных данных о стимулируемой цефтазидимом выраженной мутационной изменчивости гена *penA* (включающей помимо точечных мутаций, протяженные дупликации и делеции), потенциально влияющей на образование и/или размер ампликона, мы посчитали включение четвертой пары *bm1F1/bm4R1* в диагностический набор праймеров нецелесообразным. В связи с этим, дальнейший анализ праймеров *bm1F1/bm4R1*, специфичных последовательности гена β -лактамазы класса А, не проводили.

Таблица 33 – Распространенность генов β -лактамаз у *Burkholderia* spp. и гетерологичных видов

| 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. ceracia</i> | + | - | - | + | + |
| Гетерологич- ные виды* | - | - | - | - | + |

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

Таким образом, проведенная экспериментальная оценка распространенности генетических мишеней и видоспецифичности разработанных праймеров показала, что использование триплексной ПЦР является достаточным для уверенной идентификации *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* и их дифференциации от видов Всс и отдаленной гетерологии.

5.2.4 Анализ распространенности выбранных генетических мишеней в мировой популяции *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* биоинформатическими методами

Полученные экспериментальные результаты анализа распространенности генов β -лактамаз молекулярных классов В и D мы проверили *in silico*, проведя поиск ортологов выбранных генетических мишеней в геномах штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* и видов *Bcc*, размещенных в базе данных GenBank NCBI.

Гомологи β -лактамазы класса В (BPS_RS30385) обнаружены в полных геномах 100% штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*; β -лактамазы класса В (BPS_RS29225) – в геномах 100% штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* и видов *Bcc*; β -лактамазы класса D (BPS_RS29690) – в геномах 100% штаммов *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*. Обнаруженные ортологичные гены полностью совпадали по размерам у штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа с идентичностью нуклеотидных последовательностей в интервале 99,33 – 100%, длина выравнивания ортологов у *B. thailandensis* составила 99-100% при идентичности последовательностей не менее 93%. Среди тестируемых генов-мишеней у видов *Bcc* ортологи обнаружены только для β -лактамазы класса В (BPS_RS29225) с уровнем гомологии в интервале 76,73–87,50% при длине выравнивания 70–96% (Таблица 34).

Поскольку при заданных параметрах для сравнения использовались последовательности с высоким уровнем сборки, мы провели отдельный анализ WGS упомянутого выше штамма *B. pseudomallei* SBCT-RF80-BP1 с частично редуцированным геномом [Price et al., 2012], который не идентифицируется путем детекции *orf 2* T3SS1 [Novak et al., 2006]. Были обнаружены все искомые гены: гомологи BPS_RS29225 (идентичность 99.71%) и BPS_RS29690 (100%) находятся на контиге 77 (NZ_LWWV01000077.1), BPS_RS30385 (100%) – на контиге 33 (NZ_LWWV01000033.1). Длина выравнивания во всех случаях составила 100%.

Таблица 34 – Результаты *in silico* анализа распространенности генов β -лактамаз молекулярных классов В и D в штаммах буркхольдерий комплексов «*B. pseudomallei*» и «*B. cecacia*»

| Штамм | Гомологи β -лактамазы класса В (BPS_RS30385) | | | Гомологи β -лактамазы класса В (BPS_RS29225) | | | Гомологи β -лактамазы класса D (BPS_RS29690) | | | GenBank Ac. |
|------------------------|--|--------------------|------------------|--|--------------------|------------------|--|--------------------|------------------|-------------|
| | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | |
| <i>B. pseudomallei</i> | | | | | | | | | | |
| 1026b | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP002834.1 |
| 1026b | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP004380.1 |
| 1106a | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP000573.1 |
| 1710b | 100% | 0.0 | 99.87 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP000125.1 |
| 406e | 100% | 0.0 | 99.87 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP009297.1 |
| 576 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP008778.1 |
| 7894 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP009536.1 |
| A79A | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP009164.1 |
| B03 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP009150.1 |
| BPC006 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.88 | CP003782.1 |
| BP_3921g, | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 99.75 | LK936443.1 |
| HB PUB10134a | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 99.88 | CP008912.1 |
| HB PUB10303a | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP008893.1 |
| UKMD286 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 100.00 | LR595897.1 |
| UKMH10 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.75 | LR595893.1 |
| UKMPMC2000 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 100.00 | LR595895.1 |
| UKMR15 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.75 | LR595899.1 |
| K42 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP009163.1 |
| K96243 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP009537.1 |
| MSHR146 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP004043.1 |
| MSHR2243 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP009269.1 |

Таблица 34 – (Продолжение)

| Штамм | Гомологи β-лактамазы класса В (BPS_RS30385) | | | Гомологи β-лактамазы класса В (BPS_RS29225) | | | Гомологи β-лактамазы класса D (BPS_RS29690) | | | GenBank Ac. |
|---------------|--|--------------------|------------------|--|--------------------|------------------|--|--------------------|------------------|-------------|
| | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | |
| MSHR2543 | 100% | 0.0 | 99.46 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 99.88 | CP009477.1 |
| MSHR3965 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 99.88 | CP009152.1 |
| MSHR491 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP009484.1 |
| MSHR511 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP004024.1 |
| MSHR520 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 99.88 | CP004369.1 |
| MSHR5855 | 100% | 0.0 | 99.33 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP008783.1 |
| MSHR62 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP009234.1 |
| MSHR840 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP009473.1 |
| NAU20B-16 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP004004.1 |
| NAU35A-3 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.93 | 100% | 0.0 | 99.88 | CP004378.1 |
| NCTC 13178 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.88 | CP004002.1 |
| NCTC 13179 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.88 | CP003977.1 |
| Pasteur 52237 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.93 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP009898.1 |
| PB08298010 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP009550.1 |
| 1106a | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP008759.1 |
| 14M0960418 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP019043.1 |
| 2002721100 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.64 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP018367.1 |
| 2002721123 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP018370.1 |
| 2002721171 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP018371.1 |
| 2002721184 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP018374.1 |
| 2002721684 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP018375.1 |
| 2002734728 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP018419.1 |
| 2008724734 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP018381.1 |

Таблица 34 – (Продолжение)

| Штамм | Гомологи β -лактамазы класса В (BPS_RS30385) | | | Гомологи β -лактамазы класса В (BPS_RS29225) | | | Гомологи β -лактамазы класса D (BPS_RS29690) | | | GenBank Ac. |
|------------|---|--------------------|------------------|---|--------------------|------------------|---|--------------------|------------------|-------------|
| | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | |
| 2008724758 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP018382.1 |
| 2008724860 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP018386.1 |
| 2010007509 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP018388.1 |
| 2011756189 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP018390.1 |
| 2011756295 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.64 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP018392.1 |
| 2011756296 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.64 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP018394.1 |
| 2013746777 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP018398.1 |
| 2013746811 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.93 | 100% | 0.0 | 99.88 | CP018401.1 |
| 2013746877 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP018402.1 |
| 2013746878 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP018404.1 |
| 2013833055 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.64 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP018407.1 |
| 2013833057 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.64 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP018409.1 |
| 3000015237 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP018411.1 |
| 3000015486 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.57 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP018412.1 |
| 3000047530 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP018415.1 |
| 3000465972 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP018417.1 |
| 350105 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 99.88 | CP012093.1 |
| 9 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 99.88 | CP008754.1 |
| 982 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 99.88 | CP012577.1 |
| B03 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP046583.1 |
| BDP | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 99.88 | CP009210.1 |
| BGR | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP008835.1 |
| Bp1651 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP012042.1 |

Таблица 34 – (Продолжение)

| Штамм | Гомологи β -лактамазы класса В (BPS_RS30385) | | | Гомологи β -лактамазы класса В (BPS_RS29225) | | | Гомологи β -лактамазы класса D (BPS_RS29690) | | | GenBank Ac. |
|-----------------|--|--------------------|------------------|--|--------------------|------------------|--|--------------------|------------------|-------------|
| | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | |
| BPHN1 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP023776.1 |
| BPs110 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP036451.1 |
| BPs111 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.64 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP036453.1 |
| BPs112 | 100% | 0.0 | 99.46 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP037975.1 |
| BPs114 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP037973.1 |
| BPs115 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP037757.1 |
| BPs116 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP037759.1 |
| BPs122 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP038194.1 |
| BPs123 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP037969.1 |
| BPs133 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP038194.1 |
| BSR | 100% | 0.0 | 99.87 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP009127.1 |
| Burk178-Type1 | 100% | 0.0 | 99.33 | 100% | 0.0 | 99.64 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP016910.1 |
| Burk178-Type2 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.64 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP016912.1 |
| D286 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP025307.1 |
| FDAARGOS_592 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP033706.1 |
| FDAARGOS_593 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP033704.1 |
| FDAARGOS_594 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP033701.1 |
| H10 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP025301.3 |
| HNP001 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 99.88 | CP038806.1 |
| InDRE_1 Son2018 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.63 | CP041219.1 |
| InDRE_2 Son2018 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.63 | CP041221.1 |
| K96243, | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 100.00 | BX571966.1 |
| M1 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.88 | CP016639.1 |
| Mahidol-1106a | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP008782.1 |

Таблица 34 – (Продолжение)

| Штамм | Гомологи β -лактамазы класса В (BPS_RS30385) | | | Гомологи β -лактамазы класса В (BPS_RS29225) | | | Гомологи β -лактамазы класса D (BPS_RS29690) | | | GenBank Ac. |
|----------|--|--------------------|------------------|--|--------------------|------------------|--|--------------------|------------------|-------------|
| | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | |
| MS | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.88 | CP016637.1 |
| MSHR1435 | 100% | 0.0 | 99.87 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP025265.1 |
| MSHR1655 | 100% | 0.0 | 99.87 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP008779.1 |
| MSHR346 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.93 | 100% | 0.0 | 99.88 | CP008763.1 |
| MSHR3763 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 99.88 | CP017053.1 |
| MSHR4083 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 99.88 | CP017051.1 |
| MSHR5864 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP017049.1 |
| MSHR6755 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP017047.1 |
| MSHR7929 | 100% | 0.0 | 99.33 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP017045.1 |
| PHLS 112 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.93 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP009586.1 |
| PMC2000 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.93 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP025303.1 |
| R15 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP025305.1 |
| VB2514 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP040551.1 |
| VB3253 | 100% | 0.0 | 99.46 | 100% | 0.0 | 99.78 | 100% | 0.0 | 99.88 | CP040532.1 |
| VB976100 | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 99.63 | CP018055.1 |
| Vgh 07 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.88 | CP010974.1 |
| Vgh 16R | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP012516.1 |
| Vgh 16W | 100% | 0.0 | 99.73 | 100% | 0.0 | 99.86 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP012518.1 |
| Yap1 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP038227.1 |
| Yap2a | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP038225.1 |
| Yap3a | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP038223.1 |
| Yap4 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP038221.1 |
| Yap5 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP038219.1 |
| Yap6 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP038215.1 |

Таблица 34 – (Продолжение)

| Штамм | Гомологи β-лактамазы класса В (BPS_RS30385) | | | Гомологи β-лактамазы класса В (BPS_RS29225) | | | Гомологи β-лактамазы класса D (BPS_RS29690) | | | GenBank Ac. |
|------------------|--|----------------------------|-----------------------|--|----------------------------|-----------------------|--|----------------------------|-----------------------|-------------|
| | Длина вы- равнивания | Пока- затель E value | Идентич- ность (%) | Длина вы- равнива- ния | Пока- затель E value | Идентич- ность (%) | Длина вы- равнива- ния | Пока- затель E value | Идентич- ность (%) | |
| Yap7 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 100.00 | 100% | 0.0 | 99.75 | CP038217.1 |
| TSV202 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.93 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP009156.1 |
| TSV 48 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | 100% | 0.0 | 100.00 | CP009160.1 |
| <i>B. mallei</i> | | | | | | | | | | |
| Turkey10 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP010349.1 |
| JHU | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP009932.1 |
| FMH | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP009930.1 |
| Turkey 9 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP009742.1 |
| Turkey 8 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP009740.1 |
| Turkey 7 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP009738.1 |
| Turkey 6 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP009736.1 |
| Turkey 5 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP009734.1 |
| Turkey 4 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP009732.1 |
| Turkey 3 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP009730.1 |
| Turkey 2 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP009728.1 |
| Turkey 1 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP009726.1 |
| Bahrain 1 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP017176.1 |
| 2002721276 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP010066.1 |
| KC 1092 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP009943.1 |
| 2002734306 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP009708.1 |
| India 86-567-2 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP009643.1 |
| 11 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP009588.1 |
| 2002734299 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP009338.1 |
| NCTC 10247 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP007801.1 |

Таблица 34 – (Продолжение)

| Штамм | Гомологи β -лактамазы класса В (BPS_RS30385) | | | Гомологи β -лактамазы класса В (BPS_RS29225) | | | Гомологи β -лактамазы класса D (BPS_RS29690) | | | GenBank Ac. |
|-------------------------|---|--------------------|------------------|---|--------------------|------------------|---|--------------------|------------------|-------------|
| | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | |
| FMH 23344 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP009147.1 |
| BMQ | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP008722.1 |
| 6 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP008710.1 |
| 23344 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP008705.1 |
| NCTC 10247 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP000547.1 |
| NCTC 10229 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP000545.1 |
| SAVPI | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP000525.1 |
| ATCC 23344 | 100% | 0.0 | 99.60 | 100% | 0.0 | 99.71 | нет | нет | нет | CP000011.2 |
| <i>B. thailandensis</i> | | | | | | | | | | |
| FDAARGOS 426 | нет | нет | нет | 98% | 0.0 | 95.29 | 99% | 0.0 | 84.71 | CP023498.1 |
| MSMB121 | нет | нет | нет | 98% | 0.0 | 95.16 | 99% | 0.0 | 84.71 | CP004096.1 |
| BPM | нет | нет | нет | 99% | 0.0 | 93.75 | 100% | 0.0 | 93.33 | CP050021.1 |
| FDAARGOS 242 | нет | нет | нет | 99% | 0.0 | 93.75 | 100% | 0.0 | 93.33 | CP022216.1 |
| FDAARGOS 241 | нет | нет | нет | 99% | 0.0 | 93.75 | 100% | 0.0 | 93.33 | CP022215.1 |
| FDAARGOS 238 | нет | нет | нет | 99% | 0.0 | 93.75 | 100% | 0.0 | 92.96 | CP020391.1 |
| FDAARGOS 237 | нет | нет | нет | 99% | 0.0 | 93.75 | 100% | 0.0 | 93.33 | CP020389.1 |
| 2002721643 | нет | нет | нет | 99% | 0.0 | 93.75 | 100% | 0.0 | 93.33 | CP013413.1 |
| 2002721121 | нет | нет | нет | 99% | 0.0 | 93.75 | 100% | 0.0 | 92.96 | CP013410.1 |
| MSMB59 | нет | нет | нет | 99% | 0.0 | 93.75 | 100% | 0.0 | 93.33 | CP013408.1 |
| 34 | нет | нет | нет | 99% | 0.0 | 93.75 | 100% | 0.0 | 93.58 | CP010018.1 |
| 2002721643 | нет | нет | нет | 99% | 0.0 | 93.75 | 100% | 0.0 | 93.58 | CP009602.1 |
| E254 | нет | нет | нет | 99% | 0.0 | 93.75 | 100% | 0.0 | 93.33 | CP004382.1 |
| MSMB59 | нет | нет | нет | 99% | 0.0 | 93.75 | 100% | 0.0 | 93.33 | CP004386.1 |

Таблица 34 – (Продолжение)

| Штамм | Гомологи β -лактамазы класса В (BPS RS30385) | | | Гомологи β -лактамазы класса В (BPS RS29225) | | | Гомологи β -лактамазы класса D (BPS RS29690) | | | GenBank Ac. |
|------------------------------|--|--------------------|------------------|--|--------------------|------------------|--|--------------------|------------------|-------------|
| | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | |
| E264 | нет | нет | нет | 99% | 0.0 | 93.75 | 100% | 0.0 | 93.33 | CP008786.1 |
| USAMRU Malaysia #20 | нет | нет | нет | 99% | 0.0 | 93.75 | 100% | 0.0 | 93.33 | CP004384.1 |
| 2002721723 | нет | нет | нет | 99% | 0.0 | 93.75 | 100% | 0.0 | 93.33 | CP004098.1 |
| H0587 | нет | нет | нет | 99% | 0.0 | 93.75 | 100% | 0.0 | 92.96 | CP004090.1 |
| E264 | нет | нет | нет | 99% | 0.0 | 93.75 | 100% | 0.0 | 93.33 | CP000085.1 |
| E444 | нет | нет | нет | 99% | 0.0 | 93.75 | 100% | 0.0 | 93.33 | CP004118.1 |
| 2003015869 | нет | нет | нет | 99% | 0.0 | 93.60 | 100% | 0.0 | 92.96 | CP013361.1 |
| 2003015869 | нет | нет | нет | 99% | 0.0 | 93.60 | 100% | 0.0 | 92.96 | CP008915.2 |
| <i>B. ambifaria</i> | | | | | | | | | | |
| AMMD | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 80.34 | нет | нет | нет | CP009800.1 |
| AMMD | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 80.25 | нет | нет | нет | CP000442.1 |
| MC40-6 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 79.75 | нет | нет | нет | CP001027.1 |
| <i>B. cenocepacia</i> | | | | | | | | | | |
| DDS 22E-1 | нет | нет | нет | 98% | 0.0 | 81.58 | нет | нет | нет | CP007782.1 |
| DWS 37E-2 | нет | нет | нет | 98% | 0.0 | 79.81 | нет | нет | нет | CP007780.1 |
| VC12308 | нет | нет | нет | 93% | 0.0 | 80.09 | нет | нет | нет | CP019673.1 |
| PC184 Mulks | нет | нет | нет | 68% | 0.0004 | 86.84 | нет | нет | нет | CP021069.1 |
| VC12802 | нет | нет | нет | 84% | 0.0004 | 88.57 | нет | нет | нет | CP019670.1 |
| GIMC4560:Bcn122 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 76.73 | нет | нет | нет | CP020600.1 |
| VC1254 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 76.73 | нет | нет | нет | CP019676.1 |
| VC2307 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 76.73 | нет | нет | нет | CP019666.1 |
| 895 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 76.73 | нет | нет | нет | CP015036.1 |
| ST32 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 76.73 | нет | нет | нет | CP011918.1 |

Таблица 34 – (Продолжение)

| Штамм | Гомологи β -лактамазы класса В (BPS_RS30385) | | | Гомологи β -лактамазы класса В (BPS_RS29225) | | | Гомологи β -лактамазы класса D (BPS_RS29690) | | | GenBank Ac. |
|-----------------------------------|---|--------------------|------------------|---|--------------------|------------------|---|--------------------|------------------|-------------|
| | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | |
| J2315 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 76.73 | нет | нет | нет | AM747721.1 |
| 842 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 76.66 | нет | нет | нет | CP015034.1 |
| YG-3 | нет | нет | нет | 70% | 0.005 | 78.18 | нет | нет | нет | CP034547.1 |
| <i>B. ceracia</i> | | | | | | | | | | |
| ATCC 25416 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 81.14 | нет | нет | нет | CP034555.1 |
| ATCC 25416 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 81.14 | нет | нет | нет | CP012983.1 |
| ATCC 25416 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 81.08 | нет | нет | нет | CP007747.1 |
| FDAARGOS_345 | нет | нет | нет | 98% | 0.0 | 81.08 | нет | нет | нет | CP022082.2 |
| FDAARGOS_388 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 81.14 | нет | нет | нет | CP023520.1 |
| LO6 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 81.43 | нет | нет | нет | CP011301.1 |
| DDS7H-2 | нет | нет | нет | 98% | 0.0 | 78.10 | нет | нет | нет | CP007786.1 |
| BC16 | нет | нет | нет | 57% | 0.005 | 79.25 | нет | нет | нет | CP045235.1 |
| CH-1 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 81.56 | нет | нет | нет | AP018359.1 |
| <i>B. contaminans</i> | | | | | | | | | | |
| FL-1-2-30-S1-D0 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 81.41 | нет | нет | нет | CP013392.1 |
| MS14 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 81.41 | нет | нет | нет | CP009745.1 |
| SK875 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 81.56 | нет | нет | нет | CP028809.1 |
| XL73 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 81.43 | нет | нет | нет | CP046607.1 |
| ZCC | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 81.56 | нет | нет | нет | CP042166.1 |
| <i>B. diffusa</i> RF2-non- BP9 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 80.21 | нет | нет | нет | CP013364.1 |
| <i>B. dolosa</i> | | | | | | | | | | |
| AU0158 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 81.43 | нет | нет | нет | CP009794.1 |
| FDAARGOS_562 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 81.43 | нет | нет | нет | CP033839.1 |
| FDAARGOS_562 | нет | нет | нет | 69% | 0,0007 | 87.50 | нет | нет | нет | CP033840.1 |
| AU0158 | нет | нет | нет | 69% | 0,0007 | 87.50 | нет | нет | нет | CP009795.1 |

Таблица 34 – (Продолжение)

| Штамм | Гомологи β-лактамазы класса В (BPS_RS30385) | | | Гомологи β-лактамазы класса В (BPS_RS29225) | | | Гомологи β-лактамазы класса D (BPS_RS29690) | | | GenBank Ac. |
|-------------------------|---|--------------------|------------------|---|--------------------|------------------|---|--------------------|------------------|-------------|
| | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | |
| <i>B. multivorans</i> | | | | | | | | | | |
| ATCC 17616 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 80.40 | нет | нет | нет | AP009387.1 |
| ATCC 17616 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 80.09 | нет | нет | нет | CP000870.1 |
| DDS 15A-1 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 80.07 | нет | нет | нет | CP008728.1 |
| FDAARGOS_496 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 81.14 | нет | нет | нет | CP033855.1 |
| FDAARGOS_548 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 80.18 | нет | нет | нет | CP033746.1 |
| FDAARGOS_719 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 79.93 | нет | нет | нет | CP046336.1 |
| FDAARGOS_722 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 80.12 | нет | нет | нет | CP046345.1 |
| FDAARGOS_726 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 80.85 | нет | нет | нет | CP046341.1 |
| MSMB1640WGS | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 80.18 | нет | нет | нет | CP013468.1 |
| <i>B. vietnamiensis</i> | | | | | | | | | | |
| G4 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 79.54 | нет | нет | нет | CP000616.1 |
| LMG 10929 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 79.75 | нет | нет | нет | CP009632.1 |
| AU1233 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 79.54 | нет | нет | нет | CP013434.1 |
| AU1233 | нет | нет | нет | 70% | 0,00002 | 85.42 | нет | нет | нет | CP013433.1 |
| FDAARGOS_239 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 79.75 | нет | нет | нет | CP020395.1 |
| FL-2-3-30-S1-D0 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 78.63 | нет | нет | нет | CP013395.1 |
| HI2297 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 79.54 | нет | нет | нет | CP013441.1 |
| MSMB608WGS | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 78.48 | нет | нет | нет | CP013456.1 |
| <i>B. ubonensis</i> | | | | | | | | | | |
| MSMB0783 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 80.79 | нет | нет | нет | CP013421.1 |
| MSMB1471WGS | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 80.64 | нет | нет | нет | CP013465.1 |
| RF23-BP41 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 81.22 | нет | нет | нет | CP013368.1 |

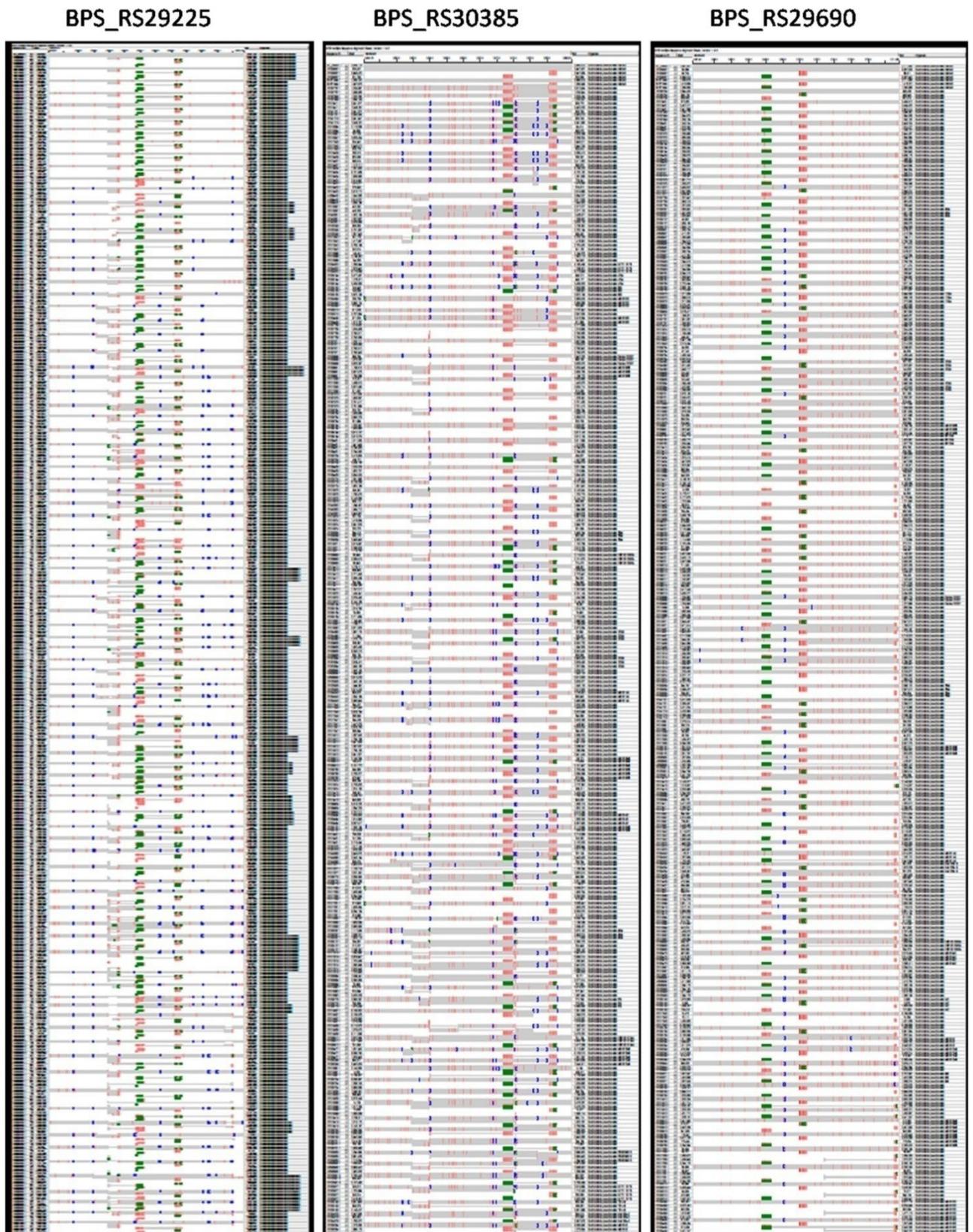
Таблица 34 – (Продолжение)

| Штамм | Гомологи β-лактамазы класса В (BPS_RS30385) | | | Гомологи β-лактамазы класса В (BPS_RS29225) | | | Гомологи β-лактамазы класса D (BPS_RS29690) | | | GenBank Ac. |
|---|--|--------------------|------------------|--|--------------------|------------------|--|--------------------|------------------|-------------|
| | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | Длина выравнивания | Показатель E value | Идентичность (%) | |
| <i>B. stabilis</i> | | | | | | | | | | |
| Е | нет | нет | нет | 75% | 0,0004 | 85.71 | нет | нет | нет | LR025743.1 |
| ATCC BAA-67 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 79.72 | нет | нет | нет | CP016444.1 |
| Виды Всс, представленные единичными штаммами | | | | | | | | | | |
| <i>B. lata</i> A05 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 81.14 | нет | нет | нет | CP024945.1 |
| <i>B. latens</i> AU17928 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 79.79 | нет | нет | нет | CP013438.1 |
| <i>B. metallica</i> FL-6-5-30-S1-D7 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 79.81 | нет | нет | нет | CP013403.1 |
| <i>B. lata</i> A05 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 81.14 | нет | нет | нет | CP024945.1 |
| <i>B. pseudomultivorans</i> SUB-INT23-BP2 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 81.58 | нет | нет | нет | CP013378.1 |
| <i>B. pyrrocinia</i> mHSR5 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 80.09 | нет | нет | нет | CP024903.1 |
| <i>B. seminalis</i> FL5410S1 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 80.68 | нет | нет | нет | CP013399.1 |
| <i>B. territorii</i> RF8-non-BP5 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 80.18 | нет | нет | нет | CP013367.1 |
| <i>Burkholderia</i> sp. | | | | | | | | | | |
| MSMB0856 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 80.32 | нет | нет | нет | CP013429.1 |
| NRF60-BP8 | нет | нет | нет | 96% | 0.0 | 79.86 | нет | нет | нет | CP013372.1 |

Таким образом, проведенный *in silico* анализ распространенности генетических мишеней на максимально возможном наборе полных геномов видов Врс и Всс, показал присутствие исследованных генов в соответствии с описанным выше видовым репертуаром у всех без исключения штаммов исследованных видов, представленных на момент проведения исследования в GenBank NCBI. Что полностью подтвердило результаты экспериментального тестирования коллекционных штаммов.

5.2.5 Оценка уровня межштаммовой гомологии паралогов β -лактамаз молекулярных классов В и D и структурной стабильности прилегающих к ним фрагментов генома

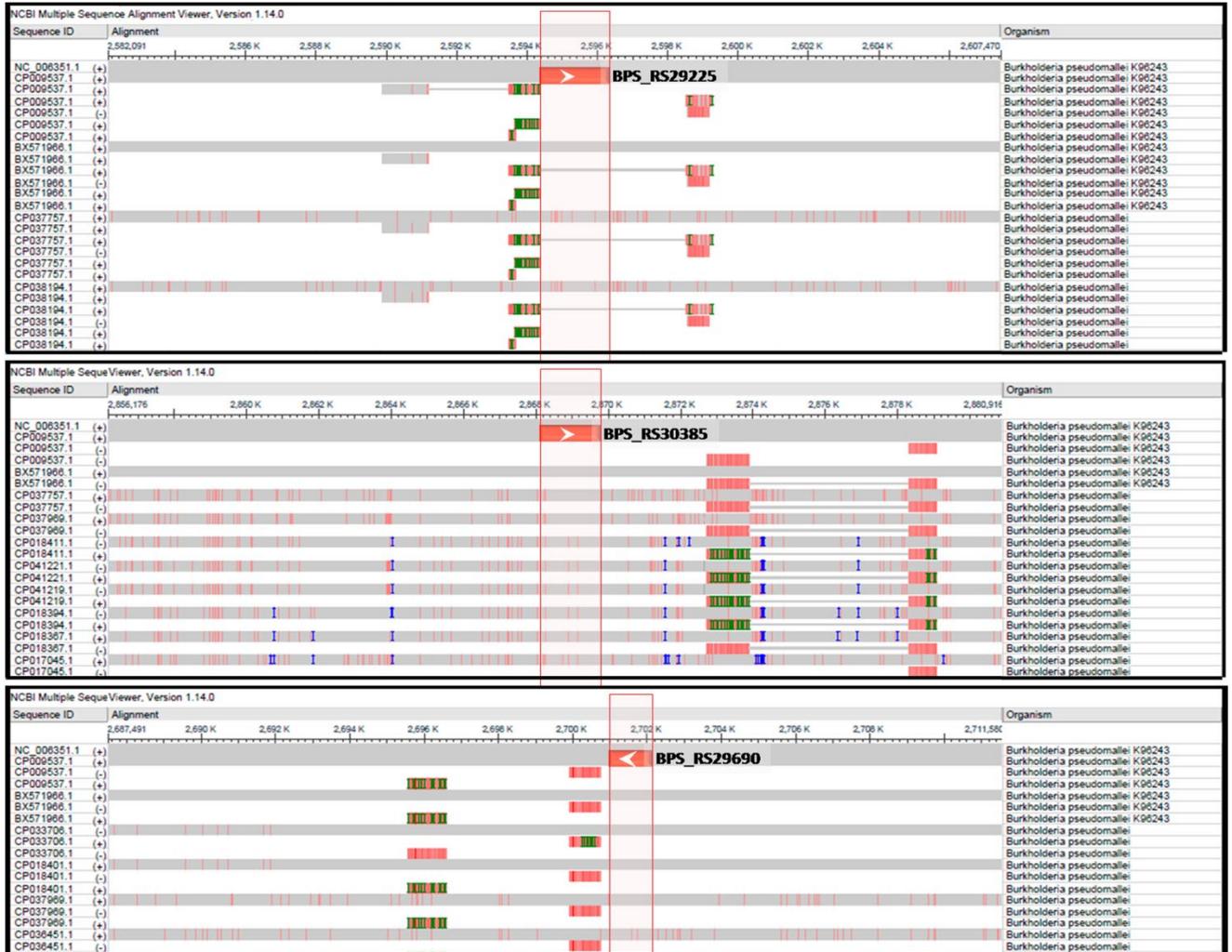
Для оценки структурной стабильности участков генома, содержащих исследуемые генетические мишени, был проведен анализ межштаммовой вариабельности фрагментов хромосомы 2, фланкирующих целевые последовательности. Анализируемые участки хромосомы 2 типового штамма *B. pseudomallei* K96243 выравнивали с полными последовательностями второй хромосомы 100 штаммов возбудителя мелиоидоза, затем проводили множественное выравнивание полученных результатов (Рисунок 31). В результате обнаружена высокая идентичность (99,23-100%) области размером 24,02 т.п.н., содержащей ген β -лактамазы-оксациллиназы класса D OXA-59 (BPS_RS29690), при длине выравнивания 99 – 100%. Фрагмент хромосомы 2 размером 23,74 т.п.н. с геном β -лактамазы класса В (BPS_RS30385) также показал высокий уровень межштаммовой идентичности (99,1–100%) при аналогичной длине выравнивания. Несмотря на наличие гена транспозазы (BPS_RS29200) в составе фрагмента хромосомы 2 размером 25,38 т.п.н. с геном β -лактамазы класса В (BPS_RS29225), этот участок также имел высокий уровень межштаммовой идентичности (99,02-100%), при этом интервал длины выравнивания оказался шире – 88-100%.



Обозначения представлены под Рисунком 32.

Рисунок 31 – Графическое представление множественного выравнивания фрагментов второй хромосомы 100 штаммов *B. pseudomallei*, содержащих анализируемые генетические мишени

Также было обнаружено, что, в отличие от прилегающих областей, исследованные гены не имеют на второй хромосоме других гомологичных последовательностей, кроме собственных паралогов (Рисунок 32).



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 2.

Область выравнивания анализируемых генов выделена рамкой.

Рисунок 32 – Увеличенные фрагменты множественного выравнивания фрагментов второй хромосомы *B. pseudomallei*, содержащих анализируемые генетические мишени, демонстрирующие отсутствие на второй хромосоме *B. pseudomallei* областей частичной гомологии для исследованных генов

Анализ выровненных нуклеотидных последовательностей показал, что подавляющее большинство пробелов (gaps) выравнивания приходятся на области GC-богатых повторов (Рисунок 33) и, возможно, являются дефектами сборки генома.

```

Query 2863804  gttcgtcgcgggcggttcggatcgggtagggcgccgcccgcggcgggcggtctctgt 2863863
Sbjct 2816947  GTTCGTCGCGGGCGTTCGGATCGGTCGAGGGCGCCGCGCGGGCGGGCGGTCTC--- 2817003

Query 2863864  ctctgtctctgtctctgtctctgtctctgtctctgtctctgtctctgtctctgt 2863923
Sbjct 2817004  --C-GTCTCCGTCTCCGTCTCCGTCT----TC-G--TC--T-TC-G--TC--T-TC-GT 2817042

Query 2863924  ctctgtctctgtctctgtctctgtctctgtctctgtctctgtctctgtctctcgg 2863983
Sbjct 2817043  CTCTGCCTCTGCCTCTGCCTCTGCCTCTGCCTCTGCCTCTGCCTCTGCCTCTG---CC-T 2817098

Query 2863856  gtctctgtctctgtctctgtctctgtctctgtctctgtctctgtctctgtctct 2863915
Sbjct 1686610  GTCTCCGTCTCCGTCTCCGTCTCCGTCTCCGTCTCCGTCTCCGTCTCCGTCTCCGTCT 1686551

Query 2863916  gtctctgtctctgtctctgtctctgtctctgtctctgtctctgtctctgtctct 2863975
Sbjct 1686550  GCCTCTGCCTCTGCCTCTGCCTCTGCCTCTGCCTCTG-C-CT-TCGCC-T-TC-G-C-CT 1686499

Query 2863976  gtctcggctcttcgcttcgcttcgcttcgcttcgcttcgcttcgcttcgcttcgct 2864035
Sbjct 1686498  -TCGCC-TCT--GCCTTCGCCCTTCGCCCTTCGCCCTTCGCCCTTCGCCCTTCGCCCT 1686443

Query 2874124  ctgcgcaact-----cgccgcgcgccgcgcgccgcgcgATCAAAATGATCGTTCGGCACA 2874176
Sbjct 2827236  CTCGCCACTCGCCCGCGCCGCGCGCGCCGCGCCGCGCGATCAAAATGATCGTTCGGCACA 2827295

Query 2874177  AACGCGCCGTCGcgccgcaacgaacacacgaacacacgaacacacgaacacacgacgca 2874236
Sbjct 2827296  AACGCGCCGTCGCCCGCACGAACACACGAACACACGAACACACGAACACACGAACACGCA 2827355

Query 2874237  cgccacgcgcaacccgacacgcaatcgcgcaatcgcgcaatcgcgcaatcgcgcaat 2874296
Sbjct 2827356  CGCCACGCGCACACCCGACCA-----CGCAATCGCGCAATCGCGCAATCGCGCAAT 2827407

Query 2702781  GGCAGCAGAACGATCGTCCGCGCGCGGGCGAGACCCGAAAAGCAAACGGATCGGC 2702840
Sbjct 599563  GGCAGCAGAACGATCGTCCGCGCGCGGGCGAGGCCGAAAAGCAAACGGATCGGC 599622

Query 2702841  TAGCAGCCGATCCGCTCTCGTCTTCcggcgccggctgcccggcacaacggcgcgccgg 2702900
Sbjct 599623  TAGCAGCCGATCCGCTCTCGTCTTCGCCGCGCCGCTGCCGGCACA----- 599668

Query 2702901  cagcggcgcgccggcTACGTATCCGTGCGCCGCGCTCCTCGCCTGCGACACCTTCAGT 2702960
Sbjct 599669  -----CGGCTACGTATCCGTGCGCCGCGCTCCTCGCCTGCGACACCTTCAGT 599717

Query 2702961  CGTCATCGTCTCGGACGATGCGGCGCCGACGCTCGCGACGCGCACCCGGTACGCGC 2703020
Sbjct 599718  CGTCATCGTCTCGGACGATGCGGCGCCGACGCTCGCGACGCGCACCCGGTACGCGC 599777

```

Рисунок 33 – Примеры пробелов (gaps) в областях GC-повторов при выравнивании исследованных хромосомных последовательностей

Известно, что детерминанты антибиотикорезистентности часто входят в состав разного рода мобильных генетических элементов (МГЭ), что может отразиться на стабильности их присутствия в геноме. В этой связи, на предмет гомологии с выбранными генетическими мишенями были проверены все предполагаемые плазмиды *B. pseudomallei* из базы данных GenBank NCBI (CP009154.1, CP009155.1, CP018385.1, CP018396.1 и GQ401131.1). Также была исследована секвенированная нуклеотидная последовательность плазмиды pPM1 коллекционного штамма *B. pseudomallei* ВКМ900, которая, при ее клонировании в *E. coli*, опосредует приобретение рекомбинантными штаммами полирезистентности. Протя-

женных участков гомологии исследованных генов-мишеней с нуклеотидными последовательностями плазмид ни в одном случае сравнения не обнаружено. Примеры результатов локального выравнивания приведены на Рисунке 34.

Содержание GC в МГЭ, способных к горизонтальному переносу, как правило, имеет значение, отличное от среднего показателя основной хромосомы. В связи с этим, для исключения внешнего происхождения исследуемых генов β -лактамаз был проведен анализ GC-содержания прилегающих к ним фрагментов хромосомы. Данный показатель у фрагментов, содержащих локусы BPS_RS29690 и BPS_RS30385, оказался равным 67%, а у фрагмента с локусом BPS_RS29225 – 69% (Рисунок 35), что соответствует среднему по геному GC-составу (~ 68%). То есть, исследованные генетические мишени имеют оригинальное происхождение.

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--------|------------|----------|------------|
| 27.4 bits(29) | 0.10 | 21/24(88%) | 1/24(4%) | Plus/Minus |

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--------|------------|----------|------------|
| 32.8 bits(35) | 0.047 | 25/30(83%) | 0/30(0%) | Plus/Minus |

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--------|------------|----------|------------|
| 27.4 bits(29) | 0.99 | 19/22(86%) | 0/22(0%) | Plus/Minus |

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--------|------------|----------|------------|
| 27.4 bits(29) | 0.10 | 21/24(88%) | 1/24(4%) | Plus/Minus |

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--------|------------|-----------|------------|
| 33.7 bits(36) | 0.015 | 26/29(90%) | 3/29(10%) | Plus/Minus |

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--------|------------|----------|-----------|
| 32.8 bits(35) | 0.002 | 22/25(88%) | 0/25(0%) | Plus/Plus |

Рисунок 34 – Примеры локального выравнивания нуклеотидных последовательностей плазмид и генов-мишеней

Оценка уровня гомологии паралогов β -лактамаз штаммов *B. pseudomallei* показала их консервативность (идентичность в пределах 99,33 – 100%), при наличии как полиморфных сайтов – идентичные SNP обнаружены у 2 и более штаммов, так и уникальных нуклеотидных замен. В гене β -лактамазы класса В (BPS_RS30385) размером 741 п.н. обнаружено 6 SNP, локализованных в периферийных областях гена, тогда как 4 уникальные замены распределены в его средней части. Однонуклеотидные полиморфизмы, присутствующие в нуклеотидной

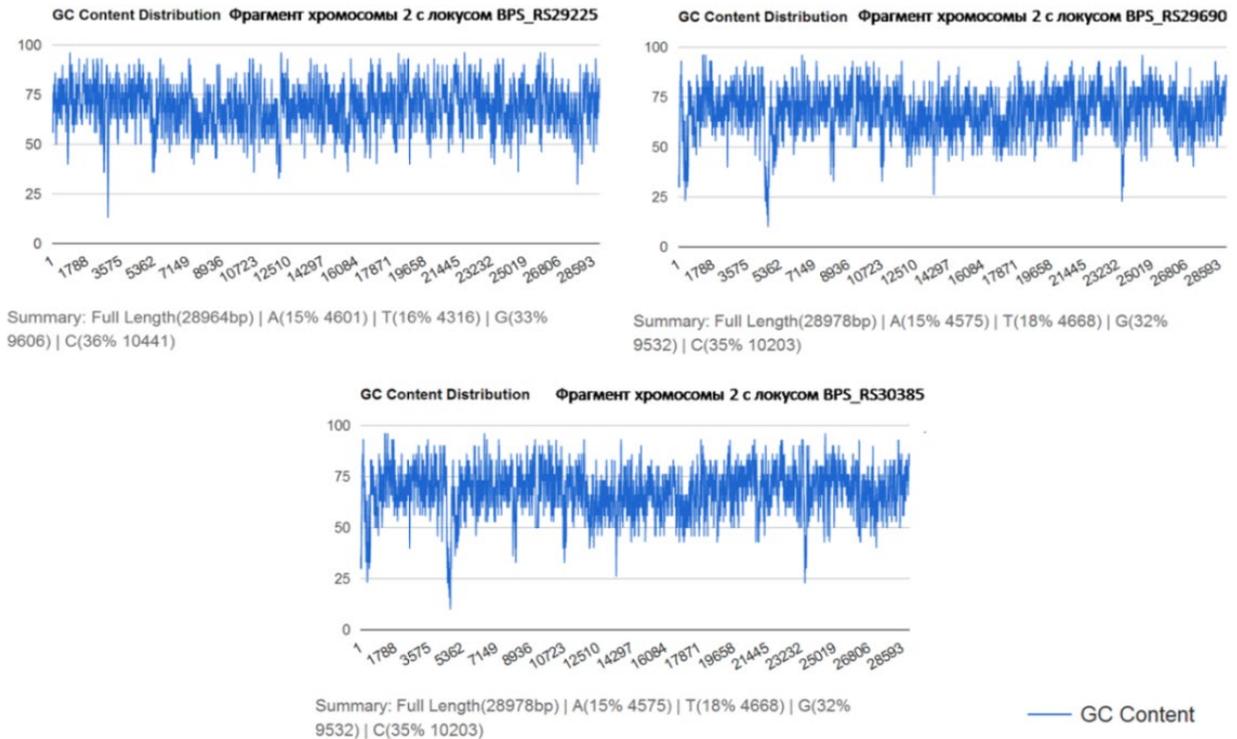


Рисунок 35 – Процент содержания GC в последовательностях фрагментов хромосомы 2, на которых находятся локусы генов-мишеней

последовательности группоспецифичной для *Bpc* и *Bsc* β -лактамазы семейства β -CASP РНК-метаболизирующие гидролазы (размер гена 1380 п.н.), распределены равномерно. В гене оксациллиназы (*BPS_RS29690*) размером 800 п.н. обнаружено 5 сайтов SNP (Рисунок 36).

Проведенный филогенетический анализ полных нуклеотидных последовательностей исследуемых генов β -лактамаз *B. pseudomallei* показал их распределение по нескольким отдельным кластерам. Причем наблюдается их группирование преимущественно в соответствии с регионом происхождения штаммов. Однако подавляющее большинство узлов дендрограммы не имели значимой бутстреп-поддержки: для паралогов *BPS_RS30385* – менее 70% во всех случаях, для *BPS_RS29225* бутстреп выше 70% имели 6 из 25 узлов, для *BPS_RS29690* – 3 из 26 узлов (Рисунок 37). Это свидетельствует консервативности исследованных групп генов при наличии отдельных полиморфных сайтов.

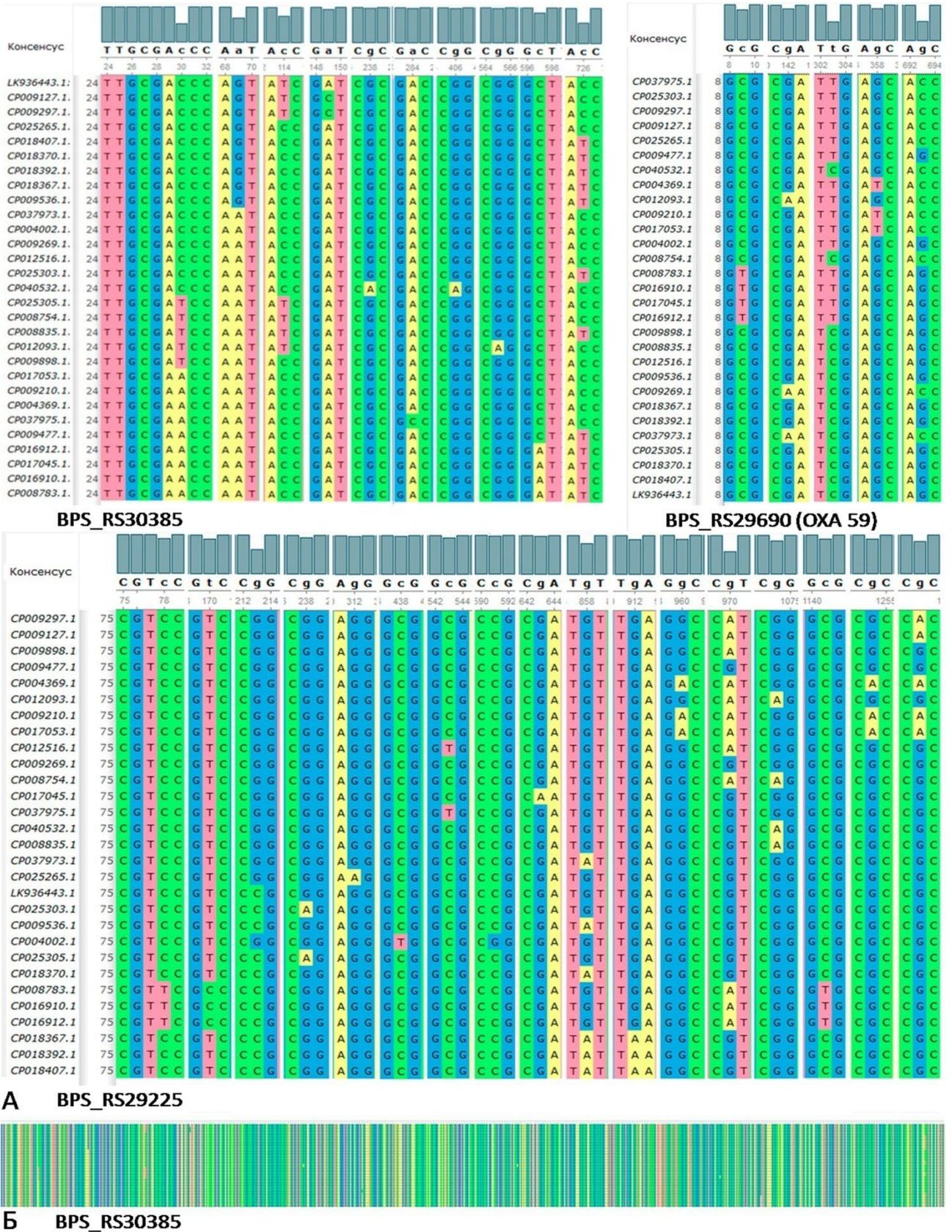


Рисунок 36 – Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей генов β-лактамаз молекулярных классов В и D штаммов *B. pseudomallei*: А – переменные локусы, Б – общий вид выравнивания локуса β-лактамазы молекулярного класса В

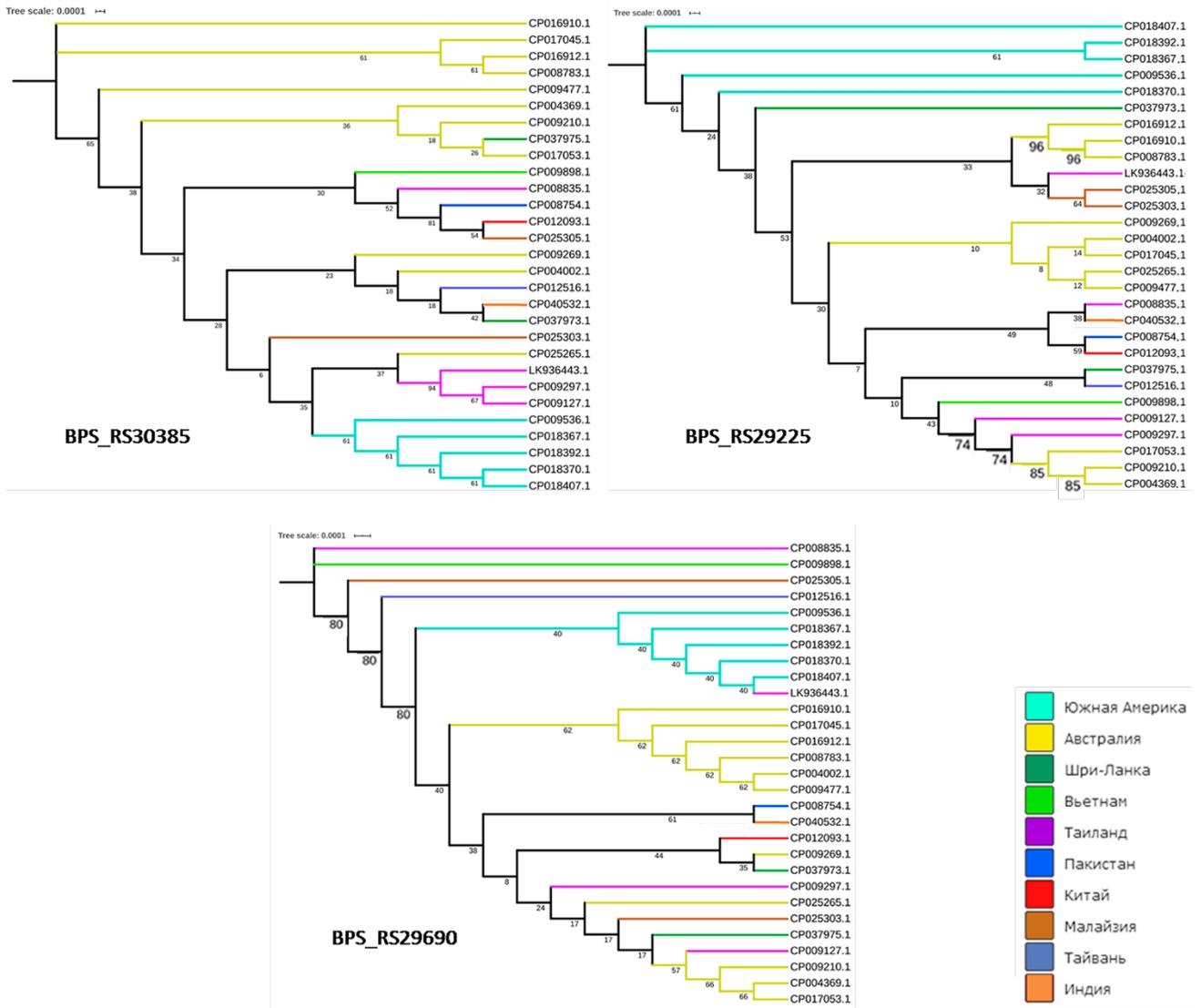
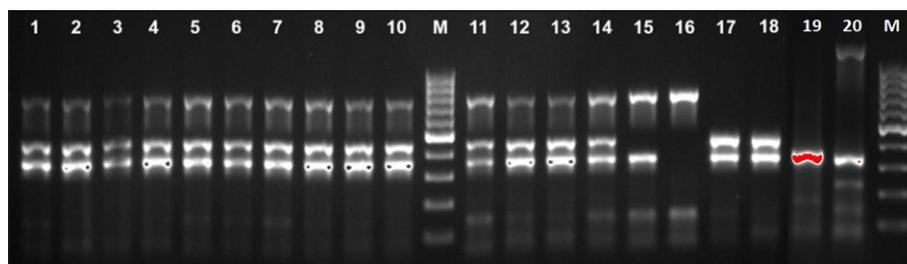


Рисунок 37 – Филогенетический анализ паралогов β -лактамаз штаммов *B. pseudomallei*. Дендрограммы построены быстрым методом минимальной эволюции (FastME v. 2.1.6.1_1) с использованием эволюционной модели Tamura-Nei (TN93), уточнением топологии методом ближайших соседних развязок (NNI) и дополнительным бутстрэп-анализом 100 случайных выборок

5.2.5.1 Анализ стабильности нуклеотидной последовательности амплифицируемых фрагментов у мутантных штаммов *Burkholderia* spp.

Экспериментальное тестирование сконструированного набора праймеров на спонтанных и инсерционных мутантных штаммах видов *Brc* и *B. ceracia* с измененным уровнем резистентности к антибактериальным препаратам различных классов, включая β -лактамы, показало его высокую эффективность и в случаях идентификации генетически измененных штаммов. Отличный от исходных штаммов дикого типа результат был зарегистрирован в единственном случае: у полирезистентного спонтанного мутанта *B. mallei* Ц5 SMP отсутствовал фрагмент с группоспецифической парой праймеров *bm1F2-bm14R2*. Тем не менее, полученный паттерн амплификации соответствует виду *B. mallei* и позволяет корректно идентифицировать мутантный штамм (Рисунок 38).



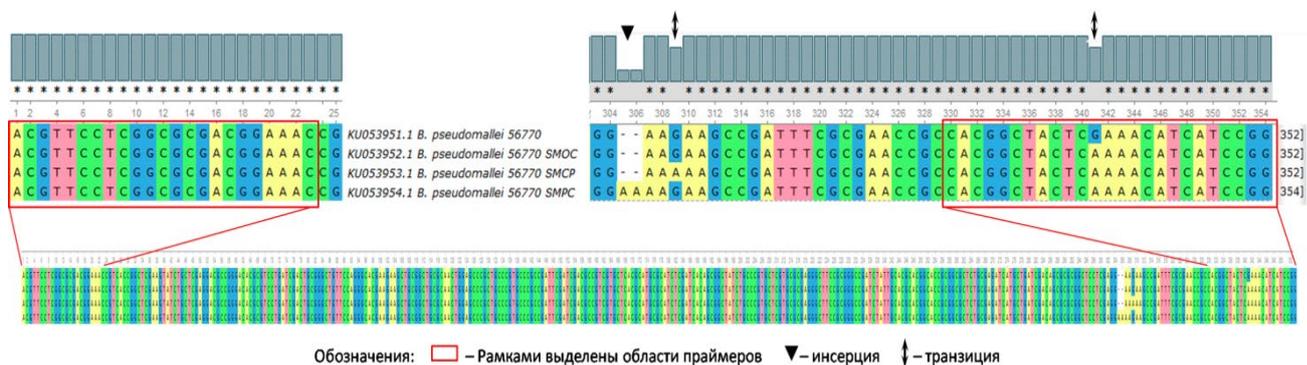
Линии: 1 – *B. pseudomallei* 57576, 2–10 – *B. pseudomallei* 57576 инсерционные мутанты; 11 – *B. pseudomallei* 56770, 12–14 – *B. pseudomallei* 56770 полирезистентные мутанты, 15 – *B. mallei* Ц 5, 16 – *B. mallei* Ц 5 полирезистентный мутант, 17 – *B. thailandensis* E264, 18 – *B. thailandensis* E264 полирезистентный мутант, 19 – *B. ceracia* 25416, 20 – *B. ceracia* 25416 NSP, М – леддер с шагом 100 п.н. (100 – 1000 п.н.).

Рисунок 38 – Идентификация штаммов *B. mallei*, *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* с измененной чувствительностью к антибиотикам и их прототипов дикого типа

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей ампликонов генов β -лактамаз классов В и D исследованных штаммов дикого типа и их полире-

зистентных производных показал у спонтанных мутантов стабильность областей посадки праймеров. В сравнении с исходными штаммами обнаружена единственная транзция (G→A) в 12-й позиции сайта отжига праймера *bm14R2* у полирезистентных производных *B. pseudomallei* 56770 (Рисунок 39), что не повлияло на факт амплификации фрагмента.

Кроме того, в последовательности амплифицированного фрагмента размером 352 п.н. у *B. pseudomallei* 56770 SMOC присутствовала еще одна транзция (G→A) в 307-й позиции ампликона, а у *B. pseudomallei* 56770 SMPC – инсерция двух аденинов в 305-м положении (Рисунок 39). Тем не менее, выявленные изменения не влияют на визуальную оценку размеров ампликонов.

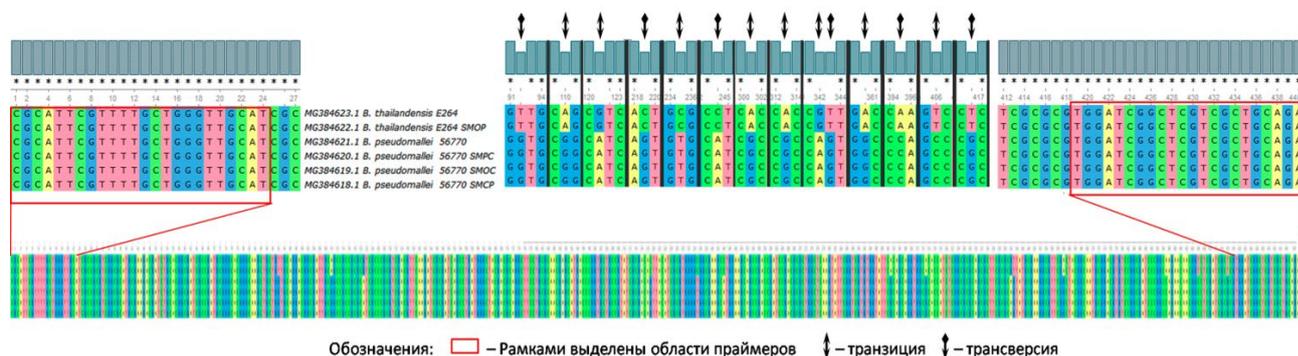


На верхней панели показаны обнаруженные изменения и области посадки праймеров (в красной рамке)

Рисунок 39 – Множественное выравнивание амплифицированных с праймерами *bm1F2/bm14R2* нуклеотидных последовательностей гена β-лактамазы молекулярного класса В штамма *B. pseudomallei* 56770 дикого типа и его полирезистентных спонтанных мутантов.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей ампликонов генов β-лактамаз класса D (*oxa*) с праймерами *bps1F4-bps8R4* изогенных штаммов *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* показал высокую внутривидовую консервативность исследованных последовательностей: в пределах одного вида сиквенсы полностью идентичны. Вместе с тем, в ортологах гена *oxa* у *B. pseudomallei* и

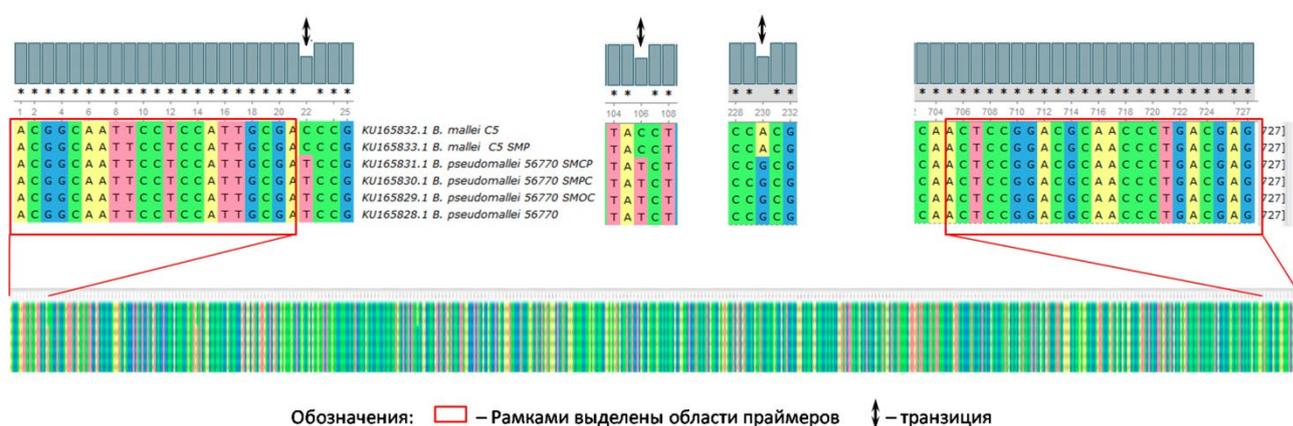
B. thailandensis обнаружен ряд межвидовых отличий – в пределах амплифицированного фрагмента выявлено 14 SNP (6 трансверсий и 8 транзиций) (Рисунок 40).



На верхней панели показаны области праймеров и обнаруженных SNP

Рисунок 40 – Множественное выравнивание амплифицированных с праймерами *bps1F4/ bps8R4* нуклеотидных последовательностей гена β-лактамазы молекулярного класса D штаммов *B. thailandensis* E264, *B. pseudomallei* 56770 дикого типа и их полирезистентных спонтанных мутантов

Нуклеотидные последовательности ампликонов генов β-лактамаз класса В (глиоксалазы) с праймерами *bps1F3/ bps1R3*, как и в случае оксациллиназы показали полную внутривидовую консервативность, при наличии межвидовых отличий (3 SNP) (Рисунок 41).



На верхней панели показаны области праймеров и обнаруженных SNP

Рисунок 41 – Множественное выравнивание амплифицированных с праймерами *bps1F3/ bps1R3* нуклеотидных последовательностей гена β-лактамазы молекулярного класса В штаммов *B. mallei* Ц5, *B. pseudomallei* 56770 дикого типа и их полирезистентных спонтанных мутантов

Таким образом, проведенный экспериментальный и *in silico* анализ показал, что виды комплекса «*B. pseudomallei*» различаются по набору β -лактамаз молекулярных классов В и D: в геномах всех штаммов *B. pseudomallei* представлены все три исследованных гена; у всех штаммов *B. mallei* присутствует β -лактамаза семейства Глиоксалазы II, отсутствует β -лактамаза-оксациллиназа класса D и наблюдается межштаммовая вариабельность по гену β -лактамазы семейства β -CASP РНК-метаболизующие гидролазы; у всех штаммов *B. thailandensis* имеются гены β -лактамазы-оксациллиназы класса D и β -лактамазы семейства β -CASP РНК-метаболизующие гидролазы и отсутствует ген β -лактамазы семейства Глиоксалазы II. Что позволяет дифференцировать эти виды как внутри комплекса, так и с видами Всс, у которых отсутствуют гены β -лактамазы семейства Глиоксалазы II и β -лактамазы-оксациллиназы класса D, но имеется ген β -лактамазы семейства β -CASP РНК-метаболизующие гидролазы.

Возможности биоинформатических технологий позволили значительно расширить круг исследованных штаммов и показать убиквитарность исследованных генов согласно их видовому репертуару. 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_LWWV000000000.1) и *B. pseudomallei* MSHR1655 (CP008779.1). Анализируемые последовательности присутствовали во всех штаммах с нетипичным уровнем резистентности, как у исследованных *in vitro* (Таблица 30), так и *in silico* – *B. pseudomallei* Bp1651 (CP012042.1), *B. pseudomallei* MSHR5864 (CP017049), MSHR6755 (CP017047.1) и MSHR7929 (CP017045.1) (Таблица 34). *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 -лактамы (цефтазидим, амоксициллин-клавуланат, имипенем и меропенем) [Bugrysheva et al., 2017]. Штаммы *B. pseudomallei* MSHR5864, MSHR6755 и

MSHR7929 – клинические изоляты со сниженной восприимчивостью к меропенему [Price et al., 2017].

Обнаруженная высокая межштаммовая идентичность генного контента областей хромосомы 2, прилегающих ко всем трем исследованным генам, 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.

5.2.6 Оценка видоспецифичности олигонуклеотидных праймеров биоинформатическими методами

Путем виртуального тестирования с полными геномными последовательностями всех видов, представленных на момент проведения анализа в GenBankNCBI (база данных NR) нами была проведена расширенная оценка видоспецифичности выбранных трех пар олигонуклеотидных праймеров и степени их соответствия своим мишеням.

Проведенный *in silico* тестирование двух пар сконструированных праймеров (*bps1F3/bps1R3* и *bps1F4/bps8R4*) с полными геномными последовательностями всех видов показал присутствие ампликонов ожидаемого размера исключительно у представителей *Brc* в соответствии с видовым репертуаром искомым генов.

Праймеры *bm1F2/bm14R2* генерировали специфический ампликон у *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *Burkholderia* spp., *B. oklahomensis*, *B. vietnamiensis*, *B. ubonensis*, *B. ceracia*, *B. multivorans*, *B. cenoceracia*, то есть только у видов, входящих в комплексы «*B. pseudomallei*» и «*B. ceracia*», что полностью совпадало с результатами экспериментальной оценки на доступных нам штаммах буркхольдерий. Причем, последовательность праймеров полностью гомологична для *B. pseudomallei* и *B. mallei*, а для *B. thailandensis* присутствуют 2

SNP в середине сайта связывания обратного праймера, которые не мешают эффективной амплификации мишени (Таблица 35). Проверка праймеров на широком наборе видов подтвердила групповую специфичность пары праймеров *bm1F2-bm1R2* для видов *Brc* и *Bcc*.

Результаты Primer-BLAST для праймеров *bps1F4-bps8R4* показали 100% идентичность олигонуклеотидов гомологичным сайтам генов β -лактамаз-оксациллиназ класса D 12 штаммов *B. pseudomallei*, полных сиквенсов хромосомы II 59 штаммов *B. pseudomallei* и 9 штаммов *B. thailandensis*. В 2 штаммах *B. pseudomallei* в сайтах связывания обратного праймера и в 6 штаммах *B. thailandensis* – прямого обнаружено по единственной SNP в середине последовательности, не влияющей на эффективность амплификации мишени, что показано нами экспериментально. В штаммах *B. oklahomensis* и *Burkholderia* sp. BDU8, входящих в состав *Brc*, в последовательностях-мишенях для указанных праймеров обнаружены 4 SNP для прямого и 1 – для обратного праймеров, что, вероятно, может повлиять на эффективность связывания праймеров (Таблица 35). Проведенный *in silico* анализ подтвердил отсутствие в геномах *B. mallei*, представленных в базах данных, мишеней, гомологичных праймерам *bps1F4-bps8R4*. Для штаммов *Bcc* в сайтах связывания праймеров обнаружено от 7 до 10 SNP на пару праймеров, причем в большинстве случаев негомологичные нуклеотиды соответствуют 3'-концевой области праймера, что критично для начала амплификации. Кроме того, размеры потенциальных ампликонов отличаются от специфических для *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* и варьируют в пределах 524 – 3769 п. н. Нами экспериментально показано отсутствие специфического ампликона *bla_{ОХА}* с использованием праймеров *bps1F4-bps8R4* у штаммов *Bcc* I-V геномоваров.

Результаты Primer-BLAST для праймеров *bps1F3-bps1R3* показали их полную гомологию своим мишеням у всех штаммов *B. mallei* и большинства *B. pseudomallei*, у 15 штаммов возбудителя мелиоидоза обнаружена единственная SNP в 10-м нуклеотиде сайта связывания обратного праймера (Таблица 35).

Праймеры *bps1F3-bps1R3* являются строго специфичными для видов *B. mallei* и *B. pseudomallei* и в эксперименте не детектировали ни один из протестиро-

ванных близкородственных и гетерологичных видов, поэтому факт детекции в Primer-BLAST двух штаммов *Burkholderia* spp. BGK (CP008917.1) и TSV202 (CP009156.1) сразу обратил на себя внимание. Мы провели для этих штаммов идентификацию *in silico* с использованием нашего триплекса, а также с праймерами для детекции orf11 (AF074878) [Thibault et al., 2004; Lowe et al. 2016] и локуса BPSS2022 [Koh et al., 2012], уникальных для *B. pseudomallei*, и orf13 T3SS1 [Thibault et al., 2004], специфичных для *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Наличие специфических фрагментов для обоих штаммов со всеми парами праймеров, полагаем, позволяет отнести штаммы *Burkholderia* spp. BGK (CP008917.1) и TSV202 (CP009156.1) к виду *B. pseudomallei*.

Таблица 35 – Результаты биоинформатического анализа специфичности праймеров *bps1F3/bps1R3*, *bps1F4/bps8R4*, *bm1F2/bm14R2*

| Штамм/ ген | Номер в GenBank NCBI | <i>bps1F3/bps1R3</i> 727 п.н. | <i>bps1F4/bps8R4</i> 440 п.н. | <i>bm1F2/bm14R2</i> 352 п.н. |
|--------------------------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| <i>B. pseudomallei</i> Burk178-Type2 | CP016912.1 | + SNP 1* | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> Burk178-Type1 | CP016910.1 | + SNP 1* | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> VB976100 | CP018055.1 | + SNP 1* | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> MS | CP016637.1 | + SNP 1* | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> M1 | CP016639.1 | + SNP 1* | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> Bp1651 | CP012042.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> vgh16W | CP012518.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> vgh16R | CP012516.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> 350105 | CP012093.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> 982 | CP012577.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> Pasteur 52237 | CP009898.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> PB08298010 | CP009550.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> K96243 | CP009537.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> MSHR668 | CP009546.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> 7894 | CP009536.1 | + SNP 1* | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> MSHR2543 | CP009477.1 | + SNP 1* | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> MSHR491 | CP009484.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> MSHR840 | CP009473.1 | + SNP 2* | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> 406e | CP009297.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> vgh07 | CP010974.1 | + SNP 1* | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> PHLS 112 | CP009586.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> 1026b | CP004380.1 | + SNP 1* | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> B03 | CP009150.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> MSHR3965 | CP009152.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> MSHR62 | CP009234.1 | + | + | + |

Таблица 35 – (Продолжение)

| Штамм/ ген | Номер в GenBank NCBI | <i>bps1F3/bps1R3</i> 727 п.н. | <i>bps1F4/bps8R4</i> 440 п.н. | <i>bm1F2/bm14R2</i> 352 п.н. |
|--|----------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| <i>B. pseudomallei</i> MSHR2243 | CP009269.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> MSHR1153 | CP009272.1 | + SNP 1* | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> K42 | CP009163.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> A79A | CP009164.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> NAU35A-3 | CP004378.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> BDP | CP009210.1 | + | + SNP 1* | + |
| <i>B. pseudomallei</i> BSR | CP009127.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> HBPUB10303a | CP008893.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> MSHR5858 | CP008891.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> MSHR5855 | CP008783.1 | + SNP 1* | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> BGR | CP008835.1 | + SNP 1* | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> 9 | CP008754.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> HBPUB10134a | CP008912.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> MSHR5848 | CP008910.1 | + SNP 1* | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> Mahidol-1106a | CP008782.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> MSHR346 | CP008763.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> MSHR1655 | CP008779.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> 576 | CP008778.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> 1106a | CP008759.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> BP 3921g | LK936443.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> MSHR520 | CP004369.1 | + | + SNP 1* | + |
| <i>B. pseudomallei</i> MSHR146 | CP004043.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> NCTC 13178 | CP004002.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> NCTC 13179 | CP003977.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> MSHR305 | CP006469.1 | + | + SNP 1* | + |
| <i>B. pseudomallei</i> MSHR511 | CP004024.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> NAU20B-16 | CP004004.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> BPC006 | CP003782.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> 1026b | CP002834.1 | + SNP 1* | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> 1106a | CP000573.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> 668 | CP000571.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> 1710b | CP000125.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> K96243 | BX571966.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> TSV 48 | CP009160.1 | + | + | + |
| <i>B. pseudomallei</i> 979b <i>oxa</i> gene | AM263455.1 | - | + | - |
| <i>B. pseudomallei</i> 392f <i>oxa</i> gene | AM263454.1 | - | + | - |
| <i>B. pseudomallei</i> 392a <i>oxa</i> gene | AM263453.1 | - | + | - |
| <i>B. pseudomallei</i> 365a <i>oxa</i> gene | AM263451.1 | - | + | - |
| <i>B. pseudomallei</i> 316c <i>oxa</i> gene | AM263450.1 | - | + | - |
| <i>B. pseudomallei</i> <i>oxa</i> -59 gene | AJ632249.1 | - | + | - |
| <i>B. pseudomallei</i> <i>oxa</i> -57 gene | AJ631966.1 | - | + | - |
| <i>B. pseudomallei</i> E15 <i>oxa</i> gene | AJ488303.1 | - | + | - |
| <i>B. pseudomallei</i> 1902a <i>oxa</i> gene | AJ488302.1 | - | + | - |
| <i>B. pseudomallei</i> 76161 <i>oxa</i> gene | FJ147202.1 | - | + | - |
| <i>B. pseudomallei</i> 576 <i>oxa</i> gene | NG049797.1 | - | + | - |
| <i>B. pseudomallei</i> E15 <i>oxa</i> gene | NG049716.1 | - | + | - |
| <i>B. pseudomallei</i> 1902a <i>oxa</i> gene | NG049707.1 | - | + | - |
| <i>B. pseudomallei</i> K96243 <i>oxa</i> gene | NG049799.1 | - | + | - |
| <i>B. pseudomallei</i> 56770 SMPC <i>blab</i> gene | KU053954.1 | - | - | + SNP 3* |

Таблица 35 – (Продолжение)

| Штамм/ ген | Номер в GenBank NCBI | <i>bps1F3/bps1R3</i> 727 п.н. | <i>bps1F4/bps8R4</i> 440 п.н. | <i>bm1F2/bm14R2</i> 352 п.н. |
|--|----------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| <i>B. pseudomallei</i> 56770 SMOС <i>blab</i> gene | KU053952.1 | - | - | + SNP2* |
| <i>B. mallei</i> C5 <i>blab</i> gene | KU053955 | - | - | + SNP2* |
| <i>B. mallei</i> Bahrain1 | CP017176.1 | + | - | + |
| <i>B. mallei</i> KC 1092 | CP009943.1 | + | - | + |
| <i>B. mallei</i> 2002721276 | CP010066.1 | + | - | + |
| <i>B. mallei</i> India86-567-2 | CP009643.1 | + | - | + |
| <i>B. mallei</i> 11 | CP009588.1 | + | - | + |
| <i>B. mallei</i> NCTC 10247 | CP007801.1 | + | - | + |
| <i>B. mallei</i> 2000031063 | CP008731.2 | + | - | + |
| <i>B. mallei</i> BMQ | CP008722.1 | + | - | + |
| <i>B. mallei</i> 6 | CP008710.1 | + | - | + |
| <i>B. mallei</i> 23344 | CP008705.1 | + | - | + |
| <i>B. mallei</i> FMH | CP009147.1 | + | - | + |
| <i>B. mallei</i> NCTC 10247 | CP000547.1 | + | - | + |
| <i>B. mallei</i> NCTC 10229 | CP000545.1 | + | - | - |
| <i>B. mallei</i> 2002734306 | CP009708.1 | + | - | - |
| <i>B. mallei</i> 2002734299 | CP009338.1 | + | - | - |
| <i>B. mallei</i> SAVP1 | CP000525.1 | + | - | + |
| <i>B. mallei</i> ATCC 23344 | CP000011.2 | + | - | + |
| <i>B. thailandensis</i> 2002721643 | CP013413.1 | - | + SNP 1* | + SNP 2* |
| <i>B. thailandensis</i> 2002721121 | CP013410.1 | - | + SNP 1* | + SNP 2* |
| <i>B. thailandensis</i> MSMB59 | CP013408.1 | - | + | + SNP 2* |
| <i>B. thailandensis</i> 2003015869 | CP013361.1 | - | + SNP 1* | + SNP 2* |
| <i>B. thailandensis</i> 34 | CP010018.1 | - | + SNP 1* | + SNP 2* |
| <i>B. thailandensis</i> 2002721643 | CP009602.1 | - | + | + SNP 2* |
| <i>B. thailandensis</i> 2003015869 | CP008915.2 | - | + SNP 1* | + SNP 2* |
| <i>B. thailandensis</i> MSMB59 | CP004386.1 | - | + | + SNP 2* |
| <i>B. thailandensis</i> E254 | CP004382.1 | - | + | + SNP 2* |
| <i>B. thailandensis</i> E264 | CP008786.1 | - | + | + SNP 2* |
| <i>B. thailandensis</i> USAMRU Malaysia 20 | CP004384.1 | - | + | + SNP 2* |
| <i>B. thailandensis</i> E444 | CP004118.1 | - | + | + SNP 2* |
| <i>B. thailandensis</i> 2002721723 | CP004098.1 | - | + | + SNP 2* |
| <i>B. thailandensis</i> H0587 | CP004090.1 | - | + SNP 1* | + SNP 2* |
| <i>B. thailandensis</i> MSMB121 | CP004096.1 | - | + | + SNP 2* |
| <i>B. thailandensis</i> E264 | CP000085.1 | - | + | + SNP 2* |
| <i>B. humptydooensis</i> MSMB 43 | CP013382.1 | - | + SNP 4** | + SNP 2* |
| <i>B. oklahomensis</i> 1974002358 | CP013359.1 | - | + SNP 5* | + SNP 3* |
| <i>B. oklahomensis</i> 1977116029 | CP013356.1 | - | + SNP 5* | + SNP 3* |
| <i>B. oklahomensis</i> C6786 | CP009556.1 | - | + SNP 5* | + SNP 3* |
| <i>B. oklahomensis</i> EO147 | CP008727.1 | - | + SNP 5* | + SNP 3* |
| <i>Burkholderia</i> sp. BGK | CP008917.1 | + | + | + |
| <i>Burkholderia</i> sp. TSV202 | CP009156.1 | + SNP 1* | + | + |
| <i>Burkholderia</i> sp. MSMB0852 | CP013425.1 | - | - | + SNP 2* |
| <i>Burkholderia</i> sp. MSMB617WGS | CP013458.1 | - | - | + SNP 2* |

Таблица 35 – (Продолжение)

| Штамм/ ген | Номер в GenBank NCBI | <i>bps1F3/bps1R3</i> 727 п.н. | <i>bps1F4/bps8R4</i> 440 п.н. | <i>bm1F2/bm14R2</i> 352 п.н. |
|--|----------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| <i>Burkholderia</i> sp. MSMB0266 | CP013418.1 | - | - | + SNP 2* |
| <i>Burkholderia</i> sp. 2002721687 | CP009548.1 | - | + SNP 4** | + SNP 2* |
| <i>Burkholderia</i> sp. BDU6 | CP013387.1 | - | - | + SNP 3* |
| <i>Burkholderia</i> sp. BDU8 | CP013388.1 | - | + SNP 5* | + SNP 3* |
| <i>Burkholderia</i> sp. MSMB0856 | CP013429.1 | - | - | + SNP 5* |
| <i>Burkholderia</i> sp. LA-2-3-30-S1-D2 | CP013385.1 | - | - | + SNP 5* |
| <i>Burkholderia</i> sp. KJ006 | CP003516.1 | - | - | + SNP 7* |
| <i>B. ubonensis</i> | | | | |
| <i>B. ubonensis</i> MSMB1471WGS | CP013465.1 | - | - | + SNP 4* |
| <i>B. ubonensis</i> MSMB0783 | CP013421.1 | - | - | + SNP 4* |
| <i>B. ubonensis</i> RF23-BP41 | CP013368.1 | - | - | + SNP 4* |
| <i>B. multivorans</i> MSMB1640 | CP013468.1 | - | - | + SNP 5* |
| <i>B. multivorans</i> DDS 15A-1 | CP008728.1 | - | - | + SNP 5* |
| <i>B. multivorans</i> ATCC 17616 | AP009387.1 | - | - | + SNP 5* |
| <i>B. multivorans</i> ATCC 17616 | CP000870.1 | - | - | + SNP 5* |
| <i>B. pseudomultivorans</i> | | | | |
| <i>B. pseudomultivorans</i> SUB-INT23-BP2 | CP013378.1 | - | - | + SNP 5* |
| <i>B. cepacia</i> ATCC 25416 | CP012983.1 | - | - | + SNP 6* |
| <i>B. cepacia</i> ATCC 25416 | CP007747.1 | - | - | + SNP 6* |
| <i>B. cenocepacia</i> | | | | |
| <i>B. cenocepacia</i> DDS 22E-1 | CP007782.1 | - | - | + SNP 5* |
| <i>B. ambifaria</i> | | | | |
| <i>B. ambifaria</i> MC40-6 | CP001027.1 | - | - | + SNP 5* |
| <i>B. vietnamiensis</i> | | | | |
| <i>B. vietnamiensis</i> HI2297 | CP013441.1 | - | - | + SNP 7* |
| <i>B. vietnamiensis</i> MSMB608WGS | CP013456.1 | - | - | + SNP 7* |
| <i>B. vietnamiensis</i> FL-2-3-30-S1-D0 | CP013395.1 | - | - | + SNP 7* |
| <i>B. vietnamiensis</i> LMG 10929 | CP009632.1 | - | - | + SNP 7* |
| <i>B. vietnamiensis</i> G4 | CP000616.1 | - | - | + SNP 7* |
| <i>B. vietnamiensis</i> AU1233 | CP013434.1 | - | - | + SNP 7* |
| Примечания | | | | |
| + – наличие ампликона расчетного размера | | | | |
| - – отсутствие ампликона расчетного размера | | | | |
| SNP n – количество однонуклеотидных замен на пару праймеров | | | | |
| * - SNP не затрагивают область связывания 3'конца праймеров | | | | |
| ** - SNP затрагивают 3 последних нуклеотида области связывания 3'конца праймеров | | | | |

Таким образом, анализ *in vitro* и *in silico* показал, что пара праймеров *bm1F2/bm14R2* (ампликон размером 352 п. н.) является группоспецифичной для видов *Brc* и *Bcc*; праймеры *bps1F4/bps8R4* специфично детектируют фрагмент гена *oxa* *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* размером 440 п. н.; а *bps1F3/bps1R3* выявляют фрагмент 727 п. н. гомологов локуса BURPS1106B_2313 строго у *B. pseudomallei* и *B. mallei*. Виртуальное тестирование разработанных праймеров с полны-

ми геномными последовательностями всех видов, представленных на момент проведения анализа в GenBankNCBI, показало их строгую специфичность в отношении заявленных видов бактерий.

Результаты биоинформатического анализа и полученные экспериментальные данные продемонстрировали применимость анализируемого 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.

Считаем важным отметить, что 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, в числе которых штамм, выделенный во Франции в 1976 г. во время знаменитой вспышки «L'affaire du jardin». 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. По нашему мнению, это является весомым аргументом в пользу стабильности выбранных генетических мишеней.

Учитывая, что дизайн праймеров предполагал их использование в формате мультиплексной ПЦР, представлялось перспективным создание на их основе диагностического набора для детекции и одновременной дифференциации видов, входящих в Врс. В связи с чем были созданы экспериментальные серии такого

набора, получившего название «Амплигенбуркхольдерии группы «*pseudomallei*» β LB/D - EPh». Экспериментальная оценка его эффективности для идентификации и дифференциации буркхольдерий комплекса «*B. pseudomallei*» и гетерологичных микроорганизмов, в том числе близкородственных видов *Bcc*, подтвердили полученные *in silico* данные о 100% специфичности разработанного набора праймеров. Чувствительность метода составила 9561 геномных эквивалентов (GE) в миллилитре для *B. pseudomallei*, 7827 GE/мл для *B. mallei* и 8749 GE/мл для *B. thailandensis* (в единицах массы Международной системы единиц – 74,8 пг, 49,3 пг и 63,5 пг, соответственно), что для всех перечисленных видов составляет менее 1×10^4 м.к./мл., то есть сопоставима для всех трех видов. Диагностическая специфичность и чувствительность набора составили не менее 99,0 %.

«Набор реагентов для выявления и дифференциации буркхольдерий группы «*pseudomallei*» в формате мультиплексной полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией «АмплигенБуркхольдерии группы «*pseudomallei*» β LB/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.).

5.3 Применение набора реагентов для идентификации клинических штаммов и при проведении мониторинговых исследований мелиоидоза на территории Вьетнама

В соответствии с планом мероприятий по оказанию научно-методической и материально-технической поддержки Социалистической Республике Вьетнам в рамках распоряжений Правительства РФ № 1789-р от 18.08.2017 г. и № 1536-р от 13.07.2019 г. с использованием разработанного набора реагентов была проведена верификация видовой принадлежности клинических изолятов, из коллекции Института тропической медицины Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра (СРВ, Ханой). Было исследовано 94 штамма, выделенных в госпиталях 6 провинций Вьетнама от больных с диа-

гнозом «мелиоидоз». Для 92 штаммов принадлежность к виду *B. pseudomallei* подтверждена, один штамм идентифицирован как *B. serasia*, другой – имел паттерн, нехарактерный ни для одного из определяемых набором видов.

Характеристики набора реагентов, простота использования и интерпретации результатов сделали разработанный генодиагностический препарат основным инструментом для идентификации штаммов из внешней среды при проведении мониторинговых исследований во Вьетнаме. Пример результатов ПЦР-скрининга почвенных штаммов с использованием набора реагентов «АмплигенБуркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL B/D - EPh» показан на Рисунке 42. Для анализа были отобраны изоляты, выросшие на агаре Эшдауна при 42°C, имевшие сходную с возбудителем мелиоидоза морфологию колоний, положительный результат теста на цитохромоксидазу, грамотрицательное окрашивание клеток, устойчивые к гентамицину, полимиксину и чувствительные к амоксициллин-клавуланату.

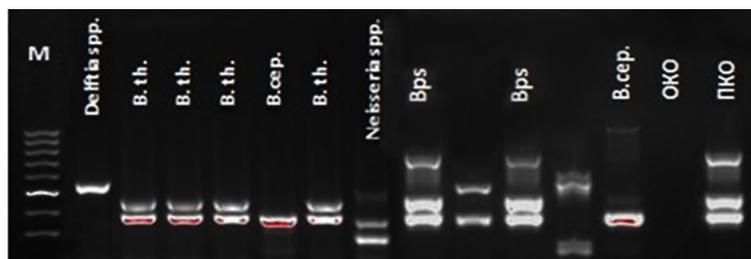


Рисунок 42 – Отдельные результаты ПЦР-скрининга штаммов, прошедших предварительные бактериологические тесты

Отдельные штаммы, определенные в ПЦР как виды комплекса «*B. serasia*», а также два изолята, имевшие нехарактерные для видов Brc паттерны амплификации с праймерами для детекции генов β-лактамаз молекулярных классов В и D, но наиболее распространенные среди выделенных гетерологичных штаммов, были проверены с использованием автоматического анализатора. Система биохимической идентификации VITEK 2 GN одинаково определила видовую принадлежность штаммов, определенных в ПЦР как виды комплекса «*B. serasia*», и каждый из 5 протестированных штаммов отнесла одновременно к 4 видам (*B. serasia*, *B.*

vietnamiensis, *B. multivorans* и *B. stabilis*. Что было ожидаемо, поскольку панель тестов карты GN не предусматривает дифференциацию видов внутри Vcc.

Два гетерологичных изолята автоматический анализатор VITEK 2 определил как *Delftia acidovorans* (Семейство *Comamonadaceae*, Порядок *Burkholderiales*) и *Neisseria* spp. (Семейство *Neisseriaceae*, Порядок *Neisseriales*).

Полученные результаты мы проверили полногеномным или частичным секвенированием нуклеотидных последовательностей, окончательно подтвердив видовую принадлежность штаммов, идентифицированных в ПЦР как *B. pseudomallei* (GenBank ac. N QLUY00000000.1, QLVB00000000.1, QLUX00000000.1, QLVA00000000.1, QLVC00000000.1, PHRB00000000.1, PHRC00000000.1, WTLF00000000.1, WSRT00000000.1, WSRV00000000.1, WSRU00000000.1, WSPI00000000.1, WUMQ00000000.1, WTLF00000000.1, WOWY00000000.1; Pub-MLST ac. 5261, 5262, 5263, 5264, 5265, 5266, 5267, 5268, 5269, 5270, 5271, 5272, 5273, 5274, 5275), *B. thailandensis* (GenBank ac. N PHRD00000000.1, WOWZ00000000.1, WOXA00000000.1) и *B. ceracia* (GenBank ac. N QLUZ00000000.1). Нуклеотидная последовательность генома клинического штамма неизвестного вида не имела достаточной гомологии ни с одним из опубликованных в базе данных NR GenBank NCBI геномов.

Проведенные исследования подтвердили высокую специфичность набора реагентов «АмплигенБуркхольдерии группы «*pseudomallei*» βLB/D - EPh» для идентификации современных клинических и природных штаммов *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* и их одновременной дифференциации как между собой, так и с близкородственными (*B. ceracia*) и более отдаленными представителями порядка *Burkholderiales*, а также видами других таксономических групп.

Таким образом, установлено, что представленный набор реагентов с высокой эффективностью идентифицирует штаммы *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* различного географического происхождения, независимо от срока давности выделения культур, а также штаммы перечисленных видов с измененным уровнем резистентности к β-лактамам.

Разработанный набор реагентов позволяет в один шаг идентифицировать три вида буркхольдерий: *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* и дифференцировать их от филогенетически близких видов комплекса *B. ceracia*, а также видов отдаленной гетерологии. Использование данного набора позволяет значительно ускорить лабораторную диагностику инфекций, обусловленных буркхольдериями комплекса «*B. pseudomallei*».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мелиоидоз, вероятно, одна из самых опасных и, вместе с тем, недооцененных тропических инфекций. Заболевание, описанное более 100 лет назад Альфредом Уитмором в Рангуне (ныне Янгон, Мьянма), для большей части мировой медицинской общественности по-прежнему остается «загадочным состоянием с высоким уровнем смертности» [Warner and Currie, 2018]. Это обусловлено, с одной стороны, невысокой осведомленностью клиницистов об этой инфекции, с другой – сложностью лабораторной диагностики, связанной с биологическими особенностями самого возбудителя, затрудняющими его идентификацию и дифференциацию с филогенетически близкими видами и рядом других грамотрицательных неферментирующих бактерий.

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. ceracia*» и «*B. pseudomallei*», а также группа *B. glumae* и *B. 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. Дендрограммы, полученные с использованием двух наборов данных и разных алгоритмов вывода деревьев, 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.

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 микроорганизмами и близкородственными непатогенными видами сыграли важную роль в выявлении механизмов, ответственных за приобретение вирулентности в естественной среде обита-

ния. К настоящему времени установлено, что, несмотря на значительные различия в патогенности между *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*, последняя содержит в своем геноме гомологи большинства известных факторов вирулентности возбудителя мелиоидоза, включая липополисахарид, систему секреции третьего типа (Т3SS) и системы Quorum Sensing.

Традиционно считалось, что ключевыми признаками, ответственными за низкий уровень вирулентности *B. thailandensis*, являются – отсутствие 1-го кластера Т3SS, наличие оперона ассимиляции L-арабинозы и значительные отличия в кластере биосинтеза капсульных полисахаридов [Reckseidler et al., 2001; Rainbow et al., 2002].

Т3SS играет важную роль во взаимодействии патогена с хозяином, обеспечивая бактериальную инвазию и выход из фагосомы [Deng et al., 2017]. Т3SS-1 отсутствует также и у *B. mallei* [Rainbow et al., 2002], тем не менее, возбудитель сапа экспрессирует Bsa (*Burkholderia* secretion apparatus), аналогичный Bsa у *B. pseudomallei*. Интересно, что области Т3SS-2 и -3 у *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* консервативны, однако у *B. thailandensis* экспрессия Bsa негативно регулируется метаболитами L-арабинозы, тогда как у *B. pseudomallei* и *B. mallei* оперон ассимиляции L-арабинозы утрачен [Moore et al., 2004; Kim et al., 2005].

На основании ранее опубликованных сведений и собственного биоинформатического исследования геномных последовательностей, размещенных в базах данных GenBankNCBI, мы провели 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 Т5SS, ответственные у возбудителя мелиоидоза за адгезию микроба к нефагоцитирующим клеткам макроорганизма. Также установлено, что белковые продукты 14 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.

BLF1 блокирует инициацию транскрипции у клетки-хозяина, инактивируя эукариотический фактор инициации EIF4A, и его ген отсутствует в геномах большинства секвенированных штаммов *B. thailandensis*, включая типовой штамм вида *B. thailandensis* E 264. По нашему мнению, представляет особый интерес, что три известных штамма, в геноме которых присутствуют гомологичные *BLF1* гены, являются природными изолятами и выделены из почвы и воды на разных континентах (Австралия и Северная Америка), что исключает клональный характер этих штаммов.

Одним из общепризнанных факторов, необходимых для способности возбудителя мелиоидоза инфицировать млекопитающих, является кластер генов биосинтеза капсульных полисахаридов (*wcb* оперон), который способствует выживанию *B. pseudomallei in vivo*, предотвращая его опсонизацию и фагоцитоз в инфицированном хозяине [DeShazer et al., 2001; Kim et al., 2005; Reckseidler-Zenteno et al., 2005; Mongkolrob et al., 2015]. Интересно, что *wcb* оперон возбудителя мелиоидоза, расположенный между локусами BPSL2787 и BPSL2810, имеет среднее содержание G + C (58 %) на 10 % ниже, чем в остальной части генома [Cuccui et al., 2012], что позволяет предположить, что он мог быть получен в результате горизонтального переноса. Считалось, что у *B. thailandensis* ортологичный кластер генов значительно отличается от такового *B. pseudomallei* и вместо капсульного полисахарида у *B. thailandensis* присутствует экзополисахарид. Но относительно недавно были обнаружены штаммы BTCV (*Burkholderia thailandensis* capsular variant), содержащие *wcb* оперон с высоким уровнем сходства с ортологичным кластером *B. pseudomallei* (идентичность нуклеотидной и аминокислотной последовательностей – 94,4% и 96%, соответственно), обозначенный Bp-like CPS, и также имеющим признаки элемента, приобретенного недавно посредством горизонтальной передачи и факт нового геномного приобретения предполагает возможность повторения такого события. Известные BTCV штаммы представлены

как клиническими, так и почвенными изолятами из Юго-Восточной Азии и Северной Америки. Вариантные штаммы *B. thailandensis* показали устойчивость к связыванию комплементом и внутриклеточное выживание в макрофагах, при незначительном повышении вирулентности для чувствительных лабораторных животных [Sim et al., 2010]. Тем не менее, все известные на сегодняшний день клинические ВТСВ штаммы явились причиной тяжелых форм инфекции.

Также весьма примечательно, что наиболее высокая идентичность белковых продуктов среди 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.

Как упоминалось выше, у *B. thailandensis* отсутствует большая часть кластера генов T3SS-1. Кроме того, отсутствуют гены эффекторных белков T3SS и T6SS – *CHBP* и *hcp1*, соответственно, а также аналоги генов BPSS0796, являющегося фактором 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%.

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 того, 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. По нашему мнению, перечисленные факты свидетельствуют, что сапрофитическая по своей природе *B. thailandensis* является оппортунистическим патогеном.

Консервативность генов вирулентности у видов, значительно отличающихся по патогенным свойствам, предполагает, что такое фенотипическое отличие не может быть объяснено только на основании анализа набора их генетических детерминант. Весьма вероятно, что оно обеспечивается дифференциальной регуляцией экспрессии генов (например, вышеупомянутое подавление генов, кодирующих компоненты T3SS-1, при экспрессии оперона ассимиляции арабинозы у *B. thailandensis*).

По-видимому, этот тезис справедлив и в отношении внутривидовой вариабельности степени патогенности у *B. pseudomallei*. Исследования геномов клинических штаммов возбудителя мелиоидоза, отличающихся по этому признаку, по-

казали их высокое сходство в репертуаре генов метаболизма и вирулентности [Nandi et al., 2010; Sarovich et al., 2014; Challacombe et al., 2014].

Установленный факт генетического сходства клинических изолятов и штаммов возбудителя мелиоидоза из внешней среды показывает, что последним не требуются дополнительные генетические изменения, чтобы успешно вызвать болезнь человека, и в патогенезе инфекции задействованы пути адаптации *B. pseudomallei* к стрессовым факторам внешней среды [Nandi et al., 2015]. Появляется все больше данных, что экспрессия генов вирулентности *B. pseudomallei* определяется окружающими условиями [Ooi et al., 2013], и становятся все более очевидными сложные регуляторные взаимодействия между клетками-хозяевами и возбудителем мелиоидоза [Vanaporn et al., 2017; Micheva-Viteva et al., 2017; Duong et al., 2018; Gupta et al., 2018]. *B. pseudomallei*, в свою очередь, также способна оказывать влияние на дифференциальную регуляцию экспрессии генов клетки-хозяина, функционирующих при апоптозе, иммунном и стрессовом ответах, а также ряда генов клеточного метаболизма [Memisevic et al., 2015].

Существует гипотеза, что *B. pseudomallei* является так называемым «случайным патогеном» и его адаптационный потенциал для выживания в природе, в том числе внутриклеточно (например, в амебах), также обеспечивает возможность успешно колонизировать млекопитающих [Casadevall and Pirofski 2007; Nandi et al., 2010], которые, возможно, являются для *B. pseudomallei* такой же естественной средой обитания, как почва и вода.

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в понимании биологии и патогенеза *B. pseudomallei*, 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. Исключение составляют Таиланд, Сингапур, три штата Австралии (Западная Австралия, Северная Территория и Квинсленд) и с 2018 года Виргинские острова, США.

В первой четверти прошлого века мелиоидоз считался редкой тропической инфекцией с узким ареалом. Примечательно, что, по представлениям того време-

ни, область его распространения включала Бирму (ныне Мьянма) [Whitmore, 1912], Цейлон (ныне Шри-Ланка) [Denny and Nicholls, 1927], Федеративные Малайские штаты (ныне Малайзия) [Stanton and Fletcher, 1932], Индокитай (ныне Камбоджа, Лаос и Вьетнам) [Vielle et al., 1926; Pons and Advier, 1927; Mesnard and Joyeux; 1929] и Голландскую Ост-Индию (ныне Индонезия) [DeMoor et al., 1932; Pet and Fossen, 1934]. То есть, удивительным образом полностью совпадала с регионами, в которых присутствовали британские, французские и голландские колониальные медицинские службы. Кстати, именно французы в Индокитае доказали, что мелиоидоз не является зоонозом, как первоначально предполагалось, а его возбудитель имеет сапрофитную природу [Vaucel, 1937; Chambon, 1955]. В настоящее время по эколого-эпидемиологическим признакам – первичная и основная среда обитания, многообразие экологических ниш и широкие адаптивные возможности возбудителя, полигостальность и полипатогенность – мелиоидоз относится к сапронозам.

Долгое время считалось, что эндемичный по мелиоидозу регион ограничен странами Юго-Восточной Азии и Северной Австралии. Однако достаточно давно в этом возникали обоснованные сомнения. Во-первых, *B. pseudomallei* обладает поразительно высокой способностью адаптироваться к разнообразным средам обитания, что отражено в его метаболическом репертуаре с возможностью использовать широкий спектр субстратов, а накопление значительных гранул полигидроксibuтирата 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* – по сути, является геномоваром *B. pseudomallei*. И, наконец, убиквитарность филогенетически близкой возбудителям мелиоидоза и сапа *B. ceracia* (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]. Однако, полного понимания кли-

матических пределов потенциального распространения *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. Среди 7 французских штаммов *B. pseudomallei* этого периода, представленных в базе данных PubMLST, присутствует 6 сиквенс-типов (ST1, ST57, ST82, ST27, ST347 и ST348), причем четыре из них являются уникальными и до настоящего времени более нигде не обнаружены (ST 1, 82, 347 и 348).

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 клональным комплексам, включающим штаммы, выделенные на территориях бывших французских колоний или сопредельных. Уникальность французских ST и их маргинальное положение на филогенетических линиях предполагают неопределенный срок давности завоза возбудителя, а распределение по популяционной кладограмме – неоднократность такого события. Перечисленные факты свидетельствуют о возможности неопределенно долгого выживания возбудителя мелиоидоза во внешней среде на широтах выше 30-х параллелей.

Более того, возбудитель может выживать в суровых пустынных условиях и в условиях климата с сезонным понижением температуры в среднем до 5-7 °C (зафиксированный минимум – минус 0,7 °C) [Yip et al., 2015; Chapple et al., 2016]. Способность *B. pseudomallei* переживать экстремальные условия просто парази-

тельна. Микроб выжил в течение шестнадцатилетней инкубации в дистиллированной воде [Pumruang et al., 2011]. Большая часть популяции возбудителя оставалась жизнеспособной до недели в анаэробных условиях, а персистирующая субпопуляция *B. pseudomallei* (приблизительно 0,1% от исходного количества клеток) – как минимум, в течение года. Адаптация к условиям повышенной солености обеспечивает перекрестную защиту от оксидативного и теплового стрессов, а также повышенную способность *B. pseudomallei* к образованию биопленки и бляшкообразованию [Pumirat et al., 2017].

Перечисленные факты отражают сложные взаимосвязи возбудителя мелиоидоза и его природной среды обитания и дают представление о необычайно высоком адаптационном потенциале микроба к физическим и химическим стрессовым воздействиям, обеспечивающем его успешное существование в самых разнообразных экотопах.

Ключевым фактором внешней среды, ограничивающим потенциальный ареал возбудителя, является температурный. *B. pseudomallei* способна успешно размножаться в диапазоне температур от 25 до 42 °С, переживать кратковременное (до одного часа) воздействие 50 °С [Vanaporn et al., 2008; Pumirat et al., 2017]. Нижний температурный предел выживания возбудителя точно не определен. Установлено, что 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, в зависимости от штамма. 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* мы попытались этого избежать, снижая температуру инкубации постепенно, тем самым давая возможность микробу адаптироваться к холоду. После 65-суточной инкубации при пониженных температурах, включая 32 дня при 1 °С, отмечено снижение числа КОЕ/мл в 3,4 и 1,2 раза для штаммов 4811 и 1501 и увеличение в 1,6 раза для *B. pseudomallei* 1512, причем эти изменения

численности не являются статистически достоверными ($t = 0,15 < t_{кр} = 2,447$). 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 ($p < 0,0001 - 0,0002$) снижении численности культивируемых клеток в $4,8 \times 10^3 - 1 \times 10^9$ раз от исходного количества, в зависимости от штамма и условий опыта. Максимальную устойчивость к воздействию отрицательных температур проявил штамм, обладающий способностью к выраженной морфологической диссоциации колоний.

Полученные данные не являются исчерпывающими, поскольку мы подсчитывали только культивируемые формы, тогда как известна способность возбудителя мелиоидоза под воздействием того или иного стресса формировать значительную персистирующую субпопуляцию жизнеспособных, но некультивируемых клеток, обладающую значительно более высокой толерантностью к неблагоприятным факторам. Кроме того, 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 объясняет длительное выживание возбудителя мелиоидоза на территории Франции и представляет убедительные, по нашему мнению, экспериментальные доказательства возможности выживания *B. pseudomallei* в условиях длительного воздействия низких, в том числе отрицательных, температур, что в корне меняет устоявшееся мнение о невозможности интродукции возбудителя на территории Российской Федерации.

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. Очевидно, что наблюдаемый рост числа регистрируемых в мире случаев мелиоидоза связан не только с объективными причинами, включающими как природные, так и социальные факторы, но и с растущей информированностью о мелиоидозе.

Хроническая и латентная формы инфекции представляют собой серьезную эпидемиологическую проблему, способствуя распространению заболевания за пределы областей эндемичности мелиоидоза. В связи с возросшим в последние годы количеством случаев завоза инфекции в страны умеренных широт больными людьми или с инфицированными животными, экскретирующими возбудитель, риск контаминации *B. pseudomallei* новых регионов становится все более реальным.

С целью определения тенденции в многолетней динамике заноса мелиоидоза в неэндемичные страны и определения влияния предрасполагающих факторов на риск развития мелиоидоза после контакта с возбудителем при посещении эндемичных регионов мы провели анализ завозных случаев заболевания на неэндемичные территории за пятнадцатилетний период с 2003 по 2017 годы, показавший некоторые отличия клинико-демографических данных между заболевшими мигрантами и коренным населением эндемичных регионов. В частности, среди авто- и неавтохтонного населения большинство заболевших составляют мужчины, но в случаях 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 30 лет при отсутствии статистически достоверной корреляции между возрастом и количеством заболевших ($t = 0,36$, $p = 0,7458$). Статистически достоверного влияния наличия предрасполагающих заболеваний на риск развития мелиоидоза, как и в случае возраста, не выявлено ($t = 1,24$, $p = 0,3040$). Данные проведенного нами анализа завозных случаев инфекции показали, что среди исследованной выборки заболевших мелиоидозом предрасполага-

ющие факторы риска имели 46,7%, по данным других исследований годы эта доля была либо меньше – 37,5% [Danet et 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.

Исходя из того, что до 80% пациентов с мелиоидозом в эндемичных регионах имеют один или несколько факторов риска заболевания, представители австралийской школы придерживаются мнения, что мелиоидоз является оппортунистической инфекцией с невысокой вероятностью развития заболевания у здоровых людей [Currie et al., 2010]. Однако следует принимать во внимание, что на эндемичных территориях наряду с *B. pseudomallei* широко распространены сходные по антигенной структуре близкородственные буркхольдерии. И у людей, родившихся и выросших в непосредственном контакте с этой микрофлорой, как правило, формируется определенный уровень специфического иммунитета. Это подтверждается данными о высокой серопревалентности местного населения, причем ее уровень отличается в разных географических областях: значения фоновых титров антител к возбудителю мелиоидоза отличаются для разных регионов эндемичного распространения *B. pseudomallei* [Appassakij et al., 1990; Kanaphun et al., 1993; Chaowagul, 2007; Cheng et al., 2008; Maude et al., 2012]. Естественно, что при наличии предрасполагающих факторов, включающих ряд хронических заболеваний и преклонный возраст, уровень иммунитета падает и возрастает вероятность практически любой инфекции.

Проведенный анализ показал, что 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 риска 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 (без учета случаев инфекции среди ветеранов, участвовавших в военных действиях на территории Юго-Восточной Азии) 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 месяца) гг. – 8 и за 2017 (8 месяца) - 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.

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. По-прежнему нет ни одного зарегистрированного случая импорта инфекции из Австралии.

Последнее, по нашему мнению, является ярким примером действенности профилактических мер. Подавляющее большинство туристов, практически ничего не зная про мелиоидоз, прекрасно осведомлены об обилии в дикой природе Австралии опасных пресмыкающихся и членистоногих. Это побуждает к соответствующей экипировке, исключая прямой контакт с почвой, что минимизирует вероятность заражения мелиоидозом.

В Российской Федерации наблюдается тенденция активного развития международного туризма, в том числе и экологического. По данным Росстата, за 4 го-

да, 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 входила в десятку мировых лидеров, при этом наибольший прирост составляли туристы из Азии и Латинской Америки. Данные факторы определяют возрастание вероятности завоза инфекционных заболеваний, включая мелиоидоз.

В России к настоящему времени зарегистрирован единственный случай мелиоидоза, который, в связи с отложенной на более чем три года диагностикой, окончился летально. 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 последствия для больного, а также предполагает риск непреднамеренного инфицирования сотрудников клинических лабораторий.

Согласно рекомендациям, разработанным в итоге обсуждения проблем диагностики инфекции на 7-м Всемирном конгрессе по мелиоидозу (Бангкок, Таиланд, 2013) [Hoffmaster et al., 2015], диагноз «мелиоидоз» следует рассматривать для каждого пациента с сепсисом, имеющего в эпидемиологическом анамнезе посещение эндемичных регионов, причем независимо от срока давности, поскольку латентный период инфекции может длиться десятилетиями. Особенно это важно для лиц, имеющих предрасполагающие заболевания такие, как сахарный диабет, заболевания почек или иммунодефицитные состояния.

Потенциальные серьезные последствия для здоровья и жизни как пациентов, так и работников здравоохранения, определяют важное значение своевременной и качественной диагностики этого заболевания, в связи с чем, рекомендуется ввести в программы основного и дополнительного образования врачей-инфекционистов раздел «Клиника и лечение мелиоидоза».

Клинические проявления мелиоидоза многообразны, инфекция может поражать различные системы органов, имитируя многие другие заболевания. В свя-

зи с этим, ключевую роль в установлении и (или) подтверждении диагноза «мелиоидоз» имеют данные эпидемиологического анамнеза больного и лабораторной диагностики.

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. ceracia*», 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 при отсутствии настороженности в отношении мелиоидоза, особенно при бактериологическом исследовании нестерильных в норме клинических образцов (мокрота, кожные поражения и другие), что является определенной проблемой лабораторной диагностики инфекции.

Для *B. pseudomallei* характерна так называемая I-диссоциация – присутствие на одной чашке морфологически весьма разнообразных (R-, S-, M- и переходные формы) типов колоний, что было описано еще в первой трети прошлого века А. Т. Stanton и L. Nicholls [Stanton, 1924; Nicholls, 1930]. Исследования последнего десятилетия свидетельствуют, что способность *B. pseudomallei* образовывать не-

сколько обратимых типов колоний отражает адаптивные изменения, способствующие выживанию возбудителя в конкретных условиях окружающей среды [Chantratita et al., 2007, 2011; Tandhavanant et al., 2010; Austin et al., 2015; Wikraiphath et al., 2015; Shea et al., 2017]. Установлено, что генетически идентичные гладкие и шероховатые варианты колоний одного и того же штамма значительно отличаются по спектру метаболической активности, уровню устойчивости к ингибиторам и вирулентности при экспериментальной инфекции у мышей [Shea et al., 2017]. 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). Проведенное нами 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. 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 нередки 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. 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 преду-

смотрены варианты, обозначаемые арабскими цифрами. 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 C (“carnation”, «гвоздики») – складчатые колонии неправильной формы, возвышающиеся над агаровой поверхностью, похожие на махровые цветы; группа B (“button”, «пуговицы») – округлые, непрозрачные колонии с валиком по окружности, в отдельных случаях валик сегментирован; группа P (“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.

Межштаммовое фенотипическое разнообразие значительно затрудняет идентификацию подозрительных культур методами классической бактериологии. Ряд признаков, имеющих диагностическое значение для *B. pseudomallei*, в частности, окисление рамнозы, ксилозы, целлобиозы, реакция денитрификации, продукция уреазы и гидролиз эскулина характеризуются заметной вариабельностью. Также являются неоднозначными такие признаки, как способность расти при 42 °С, рост в R-форме и устойчивость к гентамицину. Обнаруженные относительно недавно варианты штаммы *B. thailandensis* показывают I-диссоциацию, причем, подобно *B. pseudomallei*, большая часть колоний представлена R-формами. Устойчивость к гентамицину является видовым свойством *B. pseudomallei* и используется на этапе выделения культуры в качестве одного из первых диагностических тестов. В литературе имеются данные как о выделении отдельных штаммов возбудителя, у которых этот признак отсутствует, так и о преобладающем распространении в популяции возбудителя чувствительных к гентамицину штаммов [Podin et al., 2014]. При исследовании штаммов возбудителя из коллекции Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра (г. Ханой, Социалистическая Республика Вьетнам) мы также об-

наружили штаммы *B. pseudomallei*, частично или полностью утратившие резистентность к гентамицину.

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 санитарно-эпидемиологическими правилами; наличие в базах данных систем идентификации референтных биохимических профилей для объектов поиска; а также информацию о вероятности ошибочного определения видовой принадлежности возбудителя.

Сравнение двух доступных нам систем идентификации API (bioMe'rieux) и Vitek 2 (bioMe'rieux) 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.

Эффективность идентификации *B. pseudomallei* при помощи коммерческих анализаторов в значительной степени зависит от особенностей редко встречающихся биохимических профилей штаммов. И проблема точной идентификации атипичных штаммов возбудителя мелиоидоза, а также его дифференциации от близких непатогенных сапрофитных представителей рода, широко распростра-

ненных 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.

Непараметрический анализ сходства (ANOSIM) показал достоверные отличия биохимических профилей между кластерами штаммов *B. pseudomallei* (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. 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*. А 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*.

Установлено, что вероятность идентификации штаммов *B. mallei* в значительной степени определяется результатами тестов GGT, SAC, dCEL, ProA, dTRE, URE, O129R и PHOS. Причем сочетание 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. cepacia*.

Как упоминалось выше, для возбудителя мелиоидоза при культивировании на плотных питательных средах характерно образование морфологически различных колоний. На агаре Эшдауна *B. pseudomallei* имеет разнообразную, но с характерными особенностями морфологию колоний и, при наличии соответствующего опыта, может быть визуальна отличена от банальной микрофлоры (но не от филогенетически близких видов). Морфологическая диссоциация колоний присутствует также и на неселективных средах, но носит менее выраженный характер. В связи с этим мы провели сравнительный анализ биохимической вариабельности изогенных морфотипов *B. pseudomallei*, выращенных на агарах Лурия и Эшдауна, и ее влияние на достоверность биохимической идентификации.

Было 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 индивидуаль-

ные 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 патогенных буркхольдерий 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* или *B. mallei*, 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 чем 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.

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 обще клеточных белков штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, внедренные в базы данных S.A.R.A.M.I.S.TM и MALDI Biotyper, обеспечивают достоверную идентификацию буркхольдерий II группы патогенности.

Выявление и точная идентификация патогена является фундаментальной задачей лабораторной диагностики, решение которой обеспечивает представление об этиологии инфекционного заболевания и, как следствие, адекватно назначенное лечение. В исследованиях, направленных на выявление возбудителя мелиоидоза как из клинических образцов, так и из объектов внешней среды, как правило, применяется тактика выделения культуры. Однако, способность *B. pseudomallei* существовать в жизнеспособном, но некультивируемом состоянии, делает в таких случаях его обнаружение методами классической бактериологии невозможным. Кроме того, эти методы длительны, трудоемки и имеют ограниченную чувствительность, в связи с чем высока вероятность пропустить и культивируемые формы, например, выросшие в виде микроколоний и (или) «заросшие» другими бактериями, что особенно актуально при исследовании нестерильных в норме проб.

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.

Для обеспечения быстрой и достоверной лабораторной диагностики инфекционных заболеваний в настоящее время широко используют альтернативные подходы, направленные на выявление маркеров инфекции (специфические антитела, антигены и нуклеиновые кислоты возбудителя).

Серологические тесты представляют собой основу лабораторной диагностики многих инфекционных заболеваний 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.

Методы и технологии, основанные на анализе структуры генома, достаточно давно успешно используются в диагностике инфекций различной этиологии, позволяя своевременно определить видовую принадлежность возбудителя.

Необходимость надежной идентификации возбудителя мелиоидоза и его дифференциации с близкородственными буркхольдериями определило в свое время активный поиск альтернативных мишеней и методов генодиагностики.

Две характерные особенности *B. pseudomallei* – геномная гетерогенность [Nandi et al., 2015; Price et al., 2017] и высокая частота рекомбинации [Spring-Pearson et al., 2015] делают разработку вариантов 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 тест-системы 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, выявляющих отличные генетические локусы, и, при необходимости, последующую верификацию результатов методом MLST или частичным секвенированием гена *recA*. Для лабораторий, не имеющих такой возможности, оптимально использовать мультиплексные системы идентификации, 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 бактериальных генетических мишеней является минимальный риск их утраты в процессе адаптации к макроорганизму или в результате применения антибиотиков. По нашему мнению, было логично изучить

потенциал использования в этом качестве генов β -лактамаз, широко и разнообразно представленных на обеих хромосомах *B. pseudomallei*. В связи с чем следующей задачей нашей работы являлся 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 были сконструированы пять пар праймеров, детектирующих β -лактамазы буркхольдерий Врс молекулярных классов А, В и D (по классификации Ambler), относящихся к 2 суперсемействам – β -лактамазы/транспептидазы и металло-гидролазы/оксидоредуктазы.

Экспериментальная оценка видоспецифичности разработанных праймеров показала, что пара *bm1F2/bm14R2* является группоспецифичной для Врс и Всс; праймеры для гена β -лактамазы класса А *bm1F1/bm4R1* выявляли *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. ceracia*; праймеры *bps1F4/bps8R4* на ген β -лактамазы класса D – *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*; *bps1F3/bps1R3* на локус BURPS1106B_2313 (металло- β -лактамаза класса В) детектировали исключительно штаммы *B. pseudomallei* и *B. mallei*. Праймеры *bps3F5-bps8R5* (мишень – BURPS1106B_A3704 – последовательность металло- β -лактамазы класса В) опосредовали амплификацию фрагмента ожидаемого размера как у буркхольдерий, так и у исследованных гетерологичных видов.

На основании полученных результатов установлено, что использование набора из трех пар праймеров (*bm1F2-bm14R2*, *bps1F4-bps8R4* и *bps1F3-bps1R3*) является достаточным для дифференциации видов буркхольдерий как внутри комплекса «*B. pseudomallei*», так и с видами комплекса «*B. ceracia*».

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 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 антимикробным соединениям различных классов, включая препараты β -лактаминового ряда.

Необходимо отметить, что 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, в числе которых один из штаммов, выделенных во Франции в 1976 г. во время вспышки «L'affaire du jardin». 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.

Гены β -лактамаз классов В и D были обнаружены нами во всех коллекционных штаммах *B. pseudomallei* различного географического происхождения, выделенных из разных источников в период с 1917 по 1985 гг., включая штаммы из внешней среды, 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 всеобщей видовой распространенности и стабильности выбранных генетических мишеней.

Результаты, полученные *in vitro*, мы проверили биоинформатическими методами, протестировав выбранные три пары праймеров со всеми полными геномными последовательностями всех видов, представленных на момент проведения анализа в GenBank NCBI (база данных NR), включая виды семейства *Burkholderiaceae*. 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. Прове-

денный 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_LWWV00000000.1) 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 -лактамы (цефтазидим, амоксициллин-клавуланат, имипенем и меропенем); штаммы *B. pseudomallei* MSHR5864, MSHR6755 и MSHR7929 – клинические изоляты со сниженной восприимчивостью к меропенему.

Вероятно, β -лактамазы играют какую-то пока неизвестную важную роль в клеточной физиологии патогенных буркхольдерий, что обеспечивает их повсеместное распространение и генетическую стабильность. Помимо полученных нами сведений об убиквитарности исследованных генов β -лактамаз в мировой популяции возбудителя мелиоидоза, данное предположение подтверждается литературными данными о гиперэкспрессии у *B. pseudomallei* β -лактамазы класса В в стрессовых условиях [Pumirat et al., 2009].

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 на второй хромосоме других гомологичных последовательностей, кроме собственных паралогов. Для исключения внешнего происхождения исследуемых генов β -лактамаз проведен анализ GC-содержания прилегающих к ним фрагментов хромосомы. Данный показатель у фрагментов, содержащих локусы BPS_RS29690 и BPS_RS30385, оказался равным 67%, а у фрагмента с локусом BPS_RS29225 – 69%, что соответствует среднему по геному GC-составу (~ 68%), что подтверждает оригинальное происхождение исследованных локусов.

Также проведена оценка уровня гомологии паралогов β -лактамаз *B. pseudomallei*, которая 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. 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 консервативности.

Всеобщая распространенность исследованных генов, высокая межштаммовая идентичность генного контента всех трех 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 ис-

конной 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.

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*» βL 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.).

Набор реагентов был использован в совместных с Российско-Вьетнамским Тропическим научно-исследовательским и технологическим центром (Социалистическая Республика Вьетнам, Ханой) исследованиях распространенности *B. pseudomallei* во внешней среде на территории эндемичного по мелиоидозу Вьетнама, проводимых в соответствии с планом мероприятий, осуществлявшимся в рамках распоряжений Правительства РФ № 1789-р от 18.08.2017 г. и № 1536-р от 13.07.2019 г. Характеристики набора реагентов, простота использования и интерпретации результатов сделали разработанный генодиагностический препарат

основным инструментом для идентификации штаммов из внешней среды при проведении мониторинговых исследований и верификации видовой принадлежности клинических изолятов.

В заключение хочется еще раз подчеркнуть, что проблемы лабораторной диагностики мелиоидоза обусловлены, прежде всего, биологическими свойствами его возбудителя – наличие открытого обширного генома, имеющего высокую степень гомологии с филогенетически близкими видами; чрезвычайная геномная пластичность, обеспечивающая *B. pseudomallei* колоссальные возможности адаптации к разнообразным средам обитания; морфологическая изменчивость и вариабельность биохимических признаков; особенности взаимодействия с хозяином, включая способность уклоняться от иммунного пресса и даже влиять на него. Эти свойства могут оказывать влияние, и порой весьма значительное, на результаты тех или иных методов выявления возбудителя, что обуславливает необходимость комплексного и гибкого подхода к лабораторной диагностике мелиоидоза в каждом конкретном случае.

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 вариантами 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 варибельная 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 $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ не менее 32 суток и переживают как непрерывное воздействие температуры минус $18\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 В – 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 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*» β LB/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 происхождения, 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 СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ

| | |
|--|--|
| Bcc (<i>B. cepacia</i> complex) | Комплекс <i>Burkholderia cepacia</i> |
| Bpc (<i>B. pseudomallei</i> complex) | Комплекс <i>Burkholderia pseudomallei</i> |
| Bp-like CPS | Кластер генов биосинтеза капсульного полисахарида <i>B. thailandensis</i> , высокомолекулярный ортолог у <i>B. pseudomallei</i> |
| BTCV (<i>Burkholderia thailandensis</i> capsular variant) | Вариантные штаммы <i>B. thailandensis</i> , у которых присутствует Bp-like CPS |
| BLF1 (<i>Burkholderia</i> lethal factor 1) | <i>Burkholderia</i> летальный фактор 1 |
| Bsa (<i>Burkholderia</i> secretion apparatus) | Секреторный аппарат буркхольдерий |
| CDS (CoDing Sequence) | Последовательность нуклеотидов, соответствующая последовательности аминокислот в предсказанном белке, включает в себя стартовый и стоп-кодоны. |
| cgMLST | Мультилокусное сиквенс-типирование ядра генома |
| CIS (Contractile Injection System) | Сократительная инъекторная система |
| CPS | Капсульный полисахарид |
| EIA (Enzyme immunoassay) | Иммуноферментный анализ |
| ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) | Твердофазный иммуноферментный анализ |
| EPS | Экзополисахарид |
| GI (Genomic Island) | Геномный остров |
| ICT | Иммунохроматографический тест |
| IS (Insertion sequence) | IS-элемент – простой мобильный генетический элемент |
| ITS (16S-23S internal transcribed spacer) | Транскрибируемая разделительная последовательность между генами 16S и 23S рибосомальной РНК |
| LAMP (Loop-mediated isothermal AMPLification) | Петлевая изотермическая амплификация |
| MLST | Мультилокусное сиквенс-типирование |
| MNGC (Multinucleated Giant Cells) | Многоядерные гигантские клетки |
| NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification) | Амплификация нуклеиновых кислот, основанная на обратной транскрипции |

| | |
|--|---|
| OPS | О-полисахарид |
| orf (open reading frame) | Открытая рамка считывания |
| PBE (plant-beneficial-environmental) | Свободноживущие или ассоциированные с растениями буркхольдерии |
| SNP | Полиморфизм единичных нуклеотидов |
| SSR (Simple Sequence Repeats) | Короткие повторы длиной 1–6 нуклеотидов |
| T3SS, T5SS, T6SS | Системы секреции третьего, пятого и шестого типов |
| WGS (whole genome sequence) | Шотган полногеномный сиквенс |
| Автохтоны (от греч. autó chthōn - местный) | Коренное население, аборигены (Большой толковый словарь русского языка. Под ред. С. А. Кузнецова) |
| Геномовар | Термин, используемый для обозначения штаммов (обычно внутри родов <i>Burkholderia</i> и <i>Agrobacterium</i>), которые являются филогенетически дифференцируемыми, но фенотипически неразличимыми. Геномовар не может быть идентифицирован стандартными биохимическими тестами, при наличии дифференцирующих тестов – классифицируется как вид |
| ДИ | доверительный интервал |
| КОЕ | Колониеобразующая единица |
| МГЭ | Мобильный генетический элемент |
| м.к. | Микробные клетки |
| М. п. н., т. п. н. | Миллион, тысяча пар нуклеотидов |
| МИК | Минимальная ингибирующая концентрация |
| МФА | Метод флуоресцирующих антител |
| НМФА | Непрямой метод флуоресцирующих антител |
| РНГА | Реакция непрямой гемагглютинации |
| ТИФА | Твердофазный иммуноферментный анализ |

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алтухова, В. В. Использование полимеразной цепной реакции для обнаружения возбудителей сапа и мелиоидоза при экспериментальной инфекции/ В. В. Алтухова, В. А. Антонов, Г. А. Ткаченко, О. В. Зинченко и др. // Мол. генет., микробиол. и вирусол. – 2007. – №3. – С. 22-27.
2. Афанасьев, М. В. MALDI-ToF масс-спектрометрический анализ для идентификации возбудителей чумы, холеры и туляремии / М. В. Афанасьев, Л. В. Миронова, С. В. Балахонов //Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2015. – Т. 33, № 2. – С. 57-63.
3. Афанасьев, М. В. Апробация метода масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией для идентификации возбудителя чумы / М.В. Афанасьев, А.С. Остяк, С.В. Балахонов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – №8. – С. 39-43.
4. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях/ И.П. Ашмарин, А.А.Воробьев. – Л.: Медгиз, 1962. – 180 с.
5. Беляков, В. Д. Псевдомонады и псевдомонозы / В.Д. Беляков, Л.А. Ряпис, В.И. Илюхин . – М.: Медицина, 1990. – 224 с.
6. Ветчинин, С. С. и др. Возможность выявления штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза при сочетании методов иммуноблоттинга и амплификации ДНК/ С.С. Ветчинин, И.Ю. Щит, А.Г. Шевяков, С.Ф. Бикетов //Инфекция и иммунитет. – 2019. – Т. 9, №. 2. – С. 404-408.
7. Замарина, Т. В. Конструирование экспериментальной тест-системы иммуноферментной на основе моноклональных антител к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза/ Т. В. Замарина, Н. П. Храпова, И. И. Корсакова, Е. В. Пименова //Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2014. – №. 3 (51) . – С. 93-94.
8. Зинченко, О.В. Разработка методических подходов для специфической индикации и идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза с помощью полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией результатов: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.02.03 – Волгоград, 2010. – 23 с.
9. Илюхин, В. И. Идентификация *Pseudomonas pseudomallei* / В.И. Илюхин, Л.Д. Поповцева, Н.Н. Пивень //Лаб. дело. – 1983. – №7. – С.61-62.
10. Илюхин, В. И. Мелиоидоз: итоги столетнего изучения, современные проблемы и зримые перспективы/ В. И. Илюхин, Т. В. Сенина // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2012. – № 5. – С.41-46.
11. Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I - II групп патогенности // Методические рекомендации МР 4.2.0089-14
12. Кузютина, Ю.А. Конструирование рекомбинантных штаммов *E. coli* - продуцентов специфических антигенов *Burkholderia pseudomallei*/ Ю.А. Кузютина, И.Б. Захарова, Д.В. Викторов // Инфекция и иммунитет.– 2019.– Т. 9, № 1.– С. 203-208.

13. Кузютина, Ю.А. Поиск потенциальных мишеней для детекции и дифференциации штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа / Кузютина Ю.А., Захарова И.Б., Савченко С.С., Лопастейская Я.А. и др.// Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.– 2016.–Т.60, № 4.– С. 114-117
14. Кытманов, А.А. Разработка иммуноферментных моноклональных тест-систем для выявления возбудителей сапа и мелиоидоза/ А.А. Кытманов, Г.Д. Елагин, Г.В. Куклина, Д.В. Печенкин и др.// Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – № 3. – С.60-65.
15. Ларионов, Г.М. Эпидемиология и профилактика мелиоидоза / Г.М. Ларионов, С.Д. Гевенский, Н.И. Погасий, В.В. Сухов// Мелиоидоз: сб. науч. тр. / под ред. Н. Г. Тихонова.– Волгоград: Нижне-Волжское книжное издательство, 1995. – С.161-195.
16. Леденева, М. Л. Разработка и применение набора реагентов для выявления рнк возбудителей мелиоидоза и сапа на основе транскрипционной амплификации (nasba) в режиме реального времени / Леденева, М. Л., Ткаченко, Г. А., Батулин, А. А., Шпак, И. М.//Клиническая лабораторная диагностика. – 2018. – Т. 63, №. 10. – С. 651-657.
17. Лемасова, Л. В. Дифференциация возбудителей сапа и мелиоидоза методом ПЦР в режиме реального времени: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.02.03/ Лемасова Людмила Викторовна. – Волгоград, 2018. – 23 с.
18. Лемасова, Л. В. Оценка возможности применения в лабораторной практике набора реагентов для диагностики сапа и мелиоидоза с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени/ Л. В. Лемасова, Г. А. Ткаченко, Е. В. Прохвятилова, Л. И. Белицкая, Д. В. Викторов, А. В. Топорков //Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – Т. 64, №. 11. – С. 700-704.
19. Меринова, Л. К. Инсерционные мутации в геноме *Pseudomonas pseudomallei*, индуцированные транспозонами Tn10, Tn9, Tn5/ Л. К. Меринова, Е. В. Тимофеева, И. К. Сеимова // Мол. генет. микробиол. вирусол. – 1997. - № 1. – С.14-17.
20. Новицкая, И.В. Разработка и совершенствование средств и методов изучения иммунодиагностики особо опасных инфекций/ И.В. Новицкая, В.С. Лесовой, А.В.Липницкий, Е.В. Прохвятилова и др.// Реферативный сборник Методические документы и отчеты по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. – Саратов, 2009. – С. 52-53.
21. Онищенко, Г. Г. Проблемы противодействия биологическому терроризму на современном этапе/ Г. Г. Онищенко, А. В.Топорков, А. В. Липницкий, Д. В. Викторов // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. – 2016. –Т.1, №14. – С. 24-31.
22. Патент на изобретение RU 2 540 902 С1 Способ получения антигенного эритроцитарного диагностикума для обнаружения антител к антигенам возбудителей сапа и мелиоидоза / А.М. Куделина, И.В. Новицкая, М.Я. Кулаков, В.Г. Пушкарь и др., заявитель и патентообладатель ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – Заявка: 2013135369/15 от 26.07.2013; опубл. 10.02.2015, Бюл. № 4.
23. Патент на изобретение RU 2 188 036 С1 Способ получения диагностикума эритроцитарного антигенного сапного / Левчук Б.А., Кузнецов С.Л., Кузнецов С.М., Бондарева Т.А. и

- др., заявитель и патентообладатель Научно-исследовательский институт микробиологии МО РФ. – Заявка: 2013135369/15 от 26.07.2013; опубл. 27.08.2002.
24. Прохватилова, Е.В. Оценка эффективности применения наборов реагентов для обнаружения возбудителя мелиоидоза при проведении внутреннего контроля качества лабораторных исследований в Референс-центре по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза / Е.В. Прохватилова, В.А. Антонов, Д.В. Викторов, В.И. Илюхин, Н.П. Храпова и др. // Дальневосточный Журнал инфекционной патологии. – 2014, № 25.– С. 128-131.
 25. Спицын, А. Н. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ штаммов возбудителя чумы / А. Н. Спицын, Уткин Д. В., Щербакова Н. Е., Портенко С. А., Абдрашитова А. С., Касьян И. А., Куклев В. Е. //Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 2. – С. 91-94.
 26. Телесманич, Н. Р. Масс-спектрометрический анализ MALDI-TOF в идентификации и типировании штаммов холерных вибрионов/ Н. Р.Телесманич, С. О. Чайка, И. А. Чайка, Е. В. Гончаренко, Ю. М. Ломов. //Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т. 61, № 6. – С. 375-379.
 27. Ткаченко, Г. А., Антонов, В. А., Замараев, В. С., Илюхин, В. И. Идентификация возбудителей сапа и мелиоидоза с помощью полимеразной цепной реакции / Г. А. Ткаченко, В. А. Антонов, В. С. Замараев, В. И. Илюхин // Мол. генет., микробиол. и вирусол. – 2003. – № 3. – С. 18-22.
 28. Устинов, Д.В. Разработка схемы cgMLST-типирования штаммов *Burkholderia pseudomallei*/Д.В. Устинов, А.С. Антонов, Е.Ф. Авдюшева, Н.Н. Тетерятникова, Ю.А. Кузютина, К.В. Васильева, Т.А.Л. Буй, И.Б. Захарова, И.М. Шпак// В книге: Молекулярная диагностика и биобезопасность - 2020. Сборник материалов. Под редакцией: В.Г. Акимкина, М.Г. Твороговой. – 2020. – С. 183.
 29. Фролов, Д. М. Использование реакции латекс-агглютинации в ускоренном определении патогенных буркхольдерий/ Д. М. Фролов, Т. В. Сенина, Т. В. Замарина, Н. П. Храпова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2019. – № 3. – С. 106-110.
 30. Храпова, Н.П. Методические рекомендации по применению средств индикации и идентификации возбудителей мелиоидоза и сапа на основе моноклональных антител в режимах повседневной деятельности и чрезвычайных ситуаций/ Н.П. Храпова, Д.В. Викторов, Е.В. Прохватилова, Т.В. Замарина и др.// Реферативный сборник Методические документы и отчеты по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. – Саратов, 2014. – С. 18-19.
 31. Чухланцев, Д. А. Использование ПЦР для идентификации и межвидового дифференцирования возбудителей сапа и мелиоидоза/ Д. А. Чухланцев, И. В. Маракулин, И. В. Дармов //Проблемы особо опасных инфекций. – 2008. – №3. – С. 63-66.
 32. Шаров, Т. Н. Проблемы идентификации различных штаммов вегетативной формы *Bacillus anthracis* методом MALDI-TOF MS / Т. Н. Шаров, М. П. Червакова, И. А. Баркова, А. М. Барков и др.//Клиническая лабораторная диагностика. – 2017. – Т. 62, № 5. – С. 316-318.
 33. Щит, И. Ю. Сравнительный анализ методов LAMP и ПЦР-РВ для обнаружения возбудителей сапа и мелиоидоза/ И. Ю. Щит, К. Б. Игнатов, С. Ф. Бикетов //Клиническая лабораторная диагностика. – 2018. – Т. 63, №. 6. – С. 378-384

34. Aardema, H. Changing epidemiology of melioidosis? A case of acute pulmonary melioidosis with fatal outcome imported from Brazil/ H. Aardema, Luijnenburg, E. M., Salm, E. F., Bijlmer, H. A., Visser, C. E., Van't Wout, J. W. //Epidemiology Infection. – 2005. – Vol. 133, № 5. – P. 871-875.
35. Abbas, M. Melioidosis: a poorly known tropical disease/ M. Abbas, Emonet S, Schrenzel J, Merlani P, Loutan L, Getaz L.//Revue medicale suisse. – 2011. – Vol. 7, № 294. – P. 1002-5.
36. Allwood, E. M. Strategies for Intracellular Survival of *Burkholderia pseudomallei*/ Allwood, E. M., Devenish, R. J., Prescott, M., Adler, B., Boyce, J. D.// *Frontiers in microbiology*. – 2011. – № 2. – P. 170. doi:10.3389/fmicb.2011.00170
37. Allworth, A. M. Tsunami lung: a necrotising pneumonia in survivors of the Asian tsunami/ A. M. Allworth //The Medical Journal of Australia. – 2005. – Vol. 182, № 7. – P. 364.
38. Almog, Y. A. *Burkholderia pseudomallei* Infection Imported from Eritrea to Israel/ Y. Almog, Y. Yagel, Y. Geffen, P.A. Yagupsky //The American journal of tropical medicine and hygiene.– 2016.– Vol. 95, № 5. – P. 997-998.
39. AlShati, M. H. A 42-year-old farmer from Bangladesh with respiratory failure, septic arthritis, and multiple cavitating consolidations / M. H.AlShati, R. M. Joshi //CHEST Journal. – 2014.– Vol.146,№ 2.– P. e56-e59.
40. Alwarthan, S. M. Melioidosis: Can tropical infections present in nonendemic areas? A case report and review of the literature/ S. M. Alwarthan, A. A Aldajani, I. M. Al Zahrani, H. A. Bukhari //Saudi journal of medicine & medical sciences. – 2018. – Vol. 6, № 2. – P. 108.
41. Amadasi, S. A case of melioidosis probably acquired by inhalation of dusts during a helicopter flight in a healthy traveler returning from Singapore/ S.Amadasi, S. Dal Zoppo, A. Bonomini, A. Bussi, P. Pedroni, G. Balestrieri, F. Castelli //Journal of travel medicine. – 2014. – Vol. 22, № 1. – P. 57-60.
42. Amezyane, T. Mycotic iliac aneurysm associated with *Burkholderia pseudomallei* / T. Amezyane, S. Lecoules, J. P. Algayres //International Journal of Infectious Diseases. – 2010. – Vol. 14. – P. e381-e382.
43. Amornchai, P. Accuracy of *Burkholderia pseudomallei* identification using the API 20NE system and a latex agglutination test / P. Amornchai, W. Chierakul, V. Wuthiekanun, Y. Mahakhunkijcharoen, R. Phetsouvanh, B. J. Currie, S. J. Peacock //Journal of clinical microbiology. – 2007. – Vol. 45, № 11. – P. 3774-3776.
44. Anandan, S. Evaluation of IgM ELISA using a sonicate and a lipopolysaccharide antigen for the serodiagnosis of melioidosis/ S. Anandan, A. Augustine, E. Mathai, M.V. Jesudason // Indian J Med Microbiol. – 2010. – Vol. 28, № 2. – P. 158-61.
45. Anhalt, J. P. Identification of bacteria using mass spectrometry/ J. P. Anhalt, C. Fenselau // Analyt. Chem. –1975. – Vol. 50, № 2. P. – 219-225.
46. Annual Epidemiological Surveillance Report 2017 [Интернет ресурс] // Bureau of Epidemiology, Thailand. – 2017. – P. 131-135 – Режим доступа: <http://203.157.15.110/boeeng/download/AESR-6112-24.pdf>

47. Anuntagool, A. Rapid antigen detection assay for identification of *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei* infection/ A. Anuntagool, P. Intachote, P. Naigowit, S. Sirisinha //Journal of clinical microbiology. – 1996. – Vol. 34, № 4. – P. 975-976.
48. Anuntagool, N. Lipopolysaccharide from nonvirulent Ara+ *Burkholderia pseudomallei* isolates is immunologically indistinguishable from lipopolysaccharide from virulent Ara– clinical isolates/ N. Anuntagool, P. Intachote, V. Wuthiekanun, N. J. White, S. Sirisinha //Clinical and diagnostic laboratory immunology. – 1998. – Vol. 5, № 2. – P. 225-229.
49. Anuntagool, N. Lipopolysaccharide heterogeneity among *Burkholderia pseudomallei* from different geographic and clinical origins / N. Anuntagool, V. Wuthiekanun, N. J. White, B. J. Currie, R. W. Sermswan, S. Wongratanacheewin, S. Sirisinha //The American journal of tropical medicine and hygiene. – 2006. – Vol. 74, № 3. – P. 348-352.
50. Anuntagool, N. Monoclonal antibody-based rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in blood culture fluid from patients with community-acquired septicaemia./ N. Anuntagool, P. Naigowit, V. Petkanchanapong, P. Aramsri et al // Journal Med. Microbiol. – 2000. – Vol. 49. – P. 1075–1078.
51. Appassakij, H. Diagnostic value of the indirect hemagglutination test for melioidosis in an endemic area/ H. Appassakij, K. R. Silpapojakul, R. Wansit, M. Pornpatkul //The American journal of tropical medicine and hygiene. – 1990. – Vol. 42, № 3. – P. 248-253.
52. Aschenbroich, S. A. Melioidosis and glanders modulation of the innate immune system: barriers to current and future vaccine approaches/ S. A. Aschenbroich, E. R. Lafontaine, R. J. Hogan //Expert review of vaccines. – 2016. – Vol. 15, № 9. – P. 1163-1181.
53. Ashdown, L. R. An improved screening technique for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clinical specimens/ L. R. Ashdown //Pathology. – 1979. – Vol. 11, № 2. – P. 293-297.
54. Aunkham, A. Porin involvement in cephalosporin and carbapenem resistance of *Burkholderia pseudomallei*/ A. Aunkham, A. Schulte, M. Winterhalter, W. Suginta //PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 5. – P. e95918.
55. Austin, C. R. A *Burkholderia pseudomallei* colony variant necessary for gastric colonization/ C. R. Austin, A. W. Goodyear, I. L. Bartek, A. Stewart, M. D. Sutherland, E. B. Silva, D. Mittelman //MBio. – 2015. – Vol. 6, № 1. – P. e02462-14.
56. Badran, S. Imported melioidosis in Danish travellers: a diagnostic challenge/ S. Badran, T. I. Pedersen, C. Roed, S. Lunding, N. Birk, H. Vestergaard, J. J. Christensen //Scandinavian journal of infectious diseases. – 2010. – Vol. 42, № 6-7. – P. 445-449.
57. Balder, R. Identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* adhesins for human respiratory epithelial cells/ R. Balder, S. Lipski, J. J. Lazarus, W. Grose // BMC microbiology. – 2010. – Vol. 10, № 1. – P. 250.
58. Baldwin, A. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex/ A. Baldwin, E. Mahenthiralingam, K. M. Thickett, D. Honeybourne, M. C. Maiden, J. R. Govan, C. G. Dowson //Journal of clinical microbiology. – 2005. – Vol. 43, № 9. – P. 4665-4673.

59. Ballard, R. W. Taxonomy of the aerobic pseudomonads: *Pseudomonas cepacia*, *P. marginata*, *P. alliicola* and *P. caryophylli*/ R. W. Ballard, N. J. Palleroni, M. Doudoroff, R. Y. Stanier, M. Mandel //Microbiology. – 1970. – Vol. 60, № 2. – P. 199-214.
60. Banik, A. Characterization of N₂-fixing plant growth promoting endophytic and epiphytic bacterial community of Indian cultivated and wild rice (*Oryza* spp.) genotypes/ A. Banik, S. K. Mukhopadhyaya, T. K. Dangar //Planta. – 2016. – Vol. 243, № 3. – P. 799-812.
61. Barnes, J. L. Adaptive immunity in melioidosis: a possible role for T cells in determining outcome of infection with *Burkholderia pseudomallei*/ J. L. Barnes, J. Warner, W. Melrose, D. Durheim et al.//Clinical immunology. – 2004. – Vol. 113, № 1. – P. 22-28.
62. Bast, A. Caspase-1-dependent and -independent cell death pathways in *Burkholderia pseudomallei* infection of macrophages/ A. Bast, K. Krause, I.H. Schmidt, M. Pudla et al. // PLoS Pathog. – 2014. – Vol.10, № 3. – P. e1003986. doi: 10.1371/journal.ppat.1003986.
63. Benoit, T. J. A review of melioidosis cases in the Americas/ T. J. Benoit, D. D. Blaney, T. J. Doker, J. E. Gee, M. G. Elrod, D. B. Rolim, H. T. Walke //The American journal of tropical medicine and hygiene. – 2015. – Vol. 93, № 6. – P. 1134-1139.
64. Berger, S. Melioidosis and Glanders: Global Status: 2020 edition / S. Berger. – Los Angeles, California, USA: GIDEON Informatics, Inc, 2020. – 88 p.
65. Bevivino, A. Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*/ A. Bevivino, S. Tabacchioni, L. Chiarini, M. V.Carusi, M. Del Gallo, P. Visca //Microbiology. – 1994. – Vol. 140, № 5. – P. 1069-1077.
66. Boddey, J. A. Temperature-Regulated Microcolony Formation by *Burkholderia pseudomallei* Requires *pilA* and Enhances Association with Cultured Human Cells/ J. A. Boddey, C. P. Flegg, C. J. Day, I. R. Beacham, I. R. Peak //Infection and Immunity. – 2006. – Vol. 74, № 9. – P. 5374–5381.
67. Bodilsen, J. Mycotic aneurysm caused by *Burkholderia pseudomallei* in a previously healthy returning traveler/ J. Bodilsen, S. Vammen, K. Fursted, U. Hjort //BMJ case reports. – 2014. – Vol. 2014. – P. bcr2013202824.
68. Borgherini, G. Melioidosis: an imported case from Madagascar/ G. Borgherini, P. Poubeau, F. Paganin, S. Picot, A. Michault, F. Thibault, C. A. Berod //Journal of travel medicine. – 2006. – Vol. 13, № 5. – P. 318-320.
69. Bory, S. A. Report from the Cambodia Training Event for Awareness of Melioidosis (C-TEAM), October 2017. – 2018 / S. Bory, F. Daily, G. Khim, J. Letchford et al. // Tropical medicine and infectious disease. – 2018. – Vol.3, № 3. – P. 23. doi:10.3390/tropicalmed3010023
70. Boun, K. T. Imported melioidosis in France revealed by a cracking abdominal mycotic aortic aneurysm in a 61-year-old man / K. T. Boun, F. Biron, C.Chidiac, T. Ferry //BMJ case reports. – 2012. – Vol. 2012. – P. bcr2012006839. doi:10.1136/bcr-2012-006839
71. Bowers, J. H. Epidemiology of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of peas after seed treatment with bacterial agents for biological control/ J. H. Bowers, J. L. Parke //Phytopathology. – 1993. – Vol. 83, № 12. – P. 1466-1473.

72. Brent, A. J. Misdiagnosing melioidosis / A. J. Brent, P. C. Matthews, D. A. Dance, T. L. Pitt, R. Handy //Emerging infectious diseases. – 2007. – VOL. 13, № 2. – P. 349.
73. Brett, P. J. *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species / P. J. Brett, D. DeShazer, D. E. Woods //International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1998. – Vol. 48, № 1. – P. 317-320.
74. Brosh-Nissimov, T. Case Report: Imported Melioidosis from Goa, India to Israel, 2018/ T. Brosh-Nissimov, D. Grupel, S. Abuhasira, H. Leskes, S. Lazar et. al.//The American journal of tropical medicine and hygiene. – 2019. – Vol. 101, № 3. – P. 580-584.
75. Brundage, W.G. Four fatal cases of melioidosis in US soldiers in Vietnam./ W.G. Brundage, C.J.J. Thuss, D.C. Walden.// Am. J. Trop. Med. Hyg. – 1968. – Vol. 17. – P. 183–191.
76. Buddhisa S. Programmed death ligand 1 on *Burkholderia pseudomallei*-infected human polymorphonuclear neutrophils impairs T cell functions/ S. Buddhisa, D. Rinchai, M. Ato, G. J. Bancroft, G. Lertmemongkolchai //The Journal of Immunology. – 2015. – P. 1402417.
77. Bugrysheva, J. V. Antibiotic Resistance Markers in *Burkholderia pseudomallei* Strain Bp1651 Identified by Genome Sequence Analysis/ J. V. Bugrysheva, D. Sue, J. E. Gee, M. G. Elrod, A. R. Hoffmaster, L. B. Randall, L. M. Weigel //Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2017. – Vol. 61, № 6. – P. e00010-17.
78. Bugrysheva, J. V. Finished annotated genome sequence of *Burkholderia pseudomallei* strain Bp1651, a multidrug-resistant clinical isolate/ J. V. Bugrysheva, D. Sue, J. Hakovirta, V. N. Loparev, K. Knipe, S. A. Sammons, R. L. Tatusov//Genome announcements. – 2015.– Vol.3, № 6. – P. e01427-15.
79. Bulgari, D. Endophytic bacterial diversity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves described by 16S rRNA gene sequence analysis and length heterogeneity-PCR/ D. Bulgari, P. Casati, L. Brussetti, F. Quaglino, M. Brasca, D. Daffonchio, P. A. Bianco //The Journal of Microbiology. – 2009. – Vol. 47, № 4. – P. 393-401.
80. Burkholder, W. H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs/ W. H. Burkholder //Phytopathology. – 1950. – Vol. 40, № 1. – P. 468-75.
81. Burtnick, M. N. *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* cluster 1 type VI secretion system gene expression is negatively regulated by iron and Zinc/ M. N. Burtnick, P. J. Brett // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8, № 10. – doi: 10.1371/journal.pone.0076767.e76767
82. Bush, K. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure/ K. Bush, G. A. Jacoby, A. A. Medeiros //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1995. – Vol. 39, № 6. – P. 1211.
83. Cahn, A. Imported melioidosis, Israel, 2008/ A. Cahn, B. Koslowsky, R. Nir-Paz, V. Temper, N. Hiller, A. Karlinsky, C. Block //Emerging infectious diseases. – 2009. – Vol. 15, № 11. – P. 1809.
84. Carbonnelle, E. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory/ E. Carbonnelle, C. Mesquita, E. Bille, N. Day, B. Dauphin, J. L. Beretti, X. Nassif //Clinical biochemistry. – 2011. – Vol. 44, № 1. – P. 104-109.

85. Carrell, A. A. Bacterial endophyte communities in the foliage of coast redwood and giant sequoia/ A. A. Carrell, A. C. Frank //Frontiers in microbiology. – 2015. – Vol. 6. – P. 1008.
86. Casadevall, A. Accidental virulence, cryptic pathogenesis, martians, lost hosts, and the pathogenicity of environmental microbes/ A. Casadevall, L. Pirofski //Eukaryotic cell. – 2007. – Vol. 6, № 12. – P. 2169-2174.
87. Chagla, Z. Melioidosis in a returned traveler/ Z. Chagla, N. Aleksova, J. Quirt, J. Emery, C. Kraeker, S. Haider //Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology. – 2014. – Vol. 25, № 4. – P. 225-226.
88. Chaichana, P. Antibodies in Melioidosis: The Role of the Indirect Hemagglutination Assay in Evaluating Patients and Exposed Populations/ P. Chaichana, K. Jenjaroen, P. Amornchai, S. Chumseng et al. // Am J Trop Med Hyg. – 2018. – Vol. 99, №6. – P.1378-1385.
89. Chain, P. S. *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility/ P.S. Chain, V.J. Denef, K.T. Konstantinidis, L. M. Vergez, L. Agulló, V. L.Reyes, M.Land //Proceedings of the National Academy of Sciences.–2006.– Vol.103, №42.– P.15280-15287.
90. Challacombe, J. F. Interrogation of the *Burkholderia pseudomallei* genome to address differential virulence among isolates/ J. F. Challacombe, C. J. Stubben, C. P. Klimko, S. L., Welkos et al. //PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 12. – P. e115951.
91. Chambon, L. Isolement du bacille deWhitmore à partir du milieu extérieur./ L. Chambon// Ann. Inst. Pasteur. – 1955, № 89. – P. 229–235.
92. Chan, Y. Y. BpeAB-OprB, a multidrug efflux pump in *Burkholderia pseudomallei*/ Y. Y. Chan, T. M. C. Tan, Y. M. Ong, K. L Chua //Antimicrobial agents and chemotherapy.–2004.– Vol.48,№ 4.– P.1128-1135.
93. Chang, K. Human infection with *Burkholderia thailandensis*, China, 2013/ K. Chang, J. Luo, H. Xu, M. Li, F. Zhang, J. Li, W. Lu //Emerging infectious diseases. – 2017. – Vol. 23, № 8. – P. 1416-1418.
94. Chantratita, N. Antimicrobial resistance to ceftazidime involving loss of penicillin-binding protein 3 in *Burkholderia pseudomallei* / N. Chantratita, D. A. Rhol, B. Sim, V. Wuthiekanun, D. Limmathurotsakul, P. Amornchai, N. P. Day //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2011. – Vol. 108, № 41. – P. 17165-17170.
95. Chantratita, N. Biological relevance of colony morphology and phenotypic switching by *Burkholderia pseudomallei*/ N. Chantratita, V. Wuthiekanun, K. Boonbumrung, R. Tiyawisutrisi, M. Vesaratchavest, D. Limmathurotsakul, N. P. Day //Journal of bacteriology. – 2007. – Vol. 189, № 3. – P. 807-817.
96. Chantratita, N. Loop-mediated isothermal amplification method targeting the TTS1 gene cluster for detection of *Burkholderia pseudomallei* and diagnosis of melioidosis/ N. Chantratita, E. Meumann, A. Thanwisai, D. Limmathurotsakul et al.//Journal of clinical microbiology. – 2008. – T. 46. – №. 2. – C. 568-573.
97. Chantratita, N. Rapid detection of *Burkholderia pseudomallei* in blood cultures using a monoclonal antibody-based immunofluorescent assay/ N. Chantratita, S. Tandhavanant, G. Wongsuvan,

- V. Wuthiekanun, N. Teerawattanasook, N. P. Day, S. J. Peacock //The American journal of tropical medicine and hygiene. – 2013. – Vol. 89, № 5. – P. 971-972.
98. Chaowagul, W. Update on clinical aspects of melioidosis. /W. Chaowagul //In: Abstracts of the 5th World Melioidosis Congress (21-23 november 2007), Thailand. – 2007. - P.52.
 99. Chapple, S. N. Whole-genome sequencing of a quarter-century melioidosis outbreak in temperate Australia uncovers a region of low-prevalence endemicity/ S. N. Chapple, D. S. Sarovich, M. T. Holden, S. J. Peacock et al. //Microbial Genomics. – 2016. – Vol. 2, № 7. – P. e000067.
 100. Chen, Y. S. Effects of soil pH, temperature and water content on the growth of *Burkholderia pseudomallei* / Y. S. Chen, S. C. Chen, C. M. Kao, Y. L. Chen //Folia microbiologica. – 2003. – Vol. 48, № 2. – P. 253.
 101. Cheng, A. C. Extreme weather events and environmental contamination are associated with case-clusters of melioidosis in the Northern Territory of Australia/ A. C. Cheng, S. P. Jacups, D. Gal, M. Mayo, B. J. Currie //International journal of epidemiology. – 2005. – Vol. 35, № 2. – P. 323-329.
 102. Cheng, A. C. Indirect hemagglutination assay in patients with melioidosis in northern Australia/ A. C. Cheng, M. A. O'Brien, K. Freeman, G. Lum, B. J. Currie //The American journal of tropical medicine and hygiene. – 2006a. – Vol. 74, № 2. – P. 330-334.
 103. Cheng, A. C. Intensity of exposure and incidence of melioidosis in Thai children/ Cheng A. C. Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Chierakul W, Peacock SJ //Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 2008. – Vol. 102, № Supplement 1. – P. S37-S39.
 104. Cheng, A. C. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management / A. C. Cheng, B. J. Currie //Clinical microbiology reviews. – 2005. – Vol. 18, № 2. – P. 383-416.
 105. Cheng, A. C. Outcomes of patients with melioidosis treated with meropenem/ A. C. Cheng, D. A. Fisher, N. M. Anstey, D. P. Stephens, S. P. Jacups, B. J. Currie //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2004. – Vol. 48, № 5. – P. 1763-1765.
 106. Cheng, A. C. Prospective evaluation of a rapid immunochromogenic cassette test for the diagnosis of melioidosis in northeast Thailand/ A. C. Cheng, S. J. Peacock, D. Limmathurotsakul, G. Wongsuvan, W. Chierakul, P. Amornchai, V. Wuthiekanun //Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 2006b. – Vol. 100, № 1. – P. 64-67.
 107. Cheng, J. W. *Burkholderia pseudomallei* infection in US traveler returning from Mexico, 2014/ J.W. Cheng, M.K. Hayden, K. Singh, I. Heimler, J.E. Gee, L. Proia, B.E. Sha //Emerging infectious diseases. – 2015. – Vol. 21, № 10. – P. 1884.
 108. Chetchotisakd, P. Trimethoprim-sulfamethoxazole versus trimethoprim-sulfamethoxazole plus doxycycline as oral eradication treatment for melioidosis (MERTH): a multicentre, double-blind, non-inferiority, randomised controlled trial/ P. Chetchotisakd, W. Chierakul, W. Chaowagul, S. Anunnatsiri, K. Phimda, P. Mootsikapun, W. Susaengrat //The Lancet. – 2014. – Vol. 383, № 9919. – P. 807-814.
 109. Cheung, T. K. M. Cloning and expression of class A β -lactamase gene blaABPS in *Burkholderia pseudomallei*/ T. K. Cheung, Ho, P. L., P. C. Woo, K. Y. Yuen, P. Y. Chau //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2002. – Vol. 46, № 4. – P. 1132-1135.

110. Chewapreecha, C. Global and regional dissemination and evolution of *Burkholderia pseudomallei*/ C. Chewapreecha, M. T. Holden, M. Vehkala, N. Välimäki, Z. Yang, S. R. Harris, C. Bizet // *Nature microbiology*. – 2017. – Vol. 2, № 4. – P. 16263.
111. Chewapreecha, C. Genetic variation associated with infection and the environment in the accidental pathogen *Burkholderia pseudomallei*/ C. Chewapreecha, A. E. Mather, S. R. Harris, M. Hunt, M. T. Holden et al.// *Communications biology*. – 2019. – Vol. 2, № 1. – P. 1-11.
112. Chowdhury, F. Melioidosis in Bangladesh: A Clinical and Epidemiological Analysis of Culture-Confirmed Cases./ F. Chowdhury,; M. Jilani,; L. Barai,; T. Rahman et al.// *Trop. Med. Infect. Dis.* – 2018. – Vol. 3, № 2. – P. 40.
113. Choy, J. L. Animal melioidosis in Australia / J. L. Choy, Mayo, M., A. Janmaat, B. J. Currie // *Acta tropica*. – 2000. – Vol.. 74, № 2-3. – P. 153-158.
114. Christini, A. Neck mass in a returning traveler/ A. Christini, E. King // *Jama*. – 2012. – Vol. 308, № 20. – P. 2142-2143.
115. Chua, K. L. Flagella are virulence determinants of *Burkholderia pseudomallei*/ Chua K. L., Chan Y. Y., Gan Y. H. // *Infection and immunity*. – 2003. – Vol. 71, № 4. – P. 1622-1629.
116. Chuah, S. C. Rapid serological diagnosis of melioidosis: an evaluation of a prototype immunochromatographic test / S. C. Chuah, G. Gilmore, R. E. Norton // *Pathology*. – 2005. – Vol. 37, № 2. – P. 169-171.
117. Chusri, S. Outcomes of patients with melioidosis treated with cotrimoxazole alone for eradication therapy. / S. Chusri, T. Hortiwakul, B. Charoenmak, K. Silpapojakul // *Am J Trop Med Hyg*. – 2012. – Vol. 87, № 927 – P. 932.
118. Ciervo, A. Melioidosis in an Italian tourist injured by the tsunami in Thailand/ A. Ciervo, R. Mattei, A. Cassone // *Journal of chemotherapy*. – 2006. – Vol. 18, № 4. – P. 443-444.
119. Clarke, K. Non-Parametric Multivariate Analyses of Changes in Community Structure / K. Clarke// *Australian Journal of Ecology*. – 1993. – Vol.18 . – P. 117-143.
120. Coenye, T. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates / T. Coenye, E. Mahenthiralingam, D. Henry, J. J. LiPuma, S. Laevens, M. Gillis, P. Vandamme // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2001. – Vol. 51, № 4. – P. 1481-1490.
121. Coenye, T. *Burkholderia cepacia* genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients/ T. Coenye, J. J. LiPuma, D. Henry, B. Hoste, K. Vandemeulebroecke// *Int J Syst Evol Microbiol*. - 2001c. – Vol. 51. – P.271-279.
122. Coenye, T. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches / T. Coenye, P. Vandamme // *Environ Microbiol*. – 2003. – Vol. 5. – P.719-729.
123. Coenye, T. Genotypic and chemotaxonomic evidence for the reclassification of *Pseudomonas woodsii* (Smith 1911) Stevens 1925 as *Burkholderia andropogonis* (Smith 1911) Gillis et al. 1995/ T. Coenye, S. Laevens, M. Gillis, P. Vandamme// *Int J Syst Evol Microbiol*.-2001a.–Vol. 51.– P.183-185.

124. Coenye, T. Identification of *Pandoraea* species by 16S ribosomal DNA-based PCR assays/ T. Coenye, L. Liu, P. Vandamme, J. J. LiPuma // J Clin Microbiol. - 2001d. – Vol. 39. – P.4452-4455.
125. Coenye, T. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex/ T. Coenye, P. Vandamme, J. R. Govan, J. J. LiPuma // J Clin Microbiol. - 2001f. – Vol. 39. – P.3427-3436.
126. Compant, S. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment / S. Compant, J. Nowak, T. Coenye, C. Clément, E. Ait Barka //FEMS microbiology reviews. – 2008. – Vol. 32, № 4. – P. 607-626.
127. Compant, S. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN/ S. Compant, B. Reiter, A. Sessitsch, J. Nowak, C. Clément, E. A. Barka //Applied and Environmental Microbiology. – 2005. – Vol. 71, № 4. – P. 1685-1693.
128. Conrad, A. Multifocal melioidosis with femoral osteomyelitis in a healthy 25-year-old traveler/ A. Conrad, F. Valour, T. Ferry, F. Ader //BMJ case reports. – 2016. – Vol. 2016. – P. bcr2016216356.
129. Corea, E. Melioidosis in Sri Lanka./ E. Corea, A. De Silva, V. Thevanesam // Trop. Med. Infect. Dis. 2018– Vol. 3, №1 – P. 22
130. Corral, D. M. *Burkholderia pseudomallei* infection in a cystic fibrosis patient from the Caribbean: a case report / D.M. Corral, A.L. Coates, Y.C., Yau, R. Tellier, M. Glass, S.M. Jones, V.J. Waters // Can Respir J. – 2008. – Vol. 15, № 5. – P. 237-9.
131. Cruz-Migoni, A. A *Burkholderia pseudomallei* toxin inhibits helicase activity of translation factor eIF4A/ Cruz-Migoni, A., Hautbergue, G. M., Artymiuk, P. J., Baker, P. J. et al. //Science. – 2011. – Vol. 334, № 6057. – P. 821-824.
132. Cuadros, J. Melioidosis imported from West Africa to Europe / J. Cuadros, H. Gil, J. De Miguel, G. Marabé, T. A. P. Gómez-Herruz, B. Lobo, P. Anda, //The American journal of tropical medicine and hygiene. – 2011. – Vol. 85, № 2. – P. 282-284.
133. Cuccui, J. Characterization of the *Burkholderia pseudomallei* K96243 capsular polysaccharide I coding region/ J. Cuccui, T. S. Milne, N. Harmer et al.// Infect Immun. – 2012. – Vol. 80, № 3. – P. 1209–1221.
134. Cummings, J. E. Transient In Vivo Resistance Mechanisms of *Burkholderia pseudomallei* to Ceftazidime and Molecular Markers for Monitoring Treatment Response/ J. E. Cummings, R. A. Slayden //PLoS neglected tropical diseases. – 2017. – Vol. 11, № 1. – P. e0005209.
135. Currie, B. J. Laboratory exposure to *Burkholderia pseudomallei* – Los Angeles, California, 2003. / B. J. Currie, T. J. J. Inglis, A. M. Vannier, S. M. Novak-Weekley, J. Ruskin, L. Mascola, E. Bancroft, L. Borenstein, S. Harvey, N. Rosenstein, T. A. Clark, and D. M. Nguyen.//MMWR. Morbidity and mortality weekly report. – 2004. – Vol. 53, № 42. – P. 988-990.
136. Currie, B. J. Melioidosis: evolving concepts in epidemiology, pathogenesis, and treatment / B. J. Currie, //Seminars in respiratory and critical care medicine. – Thieme Medical Publishers, 2015. – Vol. 36, № 01. – P. 111-125.

137. Currie, B. J. The epidemiology and clinical spectrum of melioidosis: 540 cases from the 20 year Darwin prospective study/ B. J. Currie, L. Ward, A. C. Cheng //PLoS neglected tropical diseases. – 2010. – Vol. 4, № 11. – P. e900.
138. Cuzzubbo, A.J. Evaluation of a new commercially available immunoglobulin M and immunoglobulin G immunochromatographic test for diagnosis of melioidosis infection/ A.J. Cuzzubbo, V. Chenthamarakshan, J. Vadivelu, S.D. Puthuchery// J Clin Microbiol. – 2000. – Vol. 38, № 4. – P. 1670-1671.
139. D’Cruze, T. Role for the *Burkholderia pseudomallei* type three secretion system cluster 1 bpscN gene in virulence. Infect. Immun . – 2011. – Vol. 79 . – P. 3659–3664.
140. Dalmastrì C. Investigating *Burkholderia cepacia* complex populations recovered from Italian maize rhizosphere by multilocus sequence typing/ C. Dalmastrì, A. Baldwin, S. Tabacchioni, A. Bevivino, E. Mahenthiralingam, L. Chiarini, C. Dowson //Environmental microbiology. – 2007. – Vol. 9, № 7. – P. 1632-1639.
141. Dan, M. Melioidosis in travelers: review of the literature. J Travel Med. –2015. – Vol.22, № 6 – P.410–4.
142. Dan, M. Melioidosis of the Skin in an Israeli Traveler Returning from Thailand / Dan M., Taran D. //The Israel Medical Association journal: IMAJ. – 2015. – Vol. 17, № 11. – P. 724.
143. Dance, D. A. Development of resistance to ceftazidime and co-amoxiclav in *Pseudomonas pseudomallei* / D. A. Dance, V. Wuthiekanun, W. Chaowagul, Y. Suputtamongkol, N. J. White //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 1991. – Vol. 28, № 2. – P. 321-324.
144. Dance, D. A. Ecology of *Burkholderia pseudomallei* and the interactions between environmental *Burkholderia* spp. and human–animal hosts/ D. A. Dance //Acta tropica. – 2000. – VOL. 74, № 2-3. – P. 159-168.
145. Dance, D. A. Imported melioidosis in England and Wales/ D. A. Dance, M. D. Smith, H. M. Aucken, T. L. Pitt //The Lancet. – 1999. – Vol. 353, № 9148. – P. 208.
146. Dance, D. A. Melioidosis as an emerging global problem/ D. A. Dance //Acta tropica. – 2000. – Vol. 74, № 2. – P. 115-119.
147. Dance, D. Global Burden and Challenges of Melioidosis/ D. Dance, D. Limmathurotsakul // Trop. Med. Infect. Dis. – 2018 – Vol. 3, №1 – P.13
148. Dance, D. Melioidosis in the Lao People’s Democratic Republic/ D. Dance, Luangraj, M.; Rattanavong, S.; Sithivong, N. //Trop. Med. Infect. Dis. – 2018 – Vol. 3, №1 – P. 21.
149. Dantas, G. Bacteria subsisting on antibiotics/ G. Dantas, M. O. Sommer, R. D. Oluwasegun, G. M. Church//Science.– 2008. – Vol. 320, № 5872. – P. 100-103.
150. De Buck, E. Differential 2-D protein gel electrophoresis analysis of *Legionella pneumophila* wild type and Tat secretion mutants / E. De Buck, D. Höper, E. Lammertyn, M. Hecker, J. Anné //International Journal of Medical Microbiology. – 2008. – Vol. 298, № 5-6. – P. 449-461.
151. De Moor, C.E. Melioidosis op Java./ Mesnard, J.; Joyeux, B.G.// Mededeeling uit het Geneeskundig Laboratorium te Weltevreden. – 1932. – № 72. – P. 1618–1635.
152. De Smet, B. *Burkholderia stagnalis* sp. nov. and *Burkholderia territorii* sp. nov., two novel *Burkholderia cepacia* complex species from environmental and human sources/ B. De Smet, M.

- Mayo, C. Peeters, J. E. Zlosnik, T. Spilker, T. J. Hird, D. M. Wagner //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2015. – Vol. 65, № 7. – P. 2265-2271.
153. Deepak, R. N. *Burkholderia pseudomallei* identification: a comparison between the API 20NE and VITEK2 GN systems/ R. N. Deepak, B. Crawley, E. Phang // Trans. R.Soc.Trop. Med. Hyg. – 2008. – Vol. 102, № Supplement 1. – P. S42-S44.
154. Demar, M. Suppurative Epididymo-orchitis and Chronic Prostatitis Caused by *Burkholderia pseudomallei*: A Case Report and Review/ M. Demar, A. Ferroni, B. Dupont, M. Eliaszewicz, B. Patrice //Journal of travel medicine. – 2005. – Vol. 12, № 2. – P. 108-112.
155. Deng, W. Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems/ W. Deng, N. C. Marshall, J. L. Rowland, J. M. McCoy et al. //Nature Reviews Microbiology. – 2017. – Vol. 15, № 6. – P. 323.
156. Denny, C. R. Melioidosis in a European./ C. R. Denny, L. Nicholls //Ceylon Journal of Science. – 1927, № 2. – P. 27-40.
157. DeShazer, D. Identification of a *Burkholderia mallei* polysaccharide gene cluster by subtractive hybridization and demonstration that the encoded capsule is an essential virulence determinant / D. DeShazer, D. M. Waag, D. L. Fritz, D. E. Woods // Microb Pathog. – 2001. – Vol. 30. – P.253-269.
158. DeShazer, D. Virulence of clinical and environmental isolates of *Burkholderia oklahomensis* and *Burkholderia thailandensis* in hamsters and mice / D. DeShazer //FEMS microbiology letters. – 2007. – Vol. 277, № 1. – P. 64-69.
159. Despeyroux, D. Electrospray mass spectrometry for detection and characterization of purified cricket paralysis virus (CrPV) / D. Despeyroux, R. Phillipotts, P. Watts //Rapid communications in mass spectrometry. – 1996. – Vol.10, № 8. – P. 937-941.
160. Dobritsa, A. P. Transfer of eleven species of the genus *Burkholderia* to the genus *ParaBurkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov. to accommodate twelve species of the genera *Burkholderia* and *ParaBurkholderia* / A. P. Dobritsa, M. Samadpour //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2016. – Vol. 66, № 8. – P. 2836-2846.
161. Dodin, A. Naissance, vie et recul d'une maladie infectieuse, la mélioirose en pays tempéré / A. Dodin, M. Galimand //Arch. Inst. Pasteur Tunis. – 1986. – Vol. 63. – P. 69-73.
162. Doker, T. J. Contact investigation of melioidosis cases reveals regional endemicity in Puerto Rico / T. J. Doker, T. M. Sharp, B. Rivera-Garcia, J. Perez-Padilla, T. J. Benoit, E. M. Ellis, K. R. Ryff //Clinical Infectious Diseases. – 2014. – Vol. 60, № 2. – P. 243-250.
163. Doker, T. J. Fatal *Burkholderia pseudomallei* infection initially reported as a *Bacillus* species, Ohio, 2013 / T. J. Doker, C. L. Quinn, E. D. Salehi, J. J. Sherwood, T. J. Benoit, M. G. Elrod, H. T. Walke //The American journal of tropical medicine and hygiene. – 2014. – Vol. 91, № 4. – P. 743-746.
164. Donahue, M. A. CNS Melioidosis in a Traveler Returning from Cabo, Mexico/M.A. Donahue, G. Newcomb, S. Spinella, P. Prasad, J. Liesveld et. al. //Open forum infectious diseases. – 2019. – Vol. 6, № 2. – P. ofz005.

165. Douglas, M. W. Epidemiology of community-acquired and nosocomial bloodstream infections in tropical Australia: a 12-month prospective study / M. W. Douglas, G. Lum, J. Roy, D. A. Fisher, N. M. Anstey, B. J. Currie // *Tropical Medicine & International Health*. – 2004. – Vol. 9, № 7. – P. 795-804.
166. Duangurai, T. *Burkholderia pseudomallei* Adaptation for Survival in Stressful Conditions/ T. Duangurai, N. Indrawattana, P. Pumirat // *BioMed research international*. – 2018. – Vol. 2018. – Article ID3039106. <https://doi.org/10.1155/2018/3039106>
167. Duong, L. T. GvmR—A Novel LysR-Type transcriptional regulator involved in virulence and primary and secondary metabolism of *Burkholderia pseudomallei* / L. T. Duong, S. Schwarz, H. Gross, K. Breitbach et al. // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 935 doi: 10.3389/fmicb.2018.00935
168. Duplessis, C. Melioidosis Masquerading as Community-Acquired Pneumonia: A Case Report Demonstrating Efficacy of Intrapleural Fibrinolytic Therapy/ C. Duplessis, J. D. Maguire // *Journal of travel medicine*. – 2009. – Vol. 16, № 1. – P. 74-77.
169. Dvorak, G. D. Glanders. / G. D. Dvorak, A. R. Spickler // *Journal of the American Veterinary Medical Association*. – 2008. – Vol. 233, № 4. – P. 570-577.
170. Eberl, L. Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys/L. Eberl, P. Vandamme // *F1000Research*. – 2016. – V.5 doi:10.12688/f1000research.8221.1
171. Ebbers, M. 56-Year-Old Female Traveller with a Cervical Mass Lesion/ M. Ebbers, C. Fritzsche, M. Löbermann, E. C. Reisinger // *Deutsche medizinische Wochenschrift*. – 2019. – Vol.144, № 4. – P. 237.
172. Edler, C. Comparison of mast *Burkholderia cepacia*, Ashdown+ gentamicin, and *Burkholderia pseudomallei* selective agar for the selective growth of *Burkholderia* spp / C. Edler, H. Derschum, M. Köhler, H. Neubauer, H. Frickmann, R. M. Hagen // *European Journal of Microbiology and Immunology*. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 15-36.
173. Elschner, M. C. Isolation of the highly pathogenic and zoonotic agent *Burkholderia pseudomallei* from a pet green Iguana in Prague, Czech Republic/ M. C. Elschner, J. Hnizdo, I. Stamm, H. El-Adawy, K. Mertens, F. Melzer // *BMC veterinary research*. – 2014. – Vol. 10, № 1. – P. 283.
174. Engelthaler, D. M. Molecular investigations of a locally acquired case of melioidosis in Southern AZ, USA/ D. M. Engelthaler, J. Bowers, J. A. Schupp, T. Pearson, J. Ginther, H. M. Hornstra, C. Levy // *PLoS neglected tropical diseases*. – 2011. – Vol. 5, № 10. – P. e1347.
175. Estrada-De Los Santos, P. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution/ P. Estrada-De Los Santos, R. Bustillos-Cristales, J. Caballero-Mellado // *Applied and environmental microbiology*. – 2001. – Vol. 67, № 6. – P. 2790-2798.
176. Estrada-de los Santos, P. Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis/ P. Estrada-De Los Santos, P. Vinuesa, L. Martínez-Aguilar, A. M. Hirsch, J. Caballero-Mellado // *Current microbiology*. – 2013. – Vol. 67, № 1. – P. 51-60.

177. Estrada-De Los Santos, P. To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia* / P. Estrada-De Los Santos, F. U. Rojas-Rojas, E. Y. Tapia-García, M. S. Vásquez-Murrieta, A. M. Hirsch // *Annals of microbiology*. – 2016. – Vol. 66, № 3. – P. 1303-1314.
178. Ezzedine, K. Imported cutaneous melioidosis in traveler, Belgium / K. Ezzedine, M. Heenen, D. Malvy // *Emerging infectious diseases*. – 2007. – Vol. 13, № 6. – P. 946.
179. Fernandes, R. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance/ R. Fernandes, P. Amador, C. Prudêncio // *Reviews in Medical Microbiology*. – 2013. – Vol. 24, № 1. – P. 7-17.
180. Folsom, B. R. Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: kinetics and interactions between substrates/ B. R. Folsom, P. J. Chapman, P. H. Pritchard // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1990. – Vol. 56, № 5. – P. 1279-1285.
181. Fournier, J. A zoonosis gaining ground: Melioidosis/ J. Fournier // *Med. d’Egypte*. – 1960. – Vol. 9 – P. 23–54.
182. Fournier, J. La mélioiïdose et le b. de Whitmore. Controverses épidémiologiques et taxonomiques/ J. Fournier // *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales*. – 1965. – Vol. 58 – P. 753–765.
183. Francisco, A.P. Bugalho M, Ramirez M, Carriço JA. Global optimal eBURST analysis of multi-locus typing data using a graphic matroid approach/ A.P. Francisco, M. Bugalho, M. Ramirez, J.A.Carriço // *BMC Bioinformatics*. – 2009. – Vol. 10 – P. 152. doi:10.1186/1471-2105-10-152
184. Frangoulidis, D. ‘Imported’ melioidosis in Germany: relapse after 10 years/ D. Frangoulidis, D. Schwab, H. Scholz, H. Tomaso, M. Hogardt, H. Meyer, F. K. Pohle // *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. – 2008. – Vol. 102, № Supplement_1. – P. S40-S41.
185. Galyov, E. E. Molecular insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* pathogenesis / E. E. Galyov, P. J. Brett, D. DeShazer // *Annu Rev Microbiol*. – 2010, № 64. – P. 495–517.
186. Garas, G. e Melioidosis and the vacuum-assisted closure device: a rare cause of a discharging neck wound, and a new approach to management/ G. Garas, S. Ifeacho, R. Millard, N. Tolley // *The Journal of laryngology and otology*. – 2010. – Vol. 124, № 9. – P. 1021.
187. Garin, B. Autochthonous melioidosis in humans, Madagascar, 2012 and 2013/ B. Garin, I. Djamazala, N. Dubois-Cauwelaert // *Emerging infectious diseases*. – 2014. – Vol. 20, № 10. – P. 1739-41.
188. Gauthier, J. Melioidosis in travelers returning from Vietnam to France/ J. Gauthier, P. G r me, M. Defez, F. Neulat-Ripoll, B. Foucher, T. Vitry, F. V. Biot // *Emerging infectious diseases*. – 2016. – Vol. 22, № 9. – P. 1671-73.
189. Gee, J. E. *Burkholderia thailandensis* isolated from infected wound, Arkansas, USA/ J. E. Gee, M. G. Elrod, C. A. Gulvik, D. T. Haselow et al. // *Emerging infectious diseases*. – 2018. – Vol. 24, № 11. – P. 2091.
190. Gee, J. E. Recovery of a *Burkholderia thailandensis*-like isolate from an Australian water source / J. E. Gee, M. B. Glass, R. T. Novak, D. Gal, M. J. Mayo, A. G. Steigerwalt, B. J. Currie // *BMC microbiology*. – 2008. – Vol. 8, № 1. – P. 54.

191. Getaz, L. Fatal acute melioidosis in a tourist returning from Martinique Island, November 2010/ L. Getaz, M. Abbas, L. Loutan, J. Schrenzel, A. Iten, F. Simon, P. Merlani //Euro Surveill. – 2011. – Vol. 16, № 1. P.19758.
192. Gilad, J. *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* as bioterrorism agents: national aspects of emergency preparedness / J. Gilad, I. Harary, T. Dushnitsky, D. Schwartz et al.// IMAJ-RAMAT GAN. – 2007.– № 9. – P. 499-503.
193. Gilbert, D. N. Potential medical problems in personnel returning from Vietnam / D. N. Gilbert, W. L. Moore, C. L. Hedberg, J. P. Sanford // *Annals of internal medicine*. – 1968. – Vol. 68, № 3. – P. 662-678.
194. Glass, M. B. *Burkholderia oklahomensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species formerly known as the Oklahoma strain of *Pseudomonas pseudomallei* / M. B. Glass, A. G. Steigerwalt, J. G. Jordan, P. P. Wilkins, J. E. Gee //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2006. – Vol. 56, № 9. – P. 2171-2176.
195. Glass, M. B. Comparison of four selective media for the isolation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*/ M. B. Glass, C. A. Beesley, P. P. Wilkins, A. R. Hoffmaster //The American journal of tropical medicine and hygiene. – 2009. – Vol. 80, № 6. – P. 1023-1028.
196. Glass, M. B. Preliminary evaluation of the API 20NE and RapID NF plus systems for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*/ M. B. Glass, T. Popovic //Journal of clinical microbiology. – 2005. – Vol. 43, № 1. – P. 479-483.
197. Glass, M.B. Pneumonia and septicemia caused by *Burkholderia thailandensis* in the United States./ M.B. Glass, J.E. Gee, A.G. Steigerwalt, D. Cavuoti et al.// J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44. – P. 4601-04.
198. Godfrey, A. J. *Pseudomonas pseudomallei* resistance to beta-lactam antibiotics due to alterations in the chromosomally encoded beta-lactamase / A. J. Godfrey, S. Wong, D. A. Dance, W. Chaowagul, L. E. Bryan //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1991. – Vol. 35, № 8. – P. 1635-1640.
199. Godoy, D. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* / D. Godoy, G. Randle, A. J. Simpson, D. M. Aanensen, T. L. Pitt, R. Kinoshita, B. G. Spratt //Journal of clinical microbiology. – 2003. – Vol. 41, № 5. – P. 2068-2079.
200. Göhler, A. Multitarget quantitative PCR improves detection and predicts cultivability of the pathogen *Burkholderia pseudomallei* / A. Göhler, T. T. Trung, V. Hopf, C. Kohler, J. Hartleib, V. Wuthiekanun, I. Steinmetz //Applied and environmental microbiology. – 2017. – Vol. 83, № 8. – P. e03212-16.
201. Gudmundsdottir, T. Melioidosis, first four cases in Iceland T./ Gudmundsdottir, H. Asgeirsson, H. S. Hardarson, A. S. Thorisdottir, //Laeknabladid. – 2014. – Vol. 100, № 2. – P. 85-89.
202. Guilleminault, L. Tropical pneumonia: pulmonary melioidosis / L. Guilleminault, A. Holstein, M. Azzouz, O. Favelle, P. Lanotte, P. Diot //La Revue de medecine interne. – 2010. – Vol. 31, № 7. – P. e4-7.
203. Guo, R. F. Splenic abscesses in a returning traveler / R. F. Guo, F. L. Wong, M. L. Perez //Infectious disease reports. – 2015. – Vol. 7, № 1. – P. 5791.

204. Gupta, A. MarR family transcription factors from *Burkholderia* species: hidden clues to control of virulence-associated genes/ A. Gupta, A. Pande, A. Sabrin, S. S. Thapa et al. //Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2019. – Vol. 83, № 1. – P. e00039-18.
205. Guzman, A. R. Chronisches Ulkus nach Südostasienreise bei 24-jährigem Mann/ A. R. Guzman, G. Slesak, R. Fleck, R. Ignatius, R. Oehme et. al. //Hautnah. – 2018. – Vol. 17, №. 2. – P. 69-73.
206. Guzmán-Gómez, L. Melioidosis imported from Colombia to Spain / L. Guzmán-Gómez, B. M. Agudo, E. Peiro-Callizo, C. Salas //Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica. – 2015. – Vol. 33, № 3. – P. 214-216.
207. Gylfe, A. Melioidos-en viktig diagnos vid svar sjukdom efter utlandsresa/ A. Gylfe S. Cajander, T. Wahab, M. Angelin //Läkartidningen. – 2017. – Vol. 114. – P. article id ERRR
208. Hall, C.M. Expanding the *Burkholderia pseudomallei* complex with the addition of two novel species: *Burkholderia mayonis* sp. nov. and *Burkholderia savannae* sp. nov./ C.M. Hall, A.L. Baker, J,W, Sahl, M, Mayo, H,C, Scholz, M, Kaestli et al.//Appl Environ Microbiol. – 2021. – AEM0158321. doi: 10.1128/AEM.01583-21.
209. Hamad, M. A. Adaptation and antibiotic tolerance of anaerobic *Burkholderia pseudomallei*/ M. A. Hamad, C. R. Austin, A. L. Stewart, M. Higgins et al.// Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2011. –Vol. 55, № 7. – P. 3313–3323.
210. Hampton, V. Melioidosis in birds and *Burkholderia pseudomallei* dispersal, Australia. / V.Hampton, M. Kaestli, M. Mayo, J. L. Choy et al.// Emerg. Infect. Dis. – 2011. – Vol.17. – P. 1310–1312.
211. Hara, Y. Multiple-antigen ELISA for melioidosis-a novel approach to the improved serodiagnosis of melioidosis / Y. Hara, C. Y. Chin, R. Mohamed, S. D. Puthuchear, S. Nathan//BMC infectious diseases.–2013.– Vol. 13, № 1. – P. 165.
212. Haraga, A. *Burkholderia thailandensis* as a model system for the study of the virulence-associated type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei* / A. Haraga, T. E. West, M. J. Brittnacher, S. J. Skerrett, S. I. Miller //Infection and immunity. – 2008. – Vol. 76, № 11. – P. 5402-5411.
213. Harris, P. N. A. Clinical features that affect indirect-hemagglutination-assay responses to *Burkholderia pseudomallei* / P. N. Harris, N. Ketheesan, L. Owens, R. E. Norton //Clinical and Vaccine Immunology. – 2009. – Vol. 16, № 6. – P. 924-930.
214. Harris, P. N. A. Evidence of *Burkholderia pseudomallei*-specific immunity in patient sera persistently nonreactive by the indirect hemagglutination assay / P. N. Harris, N. L. Williams, J. L. Morris, N. Ketheesan, R. E. Norton //Clinical and Vaccine Immunology. – 2011. – Vol. 18, № 8. – P. 1288-1291.
215. Hassan, M. R. A. Incidence, risk factors and clinical epidemiology of melioidosis: a complex socio-ecological emerging infectious disease in the Alor Setar region of Kedah, Malaysia / M. R. Hassan, S. P. Pani, N. P. Peng, K. Voralu, N. Vijayalakshmi, R. Mehanderkar, E. Michael //BMC infectious diseases. – 2010. – Vol. 10, № 1. – P. 302.
216. Hayden, H. S. Evolution of *Burkholderia pseudomallei* in recurrent melioidosis/ H. S. Hayden, R. Lim, M. J. Brittnacher, E. H. Sims et al.//PLoS One. – 2012. – T. 7. – №. 5 . –P. e36507.

217. Hellebuyck, T. Isolation of *Burkholderia pseudomallei* from a Pet Green Iguana, Belgium./ T. Hellebuyck, P. Wattiau, F. Boyen, I. Moeremans, N. H. Roosens, K. Vanneste, et al.// *Emerging infectious diseases*. – 2018. – Vol. 24, № 12. – P. 2331.
218. Hesstvedt, L. Two Norwegian patients with melioidosis presenting with bacteraemia and splenic and prostatic abscesses / L. Hesstvedt, M. Wilhelmsen, A. T. Mengshoel, A. M. Dyrhol-Riise // *Journal of travel medicine*. – 2011. – Vol. 18, № 6. – P. 418-421.
219. Hii, S.Y.F. Comparison of in-house IgM and IgG ELISAs for the serodiagnosis of melioidosis in Malaysia / S.Y.F. Hii, N.A. Ali, N. Ahmad, F. Amran // *J Med Microbiol*. – 2017. – Vol. 66, № 11. – P. 1623-1627.
220. Hinjoy, S. Melioidosis in Thailand: present and future / S. Hinjoy, V. Hantrakun, S. Kongyu, J. Kaewrakmuk, T. Wangrangsimakul et al. // *Tropical medicine and infectious disease*. – 2018. – Vol. 3, № 2. – P. 38. doi:10.3390/tropicalmed3020038.
221. Hodgson, K. Comparison of routine bench and molecular diagnostic methods in identification of *Burkholderia pseudomallei* / K. Hodgson, C. Engler, B. Govan, N. Ketheesan, R. Norton // *Journal of clinical microbiology*. – 2009. – Vol. 47, № 5. – P. 1578-1580.
222. Hoffmaster, A. R. Melioidosis diagnostic workshop, 2013 / A. R. Hoffmaster, D. AuCoin, P. Baccam, H. C. Baggett, R. Baird, S. Bhengsri, N. Chantratita, // *Emerging infectious diseases*. – 2015. – Vol. 21, № 2.
223. Höger, A. C. R. The melioidosis agent *Burkholderia pseudomallei* and related opportunistic pathogens detected in faecal matter of wildlife and livestock in northern Australia/ Höger, A. C. R., Mayo, M., Price, E. P., Theobald, V., Harrington, G., Machunter, B., Kaestli, M. // *Epidemiology & Infection*. – 2016. – Vol. 144, № 9. – P. 1924-1932.
224. Holden, M. T. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei* / M. T. Holden, R. W. Titball, S. J. Peacock, A. M. Cerdeño-Tárraga, M. Sebaihia // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – Vol. 101, № 39. – P. 14240-14245.
225. Holmes, A. Agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: a threat to human health? / A. Holmes, J. Govan, R. Goldstein // *Emerging infectious diseases*. – 1998. – Vol. 4, № 2. – P. 221-227.
226. Hong, Y. M. A case of prostatic abscess due to *Burkholderia pseudomallei* / Hong, Y. M., Kim, B. S., Park, S. M., Park, I. W., Park, J. C., Lee, B. H., Cho, H. M. // *The Korean Journal of Medicine*. – 2011. – Vol. 81, № 4. – P. 526-532.
227. Howard, K. Novel selective medium for isolation of *Burkholderia pseudomallei* / K. Howard, T. J. Inglis // *Journal of clinical microbiology*. – 2003. – Vol. 41, № 7. – P. 3312-3316.
228. Hsueh, P. Transmission Modes of Melioidosis in Taiwan./ P. Hsueh, W. Huang, H. Hsueh, Y. Chen, Y. Chen // *Trop. Med. Infect. Dis*. – 2018– Vol. 3, №1 – P. 26.
229. Ileri, S. Z. The indirect haemagglutination test in the diagnosis of melioidosis in goats / S. Z. Ileri // *British Veterinary Journal*. – 1965. – Vol. 121, № 4. – P. 164-170.
230. Inglis, T. J. Acute melioidosis outbreak in western Australia/ T. J. Inglis, S. C. Garrow, C. Adams, M. Henderson, M. Mayo, B. J. Currie // *Epidemiol Infect*. – 1999. – Vol. 123. – P. 437–443.

231. Inglis, T. J. Environmental factors that affect the survival and persistence of *Burkholderia pseudomallei*./ T.J. Inglis, J.L. Sagripanti //Applied and Environmental Microbiology. – 2006.– Vol. 72, № 11. – P. 6865-6875.
232. Inglis, T. J. J. *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*./ T. J. J. Inglis, A. J Merritt //In Molecular Medical Microbiology (Second Edition). – 2015. – P. 769-791.
233. Inglis, T. J. J. Comparison of diagnostic laboratory methods for identification of *Burkholderia pseudomallei* / T.J.J. Inglis, A. Merritt, G. Chidlow, M. Aravena-Roman, G. Harnett // J. Clin. Microbiolog. – 2005. – Vol. 43, N.5. – P. 2201–2206.
234. Inglis, T. J. J. Melioidosis in the Americas / T. J. J. Inglis, D. B. Rolim, A. D. Q. Sousa //The American journal of tropical medicine and hygiene. – 2006. – Vol. 75, № 5. – P. 947-954.
235. Inglis, T. J. J. Potential misidentification of *Burkholderia pseudomallei* by API 20NE / T. J. J. Inglis, D. Chiang, G. S. Lee, L. Chor-Kiang //Pathology. – 1998. – Vol. 30, № 1. – P. 62-64.
236. Inglis, T. J. The public health implications of melioidosis / T. J. Inglis, A. Q. Sousa // Brazilian Journal of Infectious Diseases. – 2009. – Vol. 13, № 1. – P. 59–66.
237. Inglis, T.J. Use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis for rapid confirmation of *Burkholderia pseudomallei* in septicemic melioidosis./ T.J. Inglis, P.E. Healy, L.J. Fremlin, C.L. Golledge // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 2012. – Vol. 86. – P. 1039–1042.
238. Ismail, A. Melioidosis in a returning traveller / A. Ismail, A. Buckley, S. W. Dubrey //BMJ case reports. – 2013. – Vol. 2013. – P. bcr2013009655.
239. Issack, M. I. Melioidosis in Mauritius / M. I. Issack, C. D. Bundhun, H. Gokhool //Emerging infectious diseases. – 2005. – Vol. 11, № 1. – P. 139-140.
240. Intarak, N. Growth, motility and resistance to oxidative stress of the melioidosis pathogen *Burkholderia pseudomallei* are enhanced by epinephrine / N. Intarak, V. Muangsombut, P. Vattanaviboon, M.P. Stevens et al. // Pathog Dis. – 2014. – Vol. 72, № 1. – P. 24-31.
241. Jane, L. I. *Burkholderia pseudomallei* osteomyelitis: An unusual cause of fever in a returned traveler/ L. I. Jane, A. Crowe, J. Daffy, H. Gock //The Australasian medical journal. – 2012. – Vol. 5, № 2. – P. 141-143.
242. Jangiama, W. Role of *Burkholderia pseudomallei* RpoS in regulation of catalase activities under hydrogen peroxide induction/ W. Jangiama, S. Loprasert, S. Tungpradabkula // *ScienceAsia*. – 2008. – Vol. 34, № 1. – P. 23–29.
243. Jenjaroen, K. T-cell responses are associated with survival in acute melioidosis patients / Jenjaroen, K., Chumseng, S., Sumonwiriya, M., Ariyaprasert, P. et al.//PLoS neglected tropical diseases. – 2015. – Vol. 9, № 10. – P. e0004152.
244. Jensenius, M. Acute and potentially life-threatening tropical diseases in western travelers—a GeoSentinel multicenter study, 1996–2011 / M. Jensenius, P. V. Han, P. Schlagenhauf, E. Schwartz, P. Parola, F. Castelli, D. O. Freedman //The American journal of tropical medicine and hygiene. – 2013. – Vol. 88, № 2. – P. 397-404.

245. Jitprasutwit, S. Transcriptional profiles of *Burkholderia pseudomallei* reveal the direct and indirect roles of Sigma E under oxidative stress conditions / S. Jitprasutwit, C. Ong, N. Juntawieng et al. // *BMC Genomics*. – 2014. – Vol. 15, № 1. – article no. 787. doi: 10.1186/1471-2164-15-787.
246. Jolley, K.A. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications/ K.A. Jolley, J.E. Bray, M.C.J. Maiden // *Wellcome Open Res.* – 2018. – Vol.3. – P. 124. doi:10.12688/wellcomeopenres.14826.1
247. Joris, B. Comparison of the sequences of class A beta-lactamases and of the secondary structure elements of penicillin-recognizing proteins / B. Joris, P. Ledent, O. Dideberg, E. Fonce, J. Lamotte-Brasseur, J. A. Kelly, J. M. Frère // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 1991. – Vol. 35, № 11. – P. 2294-2301.
248. Kaestli, M. Out of the ground: aerial and exotic habitats of the melioidosis bacterium *Burkholderia pseudomallei* in grasses in Australia / M. Kaestli, M. Schmid, M. Mayo, M. Rothballer, G. Harrington, L. Richardson, A. Hartmann // *Environmental microbiology*. – 2012. – Vol. 14, № 8. – P. 2058-2070.
249. Kanaphun, P. Serology and carriage of *Pseudomonas pseudomallei*: a prospective study in 1000 hospitalized children in northeast Thailand / P. Kanaphun, N. Thirawattanasuk, Y. Suputtamongkol, P. Naigowit, D. A. Dance, M. D. Smith, N. J. White // *Journal of Infectious Diseases*. – 1993. – Vol. 167, № 1. – P. 230-233.
250. Karger, A. Determination of serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates by intact cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry/ A. Karger, M. Ziller, B. Bettin, B. Mintel, S. Schares, L. Geue // *Appl Environ Microbiol* – 2011. – Vol. 77, № 3. – P. 896–905.
251. Karger, A. Rapid identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* by intact cell Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation mass spectrometric typing / A. Karger, R. Stock, M. Ziller, M. C. Elschner, B. Bettin, F. Melzer, T. Maier, M. Kostrzewa, H.C. Scholz, H. Neubauer, H. Tomaso // *BMC Microbiology*. – 2012. – Vol.12. – P. 229.
252. Kasantikul, T. Retrospective study on fatal melioidosis in captive zoo animals in Thailand / T. Kasantikul, A. Sommanustweechai, K. Polsrila, W. Kongkham, C. Chaisongkram, S. Sanannu, et al. // *Transboundary and emerging diseases*. – 2016. – Vol. 63, № 5. – P. e389-e394.
253. Katanami, Y. A fatal case of melioidosis with pancytopenia in a traveler from Indonesia Y. Katanami, S. Kutsuna, A. Horino, T. Hashimoto, Y. Mutoh, K. Yamamoto, N. Ohmagari // *Journal of Infection and Chemotherapy*. – 2017. – Vol. 23, № 4. – P. 241-244.
254. Katangwe, T. Human melioidosis, Malawi, 2011 / T. Katangwe, J. Purcell, N. Bar-Zeev, B. Denis, J. Montgomery, M. Alaerts, C. A. Moxon // *Emerging infectious diseases*. – 2013. – Vol. 19, № 6. – P. 981-984.
255. Keith, K. E. Functional characterization of OXA-57, a class D β -lactamase from *Burkholderia pseudomallei* / K. E. Keith, P. C. Oyston, B. Crossett, N. F. Fairweather, R. W. Titball, T. R. Walsh, K. A. Brown // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2005. – Vol. 49, № 4. – P. 1639-1641.

256. Kikuchi, Y. An ancient but promiscuous host–symbiont association between *Burkholderia* gut symbionts and their heteropteran hosts / Y. Kikuchi, T. Hosokawa, T. Fukatsu //The ISME journal.– 2011. – Vol.5,№ 3.– P. 446-460.
257. Kikuchi, Y. Gut symbiotic bacteria of the genus *Burkholderia* in the broad-headed bugs *Riptortus clavatus* and *Leptocorisa chinensis* (Heteroptera: Alydidae) / Y. Kikuchi, X. Y. Meng, T. Fukatsu //Applied and Environmental Microbiology. – 2005. – Vol. 71, № 7. – P. 4035-4043.
258. Kim, H. S. Bacterial genome adaptation to niches: divergence of the potential virulence genes in three *Burkholderia* species of different survival strategies / H. S. Kim, M. A. Schell, Y. Yu, R. L. Ulrich, S. H. Sarria // BMC.Genomics. – 2005. – Vol. 6. – P.174-181.
259. Kim, S. W. Imported melioidosis in South Korea: a case series with a literature review / S. W. Kim, G. Y. Kwon, B. Kim, D. Kwon, J. Shin, G. R. Bae //Osong public health and research perspectives. – 2015. – Vol. 6, № 6. – P. 363-368.
260. Kingsley, P. V. Melioidosis in Malaysia: A Review of Case Reports / P. V. Kingsley, M. Leader, N. S. Nagodawithana, M. Tipre, N. Sathiakumar //PLoS neglected tropical diseases. – 2016. – Vol. 10, № 12. – P. e0005182.
261. Kiratisin, P. Accuracy of commercial systems for identification of *Burkholderia pseudomallei* versus *Burkholderia cepacia* / P. Kiratisin, P. Santanirand, N. Chantratita, S. Kaewdaeng //Diagnostic microbiology and infectious disease. – 2007. – Vol. 59, № 3. – P. 277-281.
262. Kite-Powell, A. Imported melioidosis-South Florida, 2005 / A. Kite-Powell, J. R. Livengood, J. Suarez, R. Hopkins, T. A. Clark, D. Chertow //Morbidity and Mortality Weekly Report. – 2006. – Vol. 55, № 32. – P. 874-876.
263. Knappik, M. Evaluation of molecular methods to improve the detection of *Burkholderia pseudomallei* in soil and water samples from Laos/ M. Knappik, D. A. Dance, S. Rattanavong, A. Pierret, O. Ribolzi, V. Davong, S. Dittrich //Applied and environmental microbiology. – 2015. – Vol. 81, № 11. – P. 3722-3727.
264. Ko, W. C. Melioidosis outbreak after typhoon, southern Taiwan / W. C. Ko, B. M. H. Cheung, H. J. Tang, H. I. Shih, Y. J. Lau, L. R. Wang, Y. C. Chuang //Emerging infectious diseases. – 2007. – Vol. 13,№ 6. – P. 896.
265. Koh, S. F. Development of a multiplex PCR assay for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia cepacia* complex/ S. F. Koh, S. T. Tay, R. Sermswan, S. Wongratanacheewin, K. H. Chua, S. D. Puthuchery //ournal of microbiological methods. – 2012. – Vol. 90, № 3. – P. 305-308.
266. Koh, T. H. Automated identification systems and *Burkholderia pseudomallei* / T. H. Koh, L. S. Y. Ng, J. L. F. Ho, L. H. Sng, G. C. Y. Wang, R. V. T. P. Lin //Journal of clinical microbiology. – 2003. – Vol. 41, № 4. – P. 1809-1809.
267. Kong, Z. Melioidosis acquired by a traveler from Papua New Guinea / Z. Kong, Y. Fang, M. Zhang, J. Hong, J. Chen, //Travel medicine and infectious disease. – 2016. – Vol. 14, № 3. – P. 267-270.
268. Korbsrisate, S. The *Burkholderia pseudomallei* RpoE (AlgU) operon is involved in environmental stress tolerance and biofilm formation/ S. Korbsrisate, M. Vanaporn, P. Kerdsuk, W. Kes-

- pichayawattana, P. Vattanaviboonet al. //FEMS microbiology letters. – 2005. – Vol. 252, № 2. – P. 243-249.
269. Krishnamurthy, T. Detection of pathogenic and non-pathogenic bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / T. Krishnamurthy, U. Rajamani, P. L. Ross //Rapid Communications in Mass Spectrometry. – 1996. – Vol.10, № 8. – P. 883-888.
270. Krumme, M. L. Degradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4 and the constitutive mutant strain G4 5223 PR1 in aquifer microcosms / M. L.Krumme, K. N. Timmis, D. F. Dwyer //Applied and environmental microbiology. – 1993. – Vol. 59, № 8. – P. 2746-2749.
271. Kunakorn, M. Clinically practical seminested PCR for *Burkholderia pseudomallei* quantitated by enzyme immunoassay with and without solution hybridization / M. Kunakorn, R. B. Markham //Journal of clinical microbiology. – 1995. – Vol. 33, № 8. – P. 2131-2135.
272. Kunakorn, M. Enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M specific antibody for the diagnosis of melioidosis/ M. Kunakorn, P. Boonma, K. Khupulsup, B. Petchclai //Journal of clinical microbiology. – 1990. – Vol. 28, № 6. – P. 1249-1253.
273. Lasch, P. Inactivation of microbial cells and spores for MALDI-TOF mass spectroscopy / P. Lasch, H. Natterman, M. Stämmler, B. Appel // Anal Chem. – 2008 Mar 15. – Vol.80, №6. – P.2026-34.
274. Lau, S. K. P. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei*: importance of expanding databases with pathogens endemic to different localities/ S. K. Lau, B. S. Tang, S. O. Curreem, T. M. Chan, P. Martelli, W. S. Cindy, P. C. Woo //Journal of clinical microbiology. – 2012. – Vol.50, № 9. – P. 3142-3143.
275. Lazar Adler, N. R. Perturbation of the two-component signal transduction system, BprRS, results in attenuated virulence and motility defects in *Burkholderia pseudomallei* / N. R. Lazar Adler, E. M. Allwood, D. D. Lucas, P. Harrison, S. Watts, A. Dimitropoulos, B. Govan //BMC genomics. – 2016. – Vol. 17, № 1. – P. 331.
276. Lazar Adler, N. R. Systematic mutagenesis of genes encoding predicted autotransported proteins of *Burkholderia pseudomallei* identifies factors mediating virulence in mice, net intracellular replication and a novel protein conferring serum resistance/ N. R. Lazar Adler, M. P.Stevens, R. E. Dean, R. J. Saint et al. //PLoS One. – 2015. – Vol. 10, № 4. – P. e0121271.
277. Lazar Adler, N. R. The molecular and cellular basis of pathogenesis in melioidosis: how does *Burkholderia pseudomallei* cause disease? / N. R. Lazar Adler, B. Govan, M. Cullinane, Harper M. et al.//FEMS microbiology reviews. – 2009. – Vol. 33, № 6. – P. 1079-1099.
278. Lee, H. M. A case of disseminated melioidosis in a migrant worker from Thailand / H. M. Lee, S. H. Choi, J. W. Chung, J. Ahn, A. R. Cho, M. K. Lee, K. J. Chang//The Korean journal of laboratory medicine. – 2009. – Vol. 29, № 2. – P. 140-144.
279. Lee, S. W. A case of melioidosis presenting as migrating pulmonary infiltration: the first case in Korea / S. W. Lee, J. Yi, S. I. Joo, Y. Kang, Yoon, Y. S., Yim, J. J., Kim, Y. W. //Journal of Korean medical science. – 2005. – Vol. 20, № 1. – P. 139-142.

280. Lee, Y. L. Pyogenic liver abscess caused by *Burkholderia pseudomallei* in Taiwan / Y. L. Lee, S. S. J. Lee, H. C. Tsai, Y. S. Chen, S. R. Wann, C. H. Kao, Y. C. Liu //Journal of the Formosan Medical Association. – 2006. – Vol. 105, № 8. – P. 689-693.
281. Lemaire, B. Identification of the bacterial endosymbionts in leaf nodules of *Pavetta (Rubiaceae)* / B. Lemaire, S. Van Oevelen, P. De Block, B. Verstraete, E. Smets, E. Prinsen, S. Dessein, //International journal of systematic and evolutionary microbiology.– 2012.–Vol. 62,№ 1.– P. 202-209.
282. Leth, S. Melioidosis in a Danish tourist returning from North-eastern Thailand / S. Leth, M. Wang, S. Deutch //Ugeskrift for laeger.–2014. – Vol. 176, № 12.
283. Li, R. A novel PCR-based approach for accurate identification of *Vibrio parahaemolyticus* / R. Li, J. Chiou, E. W. C.Chan, S. Chen //Frontiers in microbiology. – 2016. – Vol. 7.
284. Lie, J. A case of pulmonary melioidosis / J. Lie, S. Maxwell, C. Keeling-Roberts, D. Dev//Respiratory Medicine CME.–2010.– Vol.3,№2.– P.109-110.
285. Liguori, A. P. Diversity of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) reveals phylogenetic relationships in *Burkholderia pseudomallei* and its near-neighbors / A. P. Liguori, S. D. Warrington, J. L. Ginther, T. Pearson, J. Bowers, M. B. Glass, B. J. Currie//PLoSOne.–2011.– Vol.6,№12.– P.e29323.
286. Lim, R. S. M. Sinonasal melioidosis in a returned traveller presenting with nasal cellulitis and sinusitis / R. S. M. Lim, S. Flatman, M. C. Dahm //Case reports in otolaryngology. – 2013. – Vol. 2013.
287. Lim, Y. T. Extended loop region of Hcp1 is critical for the assembly and function of type VI secretion system in *Burkholderia pseudomallei* / Y. T. Lim, C. Jobichen, J. Wong, D. Limmathurotsakul, S. Li //Scientific reports. – 2015. – Vol. 5. – P. 8235.
288. Limmathurotsakul, D. Defining the true sensitivity of culture for the diagnosis of melioidosis using Bayesian latent class models/ D. Limmathurotsakul, K. Jansen, A. Arayawichanont, J. A. Simpson, L. J. White, S. J. Lee, C. Verzilli //PloS one. – 2010. – Vol. 5, № 8. – P. e12485.
289. Limmathurotsakul, D. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of melioidosis: better than we thought / D. Limmathurotsakul, N. Chantratita, N. Teerawattanasook, K. Piriya- itpaiboon, A. Thanwisai, V. Wuthiekanun, S. J. Peacock //Clinical infectious diseases. – 2011. – Vol. 52, № 8. – P. 1024-1028.
290. Limmathurotsakul, D. Increasing incidence of human melioidosis in Northeast Thailand / D. Limmathurotsakul, S. Wongratanacheewin, N. Teerawattanasook, G. Wongsuvan et al.//The American journal of tropical medicine and hygiene. – 2010a. – Vol. 82, № 6. – P. 1113-1117.
291. Limmathurotsakul, D. Melioidosis caused by *Burkholderia pseudomallei* in drinking water, Thailand, 2012/ D. Limmathurotsakul, G. Wongsuvan, D. Aanensen, S. Ngamwilai et al.//Emerging infectious diseases. – 2014. – Vol. 20, № 2. – P. 265.
292. Limmathurotsakul, D. Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis / D. Limmathurotsakul, N. Golding, D. Dance, J. Messina, D. Pigott, C. Moyes, D. Rolim, E. Bertherat, N. Day, S. Peacock, S. Hay //Nature microbiology. – 2016. – Vol. 1. – P. 15008.

293. Limmathurotsakul, D. Systematic review and consensus guidelines for environmental sampling of *Burkholderia pseudomallei* / D. Limmathurotsakul, D. A. Dance, V. Wuthiekanun, M. Kaestli, et al. // PLoS neglected tropical diseases. – 2013. – Vol., № 3. – P. e2105.
294. Lin, C. H. A comparative synteny map of *Burkholderia* species links large-scale genome rearrangements to fine-scale nucleotide variation in prokaryotes / C. H. Lin, G. Bourque, P. Tan // Molecular biology and evolution. – 2007. – Vol. 25, № 3. – P. 549-558.
295. Lipsitz, R. et al. Workshop on treatment of and postexposure prophylaxis for *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei* infection, Emerg. Infect. Dis. 2010. 18, e2 (2012).
296. LiPuma, J. J. Commercial use of *Burkholderia cepacia*: are there additional threats / J. J. LiPuma, E. Mahenthiralingam // Emerg. Infect. Dis. – 1999. – Vol. 5. – P. 5-6.
297. Livemore, D. M. β -Lactamase of *Pseudomonas pseudomallei* and its contribution to antibiotic resistance/ D. M. Livemore, P. Y. Chau, A. Wong, Y. K. Leung, // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 1987. – Vol. 20, № 3. – P. 313-321.
298. Lo, T. J. Melioidosis in a tropical city state, Singapore / T. J. Lo, L. W. Ang, L. James, K. T. Goh // Emerging infectious diseases. – 2009. – Vol. 15, № 10. – P. 1645.
299. Lopes-Santos, L. Reassessment of the taxonomic position of *Burkholderia andropogonis* and description of *Robbsia andropogonis* gen. nov., comb. nov. / L. Lopes-Santos, D.B.A. Castro, M. Ferreira-Tonin, D.B.A. Corrêa, B.S. Weir et al. // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2017. – Vol. 110, № 6. – P. 727-736. doi: 10.1007/s10482-017-0842-6.
300. Loprasert, S. Characterization and mutagenesis of fur gene from *Burkholderia pseudomallei*/ S. Loprasert, R.Sallabhan, W. Whangsuk, S. Mongkolsuk // Gene. – 2000. – Vol. 254, № 1-2. – P. 129–137.
301. Loprasert, S. Regulation of the katG-dpsA operon and the importance of KatG in survival of *Burkholderia pseudomallei* exposed to oxidative stress/ S. Loprasert, W. Whangsuk, R.Sallabhan, S. Mongkolsuk // FEBS Letters. – 2003. – Vol. 542, № 1-3. – P. 17–21.
302. Losada, L. Continuing evolution of *Burkholderia mallei* through genome reduction and large-scale rearrangements / L. Losada, C. M. Ronning, D. DeShazer, D. Woods, N. Fedorova, H. Stanley Kim, T. Nandi // Genome biology and evolution. – 2010. – Vol. 2. – P. 102-116.
303. Lowe, C. W. A Quadruplex Real-Time PCR Assay for the Rapid Detection and Differentiation of the Most Relevant Members of the *B. pseudomallei* Complex: *B. mallei*, *B. pseudomallei*, and *B. thailandensis*/ C. W. Lowe, B. A. Satterfield, D. B. Nelson, J. D. Thiriot, M. J. Heder, J. K. March, K. L. O'Neill // PloS one. – 2016. – Vol. 11, № 10. – P. e0164006.
304. Lowe, P. Comparison of automated and nonautomated systems for identification of *Burkholderia pseudomallei* / P. Lowe, C. Engler, R. Norton // Journal of clinical microbiology. – 2002. – Vol. 40, № 12. – P. 4625-4627.
305. Lowe, P. Use of various common isolation media to evaluate the new VITEK 2 colorimetric GN card for identification of *Burkholderia pseudomallei* / P. Lowe, H. Haswell, K. Lewis // Journal of clinical microbiology. – 2006. – Vol. 44, № 3. – P. 854-856.

306. Lübbert, C. Intracranial hypertension and vasculitic infarction in a patient with severe cerebral melioidosis / C. Lübbert, S. Wendt, C. Sander, A. Beeskow, D. Becker-Rux // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2018. – Vol. 18, № 10. – P. 1160.
307. Lui, G. Melioidosis in Hong Kong./ G. Lui,; A. Tam,; E. Tso,; A. Wu, et al.// *Trop. Med. Infect. Dis.* –2018. – Vol. 3, № 3. – P. 91.
308. Maharjan, B. Recurrent melioidosis in patients in Northeast Thailand is frequently due to reinfection rather than relapse./ B. Maharjan, N. Chantratita, M. Vesaratchavest, A. Cheng, V. Wuthiekanun, W. Chierakul, et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 2005. – Vol.43. – P. 6032–6034.
309. Mahenthiralingam, E. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology / E. Mahenthiralingam, A. Baldwin, C. G. Dowson // *Journal of applied microbiology*. – 2008. – Vol. 104, № 6. – P. 1539-1551.
310. Mahenthiralingam, E. Multilocus sequence typing breathes life into a microbial metagenome / E. Mahenthiralingam, A. Baldwin, P. Drevinek, E. Vanlaere, P. Vandamme, J. J. LiPuma, C. G. Dowson // *PLoS One*. – 2006. – Vol. 1, № 1. – P. e17.
311. Mahenthiralingam, E. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex / E. Mahenthiralingam, T. A. Urban, J. B. Goldberg // *Nature Reviews Microbiology*. – 2005. – Vol. 3, № 2. – P. 144-156.
312. Majerczyk, C. D. Cross-species comparison of the *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, and *Burkholderia mallei* quorum-sensing regulons / C. D. Majerczyk, M. J. Brittnacher, M. A. Jacobs, C. D. Armour, M. C. Radey, R. Bunt, E. P. Greenberg // *Journal of bacteriology*. – 2014. – Vol. 196, № 22. – P. 3862-3871.
313. Maloney, S. Evaluation of the Remel RapID NF Plus Rapid Biochemical Method for Identification of *Burkholderia pseudomallei*/ S. Maloney, C. Engler, R. Norton // *Journal of clinical microbiology*. – 2014. – VOL. 52, № 6. – P. 2175-2176.
314. Mandjee, A. *Burkholderia pseudomallei* infection after travelling in Southeast Asia, case study / A. Mandjee // *Medecine et maladies infectieuses*. – 2005. – Vol. 35, № 2. – P. 88.
315. Maude, R. R. Prospective observational study of the frequency and features of intra-abdominal abscesses in patients with melioidosis in northeast Thailand / R. R. Maude, T. Vatchara-preechasakul, P. Ariyaprasert, R. J. Maude, M. Hongsuwan, P. Yuentrakul, S. J. Peacock, // *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. – 2012. – Vol. 106, № 10. – P. 629-631.
316. Maude, R. R. Seroepidemiological surveillance of *Burkholderia pseudomallei* in Bangladesh / R. R. Maude, R. J. Maude, A. Ghose, M. R. Amin, M. B. Islam, M. Ali, R. L. Bailey // *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. – 2012. – Vol. 106, № 9. – P. 576-578.
317. Mays, E. E. Melioidosis: recrudescence associated with bronchogenic carcinoma twenty-six years following initial geographic exposure / E. E. Mays, E. A. Ricketts // *Chest*. – 1975. – Vol. 68, № 2. – P. 261-263.
318. McCormick, J. B. Wound infection by an indigenous *Pseudomonas pseudomallei*-like organism isolated from the soil: case report and epidemiologic study / J. B. McCormick, R. E. Weaver, P. S. Hayes, J. M. Boyce, R. A. Feldman, // *Journal of Infectious Diseases*. – 1977. – Vol. 135, № 1. – P. 103-107.

319. Meckenstock, R. Cutaneous melioidosis in adolescent returning from Guadeloupe / Meckenstock, R., Therby, A., Marque-Juillet, S., Monnier, S., Khau, D., Pangon, B., Greder-Belan, A. //Emerging infectious diseases. – 2012. – Vol. 18, № 2. – P. 359.
320. Memisevic, V. Mining host-pathogen protein interactions to characterize *Burkholderia mallei* infectivity mechanisms/ V. Memisevic, N. Zavaljevski, S. V. Rajagopala, K. Kwon et al. //PLoS computational biology. – 2015. – Vol. 11, № 3. – P. e1004088.
321. Meraj, S. Persistent *Burkholderia pseudomallei* Bacteremia in A Filipino Immigrant to the United States: A Case Report / S. Meraj, B. Rodenberg, S. Thannum, J. Sheley, J. Foreman //Tropical medicine and infectious disease. – 2019. – Vol. 4, № 1. – P. 20.
322. Merritt A. PCR-based identification of *Burkholderia pseudomallei* / A. Merritt, T. J. Inglis, G. Chidlow, G. Harnett //Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. – 2006. – Vol. 48, № 5. – P. 239-244.
323. Mesnard, J. Un cas de mélioiïdose au Tonkin. / J. Mesnard, B.G. Joyeux // Bull. Soc. Med. Chir. Indoch. – 1929, № 7. – P. 32–39.
324. Micheva-Viteva, S. N. PKC- η -MARCKS Signaling Promotes Intracellular Survival of Unopsonized *Burkholderia thailandensis*/ S. N. Micheva-Viteva, Y. Shou, K. Ganguly, T. H. Wu et al. // Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2017. – Vol. 7. – P. 231.
325. Mickail, N. Melioidosis breast abscesses / N. Mickail, N. C. Klein, B. A. Cunha, P. A. Schoch //Journal of Infection. – 2012. – Vol. 64, № 4. – P. 434-435.
326. Miksić, N. G. Osteomyelitis of parietal bone in melioidosis / N. G. Miksić, N. Alikadić, T. Z. Lejko, A. Andlovic, J. Knific, J. Tomažič //Emerging infectious diseases. – 2007. – Vol. 13, № 8. – P. 1257.
327. Miller, D. A. Sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* genomes and their applications in relation to cystic fibrosis/ D. A. Miller, E. Mahenthiralingam // J R Soc Med. – 2003. – Vol. 43. – P.57-65.
328. Mollaret, H. H. «L'affaire du jardin des plantesou comment la mélioiïdose fit son apparition en France / H. H. Mollaret //Medecine et Maladies Infectieuses. – 1988. – Vol. 18. – P. 643-654.
329. Monecke, S. An imported case of melioidosis presenting as pyelonephritis/urosepsis / S. Monecke, A. Friedrichs, C. Pöhlmann, K. Hochauf, F. Gunzer, D. Wiesner, G. Schmoock //JMM Case Reports. – 2015. – Vol. 2, № 5.
330. Mongkolrob, R. Correlation between biofilm production, antibiotic susceptibility and exopolysaccharide composition in *Burkholderia pseudomallei* bpsI, ppk, and rpoS mutant strains / R. Mongkolrob, S. Taweechaisupapong, S. Tungpradabkul //Microbiology and immunology. – 2015. – Vol. 59, № 11. – P. 653-663.
331. Montúfar, F. E. Melioidosis in Antioquia, Colombia: an emerging or endemic disease? A cases series / F. E. Montúfar, J. E. Ochoa, H. Ortega, L. Franco, M. C. Montúfar, A. Monsalve, M.Zapata //International Journal of Infectious Diseases. – 2015. – Vol. 37. – P. 50-57.
332. Moore, R. A. Contribution of gene loss to the pathogenic evolution of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* / R. A. Moore, S. Reckseidler-Zenteno, H. Kim, W. Nierman et al.//Infection and immunity. – 2004. – Vol. 72, № 7. – P. 4172-4187.

333. Moore, R. A. Efflux-mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*/ R. A. Moore, D. DeShazer, S. Reckseidler, A. Weissman, D. E. Woods //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1999. – Vol. 43, № 3. – P. 465-470.
334. Morelli, F. Melioidosis and renal failure in a Dutch man after a trip to Gambia / F. Morelli, L. Smeets, M. Hobijn, H. Boom //The Netherlands journal of medicine. – 2015. – Vol. 73, № 6. – P. 296-298.
335. Morici, L. Novel multicomponent vaccine approaches for *Burkholderia pseudomallei*/ L. Morici, A. G. Torres, R. W. Titball //Clinical & Experimental Immunology. – 2019. – Vol. 196, №. 2. – P. 178-188.
336. Morosini, M. I. Melioidosis in traveler from Africa to Spain / M. I. Morosini, C. Quereda, H. Gil, P. Anda, M. Núñez-Murga, R. Cantón, R. López-Vélez, //Emerging infectious diseases. – 2013. – Vol. 19, № 10. – P. 1656.
337. Moule, M. G. Characterization of new virulence factors involved in the intracellular growth and survival of *Burkholderia pseudomallei* / M. G. Moule, N. Spink, S. Willcocks, J. Lim, et al. //Infection and immunity. – 2016. – Vol. 84, № 3. – P. 701-710.
338. Moulin, L. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria / L. Moulin, A. Munive, B. Dreyfus, C. Boivin-Masson, //Nature. – 2001. – Vol. 411, № 6840. – P. 948-950.
339. Mukhopadhyay, C. Melioidosis in South Asia (India, Nepal, Pakistan, Bhutan and Afghanistan)/ C. Mukhopadhyay, T. Shaw, G. Varghese, D. Dance / Mukhopadhyay, C., Shaw, T., Varghese, G., & Dance, D. //Tropical medicine and infectious disease. – 2018. – Vol. 3, № 2. – P. 51. doi:10.3390/tropicalmed3020051
340. Naas, T. Characterization of an LysR family protein, SmeR from *Serratia marcescens* S6, its effect on expression of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase Sme-1, and comparison of this regulator with other beta-lactamase regulators / T. Naas, D. M. Livermore, P. Nordmann //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1995. – Vol. 39, № 3. – P. 629-637.
341. Nandi, T. A genomic survey of positive selection in *Burkholderia pseudomallei* provides insights into the evolution of accidental virulence / T. Nandi, C. Ong, A. P. Singh, J. Boddey, T. Atkins, M. Sarkar-Tyson, C. Nilsson //PLoS Pathogens. – 2010. – Vol. 6, № 4. – P. e1000845.
342. Nandi, T. *Burkholderia pseudomallei* sequencing identifies genomic clades with distinct recombination, accessory, and epigenetic profiles / T. Nandi, M. T. Holden, X. Didelot, K. Meher Shahi, J. A. Boddey, I. Beacham, S. Wang, //Genome research. – 2015. – Vol. 25, № 1. – P. 129-141.
343. Nathan, S. Melioidosis in Malaysia: Incidence, Clinical Challenges, and Advances in Understanding Pathogenesis./ S. Nathan, S. Chieng, P. Kingsley, A. Mohan et al.// Trop. Med. Infect. Dis. – 2018. – Vol. 3, №1 – P. 25.
344. Neubauer, H. Development and clinical evaluation of a PCR assay targeting the metalloprotease gene (*mprA*) of *B. pseudomallei*/ H. Neubauer, L. D. Sprague, M. Joseph, H. Tomaso et al. //Zoonoses and public health. – 2007. – Vol. 54, №1 – P. 44-50.
345. Ngauy, V. Cutaneous melioidosis in a man who was taken as a prisoner of war by the Japanese during World War II / V. Ngauy, Y. Lemeshev, L. Sadkowski, G. Crawford//Journal of clinical microbiology. – 2005. – Vol. 43, № 2. – P. 970-972.

346. Nicholls, L. Melioidosis, with special reference to the dissociation of *Bacillus whitmori* /L. Nicholls//British journal of experimental pathology. – 1930. – Vol. 11, № 6. – P. 393.
347. Nieminen, T. *Burkholderia pseudomallei* infections in Finnish tourists injured by the December 2004 tsunami in Thailand / T. Nieminen, M. Vaara //Euro Surveill. – 2005. – Vol. 10, № 3. – P. E050303.
348. Nierman, W. C. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome / W. C. Nierman, D. DeShazer, H. S. Kim, H. Tettelin, K. E. Nelson, T. Feldblyum, T. D. Davidsen //Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2004. – Vol. 101, № 39. – P. 14246-14251.
349. Nierman, W. C. The In vitro Antibiotic Tolerant Persister Population in *Burkholderia pseudomallei* is Altered by Environmental Factors./ W. C. Nierman, Y. Yu, L. Losada // *Frontiers in microbiology*. – 2015, № 6. – P. 1338. doi:10.3389/fmicb.2015.01338
350. Niumsup, P. Cloning of the class D β -lactamase gene from *Burkholderia pseudomallei* and studies on its expression in ceftazidime-susceptible and-resistant strains / P. Niumsup, V. Wuthiekanun //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2002. – Vol. 50, № 4. – P. 445-455.
351. Niyompanich, S. Source-identifying biomarker ions between environmental and clinical *Burkholderia pseudomallei* using whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) / S. Niyompanich, J. Jaresitthikunchai, K. Srisanga, S. Roytrakul, S. Tungpradabkul //PloS one. – 2014. – Vol. 9, № 6. – P. e99160.
352. Novak, R. T. Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting the type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei* / R. T. Novak, M. B. Glass, J. E. Gee, D. Gal, M. J. Mayo, B. J. Currie, P. P. Wilkins //Journal of clinical microbiology. – 2006. – Vol. 44, № 1. – P. 85-90.
353. O'Brien, M. Further evaluation of a rapid diagnostic test for melioidosis in an area of endemicity/ M. O'Brien, K. Freeman, G. Lum, A.C. Cheng et al. // J Clin Microbiol. – 2004. – Vol. 42, № 5. – P. 2239-2240.
354. O'Rourke, A. Environmental and genetic factors controlling *Burkholderia pseudomallei* persister phenotypes/ A. O'Rourke, N. Yee, W. C. Nierman, S. Beyhan // Current Tropical Medicine Reports. – 2017. – Vol. 4, № 3. – P. 111–116.
355. Ohbayashi, T. Insect's intestinal organ for symbiont sorting / T. Ohbayashi, K. Takeshita, W. Kitagawa, N. Nikoh, R. Koga, X. Y. Meng, Y. Kamagata, //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. – Vol. 112, № 37. – P. E5179-E5188.
356. Okonechnikov, K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit /K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov // *Bioinformatics*. – 2015. – Vol. 28, № 8. – P. 1166–1167
357. Ong, C. Patterns of large-scale genomic variation in virulent and avirulent *Burkholderia* species / C. Ong, C. H. Ooi, D. Wang, H. Chong, K. C. Ng, F. Rodrigues, P. Tan //Genome research. – 2004. – Vol. 14, № 11. – P. 2295-2307.
358. Ooi, W. F. The condition-dependent transcriptional landscape of *Burkholderia pseudomallei*/ W. F. Ooi, C. Ong, T. Nandi, J. F. Kreisberg et al. //PLoS genetics. – 2013. – Vol. 9, № 9. – P. e1003795.

359. Oren, A. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published./ A. Oren, G.M. Garrity // *Int J Syst Evol Microbiol.*- 2015.- Vol.65.-№7.- P. 2017-2025.
360. O'sullivan, B. P. *Burkholderia pseudomallei* infection in a child with cystic fibrosis: acquisition in the Western Hemisphere // B. P. O'sullivan, B. Torres, G. Conidi, S. Smole, C. Gauthier, K. E. Stauffer, T. L. Smith /*Chest.* – 2011. – Vol. 140, № 1. – P. 239-242.
361. Palleroni, N. Family of *Pseudomonadaceae*. Bergey's manual of systematic bacteriology / N. Palleroni, Ed. by N. Krieg, G. Holt. – Baltimore. – 1984. – Vol. 1. – P. 141-219.
362. Palleroni, N. J. Some properties and taxonomic sub-divisions of the genus *Pseudomonas* // N. J. Palleroni, M. Doudoroff /*Annual Review of Phytopathology.* – 1972. – Vol. 10, № 1. – P. 73-100.
363. Pande, K. Melioidosis in Brunei Darussalam / K. Pande, K. Abd Kadir, R. Asli, V. Chong // *Trop. Med. Infect. Dis.* – 2018– Vol.3, №1– P. 20
364. Panomket, P. Susceptibility of ceftazidime to *Burkholderia pseudomallei* found in patients in Sappasitprasong Hospital / S. Wanrum, J. Jittimane, N. Teerawatanasuk, J. Nilsakul, S. Nuntalohit // *J Med Tech Phy Ther.* – 2011. – Vol. 23. – P. 265-73.
365. Panya, M. Prevalence of bla (PenA) and bla (OXA) in *Burkholderia pseudomallei* Isolated from Patients at Sappasitthiprasong Hospital and Their Susceptibility to Ceftazidime and Carbapenems / M. Panya, S. Thirat, S. Wanram, P. Panomket, J. Nilsakul // *Journal of the Medical Association of Thailand Chotmaihet thangphaet.* – 2016. – Vol. 99. – P. S12-6.
366. Park, S. Y. Septicemic Melioidosis Presenting as Head and Neck Abscesses / Park, S. Y., Kang, C. I., Joo, E. J., Ha, Y. E., Ki, C. S., Lee, N. Y., ... Song, J. H. // *Infection Chemotherapy.* – 2012. – Vol. 44, № 4.
367. Parkes, H.M. Primary ocular melioidosis due to a single genotype of *Burkholderia pseudomallei* in two cats from Arnhem Land in the Northern Territory of Australia./ H.M. Parkes, C.M. Shilton, I.V. Jerrett, S. Benedict et al. // *J. Feline Med. Surg.* – 2009. – Vol. 11. – P. 856–863.
368. Partida-Martinez, L. P. Endosymbiont-dependent host reproduction maintains bacterial-fungal mutualism / L. P. Partida-Martinez, S. Monajembashi, K. O. Greulich, C. Hertweck, // *Current Biology.*–2007.– Vol. 17, № 9. – P. 773-77.
369. Patterson, M.C. Acute melioidosis in a soldier home from South Vietnam./ M.C. Patterson, C.L. Darling, J.B. Blumenthal// *J. Am. Med. Assoc.* – 1967. – Vol. 200. – P. 447–451.
370. Peacock, S. J. Comparison of Ashdown's medium, *Burkholderia cepacia* medium, and *Burkholderia pseudomallei* selective agar for clinical isolation of *Burkholderia pseudomallei* / S. J. Peacock, G. Chieng, A. C. Cheng, D. A. Dance, P. Amornchai, G. Wongsuvan, V. Wuthiekanun // *Journal of clinical microbiology.* – 2005. – Vol. 43, № 10. – P. 5359-5361.
371. Peacock, S. J. Management of accidental laboratory exposure to *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei* / S. J. Peacock, H. P. Schweizer, D. A. Dance, T. L. Smith, J. E. Gee, V. Wuthiekanun, B. J. Currie // *Emerging infectious diseases.* – 2008. – Vol. 14, № 7. – P. e2.
372. Peacock, S.J. The use of positive serological tests as evidence of exposure to *Burkholderia pseudomallei* / S.J. Peacock, A.C. Cheng, B.J. Currie, D.A. Dance // *Am J Trop Med Hyg.* . – 2011. – Vol. 84, № 6. – P. 1021-1022

373. Pearson, T. Phylogeographic reconstruction of a bacterial species with high levels of lateral gene transfer/ T. Pearson, P. Giffard, S. Beckstrom-Sternberg, R. Auerbach, H. Hornstra, A. Tuanyok, G. J. Allan //BMC biology. – 2009. – Vol. 7, № 1. – P. 78.
374. Peetermans, W. E. Melioidosis brain and lung abscess after travel to Sri Lanka / W. E. Peetermans, E. Van Wijngaerden, J. Van Eldere, J. Verhaegen //Clinical infectious diseases. – 1999. – Vol. 28, № 4. – P. 921-22.
375. Peeters, C. *Burkholderia pseudomultivorans* sp. nov., a novel *Burkholderia cepacia* complex species from human respiratory samples and the rhizosphere / C. Peeters, J. E. Zlosnik, T. Spilker, T. J. Hird, J. J. LiPuma, P. Vandamme //Systematic and applied microbiology. – 2013. – Vol. 36, № 7. – P. 483-489.
376. Pelerito, A. *Burkholderia pseudomallei*: First case of melioidosis in Portugal/ A. Pelerito, A. Nunes, S. Coelho, C. Piedade, P. Paixao, R. Cordeiro, S. Nuncio //IDCases. – 2016. – Vol. 3. – P. 10-11.
377. Pet, M. A. Melioidosis der inwendige organen (melioidosis of internal organs)/ M.A. Pet, A. Fossen// Geneeskd Tijdschr Ned Indie. – 1934, №74. – P. 976–981.
378. Phokrai P. A rapid immunochromatography test based on Hcp1 is a potential point-of-care test for serological diagnosis of melioidosis / P. Phokrai, W. Karoonboonyanan, N. Thanapat-tarapiroj, C. Promkong, A. Dulsuk, S. Koosakulnirand, D. Limmathurotsakul, N. Chantratita //Journal of clinical microbiology. – 2018. – doi:10.1128/JCM.00346-18.
379. Pinedo, I. *Burkholderia phytofirmans* PsJN induces long-term metabolic and transcriptional changes involved in Arabidopsis thaliana salt tolerance / I. Pinedo, T. Ledger, M. Greve, M. J. Poupin //Frontiers in plant science. – 2015. – Vol. 6.- C. 466.
380. Podin, Y. *Burkholderia pseudomallei* isolates from Sarawak, Malaysian Borneo, are predominantly susceptible to aminoglycosides and macrolides/ Y. Podin, D. S. Sarovich, E. P. Price, M. Kaestli, M. Mayo, K. Hii, A. Mohan, //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2014. – Vol. 58, № 1. – P. 162-166.
381. Podin, Y. Reliability of automated biochemical identification of *Burkholderia pseudomallei* is regionally dependent/ Y. Podin, M. Kaestli, N. McMahon, J. Hennessy, H. U. Ngian, J. S. Wong, R. W. Baird //Journal of clinical microbiology. – 2013. – Vol. 51, № 9. – P. 3076-3078.
382. Podnecky, N. L. The BpeEF-OprC efflux pump is responsible for widespread trimethoprim resistance in clinical and environmental *Burkholderia pseudomallei* isolates / N. L. Podnecky, V. Wuthiekanun, S. J. Peacock, H. P. Schweizer //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2013. – Vol. 57, № 9. – P. 4381-4386.
383. Pons, R. Melioidosis in Cochin China / Pons, R.; Advier, M.// J. Hyg. – 1927, № 26. – P. 28-30.
384. Price, E. P. Development and validation of *Burkholderia pseudomallei*-specific real-time PCR assays for clinical, environmental or forensic detection applications/ E. P. Price, J. L. Dale, J. M. Cook, D. S. Sarovich, M. L. Seymour, J. L. Ginther, M. B. Glass //PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 5. – P. e37723.
385. Price, E. P. Improved multilocus sequence typing of *Burkholderia pseudomallei* and closely related species / E. P. Price, B. MacHunter, B. G. Spratt, D. M. Wagner, B. J. Currie, D. S. Sarovich //Journal of medical microbiology. – 2016a. – Vol. 65, № 9. – P. 992-997.

386. Price, E. P. Transcriptomic analysis of longitudinal *Burkholderia pseudomallei* infecting the cystic fibrosis lung/ E. P. Price, L.T. Viberg, T.J. Kidd, S.C. Bell, B. J. Currie, D. S. Sarovich // Microbial Genomics. – 2018. – Vol. 4, №8, – P. e000194. doi: 10.1099/mgen.0.000194.
387. Price, E. P. Unprecedented melioidosis cases in northern Australia caused by an Asian *Burkholderia pseudomallei* strain identified by using large-scale comparative genomics/ E. P. Price, D. S. Sarovich, E. J. Smith, B. MacHunter, G. Harrington, V. Theobald, M. Mayo // Applied and environmental microbiology. – 2016b. – VOL. 82, № 3. – P. 954-963.
388. Price, E. P. Whole-genome sequences of *Burkholderia pseudomallei* isolates exhibiting decreased meropenem susceptibility / E. P. Price, M. L. Smith, E. E. Paxinos, L. J. Tallon, L. Sadzewicz, N. Sengamalay, D. S. Sarovich, // Genome announcements. – 2017. – Vol. 5, № 14. – P. e00053-17.
389. Price, E. P. Within-host evolution of *Burkholderia pseudomallei* over a twelve-year chronic carriage infection / E. P. Price, D. S. Sarovich, M. Mayo, A. Tuanyok, K. P. Drees, M. Kaestli, P. Keim // MBio. – 2013. – Vol. 4, № 4. – P. e00388-13.
390. Pumirat, P. Altered secretome of *Burkholderia pseudomallei* induced by salt stress / P. Pumirat, P. Saetun, S. Sinchaikul, S. T. Chen, S. Korbsrisate, V. Thongboonkerd // Biochimica et biophysica Acta (BBA)-Proteins and proteomics. – 2009. – Vol. 1794, № 6. – P. 898-904.
391. Pumirat, P. Effects of sodium chloride on heat resistance, oxidative susceptibility, motility, biofilm and plaque formation of *Burkholderia pseudomallei*/ P. Pumirat, M. Vanaporn, U. Boonyuen, N. Indrawattana et al. // Microbiology Open. – 2017. – Vol. 6, № 4. – P. e00493.
392. Pumirat, P. Global transcriptional profiling of *Burkholderia pseudomallei* under salt stress reveals differential effects on the Bsa type III secretion system/ P. Pumirat, J. Cuccui, R. A. Stabler et al. // BMC microbiology. – 2010. – Vol. 10, № 1. – P. 171.
393. Pumpuang, A. Survival of *Burkholderia pseudomallei* in distilled water for 16 years/ A. Pumpuang, N. Chantratita, C. Wikraiphath, N. Saiprom et al. // Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 2011. – Vol. 105, № 10. – P. 598-600.
394. Pumirat, P. The role of short-chain dehydrogenase/oxidoreductase, induced by salt stress, on host interaction of *B. pseudomallei* / P. Pumirat, U. Boonyuen, M. Vanaporn, P. Pinweha et al. // BMC Microbiol. – 2014. – Vol. 14, №1. doi: 10.1186/1471-2180-14-1.
395. Rainbow, L. Distribution of type III secretion gene clusters in *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis* and *B. mallei*/ L. Rainbow, C. A. Hart, C. Winstanley // J. Med. Microbiol. – 2002. – Vol. 51. – P. 374–384. doi: 10.1099/0022-1317-51-5-374
396. Rakotondrasoa, A. Melioidosis in the Western Indian Ocean and the Importance of Improving Diagnosis, Surveillance, and Molecular Typing./ A. Rakotondrasoa,; M. Issack,; B. Garin,; F. Biot, et al. // Trop. Med. Infect. Dis. – 2018– Vol. 3, №1 – P. 30.
397. Ralph, A. Transmission of *Burkholderia pseudomallei* via breast milk in northern Australia/ A. Ralph, J. McBride, B. J. Currie // The Pediatric infectious disease journal. – 2004. – Vol. 23, № 12. – P. 1169-1171.
398. Ramisse, V. DNA-DNA hybridization study of *Burkholderia* species using genomic DNA macro-array analysis coupled to reverse genome probing / V. Ramisse, J. Balandreau, F. Thibault, D. Vidal, G. Vergnaud // Int J Syst Evol Microbiol. – 2003. – Vol. 53. – P. 739-746.

399. Rammaert, B. Pulmonary melioidosis in Cambodia: a prospective study / B.Rammaert, J. Beauté, L. Borand, S. Hem, P. Buchy, S. Goyet, C. Mayaud //BMC infectious diseases. – 2011. – Vol. 11, № 1. – P. 126.
400. Randall, L. B. Finafloxacin overcomes *Burkholderia pseudomallei* efflux-mediated fluoroquinolone resistance / L. B. Randall, E. Georgi, G. H. Genzel, H. P. Schweizer //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2017. – Vol. 72, № 4. – P. 1258-1260.
401. Reckseidler, S. L. Detection of bacterial virulence genes by subtractive hybridization: identification of capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* as a major virulence determinant/ S. L. Reckseidler, D. DeShazer, P. A. Sokol, D. E. Woods// Infect. Immun . – 2001. – Vol. 69 . – P. 34–44.
402. Reckseidler-Zenteno, S. L. The capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* contributes to survival in serum by reducing complement factor C3b deposition/ S. L. Reckseidler-Zenteno, R. DeVinney, D. E.Woods // Infect. Immun. – 2005. – Vol. 73. – P. 1106–1115.
403. Rholl, D. A. Molecular investigations of PenA-mediated β -lactam resistance in *Burkholderia pseudomallei* / D. A. Rholl, K. M. Papp-Wallace, A. P. Tomaras, M. L. Vasil, R. A. Bonomo, H. P. Schweizer, //Frontiers in microbiology. – 2011. – Vol. 2. – P. 139.
404. Robertson, J. The survival of *Burkholderia pseudomallei* in liquid media / J. Robertson, A. Levy, J. L. Sagripanti, T. J. Inglis //The American journal of tropical medicine and hygiene. – 2010. – Vol. 82, № 1. – P. 88-94.
405. Rogul, M. Nucleic acid similarities among *Pseudomonas pseudomallei*, *Pseudomonas multivorans*, and *Actinobacillus mallei*/ M. Rogul, J. J. Brendle, D. K. Haapala, Alexander A. D. //Journal of bacteriology. – 1970. – V. 101, № 3. – P. 827-835.
406. Rolim, D. B. Melioidosis, northeastern Brazil / D. B. Rolim, D. C. F. L. Vilar, A. Q. Sousa, I. S. Miralles, D. C. A. de Oliveira, G. Harnett, T. J. Inglis, //Emerging infectious diseases. – 2005. – Vol. 11, № 9. – P. 1458.
407. Rolim, D. Melioidosis in South America./ D. Rolim,; R. Lima,; A. Ribeiro,; R. Colares et al.// Trop. Med. Infect. Dis. – 2018. – Vol. 3, № 2. – P. 60.
408. Rongkard, P. Human Immune Responses to Melioidosis and Cross-Reactivity to Low-Virulence *Burkholderia* Species, Thailand/ P Rongkard, B Kronsteiner, V Hantrakun, K Jenjaroen et al. // Emerg Infect Dis. – 2020. – Vol. 26, №3. – P. 463-471.
409. Rossi, B. Melioidosis and hairy cell leukemia in 2 travelers returning from Thailand/ Rossi, B., Epelboin, L., Jauréguiberry, S., Lecso, M., Roos-Weil, D., Gabarre, J., ... Caumes, E. //Emerging infectious diseases. – 2013. – Vol. 19, № 3. – P. 503.
410. Ryan, C. W. Public health response to an imported case of canine melioidosis./ C. W. Ryan, K. Bishop, D. D. Blaney, S. J. Britton, F. Cantone, C. Egan, G. Perkins // Zoonoses and public health. – 2018. – Vol.65, № 4. – P.420-424.
411. Rychert, J. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of *Vibrio cholerae*/ J. Rychert, D. Creely, L. M. Mayo-Smith, S. B. Calderwood, L. C. Ivers, E. T. Ryan, J. B. Harris //Journal of clinical microbiology. – 2015. – Vol.53, № 1. – P. 329-331.

412. Sadiq, M. A mini review on the antimicrobial treatment, mechanisms and patterns of resistance among clinical, veterinary and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei* / M. Sadiq, L. Hassan, S. Aziz, Z. Zakaria // Int. J. Livest Res. – 2016. – Vol. 6, № 1. doi: 10.5455/ijlr.20161118074752
413. Saïdani, N. Melioidosis as a travel-associated infection: case report and review of the literature/ N. Saïdani, K. Griffiths, M. Million, P. Gautret, G. Dubourg, P. Parola, J. C. Lagier//Travel medicine and infectious disease. – 2015. – Vol. 13, № 5. – P. 367-381.
414. Saitou N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // Molecular Biology and Evolution. – 1987. – Vol.4, №4. – P.406-425
415. Salam, A. P. Melioidosis acquired by traveler to Nigeria/ A. P. Salam, N. Khan, H. Malnick, D. T. Kenna, D. A. Dance, J. L. Klein //Emerging infectious diseases. – 2011. – Vol. 17, № 7. – P. 1296.
416. San Martin, P. Melioidosis in the Philippines. / P. San Martin,; J. Chua,; R. Bautista,; J. Nailes et al.// Trop. Med. Infect. Dis. – 2018. – Vol. 3, № 3. – P. 99.
417. Sanchez-Villamil, J. Melioidosis in Mexico, Central America, and the Caribbean./ J. Sanchez-Villamil, A. Torres // Trop. Med. Infect. Dis. – 2018 – Vol. 3, №1 – P. 24.
418. Sarovich, D. Raising the stakes: Loss of efflux-pump regulation decreases meropenem susceptibility in *Burkholderia pseudomallei* / D. S. Sarovich, J. R. Webb, M. C. Pitman, L. T. Viberg, M. Mayo, R. W. Baird, E. P. Price //Clinical Infectious Diseases. – 2018. – Vol. 67, № 2. – P. 243–250
419. Sarovich, D. S. Characterization of ceftazidime resistance mechanisms in clinical isolates of *Burkholderia pseudomallei* from Australia / D. S. Sarovich, E. P. Price, A. T. Von Schulze, J. M. Cook, M. Mayo, T. Pearson // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, 2. – P. e30789.
420. Sarovich, D. S. Phylogenomic analysis reveals an Asian origin for African *Burkholderia pseudomallei* and further supports melioidosis endemicity in Africa /D.S. Sarovich, B. Garin, B. De Smet, M. Kaestli, M. Mayo, P/ Vandamme, I.Djaomalaza//MSphere. – 2016. – Vol. 1, № 2. – P. e00089-15.
421. Sarovich, D. S. Variable virulence factors in *Burkholderia pseudomallei* (melioidosis) associated with human disease / Sarovich, D. S., Price, E. P., Webb, J. R., Ward, L. M., Voutsinos //PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № – P. e91682.
422. Sawana, A. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *ParaBurkholderia* gen. nov. harboring environmental species / A. Sawana, M. Adeolu, R. S. Gupta //Frontiers in genetics. – 2014. – Vol. 5. – P. 429.
423. Schindler, N. Melioidosis presenting as an infected intrathoracic subclavian artery pseudoaneurysm treated with femoral vein interposition graft/ N. Schindler, K. D. Calligaro, M. J. Dougherty, J. Diehl, K. H. Modi, M. N. Braffman, //Journal of vascular surgery. – 2002. – Vol. 35, № 3. – P. 569-572.

424. Schultze, D. A traveller presenting with severe melioidosis complicated by a pericardial effusion: a case report / D. Schultze, B. Müller, T. Bruderer, G. Dollenmaier, J. M. Riehm, K. Boggian //BMC infectious diseases. – 2012. – Vol. 12, № 1. – P. 242.
425. Schwarz, S. VgrG-5 is a *Burkholderia* type VI secretion system-exported protein required for multinucleated giant cell formation and virulence/ S. Schwarz, P. Singh, J. D. Robertson, M. LeRoux// Infection and immunity. – 2014. – Vol. 82, №4. – P. 1445-52.
426. Schweizer, H. P. Mechanisms of antibiotic resistance in *Burkholderia pseudomallei*: implications for treatment of melioidosis/ H. P. Schweizer //Future microbiology. – 2012. – Vol. 7, № 12. – P. 1389-1399.
427. Schweizer, H. P. New insights from the 7th World Melioidosis Congress 2013/ H. P. Schweizer, D. Limmathurotsakul, S. J. Peacock //Emerging infectious diseases. – 2014. – Vol. 20, № 7. – P. e131737. doi:10.3201/eid2007.131737.
428. Shaaban, H. Reactivation of latent melioidosis presenting with acute pyelonephritis and bacteraemia / H. Shaaban, R. Hallit, J. Slim, A. Sree, J. W. Sensakovic //Avicenna journal of medicine. – 2014. – Vol. 4, № 1. – P. 20-21.
429. Shea, A.A. Two stable variants of *Burkholderia pseudomallei* strain MSHR5848 express broadly divergent in vitro phenotypes associated with their virulence differences./ A.A. Shea, R.C. Bernhards, C.K. Cote, C.J. Chase et al.// PLoS One. – 2017. – Vol.12, №2– P. e0171363.
430. Sheibani-Tezerji, R. Transcriptome profiling of the endophyte *Burkholderia phytofirmans* psjn indicates sensing of the plant environment and drought stress/ R. Sheibani-Tezerji, T. Rattei, A. Sessitsch, F. Trognitz, B. Mitter //MBio. – 2015. – Vol. 6, № 5. – P. e00621-15.
431. Shibuya, H. A Japanese case of melioidosis presenting as multiple organ lesions accompanied by sepsis and disseminated intravascular coagulation, after a visit to Thailand/ H. Shibuya, Y. Taniguchi, N. Tashiro, K. Hara, T. Hisada //Kansenshogaku zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases. – 2007. – Vol. 81, № 3. – P. 297-301.
432. Shima, A. L. Conservation and health of Lumholtz's tree-kangaroo (*Dendrolagus lumholtzi*) / A. L. Shima, L. Berger, L. F. Skerratt //Australian Mammalogy. – 2019. – Vol. 41, № 1. – P. 57-64.
433. Shrestha, N. K. Melioidosis imported into Nepal/ N. K. Shrestha, S. K. Sharma, B. Khanal, N. Bhatta, S. S. Dhakal //Scandinavian journal of infectious diseases. – 2005. – Vol. 37, № 1. – P. 64-66.
434. Sim, B. M. Q. Genomic acquisition of a capsular polysaccharide virulence cluster by non-pathogenic *Burkholderia* isolates/ B. M. Q. Sim, N. Chantratita, W. F. Ooi, T. Nandi et al. //Genome biology. – 2010. – Vol. 11, № 8. – P. R89.
435. Sim, S. Melioidosis in Singapore: Clinical, Veterinary, and Environmental Perspectives/ S. Sim, C. Ong, Y. Gan, D. Wang et al. //Tropical medicine and infectious disease. – 2018. – Vol. 3, № 1. – P. 31.
436. Simpson, A. J. H. Aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei* / A. J. H. Simpson, N. J. White, V. Wuthiekanun //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1999. – Vol. 43, № 9. – P. 2332-2332.

437. Simpson, I. N. Multi-resistance isolates possessing characteristics of both *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* and *Burkholderia gladioli* from patients with cystic fibrosis/ I. N. Simpson, J. Finlay, D. J. Winstanley, N. Dewhurst, J. W. Nelson, S. L. Butler, J. R. W. Govan, //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 1994. – Vol. 34, № 3. – P. 353-361.
438. Sinsabaugh, H.A. Emendation of the Description of *Pseudomonas cepacia* Burkholder (Synonyms: *Pseudomonas multivorans* Stainer, *Pseudomonas kingae* Jonsson; EO-1 Group) / H. A. Sinsabaugh, Jr. G. W. Howard //International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1975. – Vol. 25, № 2. – P. 187-201.
439. Sirijant, N. *Burkholderia pseudomallei* resistance to antibiotics in biofilm-induced conditions is related to efflux pumps / N. Sirijant, R. W. Sermswan, S. Wongratanacheewin //Journal of medical microbiology. – 2016. – Vol. 65, № 11. – P. 1296-1306.
440. Smith, M. D. Arabinose assimilation defines a nonvirulent biotype of *Burkholderia pseudomallei* / M. D. Smith, B. J. Angus, V. Wuthiekanun, N. J. White //Infection and immunity. – 1997. – Vol. 65, № 10. – P. 4319-4321.
441. Smith, M. D. Quantitative recovery of *Burkholderia pseudomallei* from soil in Thailand/M.D. Smith, V. Wuthiekanun, A.L. Walsh, N.J. White //Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 1995. – Vol. 89, № 5. – P. 488-490.
442. Smith, S. Melioidosis: an Australian perspective./ S. Smith, J. Hanson, B. Currie //Tropical medicine and infectious disease. – 2018. – Vol. 3, № 1. – P. 27.
443. Snell, J. J. S. Identification of *Pseudomonas cepacia* Burkholder and its synonymy with *Pseudomonas kingii* Jonsson/ J. J. S. Snell, L. R. Hill, S. P. Lapage, M. A. Curtis //International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1972. – Vol. 22, № 3. – P. 127-138.
444. Snijders, S. L. Melioidosis: the importance of a detailed medical history, including recent travels / S. L. Snijders, J. F. Meis, A. S. Dofferhoff //Nederlands tijdschrift voor geneeskunde. – 2010. – Vol. 154. – P. A279-A279.
445. Son, J. Y. Fatal melioidosis in a tourist returning from Cambodia/ J. Y. Son, K. T. Kwon, E. J. Choi, J. P. Park, D. Y. Song, J. C. Lee, C. H. Choi, //Korean Journal of Medicine. – 2009. – Vol. 77, № 2. – P. 246-250.
446. Song, H. The early stage of bacterial genome-reductive evolution in the host/ H. Song, J. Hwang, H. Yi, R. L. Ulrich, Y. Yu, W. C. Nierman, H. S. Kim //PLoS pathogens. – 2010. – Vol. 6, № 5. – P. e1000922.
447. Songsivilai, S. Multiple replicons constitute the 6.5-megabase genome of *Burkholderia pseudomallei*/ S. Songsivilai, T. Dharakul //Acta tropica. – 2000. – Vol. 74, № 2. – P. 169-179.
448. Songsri, J. Cross-reactivity of latex agglutination assay complicates the identification of *Burkholderia pseudomallei* from soil/ J. Songsri, Y. Kinoshita, W. Kwanhian, S. Wisessombat et al. // FEMS Microbiol Lett. – 2018. – Vol.365, №22. – P. 10.1093/femsle/fny256.
449. Sousa, S. A. *Burkholderia cepacia* complex: emerging multihost pathogens equipped with a wide range of virulence factors and determinants / S. A. Sousa, C. G. Ramos, J. H. Leitao //International journal of microbiology. – 2010. – Vol. 2011. doi:10.1155/2011/607575

450. Spletstoesser, W. D. Validation and comparison of an extrapolysaccharide (EPS)-based in-house ELISA and the PanBio melioidosis rapid cassette test-kits for serodiagnosis of melioidosis in a non-endemic area/ W. D. Spletstoesser, D. Frangoulidis, S. D. Puthuchery //Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 2008. – Vol. 102, № Supplement_1. – P. S45-S46.
451. Sprague, L. D. Melioidosis in animals: a review on epizootiology, diagnosis and clinical presentation. / L.D. Sprague, H. Neubauer //Journal of Veterinary Medicine, Series B. –2004.– Vol. 51, №7. – P. 305-320.
452. Spring-Pearson, S. M. Pangenome analysis of *Burkholderia pseudomallei*: genome evolution preserves gene order despite high recombination rates/ S. M. Spring-Pearson, J. K. Stone, A. Doyle, C. J. Allender et al. //PLoS One. – 2015. – Vol. 10, №. 10. – P. e0140274.
453. Srinivasan A. Glanders in a military research microbiologist / A. Srinivasan, C.N. Kraus, D. DeShazer, P.M. Becker, J.D. Dick, L. Spacek, J.G. Bartlett, W.R. Byrne, D.L. Thomas // New Engl. J. Med. – 2001. – Vol.345. – P. 256-258.
454. Srinon V. *Burkholderia pseudomallei* BimC is required for actin-based motility, intracellular survival, and virulence/ V. Srinon, S. Chaiwattananarungruengpaisan, S. Korbsrisate, J. M. Stevens //Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2019. – Vol. 9. – P. 63. doi: 10.3389/fcimb.2019.00063
455. Srisanga, K. Polyphosphate kinase 1 of *Burkholderia pseudomallei* controls quorum sensing, RpoS and host cell invasion/ K. Srisanga, P. Suthapot, P. Permsirivisarn, P. Govitrapong // J Proteomics. – 2019. – Vol. 194. – P. 14-24.
456. Stanton, A.T. Melioidosis: Studies from the Institute for Medical Research, Federated Malay States./ A.T. Stanton, W. Fletcher. – London, England: John Bale & Sons and Danielson Ltd. 1932. – 97p.
457. Starzacher, A. K. Case report: eine Melioidose in Berlin/ A. K. Starzacher, M. Knappik, N. Schönfeld, T. T. Bauer, D. Kaiser, M. Tönnies, H. Rüssmann // Pneumologie. – 2014. – Vol. 68, № S 01. – P. P103.
458. Steinmetz, I. Melioidosis in Africa: Time to Uncover the True Disease Load. / I. Steinmetz,; G. Wagner,; E. Kanyala,; M. Sawadogo/, et al.// Trop. Med. Infect. Dis. – 2018. – Vol. 3, № 2. – P. 62.
459. Stewart, T. Epidemiology and investigation of melioidosis, southern Arizona/ T. Stewart, D. M. Engelthaler, D. D. Blaney, A. Tuanyok, E. Wangsness, T. L. Smith, C. Levy //Emerging infectious diseases. – 2011. – Vol. 17, № 7. – P. 1286–1288.
460. Stevens, J. M. Actin-binding proteins from *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* can functionally compensate for the actin-based motility defect of a *Burkholderia pseudomallei* bimA mutant/ J. M. Stevens, R. L. Ulrich, L. A. Taylor, M. W. Wood, et al. // Journal of bacteriology. – 2005. – Vol. 187, №. 22. – P. 7857-7862.
461. Suárez-Moreno, Z. R. Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia*/ Z. R. Suárez-Moreno, J. Caballero-Mellado, B. G. Coutinho, L. Mendonça-Previato, E. K. James, V. Venturi, //Microbial Ecology. – 2012. – Vol. 63, № 2. – P. 249-266.

462. Subran, B. Melioidosis in a European traveler without comorbidities: a case report and literature review/ B. Subran, F. Ackermann, L. Watin-Augouard, B. Rammaert, C. Rivoisy, D. Vilain, J. E. Kahn //International Journal of Infectious Diseases. – 2013. – Vol. 17, № 9. – P. e781-e783.
463. Suppiah, J. Development and evaluation of polymerase chain reaction assay to detect *Burkholderia* genus and to differentiate the species in clinical specimens / J. Suppiah, J. S. Thimma, S. H. Cheah, J. Vadivelu // FEMS Microbiology Letters. – 2010. – Vol. 306, № 1. – P. 9-14.
464. Suttisunhakul, V. Evaluation of Polysaccharide-Based Latex Agglutination Assays for the Rapid Detection of Antibodies to *Burkholderia pseudomallei*/ V. Suttisunhakul, N. Chantratita, C. Wikraiphath, et al. //Am J Trop Med Hyg. – 2015. – Vol.93, №3. – P. 542-546.
465. Suttisunhakul, V. Development of Rapid Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Antibodies to *Burkholderia pseudomallei*/ V. Suttisunhakul, V. Wuthiekanun, P.J. Brett, S. Khusmith et al. //J Clin Microbiol. – 2016. – Vol.54, №5. – P. 1259-68.
466. Suttisunhakul, V. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Burkholderia pseudomallei* from Asia and Australia and differentiation between *Burkholderia* species/ V. Suttisunhakul, A. Pumpuang, P. Ekchariyawat, V. Wuthiekanun, M. G. Elrod, P. Turner, S. J. Peacock //PloS one. – 2017. – Vol. 12, № 4. – P. e0175294.
467. Svensson, E. Cutaneous melioidosis in a Swedish tourist after the tsunami in 2004/ E. Svensson, C. Welinder-Olsson, B. A. Claesson, M. Studahl //Scandinavian journal of infectious diseases. – 2006. – Vol. 38, № 1. – P. 71-74.
468. Tabacchioni, S. Molecular characterization of rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*/ S. Tabacchioni, P. Visca, L. Chiarini, A. Bevivino, C. Di Serio, S. Fancelli, R. Fani //Research in microbiology. – 1995. – Vol. 146, № 7. – P. 531-542.
469. Tamtami, N. A. L. Imported case of melioidosis in Oman: Case report/ N. A. L. Tamtami, F. Khamis, A. Al-Jardani //Oman medical journal. – 2017. – Vol. 32, № 1. – P. 62-65.
470. Tamura, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees/ K. Tamura, M. Nei //Molecular biology and evolution. – 1993. – Vol. 10, № 3. – P. 512-526.
471. Tan, K. S. Suppression of host innate immune response by *Burkholderia pseudomallei* through the virulence factor TssM/ K. S. Tan, Y. Chen, Y. C. Lim, G. Y. G. Tan et al. //The Journal of Immunology. – 2010. – Vol. 184, № 9. – P. 5160-5171.
472. Tandhavanant, S. Effect of colony morphology variation of *Burkholderia pseudomallei* on intracellular survival and resistance to antimicrobial environments in human macrophages in vitro/ S. Tandhavanant, A. Thanwisai, D. Limmathurotsakul, S. Korbsrisate, N. P. Day, S. J. Peacock, N. Chantratita, //BMC microbiology. – 2010. – Vol. 10, № 1. – P. 303.
473. Tandhavanant, S. Monoclonal antibody-based immunofluorescence microscopy for the rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in clinical specimens/ S. Tandhavanant, G. Wongsuvan, V. Wuthiekanun, N. Teerawattanasook, N.P.J. Day, D. Limmathurotsakul, S.J. Peacock, N. Chantratita// Am J Trop Med Hyg. – 2013. – Vol. 89, №1 – P. 165–168.

474. Tauran, P. Emergence of Melioidosis in Indonesia and Today's Challenges / P. Tauran, S. Wahyunie, F. Saad, A. Dahesihdewi et al. // Tropical medicine and infectious disease. – 2018. – Vol. 3, № 1. – P. 32. doi:10.3390/tropicalmed3010032
475. Teo, L. Cutaneous melioidosis / L. Teo, Y.K. Tay, K.J. Mancer // J Eur Acad Dermatol Venereol. – 2006. Vol. 20, № 10. – P. 1322e4.
476. Thatrimontrichai, A. Neonatal melioidosis: systematic review of the literature / A. Thatrimontrichai, G. Maneenil // The Pediatric infectious disease journal. – 2012. – Vol. 31, № 11. – P. 1195-1197.
477. Thibault, F. M. Antibiotic susceptibility of 65 isolates of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* to 35 antimicrobial agents / F. M. Thibault, E. Hernandez, D. R. Vidal, M. Girardet, J. D. Cavallo et al. // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2004. – Vol. 54, № 6. – P. 1134-1138.
478. Thibault, F.M. Identification and discrimination of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, and *B. thailandensis* by real-time PCR targeting Type III secretion system genes / F.M. Thibault, E. Valade, D.R. Vidal, // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 2, № 12. – P. 5871–5874.
479. Thin R. N. T. Melioidosis antibodies in Commonwealth soldiers // The Lancet. – 1976. – Vol. 307, № 7949. – P. 31-33.
480. Thompson, J. D. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice / J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson // Nucleic acids research. – 1994. – Vol. 22, № 22. – P. 4673-4680.
481. Titball, R. W. *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* vaccines: are we close to clinical trials? / R. W. Titball, M. N. Burtnick, G. J. Bancroft, P. Brett et al. // Vaccine. – 2017. – Vol. 35, № 44. – P. 5981-5989.
482. Toesca, I. J. The Type VI secretion system spike protein VgrG5 mediates membrane fusion during intercellular spread by *pseudomallei* group *Burkholderia* species/ I. J. Toesca, C. T. French, J. F. Miller // Infection and immunity. – 2014. – Vol. 82, № 4. – P. 1436-1444.
483. Tonpitak, W. Fatal melioidosis in goats in Bangkok, Thailand./ W. Tonpitak, C. Sornklien, M. Chawanit, S. Pavasutthipaisit, V. Wuthiekanun, V. Hantrakun, et al. // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 2014. – Vol. 91. – P. 287–290.
484. Török, M. E. Bacterial gene loss as a mechanism for gain of antimicrobial resistance/ M. E. Török, N. Chantratita, S. J. Peacock // Current opinion in microbiology. – 2012. – Vol. 15, № 5. – P. 583-587.
485. Treerat P. The *Burkholderia pseudomallei* proteins BapA and BapC are secreted TTSS3 effectors and BapB levels modulate expression of BopE/ P. Treerat, P. Alwis, T. D'Cruze, M.Cullinane, J. Vadivelu et al. // PloS one. – 2015. – Vol. 10, № 12. – P. e0143916.
486. Trepanier, S. Characterization of the penA and penR genes of *Burkholderia cepacia* 249 which encode the chromosomal class A penicillinase and its LysR-type transcriptional regulator / S. Trepanier, A. Prince, A. Huletsky // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1997. – Vol. 41, № 11. – P. 2399-2405.

487. Tribuddharat, C. *Burkholderia pseudomallei* class A β -lactamase mutations that confer selective resistance against ceftazidime or clavulanic acid inhibition/ C. Tribuddharat, R. A. Moore, P. Baker, D. E. Woods //Antimicrobial agents and chemotherapy.–2003.– Vol. 47, №7.– P. 2082-87.
488. Trinh, T. Melioidosis in Vietnam: Recently Improved Recognition but still an Uncertain Disease Burden after Almost a Century of Reporting / T. Trinh, L. Nguyen, T. Nguyen, C. Tran et al. //Tropical medicine and infectious disease. – 2018. – Vol.3., № 2. – P. 39.doi:10.3390/tropicalmed3020039
489. Trinh, T. T. A simple laboratory algorithm for diagnosis of melioidosis in resource-constrained areas: a study from north-central Vietnam / T. T. Trinh, T. S. Hoang, D. A. Tran, V. T. Trinh, A. Göhler, T. T. Nguyen, P. M. Doan //Clinical Microbiology and Infection. – 2018. – Vol. 24, № 1. – P. 84.
490. Trunck, L. A. Molecular basis of rare aminoglycoside susceptibility and pathogenesis of *Burkholderia pseudomallei* clinical isolates from Thailand / L. A. Trunck, K. L. Propst, V. Wuthiekanun, A. Tuanyok, S. M. Beckstrom-Sternberg, J. S. Beckstrom-Sternberg, H. P. Schweizer //PLoS neglected tropical diseases. – 2009. – Vol. 3, № 9. – P. e519.
491. Truong, K. K. Case of a Lung Mass due to Melioidosis in Mexico/ K. K. Truong, S. Moghadam, S. Al Saghbin, B. Saatian //The American journal of case reports. – 2015. – Vol. 16. – P. 272-275.
492. Tuanyok A. *Burkholderia humptydooensis* sp. nov., a New Species Related to *Burkholderia thailandensis* and the Fifth Member of the *Burkholderia pseudomallei* Complex/ A. Tuanyok, M. Mayo, H. Scholz, C. M. Hall, C. J. Allender, M. Kaestli, E. W. Settles //Applied and environmental microbiology. – 2017. – Vol. 83, № 5. – P. e02802-16.
493. Tuanyok, A. Genome-wide expression analysis of iron regulation in *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* using DNA microarrays/ A. Tuanyok, H. S. Kim, W. C. Nierman, et al.// *FEMS Microbiology Letters*. – 2005. – Vol. 252, № 2. – P. 327–335.
494. Turton, J. F. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species / J. F. Turton, N. Woodford, J. Glover, S. Yarde, M. E. Kaufmann, T. L. Pitt, //Journal of clinical microbiology. – 2006. – Vol. 44, № 8. – P. 2974-2976.
495. Ulrich, R. L. Type III secretion: a virulence factor delivery system essential for the pathogenicity of *Burkholderia mallei* / R. L. Ulrich, D. DeShazer //Infection and Immunity. – 2004. – Vol. 72, № 2. – P. 1150-1154.
496. Ursing, J. B. Taxonomic note: a pragmatic approach to the nomenclature of phenotypically similar genomic groups/ J. B. Ursing, R. A. Rossello-Mora, E. Garcia-Valdes, and J. Lalucat. //International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1995. – Vol. 45, № 3. – P. 604-604.
497. Utaisinchaoen, P. *Burkholderia pseudomallei* RpoS regulates multinucleated giant cell formation and inducible nitric oxide synthase expression in mouse macrophage cell line (RAW 264.7) / P. Utaisinchaoen, S. Arjcharoen, K. Limposuwan, S. Tungpradabkul, S. Sirisinha //Microbial pathogenesis. – 2006. – Vol. 40, № 4. – P. 184-189.

498. Vadivelu, J. Diagnostic and prognostic value of an immunofluorescent assay for melioidosis / J. Vadivelu, S. D. Puthuchery //The American journal of tropical medicine and hygiene. – 2000. – Vol. 62, № 2. – P. 297-300.
499. Vadivelu, J. Serodiagnosis of melioidosis in Malaysia / J. Vadivelu, S. D. Puthuchery, G. S. Gendeh, N. Parasakthi //Singapore medical journal. – 1995. – Vol. 36. – P. 299-302.
500. Valentine, N. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry/ N. Valentine, S. Wunschel, D. Wunschel, C. Petersen, K. Wahl // Applied and Environmental Microbiology – 2005. – Vol. 71. – P. 58–64.
501. Van Zandt, K. E. Glanders: an overview of infection in humans / K. E. Van Zandt, M. T. Greer, H. C. Gelhaus// Orphanet journal of rare diseases. – 2013. – Vol. 8, № 1. – P. 131.
502. Vanaporn, M. Superoxide dismutase C is required for intracellular survival and virulence of *Burkholderia pseudomallei* / M. Vanaporn, M. Wand, S. L. Michell, M. Sarkar-Tyson et al.//Microbiology. – 2011. – Vol.157, № 8. – P. 2392-2400.
503. Vanaporn, M. The rpoE operon regulates heat stress response in *Burkholderia pseudomallei* / M. Vanaporn, P. Vattanaviboon, V. Thongboonkerd, S. Korbsrisate //FEMS microbiology letters. – 2008. – Vol. 284, № 2. – P. 191-196.
504. Vanaporn, M. Trehalase plays a role in macrophage colonization and virulence of *Burkholderia pseudomallei* in insect and mammalian hosts / M. Vanaporn, M. Sarkar-Tyson, A. Kovacs-Simon, P. M. Ireland et al.//Virulence. – 2017. – Vol. 8, № 1. – P. 30-40.
505. Vandamme, P. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools / P. Vandamme, D. Henry, T. Coenye, S. Nzula, M. Vancanneyt, J. J. LiPuma, E. Mahenthiralingam //FEMS Immunology Medical Microbiology. – 2002. – Vol. 33, № 2. – P. 143-149.
506. Vandamme, P. Diversity and role of *Burkholderia* spp // In: *Burkholderia* Molecular microbiology and genomics./ P. Vandamme, J. Govan, J.J. LiPuma, T. Coenye, P. Vandamme (eds).– Horizon Bioscience, Norfolk, 2007. – P. 1-28.
507. Vandamme, P. Occurrence of Multiple Genomovars of *Burkholderia cepacia* in Cystic Fibrosis Patients and Proposal of *Burkholderia multivorans* sp. Nov/ P. Vandamme, B. Holmes, M. Vancanneyt, T. Coenye, B. Hoste, R. Coopman, J. R. W. Govan //International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1997. – Vol. 47, № 4. – P. 1188-1200.
508. Vander Broek, C. W. Type III secretion in the melioidosis pathogen *Burkholderia pseudomallei* / C. W. Vander Broek, J. M. Stevens //Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2017. – Vol.7. – P. 255.
509. Vanlaere, E. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex/ E. Vanlaere, J. J. LiPuma, A. Baldwin, D. Henry, E. De Brandt, E. Mahenthiralingam, P. Vandamme //International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2008. – Vol. 58, № 7. – P. 1580-1590.
510. Vanlaere, E. Matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of-flight mass spectrometry of intact cells allows rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex / E. Vanlaere, K. Sergeant, P. Dawyndt, W. Kallow, M. Erhard, H. Sutton, D. Dare, B. Devreese, B. Samyn, P.

- Vandamme // J Microbiol Methods. – 2008. – Vol. 75, №2. – P.279–286.
511. Vanlaere, E. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. Nov/ E. Vanlaere, A. Baldwin, D. Gevers, D. Henry, E. De Brandt, J. J. LiPuma, P. Vandamme //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2009. – Vol. 59, № 1. – P. 102-111.
512. Vasu, C. The humoral immune response in melioidosis patients during therapy/ C. Vasu, J. Vaidivelu, S. D. Puthuchery //Infection. – 2003. – Vol. 31, № 1. – P. 24-30.
513. Vaucel, M. Présence probable du bacille de Whitmore dans l'eau de mare au Tonkin. / M. Vaucel.// Bull. Soc. Pathol. Exot. – 1937, № 30. – P. 10–15.
514. Vermis, K. Evaluation of species-specific recA-based PCR tests for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex/ K. Vermis, T. Coenye, E. Mahenthiralingam, H.J. Nelis, P. Vandamme //Journal of medical microbiology. – 2002. – Vol. 51, № 11. – P. 937-940.
515. Vermis, K. Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. nov / K. Vermis, T. Coenye, J. J. LiPuma, E. Mahenthiralingam, H. J. Nelis, P. Vandamme //International journal of systematic and evolutionary microbiology.– 2004.– Vol.54, № 3. – P. 689-91.
516. Verstraete, B. Phylogenetic lineages in *Vanguerieae* (*Rubiaceae*) associated with *Burkholderia* bacteria in sub-Saharan Africa/ B. Verstraete, S. Janssens, B. Lemaire, E. Smets, S. Dessein //American journal of botany. – 2013. – Vol. 100, № 12. – P. 2380-2387.
517. Vial, L. *Burkholderia* diversity and versatility: an inventory of the extracellular products / L. Vial, M. C. Groleau, V. Dekimpe, E. Deziel //Journal of microbiology and biotechnology. – 2007. – Vol. 17, № 9. – P. 1407-1429.
518. Viberg, L. T. Within-host evolution of *Burkholderia pseudomallei* during chronic infection of seven Australasian cystic fibrosis patients/ L. T. Viberg, D. S. Sarovich, T. J. Kidd, J. B. Geake, S. C. Bell, B. J. Currie, E. P. Price //MBio. – 2017. – Vol. 8, № 2. – P. e00356-17.
519. Vidyalakshmi, K. Emerging clinico-epidemiological trends in melioidosis: analysis of 95 cases from western coastal India //International Journal of Infectious Diseases. – 2012. – Vol. 16, № 7. – P. e491-e497.
520. Vielle, A. Un nouveau cas de mélioiïdose en Cochinchine./ A. Vielle, H.G.S. Morin, C. Massias // Bull. Soc. Med. Chir. Indoch. – 1926, № 4. – P. 459–465.
521. Visca, P. Travel-associated *Burkholderia pseudomallei* infection (melioidosis) in a patient with cystic fibrosis: a case report / P. Visca, G. Cazzola, A. Petrucca, C. Braggion, //Clinical Infectious Diseases. – 2001. – Vol. 32, № 1. – P. e15-e16.
522. Vollmar, P. Osteomyelitis caused by *Burkholderia pseudomallei*: relapse six years after pulmonary infection./ P. Vollmar, S. Zange, N. Fieser, J. Riehm, L. Zöller, B. Thoma // Clin Lab. – 2014. – Vol. 60, № 9. – P. 6515-1567.
523. Wajanarogana, S. PCR-RFLP analysis of the flagellin sequences for identification of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia cepacia* from clinical isolates/ S. Wajanarogana, S.

- Tungpradabkul, S. Tunpiboonsak, S.Panyim // *Molecular and cellular probes*. – 1999. – Vol. 13, № 2. – P. 99-105.
524. Wajanarogana, S. Efficacy of indirect ELISA for serodiagnosis of melioidosis using immunodominant antigens from non-pathogenic *Burkholderia thailandensis*/ S. Wajanarogana, K. Kritsiriwuthinan // Springerplus. – 2016. – Vol. 19, № 5. – P. 1814.
525. Walsh, C. Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities/ C. Walsh, T. Wencewicz / – American Society for Microbiology (ASM), 2016. – 477c.
526. Wang, X. Evolution of an antibiotic resistance enzyme constrained by stability and activity trade-offs / X. Wang, G. Minasov, B. K. Shoichet // *Journal of molecular biology*. – 2002. – Vol. 320, № 1. – P. 85-95.
527. Warner, J. Melioidosis in Papua New Guinea and Oceania./ J. Warner,; B. Currie // *Trop. Med. Infect. Dis.* – 2018 – Vol. 3, №1 – P. 34.
528. Webb, J. R. Loss of methyltransferase function and increased efflux activity leads to doxycycline resistance in *Burkholderia pseudomallei* / J. R. Webb, E. P. Price, B. J. Currie, D. S. Sarovich // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2017. – Vol. 61, № 6. – P. e00268-17.
529. Weber, D.R. Acute varieties of melioidosis occurring in US soldiers in Vietnam./ D.R. Weber, L.E. Douglass, W.G. Brundage, T.C. Stallkamp.// *Am. J. Med.* – 1969. – Vol. 46. – P. 234–244.
530. Webling, D. D. A. Genito-urinary infections with *Pseudomonas pseudomallei* in Australian Aborigines/ D. D. A. Webling//*Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.– 1980.– Vol.74, №1. – P.138-39.
531. Weissert, C. *Burkholderia pseudomallei* misidentified by automated system/ C. Weissert, G. Dollenmaier, P. Rafeiner, J. Riehm, D. Schultze // *Emerging infectious diseases*. – 2009. – Vol. 15, № 11. – P. 1799-801.
532. Weisskopf, L. *Burkholderia* species are major inhabitants of white lupin cluster roots/ L. Weisskopf, S. Heller, L. Eberl // *Applied and environmental microbiology*. – 2011. – Vol. 77, № 21. – P. 7715-7720.
533. White, N. J. Halving of mortality of severe melioidosis by ceftazidime./ N. J. White, D. A. Dance, W. Chaowagul, Y. Wattanagoon // *Lancet* .– 1989. – Vol. 2. – P. 697–701.
534. Whitmore A. On the bacteriology of an infective disease occurring in Rangoon. / A. Whitmore // *The British Medical Journal*. – 1912. – P. 1306-1308.
535. Wiersinga, W. J. Melioidosis / W. J. Wiersinga, B. J. Currie, S. J. Peacock // *New England Journal of Medicine*. – 2012. – Vol. 367, № 11. – P. 1035-1044.
536. Wiersinga, W. J. Melioidosis / W. J. Wiersinga, H. S. Virk, A. G. Torres, B. J. Currie, S. J. Peacock, D. A. Dance, D. Limmathurotsakul // *Nature reviews Disease primers*. – 2018. – Vol.. 4. – P. 17107.
537. Willcocks, S. J. Intracellular replication of the well-armed pathogen *Burkholderia pseudomallei*/ S. J. Willcocks, C. C. Denman, H. S. Atkins, B. W. Wren // *Current opinion in microbiology*. – 2016. – Vol. 29. – P. 94-103.

538. Wikraiphat, C. Colony morphology variation of *Burkholderia pseudomallei* is associated with antigenic variation and O-polysaccharide modification/C. Wikraiphat, N. Saiprom, S. Tandhavanant, C. Heiss, P. Azadi, P. et al. //Infection and immunity. – 2015. – T. 83. – № 5. – C. 2127-2138.
539. Win, M. Melioidosis in Myanmar. / M. Win,; E. Ashley,; K. Zin,; M. Aung et al.//Trop. Med. Infect. Dis. – 2018– Vol. 3, №1 – P. 28.
540. Wixon, J. Featured organism: reductive evolution in bacteria: *Buchnera* sp., *Rickettsia prowazekii* and *Mycobacterium leprae* / J.Wixon //Comparative and functional genomics. – 2001. – Vol. 2, № 1. – P. 44-48.
541. Woo, P. C. Y. Seronegative bacteremic melioidosis caused by *Burkholderia pseudomallei* with ambiguous biochemical profile: clinical importance of accurate identification by 16S rRNA gene and groEL gene sequencing / P. C. Y. Woo, S. K. Lau, G. K. Woo, A. M. Fung, A. H. Ngan, W. T. Hui, K. Y. Yuen //Journal of clinical microbiology. – 2003. – Vol. 41, № 8. – P. 3973-3977.
542. Woo, P. C. Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories/ P. C. Y. Woo, S. K. P. Lau, J. L. L. Teng, H. Tse, K. Y. Yuen, //Clinical Microbiology and Infection. – 2008. – Vol. 14, № 10. – P. 908-934.
543. Wuthiekanun V. Quantitation of *B. pseudomallei* in clinical samples / V. Wuthiekanun, D. Limmathurotsakul, G. Wongsuvan, W. Chierakul, N. Teerawattanasook, P. Teparrukkul, S. J. Peacock //The American journal of tropical medicine and hygiene. – 2007. – Vol. 77, № 5. – P. 812-813.
544. Wuthiekanun, V. Trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in clinical isolates of *Burkholderia pseudomallei* / V. Wuthiekanun, A. C. Cheng, W. Chierakul, P. Amornchai, D. Limmathurotsakul, W. Chaowagul, N. J. White //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2005. – Vol. 55, № 6. – P. 1029-1031.
545. Wuthiekanun, V. Development of antibodies to *Burkholderia pseudomallei* during childhood in melioidosis-endemic northeast Thailand/ V. Wuthiekanun, W. Chierakul, S. Langa, W. Chaowagul, C. Panpitpat, P. Saipan, S. J. Peacock //The American journal of tropical medicine and hygiene. – 2006. – Vol. 74, № 6. – P. 1074-1075.
546. Wuthiekanun, V., Short report: a rapid method for the differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*./ V. Wuthiekanun, N. Anuntagool, N.J. White, S. Sirisinha // Am J Trop Med Hyg. – 2002. – Vol. 66. – P.759–761.
547. Yabuuchi, E. Identification of Oklahoma isolate as a strain of *Pseudomonas pseudomallei*/ E. Yabuuchi, Y. Kosako, M. Arakawa, H. Hotta, I. Yano //Microbiology and immunology. – 1992a. – Vol. 36, № 12. – P. 1239-1249.
548. Yabuuchi, E. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov./ E. Yabuuchi, Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki, M. Arakawa.// Microbiol. Immunol. – 1992b. – Vol. 36 – P. 1251-1275.

549. Yabuuchi, E. Survival of *Pseudomonas pseudomallei* strains at 5 degrees C/ E. Yabuuchi, L. Wang, M. Arakawa, I. Yano //Kansenshogaku zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases. – 1993. – Vol. 67, № 4. – P. 331-335.
550. Yao, Q. A bacterial type III effector family uses the papain-like hydrolytic activity to arrest the host cell cycle/ Q. Yao, J. Cui, Y. Zhu, G. Wang et al. // Proc Natl Acad Sci U S A . – 2009 . – Vol. 10 – P. 3716-21.
551. Yee, K. C. Melioidosis, the great mimicker: a report of 10 cases from Malaysia / K. C. Yee, M. K. Lee, C. T. Chua, S. D. Puthuchery //The Journal of tropical medicine and hygiene. – 1988. – Vol. 91, № 5. – P. 249-254..
552. Yi, H. Substrate spectrum extension of PenA in *Burkholderia thailandensis* with a single amino acid deletion, Glu168del / H. Yi, K. Kim, K. H. Cho, O. Jung, H. S. Kim //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2012a. – Vol. 56, № 7. – P. 4005-4008.
553. Yi, H. The tandem repeats enabling reversible switching between the two phases of β -lactamase substrate spectrum / H. Yi, H. Song, J. Hwang, K. Kim, W. C. Nierman, H. S. Kim //PLoS genetics. – 2014. – Vol. 10, № 9. – P. e1004640.
554. Yi, H. Twelve positions in a β -lactamase that can expand its substrate spectrum with a single amino acid substitution / H. Yi, K. H. Cho, Y. S. Cho, K. Kim, W. C. Nierman, H. S. Kim //PLoS One. – 2012b. – Vol. 7, № 5. – P. e37585.
555. Yip, T. W. Endemic melioidosis in residents of desert region after atypically intense rainfall in central Australia, 2011/ T. W. Yip, S. Hewagama, M. Mayo, E. P. Price et al. // Emerging infectious diseases. – 2015. – Vol. 21, № 6. – P. 1038-1040.
556. Yohalem, D. S. Multilocus isoenzyme diversity among strains of *Pseudomonas cepacia* isolated from decayed onions, soils, and clinical sources/ D. S. Yohalem, J. W. Lorbeer //Systematic and applied microbiology. – 1994. – Vol. 17, № 1. – P. 116-124.
557. Yuan, Y. The first imported case of melioidosis in a patient in central China/Y. Yuan, Z. Yao, E. Xiao, J. Zhang, B. Wang et. al. //Emerging microbes & infections. – 2019. – Vol. 8, №. 1. – P. 1223-1228.
558. Yu, Y. Genomic patterns of pathogen evolution revealed by comparison of *Burkholderia pseudomallei*, the causative agent of melioidosis, to avirulent *Burkholderia thailandensis* / Y. Yu, H. S. Kim, H. H. Chua, C. H. Lin, S. H. Sim, D. Lin, W. C. Nierman //BMC microbiology. – 2006. – Vol. 6, № 1. – P. 46. doi:10.1186/1471-2180-6-46
559. Zheng, X. Endemic Melioidosis in Southern China: Past and Present. / X. Zheng,; Q. Xia,; L. Xia,; W. Li // Trop. Med. Infect. Dis. – 2019, Vol.4, №1. – P. 39.
560. Zhou, N. Whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid identification of bacteria cultured in liquid media / N. Zhou, N. Wang, B. Xu, J. Wang, J. Fang, F. Dong, K. He, X. Yang // Sci. China Life Sci. – 2011. – Vol. 54. – P. 48-53.
561. Zhou, X. H. Nonparametric estimation of ROC curves in the absence of a gold standard / X. H. Zhou, P. Castelluccio, C. Zhou //Biometrics. – 2005. – Vol. 61, № 2. – P. 600-609.

562. Zong, Z. Misidentification of *Burkholderia pseudomallei* as *Burkholderia cepacia* by the VITEK 2 system / Z. Zong, X. Wang, Y. Deng, T. Zhou // Journal of medical microbiology. – 2012. – Vol. 61, № 10. – P. 1483-1484.
563. Zueter, A. R. Skin infection caused by *Burkholderia thailandensis*: Case report with review / A. R. Zueter, M. Abumarzouq, C. Y. Yean, A. Harun // Journal of Microbiology Infectious Diseases.– 2016.– Vol. 6, № 2. – P. 92-95.