

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

На правах рукописи

Лопастейская Яна Анатольевна

**Системы автоматизированного
микробиологического анализа в лабораторной
диагностике патогенных буркхольдерий**

03.02.03 - микробиология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
доцент Викторов Д.В.

Волгоград 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Современная распространенность и эпидемиологические особенности мелиоидоза и сапа	13
1.2 Микробиологическая характеристика возбудителей мелиоидоза и сапа	22
1.3 Актуальные проблемы бактериологической диагностики мелиоидоза и сапа	28
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	37
2.1 Штаммы, питательные среды и условия культивирования	37
2.2 Пробоподготовка и проведение идентификации в системах бактериологического анализа	40
2.2.1 Постановка тестов и учёт результатов с использованием планшет IDS на платформе MICROTAX	40
2.2.2 Постановка тестов и учет результатов с использованием микробиологического анализатора Vitek 2	42
2.3 Масс-спектрометрическое профилирование штаммов буркхольдерий	44
2.4 Методы статистической обработки данных	45
Глава 3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ БУРКХОЛЬДЕРИЙ ГРУППЫ «PSEUDOMALLEI» ПО ПРИЗНАКАМ БИОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ	47
3.1 Идентификация патогенных буркхольдерий с использованием наборов Micronault IDS	47
3.2 Идентификация патогенных буркхольдерий на микробиологическом анализаторе Vitek 2	53
Глава 4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ БУРКХОЛЬДЕРИЙ ГРУППЫ «PSEUDOMALLEI» С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СРАВНИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗА МАСС-СПЕКТРОВ КОНСЕРВАТИВНЫХ КЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ	64
4.1 Выбор оптимальной схемы пробоподготовки клеток патогенных буркхольдерий для MALDI-TOF масс-спектрометрии.	64
4.2 Сравнительный анализ масс-спектров коллекционных штаммов <i>B. pseudomallei</i> и <i>B. mallei</i> и формирование референтных масс-спектров для их идентификации в MALDI-TOF MS	68
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	77
ВЫВОДЫ	94
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	97

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.

Burkholderia pseudomallei и *B. mallei*, в отличие от многих бактериальных патогенов, имеют ограниченное распространение в мире, тем не менее, интерес к их изучению поддерживается сведениями о высокой опасности микроорганизмов для человека и различных видов животных. В последние годы отношение к мелиоидозу стало более пристальным не только в эндемичных по данной инфекции регионах Юго-Восточной Азии и Северной Австралии, где улучшение диагностики привело к значительному росту числа подтвержденных случаев заболевания, но и в ряде стран Старого Света, Северной и Латинской Америки. Что касается сапа, то, хотя заболеваемость им людей отмечается редко, в некоторых странах, в том числе, сопредельных с Россией (Турция, Иран, Монголия, Италия, Саудовская Аравия) продолжают регистрировать вспышки заболевания у животных, увеличиваются грузо - и пассажиропотоки из эндемичных по сапу районов, что не исключает возможности завоза инфекции в нашу страну. Малая осведомленность и настороженность органов здравоохранения в отношении этих инфекций является причиной того, что лабораторных исследований, направленных на выявление патогенных буркхольдерий в случаях возникновения заболеваний неясной этиологии у туристов и лиц, прибывающих из эндемичных по данным инфекциям территорий, у нас в стране не проводится.

Мелиоидоз и сап у людей нередко протекают в тяжелой форме и трудно поддаются лечению. Своеобразие мелиоидоза определяется выраженным полиморфизмом клинических проявлений, оппортунистическим характером инфекции, которая может длительное время не проявлять себя и быстро развиться до пневмонии и септицемии (летальность более 90%) при снижении иммунитета, травмах, диабете, хронической патологии почек, ретровирусной инфекции и на фоне гормональной терапии [Dance D.A. 2000]. Однако даже при латентном течении и активной химиотерапии не исключена возможность

рецидивов, которые могут возникать в течение ряда последующих лет [Puthuchery, Vadivelu, 2002]. Необходимо также помнить, что *Burkholderia pseudomallei* и *B. mallei* по-прежнему рассматриваются как возможные агенты биологического оружия и средства осуществления биотеррористических актов, что подчеркивает актуальность исследований, направленных на разработку и совершенствование методов их обнаружения и идентификации. Учитывая реальную возможность завоза мелиоидоза и сапа на территорию Российской Федерации из эндемичных по данным инфекциям регионов мира, быстрая и точная диагностика данных инфекций необходима для своевременной постановки диагноза и начала адекватного лечения заболевания и организации соответствующих противоэпидемических мероприятий.

Классическая схема идентификации культур *B. pseudomallei* и *B. mallei* основывается, главным образом, на изучении культурально-морфологических и биохимических свойств микроорганизмов. Успехи последнего времени классического бактериологического метода идентификации культур возбудителей связаны, прежде всего, с широким внедрением в лабораторную практику полуавтоматических и автоматических идентификационных систем типа API, Vitek, и ряда других. Вместе с тем, несмотря на разнообразие микробиологических идентификационных тест-систем, применяемых сегодня в лабораторной диагностике патогенных буркхольдерий, задача определения оптимального набора дифференцирующих тестов для этих микроорганизмов остается актуальной. Речь идет, прежде всего, о проблемах точной идентификации атипичных штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа, дифференциации изолятов патогенных буркхольдерий от иммунологически и генетически близких им непатогенных сапрофитных представителей рода, широко распространенных в естественных биоценозах эндемичных регионов.

Внедрение в практику лабораторных исследований новых экспрессных автоматизированных методов расширенной идентификации *B. pseudomallei* и

B. mallei также является важной задачей в аспектах совершенствования схемы лабораторной диагностики сапа и мелиоидоза и детальной паспортизации штаммов возбудителей.

Степень научной разработанности темы.

Существенное увеличение числа регистрируемых в разных странах завозных случаев мелиоидоза и сапа обусловлено не столько расширением ареала данных инфекций, сколько хорошо налаженной лабораторной диагностикой. Именно это является причиной того, что практически во всех странах Западной Европы за последние годы зарегистрированы случаи мелиоидоза среди лиц, побывавших в эндемичных регионах с туристическими или деловыми целями [Cheng, Currie, 2005; Dance, 2000].

В основе лабораторной диагностики сапа и мелиоидоза лежит принцип полифазного подхода, сочетающий применение разнообразных методов анализа фенотипических свойств и молекулярно-генетических особенностей изолятов микроорганизмов. Вследствие филогенетической близости, *B. pseudomallei* и *B. mallei* свойственно значительное сходство фенотипических признаков, что существенно затрудняет их дифференциацию методами классического микробиологического анализа. В то же время, ряд биохимических признаков микроорганизмов обладает существенной изменчивостью как на межвидовом, так и внутривидовом уровне.

В коммерческих автоматизированных и полуавтоматизированных микробиологических анализаторах (API, Vitek, BioLOG, BBL Crystal и др.), используемых в диагностической бактериологии, идентификация изолятов патогенных буркхольдерий ведется с применением наборов биохимических тестов для грамотрицательных неферментирующих микроорганизмов. Необходимо отметить, что существуют определенные сложности идентификации возбудителей мелиоидоза и сапа с использованием микробиологических биохимических анализаторов. В первую очередь речь идет об ошибках идентификации в отношении близкородственных

буркхольдерий со схожими биохимическими признаками [Howard, Inglis, 2003]. Кроме того, атипичные по биохимическим профилям штаммы возбудителей сапа и мелиоидоза достаточно часто неверно идентифицируются с использованием микробиологических анализаторов [Inglis et al., 2005].

Учитывая довольно большое разнообразие коммерчески доступных систем биохимической идентификации, представляется целесообразным проведение сравнительного анализа их эффективности для установления видовой принадлежности и дифференциации штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа.

Другой перспективной диагностической технологией в отношении микробной идентификации в настоящее время становится масс-спектрометрический анализ консервативных клеточных протеинов методом времяпролетной матричной лазерной десорбции-ионизации (MALDI-TOF). Возможность получения специфичных для конкретного штамма масс-спектров с последующим их анализом дают основание для использования данного метода на этапах идентификации и внутривидовой классификации микроорганизмов.

Необходимо отметить, что в доступных идентификационных базах данных референтных масс-спектров микроорганизмов, виды *B. pseudomallei* и *B. mallei* либо вовсе не представлены, либо представлены масс-спектры очищенных образцов их рибосомальных протеинов, что делает использование технологии MALDI-TOF для идентификации штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа крайне затруднительным без существенного расширения баз масс-спектров и формирования референтных масс-спектров для каждого из видов патогенных буркхольдерий.

Цель работы:

Совершенствование алгоритмов идентификации *Burkholderia pseudomallei* и *B. mallei* с использованием систем автоматизированного микробиологического анализа.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ эффективности применения коммерческих полуавтоматических и автоматических биохимических идентификационных тестов для подтверждения видовой принадлежности и дифференциации штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа.
2. Выявить набор биохимических тестов, имеющих ключевое значение для точной идентификации видов патогенных буркхольдерий и их дифференциации от близкородственных микроорганизмов.
3. Разработать комплекс методических приемов пробоподготовки, обеспечивающий необходимый уровень биологической безопасности при масс-спектрометрическом профилировании культур *B. pseudomallei* и *B. mallei* методом MALDI-TOF MS.
4. Получить набор характеристических масс-спектров возбудителей мелиоидоза и сапа и разработать раздел электронной базы данных MALDI-TOF спектров S.A.R.A.M.I.S.[™] для идентификации штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*.
5. Разработать дополнения к регламентированным схемам лабораторной диагностики мелиоидоза и сапа в части использования современных систем микробиологического анализа.

Научная новизна:

С использованием различных биохимических идентификационных тестов исследованы и охарактеризованы фенотипические признаки, имеющие принципиальное значение для корректного установления видовой принадлежности культур *B. pseudomallei* и *B. mallei* и проведения внутривидовой дифференциации возбудителей.

Впервые установлено, что при проведении биохимической идентификации исследуемых культур возбудителя мелиоидоза, совокупность отрицательных результатов тестов β -N-ацетилглюкозаминидазы (BNAG), β -N-ацетилгалактозаминидазы (NAGA), фосфатазы (PHOS), и наличии

активности D-целлобиазы (dCEL), L-пролинариламидазы (ProA) и тирозинариламидазы (TyrA) приводит к идентификации штаммов *B. pseudomallei* с низкой дискриминацией, а сочетание положительного результата теста на активность D-целлобиазы и отрицательных тестов NAGA, TyrA и ProA ведет к ошибочной идентификации возбудителя мелиоидоза как *B. ceracia*.

Разработан комплекс методических приемов пробоподготовки, обеспечивающий эффективную белковую экстракцию, высокую воспроизводимость масс-спектрометрического анализа и необходимый уровень безопасности работ при MALDI-TOF масс-спектрометрии клеток *B. pseudomallei* и *B. mallei*.

Сформированы идентификационные масс-спектры патогенных видов *Burkholderia* spp. и разработан оригинальный раздел электронной базы данных MALDI-TOF спектров S.A.R.A.M.I.S.TM для идентификации и типирования изолятов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, позволяющие осуществлять видовую идентификацию штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа с приемлемой достоверностью.

Теоретическая и практическая значимость:

Материалы исследований, выполненных в рамках диссертационной работы, использованы при разработке разделов проектов методических рекомендаций «Создание баз данных референсных масс-спектров возбудителей I-II групп патогенности для проведения автоматической идентификации микроорганизмов методом масс-спектрометрии», «Лабораторная диагностика возбудителей мелиоидоза и сапа», при формировании единой базы 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), а также при составлении ряда нормативно-методических документов учрежденческого уровня внедрения.

Комплекс технологических приемов использования автоматизированных систем микробиологического анализа, апробированный в ходе выполнения работы, применяется для идентификации, типирования, сравнительного анализа штаммов *B.mallei* и *B.pseudomallei* в лабораториях Волгоградского НИПЧИ и в работе Референс-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза.

Разработанные в ходе выполнения диссертационного исследования методические приемы и аналитические алгоритмы используют для паспортизации и углубленного изучения коллекционных штаммов патогенных буркхольдерий, их свойств в лабораториях Волгоградского научно-исследовательского противочумного института и работе Референс-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза.

Методология и методы исследования:

Данное исследование основано на проведении сравнительного анализа эффективности применения распространенных коммерческих полуавтоматических и автоматических биохимических идентификационных тестов для установления видовой принадлежности и дифференциации штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа, а также разработке методологии пробоподготовки бактериальных культур и получения набора характеристических масс-спектров возбудителей мелиоидоза и сапа для идентификации штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* методом MALDI-TOF MS.

При выполнении работы использованы идентификационные биохимические наборы Micronault IDS (SY-Lab, Австрия), API 20 NE (Biomerieux, Франция) и Vitek 2 GN (Biomerieux, Франция).

При проведении масс-спектрического анализа клеточных экстрактов различных штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа использовался масс-

спектрометр Axima Performance™ (Shimadzu, Япония) и инструментарий программного комплекса S.A.R.A.M.I.S. v. 3.62 (Anagnostec, Германия).

При сравнительном анализе профилей биохимической активности исследуемых штаммов использована неметрическая многомерная градация (nonmetric multidimensional scaling, nMDS), а также метод непараметрического анализа сходства (analysis of similarities, ANOSIM). Для вычисления среднего вклада индивидуальных биохимических тестов в различия между штаммами применялась процедура анализа процента подобия (similarity percentage, SIMPER).

Кластерный анализ масс-спектров общеклеточных белков коллекционных штаммов патогенных буркхольдерий проводили с использованием алгоритма Neighbor-Joining.

Положения, выносимые на защиту:

1. Некорректная идентификация ряда штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа при применении биохимических идентификационных наборов широкой специфичности (Micronault IDS и аналоги) обусловлена межштаммовой вариабельностью таких биохимических признаков, как активность ферментов фосфодиэстеразы (DIP), хитиназы (CHIT), пролинамидазы (PRO), ассимиляция мальтозы (MALA), ферментация глюкозы (GLUF).

2. В случае использования идентификационных наборов Vitek 2 GN, совокупность отрицательных результатов тестов NAGA, BNAG, PHOS и положительных dCEL, TugA и ProA приводит к идентификации штаммов *B. pseudomallei* с низкой дискриминацией, а сочетание положительного результата теста на активность D-целлобиазы и отрицательных тестов NAGA, TugA и ProA ведет к ошибочной идентификации возбудителя мелиоидоза как *B. ceracia*.

3. Оптимальной схемой культивирования *B. pseudomallei* и *B. mallei*, обеспечивающей достаточный уровень воспроизводимости и высокие

качественные характеристики получаемых клеточных масс-спектров является выращивание клеток микроорганизмов в течение 18 - 24 ч при 37°C на агаре Luria.

4. Наиболее эффективным методом пробоподготовки культур патогенных буркхольдерий для масс-спектрометрического профилирования, обеспечивающим как обеззараживание, так и эффективную экстракцию белковых компонентов, является обработка муравьиной кислотой и ацетонитрилом.

5. Сформированные видовые референтные «суперспектры» обще клеточных белков *B. pseudomallei* и *B. mallei*, содержащие набор наиболее характерных и стабильно воспроизводимых спектральных пиков, и разработанный на их основе оригинальный раздел электронной базы данных референтных MALDI-TOF спектров S.A.R.A.M.I.S.TM позволяют проводить видовую идентификацию штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа с приемлемой достоверностью (score ≥ 75 %).

Степень достоверности и апробация результатов:

Диссертация выполнена в рамках государственной темы № 081-3-13 (№ гос. регистрации 01201351985). Основные результаты исследований изложены в 9 опубликованных работах, из них 4 - в рецензируемых периодических изданиях, входящих в перечень ВАК. Результаты исследований по теме диссертационной работы были представлены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (23-24 мая 2012г., г. Ставрополь), Международной научно-практической конференции «Перспективы сотрудничества государств - членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных заболеваний» (25-26 мая 2015г., г. Сочи), научно-практической конференции молодых ученых и специалистов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, «Современное состояние и

перспективные разработки в области диагностики, микробиологии и эпидемиологии мелиоидоза, сапа, глубоких микозов и лихорадки Западного Нила» (г. Волгоград, май 2015г.), VII Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (г. Санкт-Петербург, 8-10 декабря 2015г.), научно-практической конференции молодых ученых и специалистов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора «Современное состояние и актуальные направления фундаментальных и прикладных исследований в отношении опасных инфекционных болезней» (г. Волгоград, май 2016 г.), Всероссийском ежегодном конгрессе «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика» (13-15 октября 2016 г., г. Санкт-Петербург), XIII Межгосударственной научно-практической конференции «Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005г.) до 2016 года» (25-26 октября 2016г., г. Саратов), VII Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (г. Москва, 1-3 ноября 2016 г.).

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 123 листах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, методической части, 2 глав экспериментальных исследований, заключения, выводов и списка литературы, включающего 214 источников, в том числе 30 отечественных и 184 - зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 12 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 СОВРЕМЕННАЯ РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕЛИОИДОЗА И САПА

Мелиоидоз эндемичен для ряда стран Юго-Восточной Азии (Таиланд, Малайзия, Камбоджа, Вьетнам, Лаос, Мьянма, Гонконг, Тайвань, Сингапур), территорий южного Китая, Индостана, а также северной Австралии, Папуа Новой Гвинеи, Западной и Центральной Африки, о. Мадагаскар, в западном полушарии – Пуэрто-Рико, Сальвадора, островов Карибского бассейна, стран Латинской Америки (Венесуэла, Бразилия, Эквадор), где возбудитель входит в состав микробиоты почвы и воды стоячих водоемов.

Во второй половине XX века мелиоидоз был признан заболеванием, имеющим важное значение для здравоохранения Юго-Восточной Азии и северной Австралии. Ежегодная регистрация болезни в эндемичных очагах составляет до 50 случаев на 100 000 населения [Cheng, Currie, 2005]. Мелиоидоз занимает третье место по смертности от инфекционных болезней в Таиланде, уступая только ВИЧ-инфекции и туберкулезу [Limmathurotsakul, Reasock, 2011]. Считается, что нозоареал мелиоидоза соответствует приблизительно 20° с.ш. и 20° ю.ш. [Leelarasamee, 1989; Leelarasamee, 2000]. Однако крупные вспышки болезни были отмечены за пределами этой зоны в Австралии [Ketterer et al., 1986]. Аутохтонные случаи мелиоидоза были также отмечены в штате Квинсленд, Западная Австралия, в долине реки Brisbane [Ketterer et al., 1975].

В Австралии до середины 20-го века не было отмечено случаев мелиоидоза людей [Cheng, Currie, 2005]. В Австралии мелиоидоз был впервые обнаружен при вспышке болезни у овец на севере штата Квинсленд [Cottew, 1950]. Первые случаи заболевания человека с летальным исходом стали регистрироваться с 1950 - 1960 гг.

Заболееваемость мелиоидозом в Австралии колебалась от 16,5 случаев на 100 тысяч населения в конце 1990-х годов [Currie et al., 2000] до 40 случаев на 100 тысяч населения в начале 2000-х и позднее [Faa, Holt, 2002]. Исследование образцов из внешней среды (почва, ил, вода поверхностных водоемов) выявило широкое распространение возбудителя на севере Австралии [Thomas et al, 1979; Thomas et al, 1980].

В Таиланде ежегодно выделяют несколько тысяч штаммов *B. pseudomallei*. Наряду с большим числом клинических изолятов возбудителя, значительное количество штаммов выделяют из почвы, чаще всего с поверхности рисовых плантаций [Finkelstein et al., 2000; Wuthiekanun et al., 1995].

В Таиланде и северных районах Австралии, где в настоящее время регистрируется наибольшее число заболевших, исследования образцов из внешней среды (почва, ил, вода поверхностных водоемов) выявляют широкое распространение возбудителя. Неоднократно описаны вспышки заболевания, связанные с контаминацией запасов питьевой воды. Серологические обследования, проведенные среди различных групп населения в эндемичных по мелиоидозу регионах (северная Австралия, Таиланд, КНР, Тайвань, Сингапур, Камбоджа, Малайзия, северная и центральная Бразилия) демонстрируют высокий процент серопозитивности (до 35 - 40 %) прежде всего в группах, связанных с сельскохозяйственным производством. Подъем заболеваемости населения мелиоидозом в эндемичных регионах, как правило, приурочен к влажному климатическому периоду года (сезон дождей). Природные аномалии и катастрофы, связанные с обширным обводнением территорий эндемичных регионов, также сопровождаются выраженным подъемом заболеваемости мелиоидозом [Chen et al., 2014]. Так, локальные вспышки мелиоидоза были отмечены в Таиланде, Индонезии, Шри-Ланке, Индии в период после цунами 2004 г., на юге Тайваня после тайфуна 2005 г.,

в Бразилии (штат Ceara) после наводнения в 2003 г., на северных территориях Австралии после продолжительного дождливого сезона 2009-2010 гг.

Первый документированный случай мелиоидоза в Южной Америке описан в Эквадоре в 1960-х годах [Biegeleisen et al., 1964]. Первый лабораторно подтвержденный случай мелиоидоза человека был зарегистрирован в Бразилии в феврале 2003 г. [Miralles et al., 2003; Rolim et al., 2005; Rolim et al., 2011].

Географическая распространенность случаев мелиоидоза существенно расширилась в последнее двадцатилетие. Так, описаны случаи мелиоидоза в Новой Каледонии, эндемичность мелиоидоза установлена в Папуа Новая Гвинея [Currie, 1993; Currie et al., 2000], спорадические случаи мелиоидоза описаны в африканских странах – Нигерии, Гамбии, Кении, Уганде [Birnie et al., 2015; Dance et al., 1991], но в целом распространение этой болезни в Африке мало изучено и некоторые сообщения сомнительны.

Все более актуальной становится проблема заболеваемости мелиоидозом деловых людей и туристов, посещающих эндемичные регионы мира [Cahn et al., 2009; Dance et al., 1999; Carlson, Seppanen, 2000; McBride, 2008; Visca et al., 2001]. Недавно описан случай мелиоидоза с поражением легких и костного мозга и 55-летнего туриста из Франции через год после посещения Камбоджи. Два случая мелиоидоза у жителей США, по-видимому, были связаны с пребыванием в Гондурасе.

Регистрация случаев мелиоидоза в странах умеренных широт практически всегда связана с завозом инфекции из эндемичных территорий. Большинство завозных случаев мелиоидоза (более 100) зарегистрировано в США среди ветеранов войны во Вьетнаме [Clayton et al., 1979].

На долю США также приходится большинство из зарегистрированных случаев завоза инфекции за последние 10 лет (36 случаев). В последнее время случаи мелиоидоза регистрировались также в Бельгии, Испании, Великобритании, Норвегии, Швеции, Финляндии, ФРГ, Израиле; в

эпиданамнезе заболевших показано посещение эндемичных по мелиоидозу территорий. 23 случая завоза мелиоидоза в страны Европы и Средиземноморского региона в период 2010 – 2015 гг. распределены следующим образом: 9 случаев завоза из Индии, все в Великобританию; 5 случаев завоза из Таиланда (3 – в Финляндию, 1 – в Бельгию, 1 – в Израиль), 3 случая завоза из Бангладеш (все в Великобританию), по 1 случаю завоза из Гамбии (в Испанию) и Мадагаскара (в Бельгию), по 1 случаю завоза в Финляндию и Испанию с территории Юго-Восточной Азии и экваториальной Африки (оба случая заболевания выявлены у лиц, посещавших несколько стран в обозначенных регионах) [Nasner-Posso, et al., 2015].

Согласно опубликованным недавно результатам прогнозно-аналитических исследований профильных специалистов из университетов Oxford и Cambridge (Великобритания), Mahidol (Таиланд), Fortaleza (Бразилия), Департамента пандемических и эпидемических заболеваний ВОЗ (Швейцария), Национального института здоровья (США) и ряда других исследовательских центров, современная заболеваемость мелиоидозом в мире может быть оценена на уровне 165000 случаев/год, а уровень смертности от инфекции составляет порядка 80000 случаев ежегодно, что сравнимо с показателем ежегодной смертности от кори (96500 случаев/год) и превышает смертность от лептоспироза (50000 случаев/год) и лихорадки Денге (9100 – 12500 случаев/год), при этом более 90 % летальных случаев мелиоидоза приходится на регионы Южной, Юго-Восточной Азии и Океании [Limmathurotsakul et al., 2015].

Полагают, что в большинстве случаев контакт с *B. pseudomallei* здоровых индивидуумов не вызывает заболевания с выраженными клиническими симптомами [Limmathurotsakul, Peacock, 2011]. Клинические случаи обычно возникают вскоре после заражения, однако *B. pseudomallei* может оставаться в организме в течение многих лет в латентной форме.

Максимальный инкубационный период, который был отмечен у ветерана II мировой войны, составляет 62 года [Ngauy et al., 2005].

B. pseudomallei – пластичный организм, который в состоянии выживать в неблагоприятных условиях внешней среды [Inglis, Sagripanti, 2006], включая длительный дефицит питания [Wuthiekanun et al., 1995], наличие антисептиков и детергентов [Sookpranee et al., 1989; Gal et al., 2004], высокую кислотность (рН до 4.5) [Dejsirilert et al., 1991], широкий диапазон температур (24°C–32°C) и дегидратацию (содержание соли в воде до 10 %) [Tong et al., 1996; Chen et al., 2003]. Однако он малоустойчив к облучению ультрафиолетовым светом [Tong et al., 1996]. По-видимому, жесткие условия внешней среды могут обеспечить селективное преимущество для роста *B. pseudomallei*, по сравнению с другими микроорганизмами. Наибольшее значение для инфицирования людей имеет контакт с влажной почвой и водной поверхностью, где обитает возбудитель [Strauss et al., 1969; Nachiangmai et al., 1985; Wuthiekanun et al., 1995].

Существуют три основных способа заражения мелиоидозом, приводящих к заболеванию: инокуляция, ингаляция и алиментарный путь, но относительное значение каждого из них точно не установлено [Cheng, Currie, 2005]. Наиболее часто инфицирование связано с проникновением микроба через кожу. Небольшие повреждения кожи на ногах у лиц, занятых в сельскохозяйственном производстве способствуют развитию заболевания [Chaowagul et al., 1989]. До четверти от общего числа больных мелиоидозом, обследованных в Австралии, имели повреждения кожных покровов [Currie et al., 2000].

B. pseudomallei относится к потенциальным агентам биотерроризма [Bossi et al., 2004; Bossi et al., 2005; Jeddloh et al., 2003; Warawa, Woods. 2002]. На моделях экспериментальных животных доказана высокая опасность аэрогенного мелиоидоза [Jeddloh et al., 2003], но за исключением нескольких случаев внутрилабораторного заражения [Imported melioidosis-South Florida,

2005; Green, 1968; Piliouras et al., 2000], вне эндемических очагов случаи заболевания людей, связанные с намеренным распространением возбудителя, не зафиксированы. Потенциальный риск *B. pseudomallei* как биологического оружия связан с его естественной антибиотикорезистентностью и отсутствием средств специфической профилактики [Cheng, Currie, 2005].

Существует большое количество факторов риска развития мелиоидоза. Особенно часто среди больных мелиоидозом встречаются индивидуумы с сахарным диабетом. До 60% пациентов имеют предсуществующий или вновь диагностируемый диабет типа 2 [Keluangkhhot et al., 2005; Chen et al., 2014; Currie et al., 2006; Suputtamongkol et al., 1994; Suputtamongkol et al., 1999].

Другие факторы риска заболеваемости мелиоидозом включают возраст свыше 40 лет и некоторые сопутствующие заболевания, помимо сахарного диабета. Придается значение болезням легких, хроническим нарушениям функции почек, чрезмерному потреблению алкоголя [Gopalakrishnan et al., 2013; Hanna et al., 2010; Malczewski et al., 2005]. Имеются наблюдения о таких факторах риска как злокачественные образования и цистический фиброз [Malczewski et al., 2005; Corral et al., 2008]. Факторами риска для возникновения первичной мелиоидозной пневмонии являются также ревматическая болезнь сердца, хроническая обструктивная болезнь легких и курение [Merianos et al., 1993].

Повышенный риск заболеваемости мелиоидозом может быть связан с применением стероидов [Suputtamongkol et al., 1999]. Во многих случаях прослеживается взаимосвязь между мелиоидозом и хроническим гранулематозом [Dorman et al., 1998; Suttmoller et al., 1957]. Фактором риска может признается также нарушение функции фагоцитов у больных гемосидерозом [Maegraith, Leithead, 1964; Rolim et al., 2005]. В то же время полагают, что инфицирование ВИЧ не относится к известным факторам риска развития мелиоидоза [Chierakul et al., 2005; Chierakul et al., 2004].

Сап – высококонтагиозное и часто смертельное зоонозное заболевание преимущественно непарнокопытных животных, таких как лошади, мулы и ослы [Al-Ani, Roberson, 2007; Hornstra et al., 2009; Sprague, Neubauer, 2004; Van Zandt et al., 2013]. Они являются естественным резервуаром *B. mallei* в природе. У ослов обычно развивается острая форма сапа, тогда как у лошадей чаще возникает хроническая и латентная инфекция. У мулов зафиксирована как острая, так и хроническая форма болезни. Многие виды хищных животных могут заражаться в естественных условиях при поедании мяса инфицированных сапом лошадей [Alibasoglu et al., 1986; Bossi et al., 2004; Gilad, 2007]. В лабораторных условиях к сапу восприимчивы хомячки, мыши, морские свинки, кролики и виды приматов [Fritz et al., 2000; Fritz et al., 1999; Khan et al., 2013; Woods, 2002]. В естественных условиях отмечена чувствительность к сапу верблюдов [Wernery et al., 2011].

Сап к началу 1950-х гг. был ликвидирован среди животных и людей в Канаде, США, восточной Европе, включая территории бывшего СССР [Nicoletti, 2007; Van Zandt et al., 2013; Waag, DeShazer, 2004; Darling, Woods, 2004]. В современной России случаи сапа среди животных не регистрировались.

Вместе с тем, болезнь еще остается эндемичной в некоторых регионах Африки, Азии, Среднего Востока, Центральной и Южной Америки [Al-Ani, Roberson, 2007; Dvorak, Spickler, 2008; Khan et al., 2013]. Так, в Индии крупные вспышки сапа описаны в различных частях страны между 1976 г. и 1982 г. Позднее спорадические случаи отмечены в 1988 г., 1990 г. и 1998 г. [Malik et al., 2012]. Диагноз сапа у ослов, подтвержденный выделением *B. mallei*, поставлен в одном из штатов Бразилии [Mota et al., 2010]. Wernery et al. [Wernery et al., 2011] подтвердили естественную инфекцию сапом одногорбых верблюдов (дромадеров) в Бахрейне. По данным Wittig et al. [Wittig et al., 2006] количество вспышек сапа на лошадях в Азии и Южной Америке значительно возросло. Авторы считают, что болезнь в любое время может быть занесена в

свободные от сапа регионы мира лошадьми с субклиническими формами болезни.

Передача сапа от животных человеку в прошлом была достаточно частым явлением, хотя болезнь не всегда возникала даже при постоянном и близком контакте с больными животными [Bossi et al., 2004; Rotz et al., 2002]. Тем не менее, основным фактором риска заболевания сапом людей остается тесный контакт с больными животными, и, таким образом, существует профессиональный риск для ветеринаров и других специалистов. Факторы передачи, связанные с употреблением зараженных *B. mallei* продуктов и воды возможны, но, по-видимому, они не играют существенной роли в инфицировании людей сапом [Waag, DeShazer, 2004].

Передача сапа от человека человеку редка и описана лишь при уходе за больными, или при вскрытии погибших от сапа [DeShazer, 2000]. Было также описано заболевание сапом членов семьи при уходе за больным [Сап, под. ред. Н.Г.Тихонова, 1995].

В настоящее время наибольший риск инфицирования сапом связан с манипуляциями с возбудителем в лабораторных условиях. Заражение в лабораторных условиях обычно приводит к развитию острой формы сапа [Rusnak et al., 2004; Srinivasan et al., 2001; Waag, DeShazer, 2004]. Считают, что проникновение *B. mallei* через неповрежденную кожу человека не происходит, хотя во многих случаях повреждения кожи могут быть малозаметными. Также путями передачи инфекции являются ингаляция, а также проникновение микроба через слизистую носа, рта и конъюнктивы [Van Zandt et al., 2013]. Значимость аэрозольного пути инфицирования *B. mallei* подтверждается случаями заболеваемости сотрудников микробиологических лабораторий [Rusnak et al., 2004; Srinivasan et al., 2001].

Инкубационный период при острой форме сапа составляет 1-14 дней, тогда как при хронической - он может достигать 12 недель. Локализованная кожная форма обычно возникает в течение 2-5 дней после инфицирования,

тогда как при легочной форме клинические симптомы могут развиваться через 10-14 дней после заражения. Септицемия отмечается в течение двух недель после появления клинических симптомов [Van Zandt et al., 2013].

Возбудитель сапа общепризнан как потенциальное биологическое оружие [Сап, под. ред. Н.Г.Тихонова, 1995; CDC, 2000; Cheng,2005; Darling, Woods, 2004; Dvorak, Spickler, 2008; Rotzet al., 2008; Van Zandt et al., 2013; Waag, DeShazer, 2004].

На сегодняшний день нет документально подтвержденных данных о возможностях размножения возбудителя сапа во внешней среде, вне нахождения в условиях макроорганизма, ввиду относительно низкой его устойчивости в окружающей среде, хотя сохраняться в объектах внешней среды он может достаточно долгое время. Так, *B. mallei* чувствителен к ультрафиолетовому облучению, прямой солнечный свет убивает микроб в течение нескольких десятков минут. В то же время, в условиях темноты и влажной атмосферы возбудитель может сохранять свои биологические свойства до нескольких месяцев [Ларионов, 1995; Dvorak, Spickler, 2008].

В воде и гниющих материалах возбудитель сохраняется до трех недель, а в носовом отделяемом до двух недель. Возбудитель сапа недостаточно устойчив к действию высоких температур. При 50-55°C в водной суспензии *B. mallei* инактивируется в течение 30 мин, а при кипячении погибает в течение нескольких минут. Возбудитель сапа обладает также слабой устойчивостью к действию дезинфицирующих средств [Андрус, 1995; Dvorak, Spickler, 2008].

1.2 МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МЕЛИОИДОЗА И САПА

B. pseudomallei – грамотрицательный микроорганизм, подвижный за счет полярно расположенных жгутиков, способный продуцировать вещество капсулы. Эти хорошо известные сегодня свойства возбудителя мелиоидоза, установленные в работах разных лет, составляют его общую

морфологическую характеристику, многократно упомянутую в различных исследованиях [Chambon, 1956; Stanier, 1966; Palleroni, 1975; Gillardi, 1971; Киприанова, 1976; Михайлова, 1983].

Микроорганизм имеет типичную для грамотрицательных бактерий субмикроскопическое строение [Palleroni, 1970; Ряпис 1975; Михайлова, 1983; Каплиев, 1989; Попов и др., 1990, Попов и др., 1994]. В отличие от *B. pseudomallei*, у *B. mallei* не обнаружены пили, а также жгутиковый аппарат, ответственный за подвижность [Palleroni, 1970, Ряпис 1975, Каплиев 1988, Попов 1995].

Микроорганизм представляет собой прямую или слегка изогнутую цилиндрическую палочку с закругленными краями. Для клеток *B. mallei* характерен более выраженный, чем у *B. pseudomallei* полиморфизм. На ультратонких срезах клетки *B. mallei* также имеют структуру, соответствующую общему принципу строения грамотрицательных микроорганизмов [Ряпис, 1975, Попов, 1995].

Культуральные и биохимические свойства *B. pseudomallei* и *B. mallei* подробно изучены. Сведения о них систематизированы в работах, касающихся, главным образом, определения таксономической принадлежности и идентификации этих микроорганизмов, а также в практических руководствах и методических пособиях по лабораторной диагностике опасных инфекционных болезней [Palleroni, 1975, 1984; Gillardi 1968, 1971; Yabuuchi, 1992; Al-Ani and Roberson, 2007; Mota et al., 2010; Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней, 2009, 2013].

Несмотря на установленную высокую степень генетического родства, возбудители мелиоидоза и сапа отличаются по ряду биологических свойств как экологически отдельные виды, адаптированные к определенным условиям существования [Godoy, 2003; Nierman, 2004].

Оба микроба неприхотливы по отношению к питательным средам и условиям выращивания. Как факультативные аэробы, они хорошо растут в

атмосфере кислорода на простых средах различного состава, в том числе, синтетических, содержащих в качестве единственного источника углерода и азота глюкозу и серноокислый аммоний [Ширяев, 1976; Gillardi, 1971]. Присутствие в среде нитрата делает возможным рост этих микроорганизмов в анаэробных условиях [Becker, 1981; Mayer, 1981]. Усилению роста способствует добавление к среде 4-5 % глицерина.

Оптимальной для выращивания *B. pseudomallei* и *B. mallei* является температура 37°C. Однако для *B. pseudomallei* практически равноценной для роста можно считать также температуру 42°C, при которой размножение этого микроорганизма происходит не менее эффективно, чем при 37° [Dance, 2000]. Как было отмечено Strauss et al., 40-43°C – температура обычная для влажной почвы рисовых полей эндемичных регионов, где поддерживается сохранение возбудителя мелиоидоза [Strauss et al., 1969]. Рост при 42° входит в число признаков, дифференцирующих *B. pseudomallei* от *B. mallei* [Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней, 2013; Сап, 1995; Мелиоидоз, 1995].

Отличительным свойством культур возбудителя мелиоидоза является также способность к морфологической диссоциации на плотных питательных средах [Орлова, 1971; Мелиоидоз, 1995; Zierdt, 1972]. Хотя у *B. mallei* описаны случаи образования R- и M- форм [Сап, 1995], это, в целом, не характерно для роста микроба на плотных питательных средах. В подавляющем большинстве случаев возбудителем сапа формируются блестящие полупрозрачные S- колонии.

Отмечено, что практически любой штамм *B. pseudomallei*, независимо от того, выделен он из клинического материала или из внешней среды, может образовывать колонии в S-, R- или M-форме, а также ряд промежуточных вариантов. При этом колонии первоначально блестящие, выпуклые, полупрозрачные через 48-72 ч теряют гладкую структуру, становятся тусклыми. Поверхность их приобретает матовый оттенок, складчатость и

шероховатую исчерченность. Одновременно возможно появление крупных слизистых, растекающихся колоний.

Выраженность диссоциативного процесса варьирует в зависимости от среды. Значительным разнообразием морфологических типов отличаются культуры, выращенные на богатых питательных средах, таких как мясо-пептонный агар [Ширяев, 1976; Zierdt, Marsh, 1971]. При добавлении в среду глицерина колонии увеличиваются в размере, отчетливее проявляется их полиморфизм, сильнее выражена шероховатость и чаще образуются слизистые варианты [Орлова и др., 1973].

Сегодняшний интерес к феномену морфологической диссоциации у *B. pseudomallei* связан, в основном, с идеей переключения морфотипов в процессе реализации микроорганизмом вирулентности и адаптации во внешней среде [Chantratita et al., 2007, Chen et al., 2009, Tandhawanant et al., 2010].

Возбудитель мелиоидоза – хемоорганотроф, способный усваивать в качестве единственного источника углерода многие простые и сложные соединения, в том числе, гетероциклические углеводороды [Gillard, 1976; Ogawa, 1981]. Обычными в перечне источников углерода для *B. pseudomallei* являются глюкоза, лактоза, мальтоза, β -аланин, аспарагин и др.

Микроорганизм является строгим аэробом. Вместе с тем, наличие денитрифицирующей активности позволяет *B. pseudomallei* использовать в качестве альтернативного акцептора электронов нитраты и размножаться в их присутствии в анаэробных условиях [Stanier, 1976; Bergey 1984].

Азотистый обмен в клетках *B. pseudomallei* осуществляется в процессе диссимиляции и биосинтеза аминокислот. Лишь некоторые аминокислоты (глицин, цитрулин, валин, изовалин, норлейцин, метионин, фенилаланин) могут быть использованы этим микроорганизмом в качестве единственного источника азота и углерода [Ряпис, Ширяев, 1974]. Усвоение аспарагина, гистидина и серина происходит путем их дезаминирования. У возбудителя

мелиоидоза не обнаружены декарбоксилазы лизина, аргинина и орнитина, в тоже время аргинин эффективно утилизируется с помощью аргининдигидролазной системы [Мелиоидоз, 1995].

B. pseudomallei обладает также аминотрансферазной системой, катализирующей перенос аминокрупп ряда аминокислот на 2-кетоглутаровую, пировиноградную и щавелевоуксусную кислоты. Предположительно, первоначальное расщепление большинства аминокислот у него происходит в процессе переаминирования, а аминотрансферазы одновременно участвуют как в катаболизме, так и синтезе аминокислот [Беляков и др. 1990].

Возбудитель мелиоидоза, как другие буркхольдерии, не способен осуществлять превращение глюкозы в триозофосфаты путем окислительно-восстановительного фосфорилирования Эмбдена-Мейергофа из-за отсутствия ключевого фермента 6-фосфофруктокиназы. Поэтому основным механизмом диссимиляции 6-фосфоглюконата для *B. pseudomallei* принято считать путь Энтнера-Дудорова [Беляков и др. 1990]. Промежуточными продуктами диссимиляции глюкозы при этом являются глюконовая и пировиноградная кислоты. Наряду с глюкозой возбудитель мелиоидоза окисляет также ксилозу, сахарозу, лактозу и мальтозу [Мелиоидоз, 1995]. Принципиальное диагностическое значение имеет отсутствие у *B. pseudomallei* способности усваивать арабинозу, что является важным биохимическим признаком, дифференцирующим ее от родственного непатогенного микроорганизма *B.thailandensis*.

B. pseudomallei секретирует ряд ферментов: протеазы, липазы, лецитиназы (фосфолипаза С), гемолизины, сидерофоры, а также каталазу, пероксидазу, супероксиддисмутазу [Aschdown, Kochler, 1990; Puthuchearu, 2002]. Некоторые из этих ферментов имеют отношение к выживанию микроорганизма в естественной среде обитания, тогда как другие (каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза) играют определенную роль как факторы вирулентности [Puthuchearu, 2002; Lazar, 2009; Vellasamy et al., 2009].

Основные сведения о биохимических свойствах *B. mallei* содержат работы различных исследователей, систематизированные Bergey [Ряпис, 1968; Gillardi, 1976; Илюхин с соавт., 1983; Bergey, 1984; Сап, 1995]. Большинство из рассмотренных в них биохимических признаков составляют основу идентификации возбудителя сапа, не утратившую своего значения и в современной микробиологической диагностике [Al-Ani, Roberson, 2007; Mota et al., 2010; Malik et al., 2012].

По ряду биохимических свойств микроорганизм не имеет принципиальных отличий от возбудителя мелиоидоза. Это относится к аэробному и нитратному типам дыхания, окислительному катаболизму углеводов и усвоению аминокислот. Вместе с тем, способность штаммов возбудителя сапа расщеплять углеводы вариабельна по отношению к различным сахарам. Большинство штаммов *B. mallei* окисляют глюкозу, фруктозу, галактозу, маннозу, лактозу, но не усваивают сахарозу, ксилозу, рамнозу, арабинозу [Сап, 1995; Gillardi, 1976].

Процессы азотистого обмена этого микроорганизма - катаболизм и синтез аминокислот - имеют общие с *B. pseudomallei* биохимические механизмы. В частности, у *B. mallei* не обнаружены декарбоксилазы аргинина, который расщепляется аргининдигидролазным комплексом, а основной путь превращения аминокислот включает переаминирование с помощью трансаминаз [Беляков и др, 1990; Сап, 1995].

Ферментативная активность возбудителя сапа, в целом, имеет замедленный характер. Так, цитохромоксидазная или каталазная активность может проявляться в поздние сроки роста и лишь в определенных условиях. Протеолитическая активность микроорганизма чаще проявляется в способности гидролизовать желатин, но не казеин молока, при этом гидролиз субстрата обычно наблюдается не ранее, чем через 72-120 ч [Агеева и др. 2005]. Штаммы *B. mallei* различаются по протеолитической активности [Агеева и др. 2005]. Дефектные по протеолитической активности культуры *B.*

mallei нестабильно проявляют гемолитическую активность и не секретируют липазу и фосфолипазу С.

1.3 АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

МЕЛИОИДОЗА И САПА

Клиническая диагностика сапа или мелиоидоза из-за большого многообразия симптомов и быстрого течения этих заболеваний весьма затруднена [Беляков В.Д., 1990; Dance, 1991; Kanai, 1988; Leelarasamee, 2000]. Так, например, больным мелиоидозом до выделения специфической культуры часто ставят диагноз лихорадки, флегмоны, фарингита, пневмонии, туберкулеза, артрита, холецистита [Dance, 1991; Kiertiburanakul et al., 2002; Wanvarie, 1984]. Полиморфизм клинических проявлений настолько велик, что даже в эндемичных регионах поставить диагноз «мелиоидоз» на основании только клинической картины крайне проблематично.

Несомненно, что существенное увеличение числа регистрируемых в разных странах случаев сапа и мелиоидоза связано не столько с расширением ареала распространения этих инфекций в мире, сколько с хорошо налаженной в развитых странах лабораторной службой. Именно это привело к тому, что практически во всех странах Западной Европы за последние годы зарегистрированы случаи мелиоидоза среди лиц, побывавших в эндемичных зонах [Cheng, Currie, 2005; Dance, 2000].

Сап был широко распространён в России в начале XX века. К середине прошлого столетия, вследствие проводимых профилактических мероприятий и резкого сокращения поголовья лошадей, эта инфекция исчезла в большинстве стран Европы, в том числе и в России. В настоящее время сап регистрируют у животных в Монголии, Турции, Иране, Ираке, Китае, Индии и других странах, использующих в различных сферах экономики непарнокопытных животных [Anuntagool, Sirisinha, 2002, Chantratita et al., 2006; Harvey, Minter, 2005; Nierman, 2004]. Заболеваемость среди людей носит

в основном спорадический характер [Цветков Н.Е., 1947]. Тем не менее, периодически появляются публикации о выделении *B.mallei* в клинических лабораториях Италии, Испании, США. В ряде случаев это связано с внутрилабораторным заражением, что подтверждает чрезвычайную опасность работы с культурами *B. mallei*. Диагностика этого заболевания по-прежнему остается весьма сложной задачей. Так, описан случай, при котором сотрудник одного из НИИ США заболел сапом в результате внутрилабораторного заражения. Из крови и абсцесса печени больного была выделена культура. Причем, при бактериологическом анализе в дифференциальных полуавтоматических системах типа API 20 NE возбудитель заболевания был идентифицирован как *Pseudomonas fluorescens/putida*. Проводимая терапия, направленная на эрадикацию псевдомонад, успеха не принесла. Лишь только проведение газо-жидкостной хроматографии жирных кислот и секвенирования 16S рРНК позволило правильно определить вид возбудителя как *B.mallei* и назначить адекватную этиотропную терапию [Srinivasan, 2001].

Стандартная схема лабораторной диагностики сапа и мелиоидоза предусматривает проведение *экспресс и ускоренной диагностики* с использованием микроскопии образцов клинического материала постановки МФА, ИФА и ПЦР, выделение возбудителей из объектов исследования (либо выявление специфических антигенов) и определение специфических антител в крови людей и животных. В качестве биопробных животных используют золотистых хомячков. При отсутствии золотистых хомячков возможна постановка биопробы на морских свинках.

Идентификация чистых бактериальных культур, подозрительных на принадлежность к возбудителям сапа и мелиоидоза проводится в два этапа, последовательно определяющих род и вид исследуемой культуры бактерий. При отборе культур, подозрительных на принадлежность к роду *Burkholderia* учитывают их агглютинабельность диагностическими агглютинирующими сыворотками в титре не менее 1:200, положительную каталазную активность,

положительную цитохромоксидазную активность, способность к окислению глюкозы без ферментации.

Установление принадлежности исследуемой культуры к виду *B. pseudomallei* или *B. mallei* проводят на основании отсутствия способности к образованию истинного диффундирующего пигмента на плотных питательных средах, наличия аргининдигидролазы и отсутствия способности к декарбоксилированию лизина и орнитина, способности к гидролизу желатина, характеру роста при 42°C, способности к росту на средах с полимиксином и гентамицином, отсутствия роста на средах с высокими концентрациями NaCl (2,5 % и выше), отсутствия признака ассимиляции L-арабинозы. Оценивают также способность культуры к денитрификации и гидролизу эскулина.

В коммерческих автоматизированных и полуавтоматизированных микробиологических анализаторах (API, Vitek, BioLOG, BBL Crystal и другие) могут быть использованы идентификационные биохимические наборы для грамотрицательных неферментирующих микроорганизмов. Следует иметь в виду, что коммерческие идентификационные системы не позволяют достоверно определять видовую принадлежность сапных культур, вероятно вследствие замедленного роста на используемых в системах средах и variability проявления на них биохимических свойств возбудителя. Применение автоматизированных и полуавтоматизированных биохимических идентификационных систем должно соответствовать требованиям по безопасности работ с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности), определенным действующими санитарно-эпидемиологическими правилами.

При определении вирулентности для золотистых хомячков, типичные штаммы возбудителей сапа и мелиоидоза вызывают гибель животных после внутрибрюшинного заражения в дозе менее 10^2 м.к. в течение 7 суток с выделением из паренхиматозных органов павших животных (селезенка, печень, легкие) чистой культуры.

При идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза в ПЦР используют праймеры для выявления консервативных нуклеотидных последовательностей (гены 16S рРНК, 23S рРНК) и факторов патогенности (генный кластер III типа секреции TTSI, флагеллярный ген *fliC*).

Для определения чувствительности штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* используют доксициклин, триметоприм/сульфаметоксазол, левомецетин, цефтазидим, имипенем (меропенем), рифампицин, моксисициллин/клавулановую кислоту (амоксиклав) и некоторые фторхинолоны (ципрофлоксацин, спарфлоксацин).

Основными методами серодиагностики сапа и мелиоидоза являются РНГА и ТИФМ. При поиске специфических антител в сыворотках больных мелиоидозом людей и животных исследуют парные сыворотки. Для выявления специфических антител в сыворотках больных людей и животных используют также непрямой вариант ТИФМ или непрямой МФА с добавлением комплемента.

У больных животных и человека *B. mallei* и *B. pseudomallei* могут быть выделены из содержимого абсцессов, мокроты, гнойного отделяемого язв, пунктатов лимфоузлов, рвотных масс, испражнений. При острой септической форме микроорганизмы обнаруживаются в крови, моче, цереброспинальной жидкости и в полостных экссудатах. При вскрытии трупов животных для анализа берут кусочки органов (селезенка, печень, легкое), лимфатических узлов, кровь, костный мозг [Цветков Н.Е., 1947; Беляков В.Д., 1990].

С момента поступления материала проводят бактериоскопию мазков в световом и люминесцентном микроскопах и бактериологическое исследование, направленное на выделение культуры патогенных буркхольдерий. Для выделения чистой культуры дополнительно используют биологическое исследование. Серологическое исследование нативного материала проводится для выявления видоспецифических антигенов или сыворотки крови при поиске специфических антител.

Следует отметить, что в случае диагностики сапа у животных, важна его дифференциальная диагностика от хронических ринитов или синуситов, вызванных *Streptococcus equi*, язвенного лимфангоита, обусловленного *Corynebacterium pseudotuberculosis* и *Sporotrichium* spp. или эпизоотического лимфангоита, возбудителем которого является *Histoplasma farciminosum* [Илюхин В.И., 1995, Илюхин В.И., 1998].

Микроскопия для диагностики сапа и мелиоидоза имеет ориентировочное значение. *B.mallei* и *B.pseudomallei* чаще удаётся обнаружить в мазках из очагов поражений лишь при остром заболевании. При хронических, а тем более при латентных формах найти микробы гораздо труднее, а нередко их совсем не удаётся обнаружить [Беляков В.Д., 1990].

При бактериологическом методе исследуемый материал высевают на жидкие и плотные питательные среды: МПГБ (мясо-пептонный бульон с глицерином), МПГА (мясо-пептонный агар с глицерином). С целью подавления роста посторонней микрофлоры в пробы, подозрительные на присутствие *B.pseudomallei*, добавляют полимиксин (50 ед/мл) или гентамицин (4 мкг/мл) [Ashdown, 1979; Peacock et al., 2005]. При выделении возбудителя сапа для подавления роста посторонней микрофлоры в питательные среды вносят некоторые ингибиторы (фуксин красный, кристаллический фиолетовый) и антибиотики (пенициллин, полимиксин, нистатин) [Жога Л.К., 1995; Ряпис Л.А., 1988; Thibault et al., 2004].

От больных людей возбудитель мелиоидоза сравнительно часто выделяют из крови и из свежих очагов поражения. При септицемических и септикопиемических формах выделение гемокультуры обычно удаётся при первой попытке [Wuthiekanun et al., 1990]. Однако бактериологический метод мало эффективен при диагностике хронического мелиоидоза у человека и животных.

В качестве подтверждающего теста при бактериологической диагностике в некоторых случаях проводят определение чувствительности

выделенной культуры к специфическим бактериофагам. После первых публикаций о наличии у мелиоидозного микроба феномена лизогении и выделения специфических фагов, дальнейшие работы были направлены на изучение их активности и специфичности с целью разработки видового поливалентного диагностического фага [Адимов Л.Б., 1986; Гришкина Т.А., 1996; Томов А.Ц., 1970]. Ряд мелиоидозных бактериофагов и фагов, выделенных из родственного микроорганизма *B. thailandensis*, были предложены для идентификации возбудителя сапа [Deshazer, 2004; Woods et al., 2002].

В последнее время происходит активное и эффективное внедрение в практику бактериологических лабораторий полуавтоматических и автоматических систем идентификации, основанных на определении признаков биохимической активности исследуемой бактериальной культуры в отношении различных субстратов.

В отношении патогенных буркхольдерий, необходимо отметить несколько характерных моментов, определяющих сложности их идентификации. В первую очередь они касаются присутствия близкородственных буркхольдерий со схожими биохимическими признаками в нестерильных объектах [Howard, Inglis, 2003]. Так же, как и у возбудителя сапа, достаточно часто варьирующие биохимические профили *B.pseudomallei* вводят в заблуждение сотрудников практических лабораторий [Inglis et al., 2005]. При отсутствии эпидемиологической настороженности в отношении возбудителей сапа и мелиоидоза использование лишь таких систем идентификации создает предпосылки для получения некорректных результатов.

P. Lowe с соавторами [Lowe et al., 2002] отмечали высокую (до 99 %) точность идентификации *B.pseudomallei* с помощью системы API 20E. Однако другими исследователями при изучении штаммов возбудителя мелиоидоза с помощью данной системы, достоверно микроорганизм был идентифицирован

лишь в 50 - 63 % случаев. Так, Inglis с соавторами [Inglis et al., 1998] отмечали случаи недостаточно корректной идентификации *B. pseudomallei* в API 20NE, возбудитель мелиоидоза с помощью этой системы определялся как *Chromobacterium violaceum*.

Опубликованы также сообщения о том, что система Microbact 24E была более результативна при идентификации возбудителя мелиоидоза (от 84 % до 100 % случаев) [Thomas, 1983], однако, другими авторами подобное преимущество Microbact 24E не отмечалось.

При использовании системы BD Phoenix были отмечены более существенные ошибки идентификации. Учитывая, что в базе данных этой системы отсутствуют данные о возбудителе мелиоидоза, в 95-99 % случаев микроорганизм был определен как *B. ceracia* [Koh et al., 2003]. С помощью данной системы при тестировании 134 изолятов *B. ceracia* правильная идентификация этой буркхольдерии отмечена лишь в 50 % случаях [Brisse et al., 2002].

В литературе были неоднократно описаны случаи ошибочной идентификации изолятов *B. pseudomallei* при использовании автоматической системы VITEK 2 в различных клинических лабораториях [Deepak et al, 2008; Kiratisin et al, 2007; Podin et al, 2013; Zong et al, 2012].

Чаще всего штаммы *B. pseudomallei* и *B. mallei* определяются ложно как микроорганизмы комплекса *B. ceracia* и *Sphingomonas paucimobilis*, соответственно. Выявлено, что именно такие ложно идентифицируемые штаммы патогенных буркхольдерий характеризуются нетипичными результатами отдельных биохимических тестов - BNAG(-), NAGA(-) и dCEL(+) – для мелиоидозных штаммов и SAC(+), dTRE(+), ProA(-), TugA(-), GlyA(+) – для сапных. Так, Podin Y. с соавт. отмечали данную закономерность: отрицательные результаты тестов β -N-ацетилглюкозаминидазы (BNAG) и β -N-ацетилгалактозаминидазы (NAGA) у изолятов *B. pseudomallei*, как правило, приводили к их ложной идентификации как микроорганизмов комплекса *B.*

seracia. Большинство правильно идентифицированных штаммов *B. pseudomallei* обладали BNAG активностью, в то время как 12 % штаммов, у которых видовая принадлежность была определена ошибочно, не обладали таковой [Podin et al, 2013].

BNAG и NAGA – ферменты, субстратами для которых являются структурные компоненты экзополисахарида бактерий: поли- β -(1-6)-N-ацетилглюкозамин (PNAG) и N-ацетилгалактозамин [Yakandawala N. et al, 2011]. При этом PNAG, как известно, является важным элементом в формировании биопленок у многих видов *Burkholderia* и играет определенную роль в формировании множественной лекарственной резистентности микроорганизмов [Masoud et al, 1997]. N-ацетилгалактозамин, производное NAGA, также входит в состав экзополисахарида *B. pseudomallei* в качестве одного из основных компонентов [Masoud et al, 1997].

Известно, что условия культивирования (различные питательные среды, время и температура) могут повлиять на результат идентификации. Lowe P. с соавт. показали, что процент верной идентификации клинических изолятов *B.pseudomallei* с помощью VITEK 2 зависел от питательной среды, на которой выращивали микроорганизмы. Наиболее высокий процент правильной идентификации (81%) наблюдался при использовании кровяного агара (Colombia horse blood agar), а наименьший (63%) – агара Мак-Конки. Авторы отмечают, что при диагностике микроорганизмов, выросших на TSA, процент их корректного видового определения был средним (78%) [Lowe et al, 2006].

Следует отметить, что противоречия, связанные с интерпретацией ряда диагностических тестов, несомненно, связаны со свойствами исследуемых штаммов. Причем, для возбудителя сапа они скорее являются правилом (замедленная оксидазная реакция, а также проблемы при учете кислотообразования из сахаров, оценке декарбоксилазной активности и гидролиза ряда субстратов) [Srinivasan et al., 2001]. Так, с помощью биохимической системы идентификации API 20E ни один из изученных 9

штаммов *B. mallei* не был правильно идентифицирован. При использовании Oxi-Ferm набора в 7 случаях диагноз был точным, а в двух — сомнительным [Becker, 1981].

Для идентификации возбудителя сапа эффективной оказалась Sherlock Microbial Identification System (известная как система MIDI), основанная на полной автоматизации анализа жирных кислот [O'Hara, 2005]. Из других биохимических систем идентификации *B. mallei* рекомендована GN2 Microplate, RapiD NF Plus, а из автоматических систем – Vitek GNI+ и Vitek 2 ID-GNB [O'Hara, 2005]. В то же время, другими авторами в системах API 20NE и RapID NF отмечены как неправильные, так и ложноотрицательные результаты. С использованием данных систем корректная идентификация наблюдалась, в лучшем случае, в 60 % случаев [Glass, Popovic, 2005].

Приведенный в данной главе материал демонстрирует, что несмотря на достаточно большое число разработок и разнообразие современных диагностических технологий, в схеме лабораторной диагностики патогенных буркхольдерий, по-прежнему, присутствует ряд проблем. Одними из наиболее актуальных из них являются проблемы, связанные с эффективностью традиционного бактериологического исследования и областью применения все более широко распространяющихся в клинико-диагностической практике систем автоматизированного микробиологического анализа. Решению ряда методологических вопросов по данной проблематике и посвящена настоящая работа.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Штаммы, питательные среды и условия культивирования

В работе использовалось 53 штамма *B. pseudomallei*, 14 штаммов *B. mallei*, 5 штаммов *B. thailandensis* (табл. 1, 2, 3), а также 9 штаммов микроорганизмов комплекса *Burkholderia ceracia* (табл. 4) из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Таблица 1

Штаммы возбудителя сапа (*B. mallei*)

№ штамма в коллекции Волгоградского НИПЧИ	Международный номер или авторское обозначение	Место и год Выделения	Источник выделения
101	10230	нет данных	нет данных
102	Ц – 4	Монголия, 1967	лошадь
103	Ц – 5	-"-	-"-
104	«Иванович»	Югославия	-"-
105	«Будапешт»	Венгрия	-"-
106	Р – 1	Югославия	-"-
107	11	Польша, 1954	-"-
108	Z – 12	Югославия, 1959	-"-
109	8	Москва, ГНКИ ветпрепаратов	-"-
110	В - 120	Улан – Уде, 1985	-"-
112	Bogor – 37	Индонезия, 1979	-"-
114	Muksuwar – 11	Индия, 1979	-"-
116	5584	Россия, 1917	-"-
120	«Zagreb»	Югославия	-"-

Штаммы возбудителя мелиоидоза (*B. pseudomallei*)

№ штамма в коллекции Волгоградского НИПЧИ	Международный номер или авторское обозначение	Место и год выделения	Источник выделения
1	2	3	4
201	1	Вьетнам, 1970	кровь больного
202	2	Вьетнам, 1985	кровь больного
203	Tchad 97	Чад	-''-
204	Jran Terre 98	Иран	-''-
205	Niamay 99	Нигер	-''-
206	Dalat 100	Вьетнам, 1985	-''-
208	Shigan 102	Китай	-''-
209	Cherol dujurdin 103	нет данных	нет данных
210	PJ 54 107	нет данных	нет данных
211	Ward 108	Австралия, 1983	нет данных
212	Roos 109	Вьетнам, 1985	мокрота
213	Pearce 110	Австралия	кровь больного
214	Mahen 111	-''-	мокрота
215	Coorek 112	Австралия, 1982	раневое отделяемое
216	Skandmandri 113	-''-	мокрота
217	Snider 114	Австралия, 1981	лимф.узел
218	Soil isolate 115	Австралия, 1982	почва
220	Goat isolate 17 117	-''-	молоко козы
219	Soil isolate 13 116	-''-	почва
221	Sheep isolate 118	-''-	овца
222	Dallachu 119	Австралия, 1983	нет данных
224	127	нет данных	нет данных
225	128	нет данных	нет данных
226	129	нет данных	нет данных
227	130	нет данных	нет данных
228	131	Таиланд, 1985	клинический изолят
229	132	-''-	-''-
230	133	-''-	-''-
231	134	-''-	-''-
232	135	-''-	-''-
233	136	-''-	-''-
234	137	-''-	-''-
235	138	-''-	-''-
236	139	-''-	-''-
237	140	-''-	-''-
238	C-141	Сайгон, 1948	кровь больного

Таблица 2. продолжение

1	2	3	4
239	ССЕВ-860	ЧССР, ин-т микробиологии	неизвестно
240	ВКМ 900	ин-т «Микроб», Саратов, 1985	неизвестно
242	56738	Вьетнам, 1950	кровь больного
243	56770	-''-	моча
244	56812	-''-	кровь больного
245	56830	-''-	моча
246	57562	-''-	гной сустава
247	57576	-''-	содержимое желудка
248	57582	-''-	мокрота
249	59214	-''-	кровь больного
250	59361	-''-	из гноя яичка свиньи
251	59426	-''-	кровь больного
252	59437	-''-	из гноя плевральной полости
253	60263	-''-	из гноя подкожного абсцесса
254	60631	-''-	кровь
255	60806	-''-	из гноя подкожного абсцесса
256	60839	-''-	кровь
257	60913	-''-	-''-
258	61503	-''-	из гноя подкожного абсцесса
259	611083	-''-	мокрота

Таблица 3

Штаммы *B. thailandensis*

№ по кол- лекционному центру ВолгНИПЧИ	Международный номер или авторское обозначение	Место и год выделения	Источник выделения
3681	E 251	Получены из университета Calgary, Canada, 2001, от Dr. Woods	почва
3682	E 264 (ATCC 700388)	-''-	-''-
3683	E 265	-''-	-''-
3684	E 295	-''-	-''-
3685	E 299	-''-	-''-

Штаммы *B. cerasia*

№ по коллекционному центру ВолгНИПЧИ	Международный номер или авторское обозначение	Номер геномовара
25416	ATCC 25416	I
3181		I
3189		I
610		I
611		I
620		I
621		I
506		III
370		III

Штаммы микроорганизмов выращивали на Luria агаре (HiMedia, Индия) и триптиказо-соевом агаре, TSA (HiMedia, Индия) при температуре 37 °С в течение 1-2 суток. Используемые в работе штаммы по морфологическим и культурально-биохимическим свойствам были типичными представителями рода *Burkholderia*.

Учитывая, что возбудители сапа и мелиоидоза относятся к агентам II группы патогенности, работа с ними проводилась в соответствии действующими санитарными правилами «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) [СП 1.3.3118-13, 2014].

2.2 Пробоподготовка и проведение идентификации в системах бактериологического анализа

2.2.1 Постановка тестов и учёт результатов с использованием планшет IDS на платформе MICROTAX

Культуры штаммов *Burkholderia* spp. выращивали на Luria агаре (HiMedia, Индия) при температуре 37°С в течение 18 - 24 ч. Из агаровой

культуры буркхольдерий готовили суспензию в 5 мл стерильного 0.9 % NaCl согласно стандарту мутности McFarland 2.0.

Суспендированный материал вносили в объеме 100 мкл в каждую лунку планшета. В определенные лунки планшета, согласно инструкции производителя, добавляли по 2 капли парафинового масла для создания анаэробных условий.

После инокуляции планшет накрывали специальной перфорированной пленкой для проникновения кислорода, необходимого для аэробных реакций. Инкубацию проводили в течение 5 - 6 часов при 37°C. По окончании инкубации удаляли перфорированную пленку и вносили в определенные лунки планшета по две капли индол- и пептидазного реагентов согласно инструкции производителя. Оценка результатов биохимических реакций проводили спустя 5 минут инкубации, с использованием микропланшетного ридера MT-1 (SyLAB, Австрия), либо визуально, с помощью оценочных таблиц SY-Lab Microtax, содержащих цветовые коды для положительных, отрицательных или промежуточных результатов теста активности в отношении того или иного биохимического субстрата. Общая схема анализа биохимической активности бактериальной культуры приведена на рисунке 1.

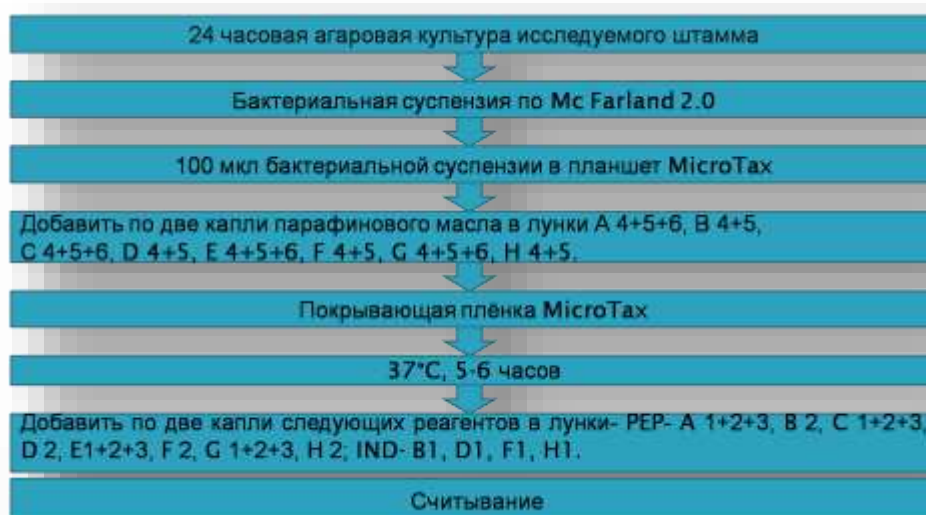


Рисунок 1. Схема анализа биохимической активности штамма микроорганизма на планшетах IDS MicroTax.

Перечень основных биохимических тестов планшетов IDS MicroTax приведен в таблице 5.

Таблица 5

Основные биохимические тесты планшета IDS MicroTax

Код	Признак	Код	Признак	Код	Признак	Код	Признак
IND	Образование индола	GLU	Ассимиляция глюкозы	LAT	Ассимиляция лактата	LIPC	Фосфо липаза С
ESC	Гидролиз эскулина	MAN	Ассимиляция маннозы	ADI	Ассимиляция адипата	DIP	Фосфо диэстераза
URE	Уреаза	MALA	Ассимиляция мальтозы	SUB	Ассимиляция суберата	PRO	Пролин амидаза
ODC	Орнитин декарбоксилаза	NAG	Ассимиляция п-ацетил глюкозамина	MAA	Ассимиляция малата	AMA	α-мальтозидаза
ADH	Аргинин дегидролаза	MAT	Ассимиляция маннитола	PAA	Ассимиляция фенол ацетата	CHIT	Хитиназа
GLUF	Ферментация глюкозы	GCA	Ассимиляция глюконата	HIS	Ассимиляция гистидина	APH	Кислая фосфатаза
SUCF	Ферментация сахарозы	HVA	Ассимиляция β-гидрокси бутирата	ONPG	Орто нитрофенил β-галактозидаза	OXI	оксидаза

2.2.2 Постановка тестов и учет результатов с использованием микробиологического анализатора Vitek 2

Штаммы микроорганизмов выращивали на Luria агаре (HiMedia, Индия) и триптиказо-соевом агаре – ТСА (HiMedia, Индия) при температуре 37°C.

GN карты, предназначенные для автоматической идентификации клинически значимых ферментирующих и неферментирующих грамотрицательных палочек, заполняли в соответствии с инструкцией изготовителя с использованием реагентов и оборудования, поставляемого bioMérieux. Бактериальную суспензию плотностью 0,50–0,63 по McFarland готовили в 3 мл стерильного 0,85 % раствора NaCl pH 7.0 в полистироловой пробирке с использованием денситометра VITEK2 DensiCHEK™ Plus.

Заполненные карты загружали в прибор не позднее 30 мин после инокуляции. Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения VITEK2 версии 07.01.1.19.18.

Карты GN содержали 47 биохимических тестов с лиофилизированными биохимическими субстратами и необходимыми реагентами, позволяющими оценить утилизацию углеводов, ферментативную активность и устойчивость к ингибиторам. Результат взаимодействия микроорганизма с реактивами с помощью флуоресцентного индикатора фиксировался прибором и оценивался компьютерной программой на основе сравнения полученного профиля образца с имеющейся базой данных, содержащей информацию о типичных биохимических реакциях более 300 видов микроорганизмов. Перечень биохимических тестов карт GN Biomerieux приведен в таблице 6.

Таблица 6

Основные биохимические тесты карт GN (Biomerieux)

Код	Признак	Код	Признак
APPA	Ala-Phe-Pro-АРИЛАМИДАЗА	dTAG	D-ТАГАТОЗА
ADO	АДОНИТОЛ	dTRE	D-ТРЕГАЛОЗА
PyrA	L-пирролидонАРИЛАМИДАЗА	CIT	ЦИТРАТ (НАТРИЯ)
dCEL	D-ЦЕЛЛОБИОЗА	MNT	МАЛОНАТ
BGAL	БЕТА-ГАЛАКТОЗИДАЗА	5KG	5-КЕТО-D-ГЛЮКОНАТ
H2S	ПРОДУКЦИЯ H2S	ILATk	L-ЛАКТАТ, подщелачивание
BNAG	БЕТА-N-АЦЕТИЛГЛЮКОЗАМИНИДАЗА	AGLU	АЛЬФА-ГЛЮКОЗИДАЗА
AGLTp	Глютамилариламидаза рNA	SUCT	СУКЦИНАТ, подщелачивание
dGLU	D-ГЛЮКОЗА	NAGA	Бета-N-АЦЕТИЛГАЛАКТОЗАМИНИДАЗА
GGT	ГАММА-ГЛЮТАМИЛТРАНСФЕРАЗА	AGAL	АЛЬФА-ГАЛАКТОЗИДАЗА
OFF	СБРАЖИВАНИЕ ГЛЮКОЗЫ	PHOS	ФОСФАТАЗА
BGLU	БЕТА-ГЛЮКОЗИДАЗА	GlyA	ГлицинАРИЛАМИДАЗА
dMAL	D-МАЛЬТОЗА	ODC	ОРНИТИНДЕКАРБОКСИЛАЗА
dMAN	D-МАННИТ	LDC	ЛИЗИНДЕКАРБОКСИЛАЗА
dMNE	D-МАННОЗА	0DEC	ДЕКАРБОКСИЛАЗА-КОНТРОЛЬ (ОСНОВА)
BXYL	БЕТА-КСИЛОЗИДАЗА	IHISa	L-ГИСТИДИН, ассимиляция
BAlap	БЕТА-аланинариламидаза рNA	CMT	КУМАРАТ
ProA	L-пролинАРИЛАМИДАЗА	BGUR	БЕТА-ГЛЮКУРОНИДАЗА
LIP	ЛИПАЗА	O129R	УСТОЙЧИВОСТЬ к O/129 (вibriостатик)
PLE	ПАЛАТИНОЗА	GGAA	Glu-Gly-Arg-АРИЛАМИДАЗА
TyrA	ТирозинАРИЛАМИДАЗА	IMLTa	L-МАЛАТ, ассимиляция
URE	УРЕАЗА	ELLM	ЭЛЛМАН
dSOR	D-СОРБИТ	ILATa	L-ЛАКТАТ, ассимиляция
SAC	САХАРОЗА		

Система выдавала четкий окончательный ответ (единственный выбор) при степени соответствия профиля идентифицируемого штамма одному из видовых ключей 85–99 %. Если полученному биохимическому профилю не соответствовал ни один из имеющихся в базе данных, система выдавала список вероятных микроорганизмов, либо сообщение о невозможности идентификации. В таком случае, лабораторный отчет содержал перечень предлагаемых дополнительных тестов, необходимых для окончательной идентификации.

2.3 Масс-спектрометрическое профилирование штаммов буркхольдерий

Штаммы выращивали на Luria агаре (HiMedia, Индия) при температуре 37°C в течении 24 ч. Из клеток агаровой культуры буркхольдерий готовили взвеси в 300 мкл ультрачистой воды для ВЭЖХ (Pancreas, Испания) в микроцентрифужных пробирках объемом 1,5 мл. Материал тщательно суспендировали для достижения максимально гомогенизированной взвеси. Затем в пробирки с препаратами добавляли по 900 мкл абсолютного этанола, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение получаса. После экспозиции центрифугировали 2 минуты при 13000 об/мин, удаляли супернатант, высушивали на воздухе.

Далее в пробирки вносили по 50 мкл ацетонитрила и 70% раствора муравьиной кислоты, вновь перемешивали, и материал в объеме 1 мкл наносили на лунки металлической мишени (чипа). На каждую пробу наносили по 1 мкл матрицы для MALDI-ToF (α -циано-гидроксикоричная кислота в растворе 50% ацетонитрила и 2,5% трихлоруксусной кислоты, ТФК). После кристаллизации проб мишень с образцами помещали в камеру масс-анализатора. Клетки штамма *E. coli* CCUG 10797 использовали для калибровки прибора.

Для получения одиночного масс-спектра использовали 100 импульсов лазера (частота 60 Гц); диапазон регистрации составлял 1000-20000 m/z, фиксировались только положительные ионы, суммарный спектр каждого образца составлялся на основе 100 единичных выстрелов. С каждой лунки чипа снимался спектр, представляющий собой сумму 6 одиночных спектров (600 импульсов лазера). Все масс-спектры регистрировали в линейном режиме, без использования рефлектрона.

Для формирования референсных спектров использовали 5 штаммов *B. mallei* и 5 штаммов *B. pseudomallei*, с 10-кратной повторностью по каждому из штаммов. При анализе результатов учитывались следующие характеристики масс-спектра: количество пиков, их интенсивность, общая величина шумового компонента. Результирующий спектр каждого штамма экспортировали в базу данных S.A.R.A.M.I.S.TM для последующего анализа.

Заключение о видовой, или родовой принадлежности исследуемой культуры делали на основе сопоставления индивидуальных масс-спектров в режиме «Идентификация» с базой данных S.A.R.A.M.I.S.TM, дополненной полученными референсными спектрами. Корректная идентификация до вида достигалась при величинах показателя score ≥ 75 %.

2.4 Методы статистической обработки данных

При сравнительном анализе профилей биохимической активности, данные формализовали в бинарном виде (0 – отсутствие признака, 1 – наличие признака) и анализировали с помощью пакета PRIMER v. 7.0.10 (Primer-E, Великобритания). Для группирования (кластеризации) исследуемых штаммов использовалась неметрическая многомерная грация (nonmetric multidimensional scaling, nMDS) евклидовых расстояний матрицы сходства биохимических профилей [Legendre et al., 2005]. Достоверность отличий биохимических профилей корректно и некорректно идентифицированных штаммов оценивалась методом непараметрического анализа сходства (analysis

of similarities, ANOSIM) [Warton et al., 2012]. Для вычисления среднего вклада каждого биохимического теста в общий показатель различия между кластерами штаммов применялась процедура анализа процента подобия (similarity percentage, SIMPER) [Warton et al., 2012].

Кластерный анализ масс-спектров общеклеточных белков коллекционных штаммов патогенных буркхольдерий проводили с использованием алгоритма Neighbor-Joining [Saitou N, Nei M., 1987].

Глава 3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ БУРКХОЛЬДЕРИЙ ГРУППЫ «*PSEUDOMALLEI*» ПО ПРИЗНАКАМ БИОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

3.1. Идентификация патогенных буркхольдерий с использованием наборов Micronault IDS

Наборы Micronault IDS, применяемые для быстрой (в течение 3-5 часов) биохимической идентификации 113 видов клинически значимых аэробных грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, были использованы нами в качестве образца недорогих автоматизированных микробиологических тестов широкой специфичности, рутинно применяемых в диагностических лабораториях.

Из проанализированных в данном разделе исследования штаммов *B. ceracia* корректно с использованием наборов Micronault IDS была определена видовая принадлежность для штаммов *B. ceracia* 496, 499, 501 и 25416 с вероятностью идентификации 80 % и выше. Вместе с тем, с использованием данного варианта биохимического профилирования, к виду *B. ceracia* были отнесены некоторые штаммы *B. thailandensis* (E251, E265), *B. mallei* (Ц-5, Иванович, Z-12, В-120), а также *B. pseudomallei* (ССЕВ-860, 107). Следует отметить, что для них вероятность корректной идентификации не превышала 72 %.

Для основной массы анализируемых штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* видовая идентификация на наборах Micronault IDS не была получена. В ряде случаев исследуемые штаммы с низкой дискриминацией были отнесены к видам *Sphingomonas paucimobilis*, *Pantoea agglomerans*, *Ochrobactrum anthropi*.

Результаты оценки биохимической активности коллекционных штаммов различных видов буркхольдерий с использованием тест-планшет Micronault IDS приведены в таблице 7.

Таблица 7

Оценка биохимической активности штаммов *Burkholderia* spp. с использованием планшет Micronault IDS (SY-LAB)

	PROL	IND	PYR	HPR	APPA	MAL	URE	LDC	ODC	ADH	a-GLU	b-GLU	CHIT	PNPG	PNPX	a-GAL	DIP	PGUR	L-ALA	GLUF	MANF	ADOF	TREF
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
<i>B. mallei</i> 10230	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>B. mallei</i> 5584	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. mallei</i> 8	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>B. mallei</i> B-120	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
<i>B. mallei</i> muksuwar 11	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>B. mallei</i> Z-12	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
<i>B. mallei</i> Богор 37	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. mallei</i> Будапешт	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	+/-	0	0	0	0	0	0
<i>B. mallei</i> Загреб	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. mallei</i> Иванович	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
<i>B. mallei</i> Ц-4	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>B. mallei</i> Ц-5	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
<i>B. cepacia</i> 25416	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
<i>B. cepacia</i> 496	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
<i>B. cepacia</i> 499	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
<i>B. cepacia</i> 501	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
<i>B. pseudomallei</i> 100	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>B. pseudomallei</i> 107	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
<i>B. pseudomallei</i> 109	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
<i>B. pseudomallei</i> 110	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. pseudomallei</i> 113	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	+/-	+/-	0	0	0	0	0
<i>B. pseudomallei</i> 115	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	0	0	0	+/-	+/-	0	0
<i>B. pseudomallei</i> 117	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>B. pseudomallei</i> 118	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	0	0	0	+/-	+/-	0	0

Таблица 7. Продолжение

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
<i>B.pseudomallei</i> 119	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	+/-	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 127	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	+/-	0	0	1	+/-	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 128	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	+/-	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 129	0	0	0	0	0	+/-	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	+/-	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 130	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	+/-	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 131	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 132	+/-	0	0	0	+/-	1	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	+/-	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 133	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 134	+/-	0	0	0	+/-	+/-	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	+/-	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 135	0	0	0	0	0	+/-	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	+/-	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 136	0	0	0	0	0	+/-	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	+/-	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 137	0	0	0	0	0	+/-	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	+/-	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 138	0	0	0	0	1	+/-	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 139	0	0	0	0	0	+/-	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 140	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 56738	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	+/-	+/-	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 56770	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	+/-	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 56812	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 56830	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 57562	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	+/-	+/-	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 57576	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 57582	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	+/-	0	0	0	0	0	0

Таблица 7. Продолжение

<i>B.pseudomallei</i> 59214	0	0	0	0	0	+/-	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	+/-	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 59361	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	+/-	0	0	1	+/-	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 59426	0	0	0	0	0	+/-	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	+/-	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 59437	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 60263	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	+/-	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 60631	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 60806	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 60839	0	0	0	0	+/-	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 60913	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	+/-	0	0	+/-	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 611089	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 61503	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	+/-	0	0	0	+/-	+/-	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> 97	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> Vang	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> VPA	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> BKM 900	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	+/-	0	0	0	0	1	1	0	1
<i>B.pseudomallei</i> C-141	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>B.pseudomallei</i> CCEB-860	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
<i>B.thailandensis</i> E 251	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
<i>B.thailandensis</i> E 264	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
<i>B.thailandensis</i> E 265	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
<i>B.thailandensis</i> E 295	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1
<i>B.thailandensis</i> E 299	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1

Группирование профилей биохимической активности штаммов *Burkholderia* spp. на основе невзвешенной парно-групповой оценки эвклидовых расстояний показателей сходства профилей биохимических признаков позволила разделить исследуемые штаммы на 17 кластерных групп (рис. 2), при этом, из полученных результатов видно, что сформированные группы сходства биохимических профилей гетерогенны в отношении реальной видовой принадлежности штаммов, их составляющих, за исключением корректно идентифицированных штаммов *B. cerasia*.

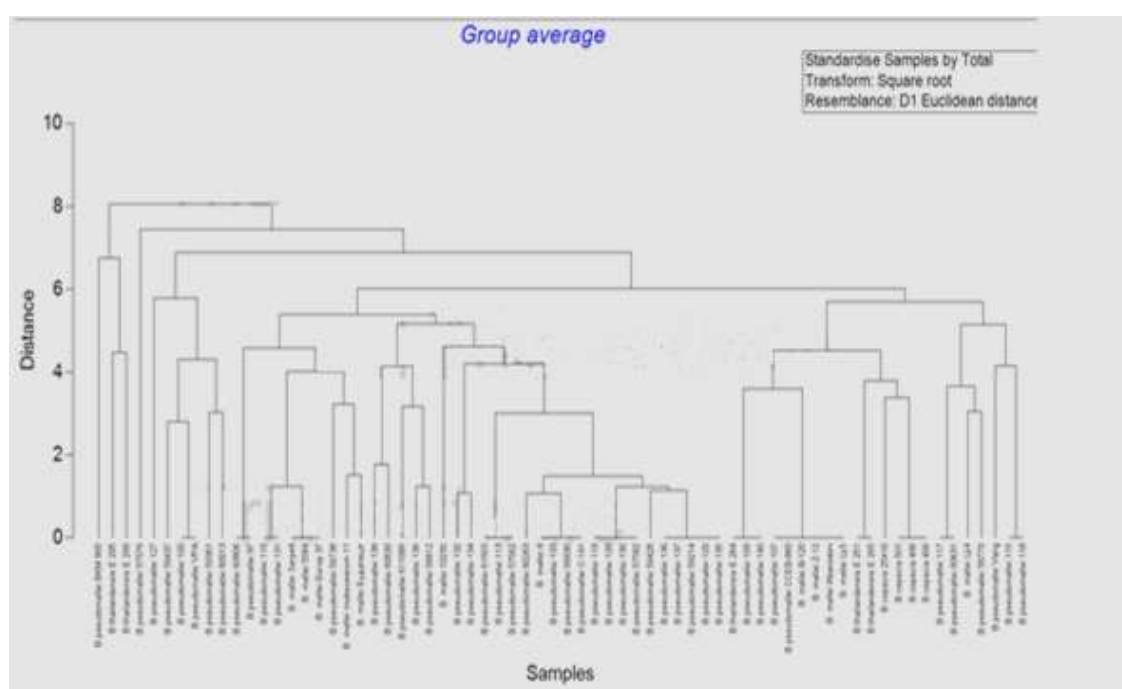


Рисунок 2. Группирование штаммов *Burkholderia* spp. на основе эвклидового расстояния показателей сходства биохимических профилей методом UPGMA.

Неметрическое многомерное ранжирование показателей сходства биохимических профилей (nMDS) позволило оценить распределение исследуемых штаммов буркхольдерий в системе двумерных координат, отражающих «расстояние» (степень несоответствия) индивидуальных биохимических профилей друг от друга (рис. 3).

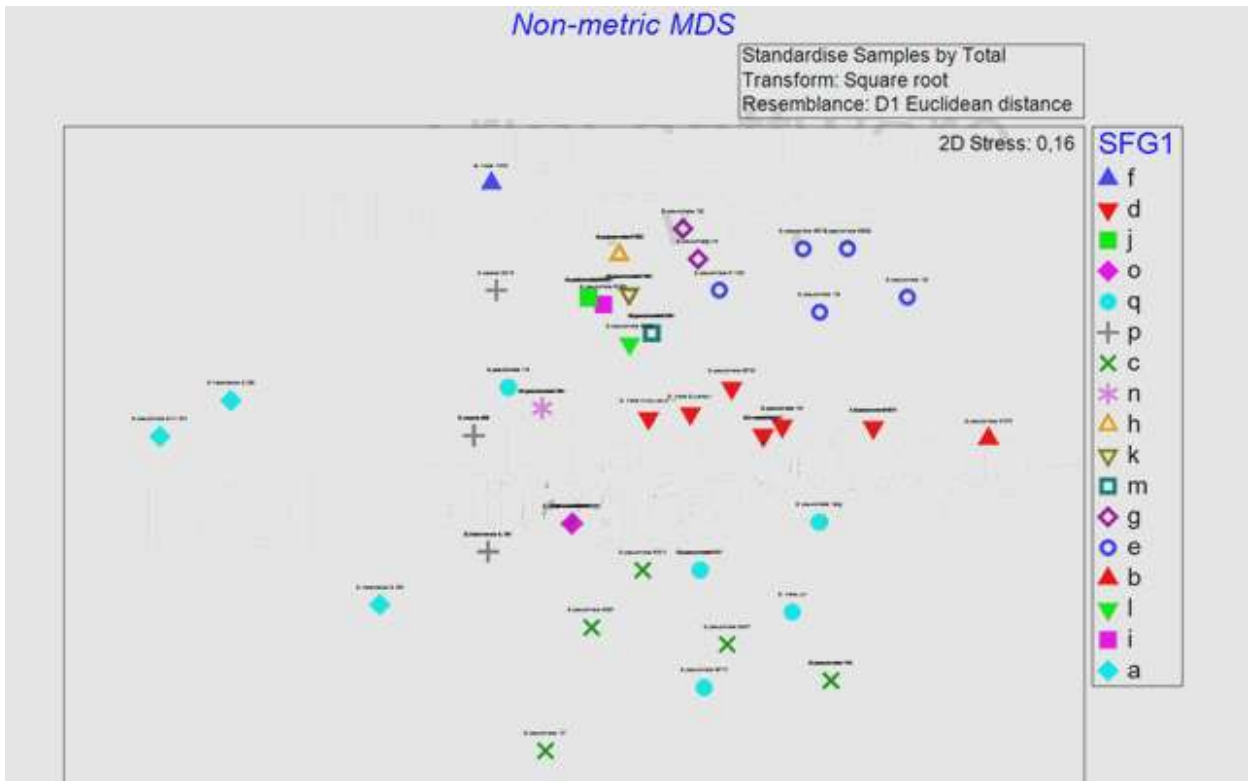


Рисунок 3. Распределение штаммов различных видов буркхольдерий методом неметрической многомерной градации показателей сходства их биохимических профилей (nMDS)

Из приведенных данных видно, что биохимические профили исследованных штаммов отличаются заметной гетерогенностью. Достаточно компактные группы сходства формируют штаммы кластеров **d** (штаммы *B. pseudomallei* 110, 131, 56738, 60806, 97, *B. mallei* 5584, Muksuwarum 11, Bogor 37, Будапешт, Загреб) и **e** (*B. pseudomallei* 138, 139, 56812, 60839, 611089).

Вместе с тем, непараметрический анализ сходства (ANOSIM) показал, в целом, невысокую степень достоверности отличий биохимических профилей исследованных штаммов буркхольдерий ($R\ 0.763$, $p\ 0.001$).

Анализ вклада индивидуальных биохимических тестов в общий показатель несходства между кластерами биохимических профилей штаммов, идентифицированных корректно/некорректно, и вообще не идентифицированных с использованием Micronault IDS, хотя и формирующих более или менее компактную группу сходства биохимических профилей продемонстрировал, что наибольший вклад в вариабельность результатов

оценки биохимических спектров штаммов вносят данные тестов на активность фосфодиэстеразы (DIP), хитиназы (CHIT), пролинамидазы (PRO), ассимиляции мальтозы (MALA), ферментации глюкозы (GLUF).

Учитывая то обстоятельство, что с использованием полуавтоматических тестов типа Micronault IDS могут быть получены нестабильные результаты, в том числе и в отношении родоспецифических и фенотипических признаков буркхольдерий (в частности, ферментации глюкозы, GLUF), становится очевидным неприменимость данных идентификационных наборов широкого спектра и их аналогов для определения видовой принадлежности глюкозо-неферментирующих грамотрицательных оксидазоположительных подвижных аэробных микроорганизмов, подозрительных на принадлежность к роду *Burkholderia*.

3.2. Идентификация патогенных буркхольдерий на микробиологическом анализаторе Vitek 2

При выполнении данного раздела работы были использованы 40 коллекционных штамма *B. pseudomallei* и 12 штаммов *B. mallei* (табл. 8, 9).

Из 40 исследованных штаммов *B. pseudomallei* – 31 был идентифицирован как возбудитель мелиоидоза с вероятностью 90 – 99 %, что составило 77,5 % от общего количества штаммов этого вида, взятых в работу. Штаммы *B. pseudomallei* 1, 2, Iran Terre 98, 139 и 56830 характеризовались нетипичным результатом по отдельным дифференцирующим тестам – способность к утилизации D-целлобиозы и отсутствие β -N-ацетилглюкозаминидазы – что снижало вероятность идентификации до 93 %. Вероятность идентификации оставшихся 9 штаммов возбудителя мелиоидоза составила менее 85 %. Данные штаммы были отнесены либо к *Burkholderia ceracia* group (4 штамма), либо к роду *Burkholderia* (5 штаммов) с возможностью определения видовой принадлежности микроорганизма с помощью дополнительных дифференциальных тестов (табл. 8).

Результаты идентификация коллекционных штаммов *B. pseudomallei* с использованием наборов Vitek GN

Международный номер или авторское обозначение штамма	Место выделения	Источник выделения	Система VITEK 2			
			Вероятность идентификации %, вид	Тесты с нетипичным результатом		
				dCEL	NAGA	BNAG
1	2	3	4	5	6	7
1	Вьетнам	больной человек	98 <i>B.pseudomallei</i>	+	+	+
2	Вьетнам	"-"	97 <i>B.pseudomallei</i>	+	-	+
Tchad 97	нет данных	нет данных	99 <i>B.pseudomallei</i>	-	+	+
Iran Terre 98	"-"	"-"	93 <i>B.pseudomallei</i>	+	-	-
Niamay 99	"-"	"-"	<85 <i>B.cepacia</i> / <i>B.pseudomallei</i>	+	-	+
Dalat 100	"-"	"-"	<85 <i>B.cepacia</i> / <i>B.pseudomallei</i>	+	+	-
Shigan 102	"-"	"-"	<85 <i>B.cepacia</i> / <i>B.pseudomallei</i>	+	-	-
Cheval du.jardin 103	"-"	"-"	<85 <i>B.cepacia</i> / <i>B.pseudomallei</i>	+	-	-
PJ 54 107	"-"	"-"	<85 <i>B.cepacia</i>	-	-	+
Ward 108, Roos 109, Pearce 110, Mahen 111, Coopek 112, Skanmandri 113, Snider 114	Австралия	больной человек	90 – 99 <i>B.pseudomallei</i>	-/+	-/+	+
Soil isolate 12 115	"-"	почва	96 <i>B.pseudomallei</i>	-	-	+
Soil isolate 13 116	"-"	"-"	98 <i>B.pseudomallei</i>	+	+	+
Goat isolate 17 117	"-"	коза	98 <i>B.pseudomallei</i>	+	+	+
128	"-"	нет данных	99 <i>B.pseudomallei</i>	-	+	+
130	"-"	"-"	<85 <i>B.cepacia</i>	+	-	+
131, 132, 133, 134, 136, 137	Таиланд	больной человек	97 – 99 <i>B.pseudomallei</i>	-/+	+	+
135	"-"	"-"	<85 <i>B.cepacia</i> / <i>B.pseudomallei</i>	+	-	+

Таблица 8. Продолжение

1	2	3	4	5	6	7
138	-''-	-''-	<85 <i>B.cepacia</i>	+	-	-
139	-''-	-''-	96 <i>B.pseudomallei</i>	+	+	-
C- 141(CIP6068),56770, 56812, 57582, 59437, 60631, 60806, 611083	Вьетнам, Сайгон	больной человек	95 – 99 <i>B.pseudomallei</i>	-/+	-/+	+
56830	-''-	-''-	98 <i>B.pseudomallei</i>	-	-	-
60839	-''-	-''-	<85 <i>B.cepacia</i>	+	-	+

Примечание: dCEL – D-целлобиоза, NAGA – β -N-ацетилгалактозоминидаза, BNAG – β -N-ацетилглюкозоминидаза; серый цвет ячеек – нетипичный результат теста; отрицательная реакция – «-», положительная реакция – «+».

Из 12 штаммов возбудителя сапа 8 (66,7 %) были идентифицированы как вид *B. mallei* с вероятностью более 90 – 99 % (табл. 9). Оставшиеся четыре штамма из-за наличия в биохимическом профиле нетипичных результатов пяти тестов (способность к утилизации сахарозы и D-трегалозы, отсутствие L-пролинариламидазы и тирозинариламидазы, наличие глицинариламидазной активности) система VITEK 2 отнесла одновременно к двум микроорганизмам: *Sphingomonas paucimobilis* и *B. mallei*, – с предложением использования дополнительных тестов для их дифференциации.

Таблица 9

Результаты идентификации коллекционных штаммов *B. mallei* с использованием наборов Vitek GN

Международный номер или авторское обозначение штамма	Место выделения	Система VITEK 2					
		Вероятность идентификации %, вид	Тесты с нетипичным результатом				
			SAC	dTRE	ProA	TyrA	GlyA
1	2	3	4	5	6	7	8
Ц-5	Монголия	<85 <i>S. paucimobilis/</i> <i>B. mallei</i>	+	+	+	+	+
«Иванович»	Югославия	99 <i>B. mallei</i>	-	-	+	+	-

Таблица 9. Продолжение

1	2	3	4	5	6	7	8
«Будапешт»	Венгрия	99 <i>B. mallei</i>	-	-	-	-	-
P-1	Югославия	99 <i>B. mallei</i>	-	-	-	+	-
11	Польша	95 <i>B. mallei</i>	-	-	-	+	-
Z-12	Югославия	<85 <i>S. paucimobilis/ B. mallei</i>	+	-	+	+	-
8	нет данных	96 <i>B. mallei</i>	-	-	-	+	-
B-120	Улан – Удэ	<85 <i>S. paucimobilis</i>	+	-	-	-	-
Bogor-37	Индонезия	90 <i>B. mallei</i>	+	+	+	+	+
Muksuwar-11	Индия	91 <i>B. mallei</i>	+	+	+	+	+
5584	нет данных	99 <i>B. mallei</i>	-	-	-	+	-
«Zagreb»	Югославия	<85 <i>S. paucimobilis/ B. mallei</i>	+	+	-	-	-

Примечание: SAC – сахароза, dTRE – D-трегалоза, ProA – L-пролинариламидаза, TyrA – тирозинариламидаза, GlyA – глицинариламидаза; серый цвет ячеек – нетипичный результат; отрицательная реакция – «-», положительная реакция – «+».

В литературе были неоднократно описаны случаи ошибочной идентификации изолятов *B. pseudomallei* при использовании автоматической системы VITEK 2 в различных клинических лабораториях [Deepak R.N. et all, 2008; Kiratisin, P. et all, 2007; Podin Y. et all, 2013; Zong Z. et all, 2012].

Использование автоматического анализатора VITEK 2 позволило корректно идентифицировать две трети из 52 штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза, изученных в рамках настоящей работы и полученных из лаборатории коллекционных штаммов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Однако, четыре штамма *B. pseudomallei* и один *B. mallei* были определены ложно как микроорганизмы комплекса *B. ceracia* и *S. paucimobilis* соответственно. Именно эти штаммы характеризовались нетипичными результатами тестов

BNAG(-), NAGA(-) и dCEL(+) – для мелиоидозных штаммов и SAC(+), dTRE(+), ProA(-), TyrA(-), GlyA(+) – для сапных.

Podin Y. с соавт. отмечали аналогичную закономерность: отрицательные результаты тестов β -N-ацетилглюкозаминидазы (BNAG) и β -N-ацетилгалактозаминидазы (NAGA) у изолятов *B. pseudomallei*, как правило, приводили к их ложной идентификации как микроорганизмов комплекса *B. ceracia*. При этом правильно идентифицированные штаммы *B. pseudomallei* обладали BNAG активностью, в то время как 12% штаммов, у которых видовая принадлежность была определена ошибочно, не обладали таковой [Podin Y. et al, 2013].

BNAG и NAGA – ферменты, субстратами для которых являются структурные компоненты экзополисахарида бактерий: поли- β -(1-6)-N-ацетилглюкозамин (PNAG) и N-ацетилгалактозамин [Yakandawala N. et al, 2011]. При этом, PNAG как известно, является важным элементом в формировании биопленок у многих видов *Burkholderia* и играют определенную роль в формировании множественной лекарственной резистентности микроорганизмов [Masoud H. et al, 1997].

N-ацетилгалактозамин, производное NAGA, также входит в состав экзополисахарида *B. pseudomallei* в качестве одного из основных компонентов [Masoud H. et al, 1997].

Ошибочная идентификация штаммов *B. pseudomallei* в нашем исследовании была связана с еще одним биохимическим показателем, не характерным для части штаммов возбудителя мелиоидоза – наличием активности фермента целлобиазы (β -глюкозидазы), катализирующим гидролиз гликозидной связи между двумя остатками глюкозы в молекуле целлобиозы. Данная активность присуща в первую очередь фитопатогенным бактериям, так как целлобиаза в синергизме с целлюлазой выполняют существенную роль в ферментативном разрушении оболочек растительных клеток. Ранее нами было показано наличие фитопатогенных свойств

различной степени выраженности у коллекционных штаммов *B. pseudomallei*: инфицирование листовых пластинок *Pereskia aculeata* приводило к их быстрой мацерации и изъязвлению, что косвенно указывало на наличие целлюбиазной активности [Молчанова Е.В., Агеева Н.П., 2014].

Более детальный анализ биохимических особенностей штаммов *B. pseudomallei*, приводящих к их ошибочной идентификации с использованием системы VITEK 2, был проведен с использованием алгоритма неметрической многомерной градации (nonmetric multidimensional scaling, nMDS) евклидовых расстояний матрицы сходства биохимических профилей. При этом достоверность отличий биохимических профилей корректно и некорректно идентифицированных штаммов оценивали методом непараметрического анализа сходства (analysis of similarities, ANOSIM), для вычисления среднего вклада каждого биохимического теста в общий показатель различия между кластерами штаммов применялась процедура анализа процента подобия (similarity percentage, SIMPER).

Неметрическая многомерная градация показателей сходства биохимических профилей (nMDS) позволила разделить исследуемые штаммы *B. pseudomallei* на 8 кластерных групп (рис. 4).

В состав кластеров А, F, E и G вошли по одному штамму. Кластер В представлен тремя ошибочно идентифицированными как *B. serapia* штаммами и одним с отличной идентификацией. В кластер С сгруппировано 13 штаммов с вероятностью идентификации 97 - 99 %. Наиболее представительным оказался кластер Н, включающий 11 штаммов с отличной, 2 штамма с хорошей достоверностью идентификации и 2 штамма, идентифицированные с низкой дискриминацией. В кластер D вошли 4 штамма, из которых 3 - с низкой дискриминацией и 1 - с вероятностью идентификации 93 % (таблица 10). Непараметрический анализ сходства (ANOSIM) показал достоверные отличия биохимических профилей корректно и ошибочно идентифицированных штаммов (R 0.836, P 0.001).

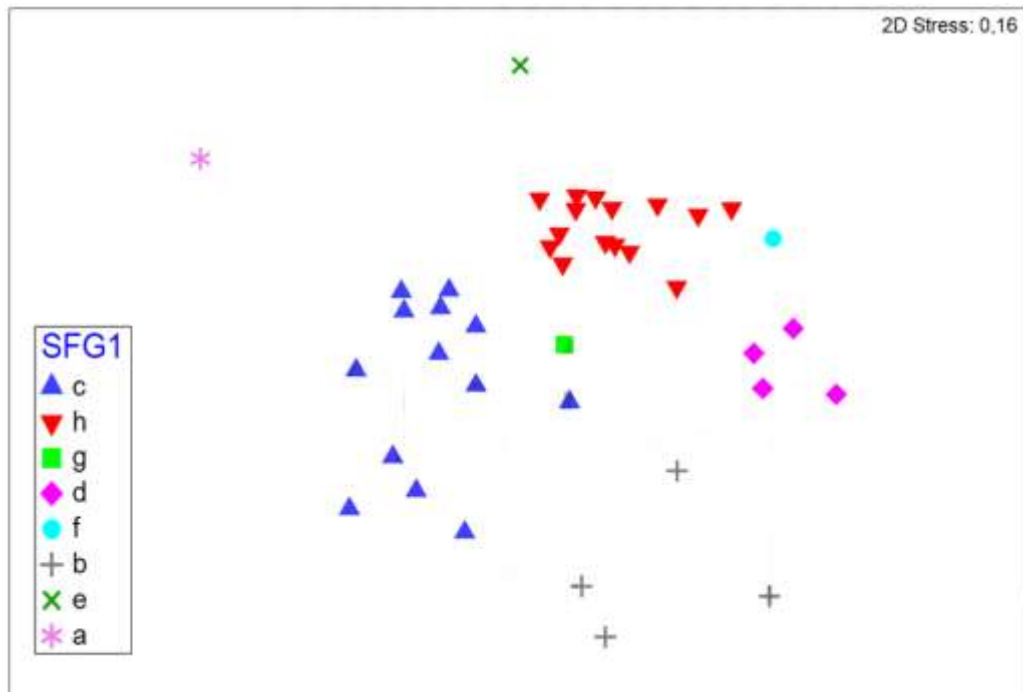


Рисунок 4. Распределение штаммов *B. pseudomallei* методом неметрической многомерной градации показателей сходства биохимических профилей (nMDS)

Таблица 10

Анализ сходства биохимических профилей штаммов *B. pseudomallei* методом nMDS

№ п/п	№ штамма	Идентифицированы как вид(ы)	Достоверность / Вероятность (%)	Кластер
1	2	3	4	5
1.	107	<i>B.ceracia</i> complex	отличная	A
2.	2	<i>B.pseudomallei</i>	97	B
3.	130	<i>B.ceracia</i> complex	отличная	B
4.	138	<i>B.ceracia</i> complex	очень хорошая	B
5.	60839	<i>B.ceracia</i> complex	отличная	B
6.	1	<i>B.pseudomallei</i>	98	C
7.	97	<i>B.pseudomallei</i>	99	C
8.	112	<i>B.pseudomallei</i>	99	C
9.	115	<i>B.pseudomallei</i>	96	C
10.	117	<i>B.pseudomallei</i>	98	C
11.	128	<i>B.pseudomallei</i>	99	C
12.	133	<i>B.pseudomallei</i>	97	C
13.	136	<i>B.pseudomallei</i>	99	C
14.	56770	<i>B.pseudomallei</i>	99	C
15.	56812	<i>B.pseudomallei</i>	99	C

Таблица 10. продолжение

1	2	3	4	5
16.	56830	<i>B.pseudomallei</i>	98	C
17.	57582	<i>B.pseudomallei</i>	97	C
18.	59437	<i>B.pseudomallei</i>	99	C
19.	98	<i>B.pseudomallei</i>	93	D
20.	100	<i>B.cepacia/ B.pseudomallei</i>	низкая дискриминация	D
21.	102	<i>B.cepacia/ B.pseudomallei</i>	низкая дискриминация	D
22.	103	<i>B.cepacia/ B.pseudomallei</i>	низкая дискриминация	D
23.	C-141	<i>B.pseudomallei</i>	95	E
24.	139	<i>B.pseudomallei</i>	96	F
25.	108	<i>B.pseudomallei</i>	99	G
26.	99	<i>B.cepacia/ B.pseudomallei</i>	низкая дискриминация	H
27.	109	<i>B.pseudomallei</i>	98	H
28.	110	<i>B.pseudomallei</i>	99	H
29.	111	<i>B.pseudomallei</i>	90	H
30.	113	<i>B.pseudomallei</i>	99	H
31.	114	<i>B.pseudomallei</i>	98	H
32.	116	<i>B.pseudomallei</i>	98	H
33.	131	<i>B.pseudomallei</i>	99	H
34.	132	<i>B.pseudomallei</i>	99	H
35.	134	<i>B.pseudomallei</i>	98	H
36.	135	<i>B.cepacia/ B.pseudomallei</i>	низкая дискриминация	H
37.	137	<i>B.pseudomallei</i>	98	H
38.	60631	<i>B.pseudomallei</i>	96	H
39.	60806	<i>B.pseudomallei</i>	99	H
40.	611083	<i>B.pseudomallei</i>	98	H

Анализ среднего вклада каждого биохимического теста в общий показатель несходства между кластерами биохимических профилей штаммов *B. pseudomallei*, идентифицированных с разным уровнем достоверности, показал, что достоверность идентификации резко снижается при отсутствии у штаммов признаков активности фосфатазы (PHOS), β -N-ацетилглюкозаминидазы (BNAG), β -N-ацетилгалактозаминидазы (NAGA) и наличия активности D-целлобиазы (dCEL), L-пролинариламидазы (ProA) и тирозинариламидазы (TyrA). При этом у штаммов, идентифицированных с

низкой дискриминацией, тесты dCEL, TyrA (в 100% случаев) и ProA (в 80% случаев) были положительными, а тесты NAGA (в 80% случаев), BNAG и PHOS (в 60% случаев) – отрицательными (табл. 11).

Сравнительный анализ биохимических профилей штаммов, составивших кластер В (штамм *B. pseudomallei* 2 с вероятностью идентификации 97 % и штаммы *B. pseudomallei* 130, 138 и 60839, ошибочно идентифицированные как *B. ceracia*), показал, что у всех штаммов тест на D-целлобиазу был положительным, а тесты на фосфатазу и β -N-ацетилгалактозаминидазу – отрицательными; тест BNAG оказался отрицательным только у одного из ошибочно идентифицированных штаммов – *B. pseudomallei* 138.

Таблица 11

Средний вклад каждого биохимического теста в наблюдаемое общее несходство между кластерами штаммов *B. pseudomallei*

Тест*	Доля вклада признака в общее несходство между кластерами (%)					Число (%) штаммов, показавших «+» результат теста		
	С-Н	С-D	Н-D	С-В	Н-В	идентифицированные		
						корректно	с низкой дискриминацией	некорректно
PHOS	3,44	7,40	9,76	8,75	6,77	25 (80,6%)	2 (40%)	1 (25%)
dCEL	4,16	7,89	6,83	10,73	5,86	10 32,3(%)	5 (100%)	3 (75%)
NAGA	4,32	5,82	7,08	7,86	5,94	24 (77,4%)	1 (20%)	0 (0%)
BNAG	< 3	9,25	9,76	4,35	< 3	28 (90,3%)	2 (40%)	3 (75%)
ProA	7,94	8,49	< 5	< 4	5,44	18 (58%)	4 (80%)	0 (0%)
TyrA	7,42	7,84	< 5	< 4	5,44	20 (64,5%)	5 (100%)	0 (0%)

*Полное название тестов приведено под таблицей 12

Также варьирующими оказались тесты AGLTr, dMAL, dMAN, dSOR, CIT и MNT, однако какой-либо закономерности, влияющей на правильность идентификации штаммов в этих случаях не выявлено (табл. 12).

Сравнительный анализ биохимических профилей штаммов *B. pseudomallei*, составивших кластер В*

	dCE L	NAG A	BNA G	AGLT p	dMA L	dMA N	Pro A	Tyr A	dSO R	CI T	MN T
<i>B. pseudomallei</i> 2	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 138	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>B. pseudomallei</i> 130	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 60839	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+

*В таблице не приведены тесты с единообразными результатами для всех штаммов группы. **dCEL** - D-целлобиаза; **NAGA** - β -N-ацетилгалактозаминидаза; **BNAG** - β -N-ацетилглюкозаминидаза; **PHOS**– фосфатаза; **AGLTp** – глутамилариламидаза; **dMAL** - D-мальтоза; **dMAN** - D-маннит; **ProA** - L-пролинаруиламидаза; **TyrA** - тирозинариламидаза; **dSOR** - D-сорбит; **CIT** - цитрат; **MNT** - малонат

Ключевыми в этой группе штаммов оказались результаты тестов на наличие активности ферментов L-пролинаруиламидазы и тирозинариламидазы – данные тесты были положительными у штамма *B. pseudomallei* 2, так же, как и у 58 % и 64,5 % корректно идентифицированных штаммов, соответственно, в то время как все ошибочно идентифицированные штаммы имели по этим тестам отрицательный результат (табл. 12).

Таким образом, на исследованной выборке штаммов с высокой статистической достоверностью показано, что совокупность отрицательных результатов тестов NAGA, BNAG, PHOS и положительных dCEL, TyrA и ProA приводит к идентификации штаммов *B. pseudomallei* с низкой дискриминацией, а сочетание наличия активности D-целлобиазы и отрицательных тестов NAGA, TyrA и ProA ведет к ошибочной идентификации возбудителя мелиоидоза как *B. ceracia*.

Полученные результаты демонстрируют необходимость дальнейшего расширения базы идентификационных ключей платформы VITEK 2 в отношении штаммов *B. pseudomallei* с атипичными профилями биохимической активности. Кроме того, учитывая реальную возможность завоза в нашу страну данного опасного заболевания, очевидно, что

инфекционисты и специалисты клинических диагностических лабораторий должны быть осведомлены о возможности ошибочной идентификации возбудителя мелиоидоза как *B. serapia* с использованием микробиологических анализаторов, а также о необходимости направления клинических образцов от пациентов с неясным диагнозом, побывавших в эндемичных по мелиоидозу регионах, на исследование непосредственно в специализированные лаборатории, имеющие разрешение на работу с ПБА I-II групп патогенности (опасности).

Глава 4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ БУРКХОЛЬДЕРИЙ ГРУППЫ «*PSEUDOMALLEI*» С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СРАВНИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗА МАСС-СПЕКТРОВ КОНСЕРВАТИВНЫХ КЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ

4.1. Выбор оптимальной схемы пробоподготовки клеток патогенных буркхольдерий для MALDI-TOF масс-спектрометрии

Поскольку на времяпролетных масс-спектрометрах, включая используемый Axima Confidence (Shimadzu) не предусмотрена дезинфекция внутренней рабочей зоны, одной из задач настоящей работы являлись выбор и оценка инактивирующей способности метода пробоподготовки для анализа вирулентных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*.

В рамках выполнения данного раздела исследования были испытаны различные методы пробоподготовки, включающие в себя как обеззараживание культуры, так и экстракцию белковых компонентов из клеток, а также их модификации, и на основе полученных результатов определен оптимальный вариант пробоподготовки для масс-спектрометрического анализа клеток патогенных буркхольдерий.

Перед использованием препаратов клеток для нанесения на мишени масс-спектрометра проводился контроль специфической стерильности. Для этого проводили высев по 0.1 мл клеточных суспензий на поверхность плотной питательной среды (Nutrient agar, Himedia) и инкубировали посеvy в термостате 48-72 часа при 37°C. Также высевали 1 мкл суспензии в пробирку с Luria бульоном на 48-72 часа при 37°C.

При выполнении данного раздела работы нами были использованы 2 варианта предварительной пробоподготовки.

В первом варианте 24 – 48 ч агаровую культуру бактерий в объеме 2-х стандартных бактериальных петель диаметром 2мм тщательно суспендировали микроцентрифужных пробирках в 100.0 мкл ультрачистой деионизованной воды (категория HPLC-grade). Затем к бактериальной

суспензии добавляли по 900.0 мкл 96° этанола, встряхивали на вортексе 20 - 30 секунд и центрифугировали при 10 тыс. об/мин в течение 2 минут. Супернатант удаляли, а осадок высушивали до полного удаления остатков этанола. Далее, к осадку добавляли 50.0 мкл 70 % муравьиной кислоты и 50.0 мкл ацетонитрила, тщательно перемешивали на вортексе, инкубировали 30 мин при комнатной температуре, еще раз перемешивали и центрифугировали при 13 тыс. об/мин в течение 2 мин. Супернатант, содержащий белковый экстракт, отбирали и использовали для нанесения на мишень масс-спектрометра (до использования хранили при -30°C).

При втором варианте пробоподготовки, в основу которого был положен метод экстракции клеточных белков трифторуксусной кислотой, описанный ранее [Lash et al., 2008], бактериальную массу (одна полная стандартная бактериальная петля, 2мм) суспендировали в микроцентрифужной пробирке в 50,0 мкл 80 %-й трифторуксусной кислоты (ТФУ), инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, далее к суспензии последовательно добавляли 150.0 мкл деионизованной H₂O, 200.0 мкл ацетонитрила, каждый раз тщательно перемешивая материал на вортексе. Далее препарат центрифугировали при 12 тыс. об/мин в течение 2 мин, супернатант, содержащий белковый экстракт, отбирали и использовали для снятия масс-спектров. До использования белковый экстракт хранили при минус 80°C.

Контроль специфической стерильности белковых экстрактов, полученных по первому и второму вариантам пробоподготовки показал отсутствие специфического бактериального роста на чашках с агаром и в Luria бульоне, что свидетельствовало о полном отсутствии жизнеспособных бактериальных клеток в подготовленных препаратах.

При анализе качества и воспроизводимости получаемых масс-спектров учитывались их следующие характеристики: количество спектральных пиков, их интенсивность (уровень сигнала), общая величина шумового компонента.

Результирующий спектр каждого штамма экспортировали в базу данных S.A.R.A.M.I.S.TM для последующего анализа.

Тестирование качества и воспроизводимости клеточных масс-спектров, полученных с использованием обоих методов экстракции, показало, что при экстракции 80 % ТФУ отмечалось недостаточное качество результирующего масс-спектра, вероятно, вследствие негативного влияния кислоты, оказываемого на структуру клеточных белков (рис. 5).

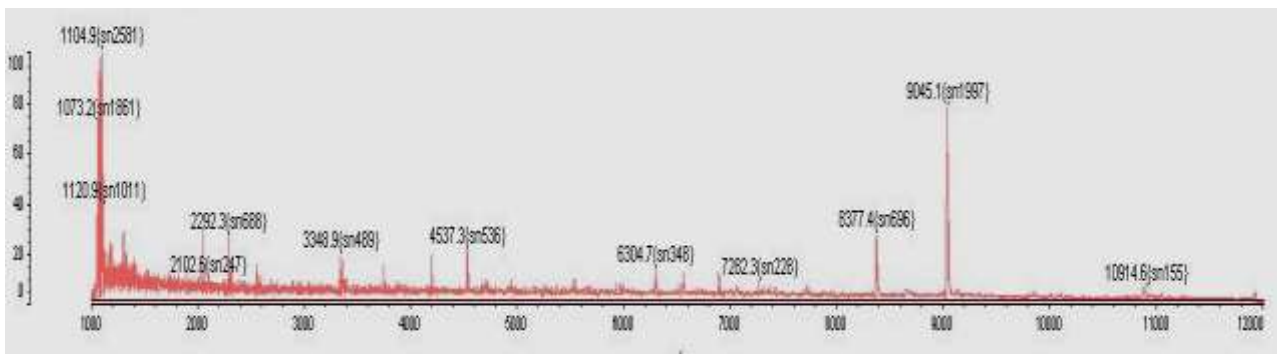


Рисунок 5. Масс-спектр клеток *B. pseudomallei* C-141 после пробоподготовки с применением экспозиции в 80%-м растворе трифторуксусной кислоты в течение 30 минут.

Изменение концентрации ТФУ в последующих опытах не приводило к заметному улучшению качества результирующих спектров (рис. 6).

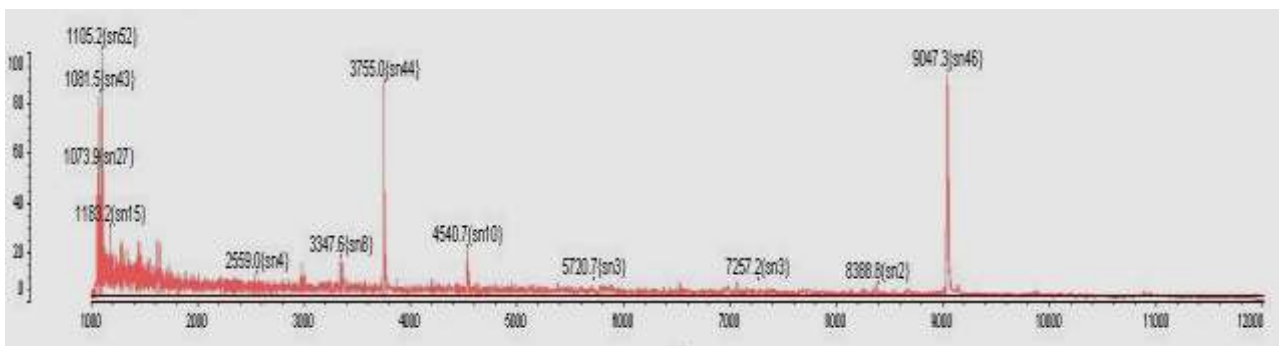


Рисунок 6. Масс-спектр клеток *B. pseudomallei* C-141 после пробоподготовки с применением экспозиции в 90%-м растворе трифторуксусной кислоты в течение 30 минут

Следующим испытанным методом пробоподготовки был метод экстракции белков смесью муравьиной кислоты и ацетонитрила после обработки этанолом, предложенный ранее [Karger et al., 2012]. К оригинальному протоколу авторов был добавлен этап прогревания образцов в течение 10 минут, дополнительные этапы центрифугирования, а кроме того, в дальнейшем анализе помимо супернатанта использовали и осадок (рис. 7).

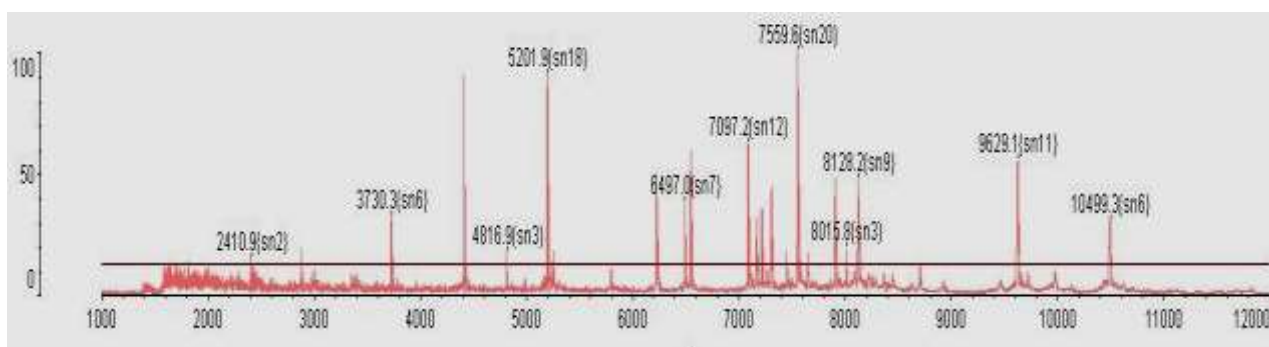


Рисунок 7. Масс-спектр клеток *B. pseudomallei* C-141 после пробоподготовки с применением муравьиной кислоты и ацетонитрила.

Основываясь на качестве масс-спектров, полученных после обработки культур данным методом, он был признан оптимальным. В результате, окончательный вариант пробоподготовки культур патогенных буркхольдерий для масс-спектрометрического анализа выглядел следующим образом.

Из культур штаммов буркхольдерий, выросших на плотной питательной среде, готовили взвеси в 300 мкл ультрачистой воды для ВЭЖХ (Panreac, Испания) в микроцентрифужных пробирках объемом 1.5 мл, используя для приготовления клеточной суспензии материал изолированной колонии. В пробирки с суспензиями клеток добавляли по 900 мкл абсолютного этанола, тщательно перемешивали на вортексе и инкубировали при комнатной температуре в течение получаса. После экспозиции препараты центрифугировали 2 мин при 3000 об/мин, удаляли супернатант, и тщательно высушивали на воздухе от остатков этанола. Далее в пробирки вносили по 50

мкл 70 % раствора муравьиной кислоты и ацетонитрила, и вновь перемешивали на вортексе. Суспендированный материал в объеме 0.5 мкл наносили на лунки металлической мишени (чипа). Сверху на каждую пробу добавляли по 0.5 мкл матрицы для MALDI-TOF (α -циано-гидроксикоричная кислота в растворе 50 % ацетонитрила и 2.5 % ТФУ). После кристаллизации проб мишень с образцами помещали в камеру масс-спектрометра. Согласно инструкциям производителя программного обеспечения S.A.R.A.M.I.S.TM, на 2 лунки каждой мишени также наносили клеточную суспензию референтного штамма *Escherichia coli* CCUG для калибровки прибора.

Регистрацию масс-спектров осуществляли на приборе «Axima Performance» ShimadzuTM с азотным лазером. Диапазон регистрации составлял 1000-20000 m/z, фиксировались только положительные ионы, суммарный спектр каждого образца составлялся на основе 100 единичных выстрелов лазера. В результате проведенной работы были получены качественные масс-спектры возбудителей сапа и мелиоидоза, а также оптимизирован протокол пробоподготовки культур *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei* для проведения масс-спектрометрического анализа.

4.2. Сравнительный анализ масс-спектров коллекционных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* и формирование референтных масс-спектров для их идентификации в MALDI-TOF MS

Полученные масс-спектры коллекционных штаммов возбудителя мелиоидоза и возбудителя сапа были сопоставлены в режиме «идентификация» с имеющейся в нашем распоряжении базой данных масс-спектров S.A.R.A.M.I.S.TM v.3.62 (Anagnostec).

Результатом такого сопоставления была генерация СУБД S.A.R.A.M.I.S.TM ранжированного списка видов микроорганизмов, имеющих максимальные показатели соответствия (score value) нормализованных значений индивидуальных масс спектральных пиков с массами ионов

тестируемого спектра. Показатели 'score' при этом, несут обобщенную и выраженную логарифмически информацию о количестве совпадений в массах индивидуальных пиков спектров, степени отклонения массы индивидуального пика тестируемого спектра от усредненного значения «референтного» показателя, а также частоте встречаемости (воспроизводимости) конкретного спектрального пика в референтной группе спектров. Пороговые значения 'score' для определения принадлежности тестируемого масс-спектра к конкретному роду и виду микроорганизмов определены производителем аналитического программного обеспечения (Anagnostec GmbH) как равные, либо превышающие 75 % в большинстве случаев.

Результаты ранжирования тестируемых клеточных масс-спектров штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* представлены на рисунках 8 и 9.

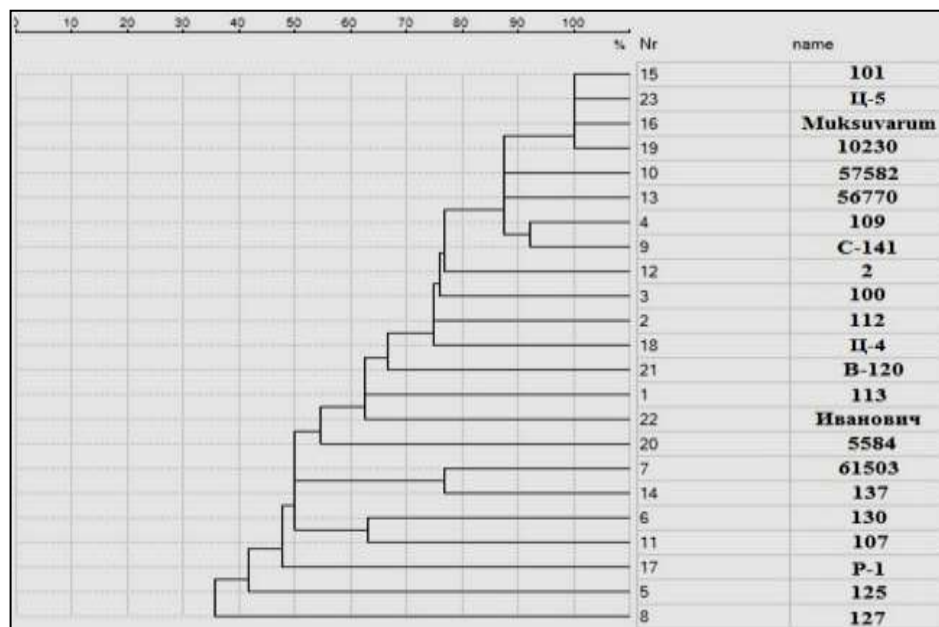


Рисунок 8. Ранжирование тестируемых клеточных масс-спектров штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*.

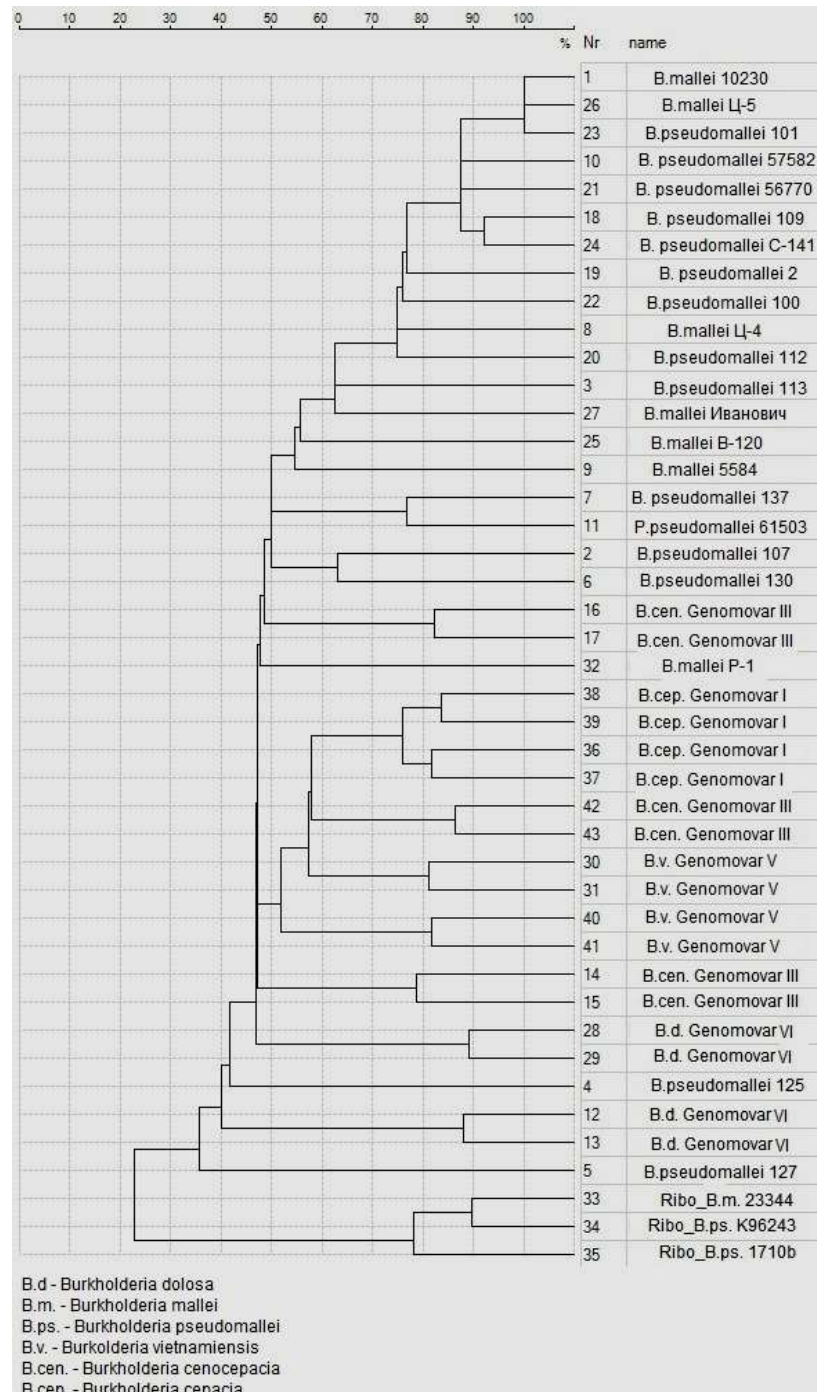


Рисунок 9. Ранжирование тестируемых клеточных масс-спектров штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* по отношению к характеристическим масс-спектрам *Burkholderia* spp. базы данных S.A.R.A.M.I.S.TM.

Известно, что условия культивирования (различные питательные среды, время и температура выращивания) могут повлиять на результат масс-спектрометрического белкового анализа в идентификации [Афанасьев М.В. и др., 2014; Karger A. et al., 2012]. При масс-спектрометрическом

профилировании штаммов, выращенных на Luria агаре и агаре на основе кислотного гидролизата казеина (АГК) выявлена зависимость качества получаемых белковых профилей от питательной среды. Так, масс-спектры, полученные из культур, выращенных на АГК, характеризовались меньшим количеством и интенсивностью пиков, а также большим зашумлением (рис. 10).

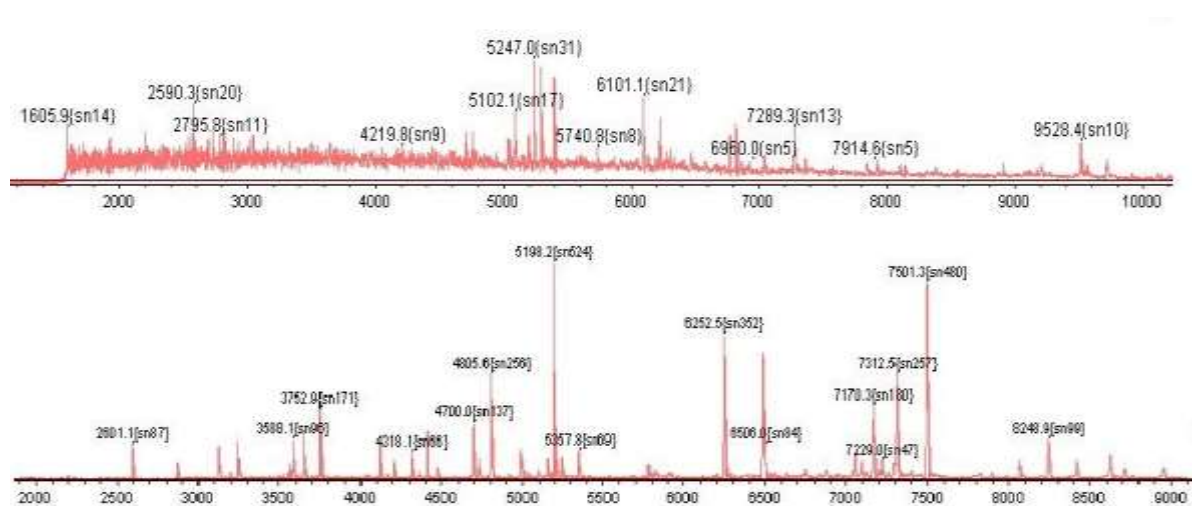


Рисунок 10. Масс-спектры общеклеточных белков штамма *B. pseudomallei* 109, выращенного на АГК (вверху) и на Luria агаре (внизу)

Вместе с тем, не было выявлено значимых различий в характеристиках белковых масс-спектров 18 или 24 ч агаровых культур. Также установлено, что при использовании клеток, культивируемых более суток, получение гомогенной суспензии было крайне затруднительным, что делало такую пробу непригодной для дальнейшего анализа.

На основании полученных результатов для масс-спектрометрического профилирования штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* в качестве питательной среды применялся Luria агар; период культивирования составлял не более 24 ч. Хотя при использовании любой из этих сред удалось идентифицировать микроорганизмы до вида, предпочтительным, на наш взгляд, было использование Luria агара (табл. 14).

Таблица 14

Степень достоверности (показатель 'score') идентификации в MALDI-TOF MS штаммов патогенных буркхольдерий

Число исследованных штаммов	Luria агар	АГК
32 штамма <i>B. pseudomallei</i>	>76%	>70%
11 штаммов <i>B. mallei</i>	>76%	>70%

С целью оценки воспроизводимости белковых масс-спектров культуры патогенных буркхольдерий исследовали троекратно с интервалом 6 мес. В результате было выяснено, что масс-спектрометрические профили, полученные для одного штамма, остаются фактически идентичными в течение всего времени исследования.

Как следует из вышеприведенных данных, надежная идентификация вида исследуемой бактериальной культуры и дифференциация между *B. pseudomallei* и *B. mallei* с использованием стандартной конфигурации идентификационной базы данных была возможна в большинстве случаев. Вместе с тем, в отдельных случаях между масс-спектрами различных видов более высокие показатели сходства, чем между штаммами внутри вида, что говорит о необходимости формирования референтных масс-спектров полного набора клеточных белков с использованием большего числа штаммов каждого из исследуемых видов буркхольдерий и строго унифицированных условий культивирования микроорганизмов.

Следует отметить, что в коммерческой базе данных S.A.R.A.M.I.S.[™], референтные спектры микроорганизмов видов *B. pseudomallei* и *B. mallei* соответствуют масс-спектрам чистых препаратов рибосомальных протеинов, в то время как в данной работе регистрировали спектры полного набора клеточных белков. Данное обстоятельство также предполагало предварительное создание соответствующих подразделов базы данных масс-спектров исследуемых микроорганизмов и формирование наборов спектров,

используемых в качестве референтных при идентификации штаммов патогенных буркхольдерий.

Для формирования референсных масс-спектров использовали по 5 типичных штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei*; спектры генерировали с 10-кратной повторностью по каждому из штаммов. Полученные референсные масс-спектры были использованы в дальнейшем для процедур автоматизированной идентификации изолятов и их группирования (типирования) на основе сходства/различия масс-спектрометрических характеристик.

Всего в базу данных S.A.R.A.M.I.S.TM были импортированы 10 референтных спектров белковых экстрактов типичных штаммов патогенных буркхольдерий, выращенных на L-агаре (рис. 11). При получении масс-спектров были использованы следующие параметры: алгоритм идентификации пика – Threshold 25%, Centroid, отношение сигнал/шум для спектров – не менее 5, минимальная интенсивность пика – не менее 100 относительных единиц, количество качественных пиков – до 200, ширина пика – 4 m/z. Дальнейшая идентификация остальных культур проводилась с использованием дополненной базы данных. Анализ масс-спектров белков выявил наличие пиков с определенными молекулярными массами, характерными для культур *B. pseudomallei* и *B. mallei*. Из 64 протеинов, отображенных на графических профилях, семь (3780, 4815, 5202, 6560, 7090, 7560, 9624 и 10460 Da) были найдены в спектрах всех исследованных образцов, пять из них - 4815, 5202, 6560, 7560, 9624 Da - имели максимальную интенсивность. Белок с конкретной молекулярной массой, наличие или отсутствие которого на масс-спектре позволило бы отнести исследуемый образец либо к *B. pseudomallei*, либо к *B. mallei* мы не обнаружили, однако, на белковых профилях легко визуализировался ряд пептидов со значительными различиями по интенсивности выраженности пика в зависимости от видовой принадлежности.

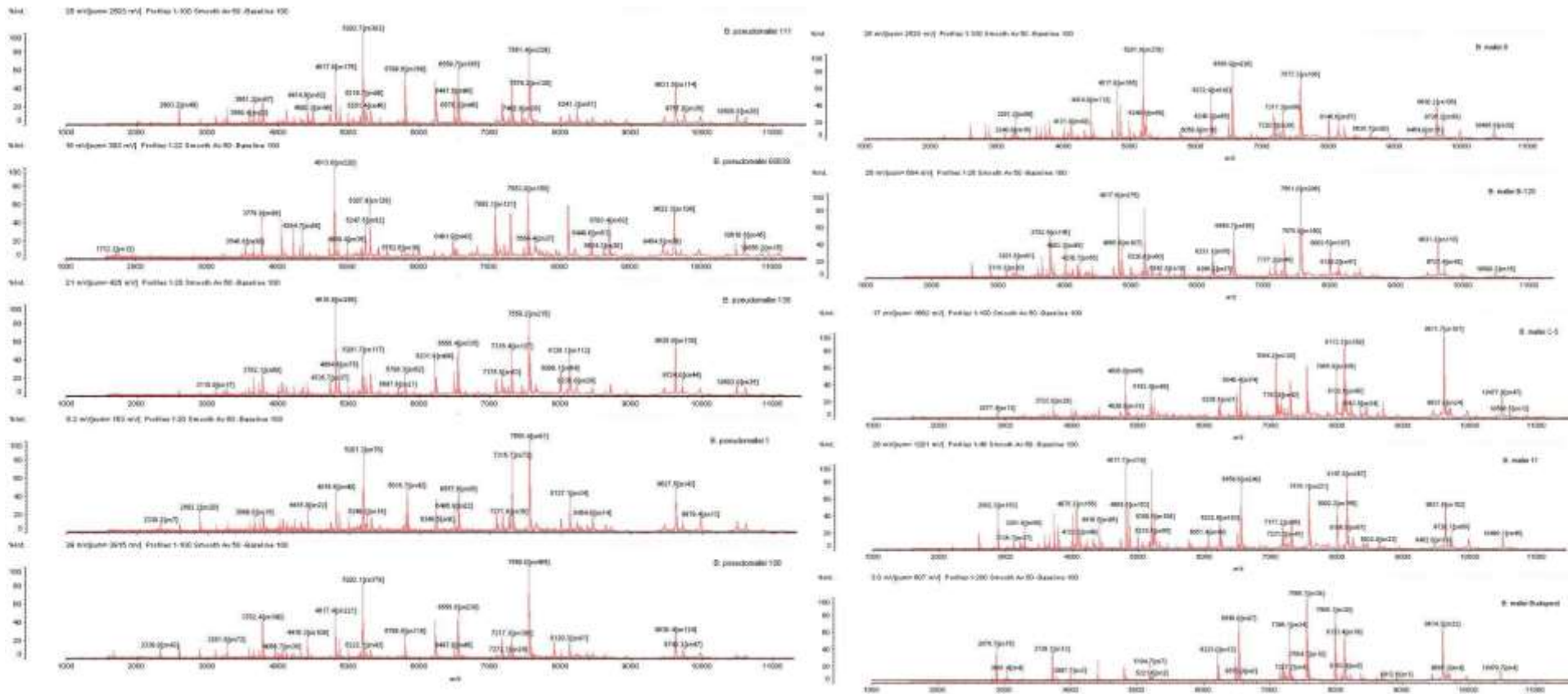


Рисунок 11. Референсные масс-спектры общецелочных белков штаммов патогенных буркхолдерий (слева - *B.mallei*, справа - *B.pseudomallei*)

Так, пики масс-спектров с молекулярными массами 6560, 8000, 8127 Da отличались у исследуемых видов и, возможно, могли бы рассматриваться как дифференцирующий признак.

В дальнейшем каждый из индивидуальных масс-спектров исследуемых штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* был сопоставлен в режиме «Идентификация» с базой данных характеристических масс-спектров, дополненной набором референсных спектров *B. pseudomallei* и *B. mallei*, сформированных в ходе проводимого исследования

Наличие референсных масс-спектров суммарных клеточных белков *B. pseudomallei* и *B. mallei* в базе данных обеспечивало 100 % корректную идентификацию исследуемого «неизвестного» изолята с валидной для видовой идентификации достоверностью (score value ≥ 75 %). Кластерный анализ полученных масс-спектров коллекционных штаммов патогенных буркхольдерий с использованием алгоритма Neighbor-Joining [Saitou, Nei, 1987] продемонстрировал группирование исследованных штаммов в соответствии с их видовой принадлежностью, вместе с тем, каких-либо закономерностей их распределения в зависимости от биохимических свойств, особенностей антигенной структуры, вирулентности проследить не удалось (рис. 12).

Аналогичный методологический подход был использован Karger с соавторами [Karger A. et al., 2012] в работе по оценке эффективности идентификации патогенных буркхольдерий методом MALDI ToF MS с использованием платформы MALDI Biotyper (Bruker). Авторами показано, что дифференциация между *B. pseudomallei* и *B. mallei* была затруднительна в случае использования в качестве элемента сравнения в базе данных индивидуальных масс-спектров штаммов микроорганизмов, однако дискриминирующую способность метода удалось повысить при предварительном формировании MSP-спектров для каждого из видов, соответствующих референсным спектрам платформы S.A.R.A.M.I.S.TM.

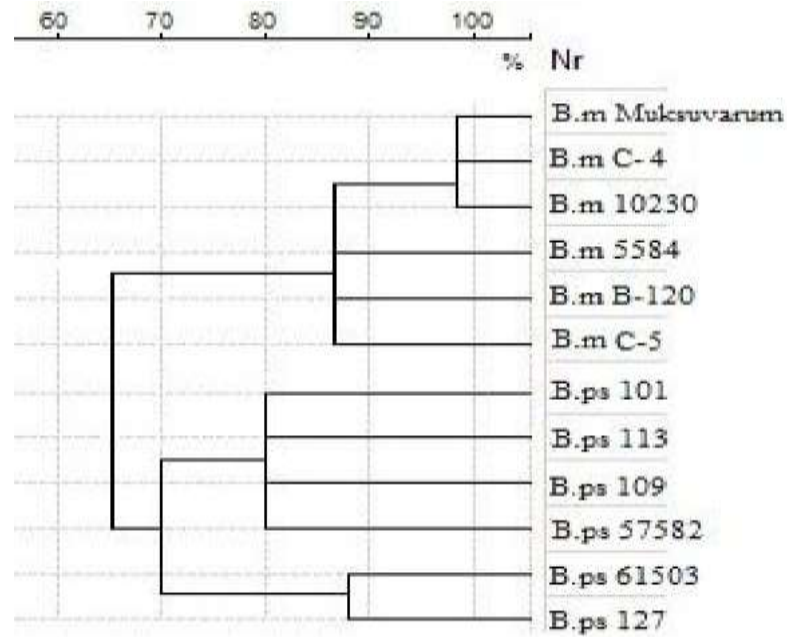


Рисунок 12. Кластерный анализ масс-спектров общеяклеточных белков коллекционных штаммов патогенных буркхольдерий (B.m. – *B. mallei*, B.ps. – *B. pseudomallei*).

Таким образом, результатом исследований, выполненных в данном разделе работы, стала разработка методологического подхода к идентификации *B. pseudomallei* и *B. mallei* с использованием прямого масс-спектрометрического профилирования клеточных белков. В ходе работы был оптимизирован протокол пробоподготовки культур возбудителей в соответствии с требованиями биологической безопасности при манипуляциях с ПБА II группы патогенности, подобраны условия культивирования штаммов и сформирован набор референсных масс-спектров для идентификационной базы данных S.A.R.A.M.I.S.TM (Anagnostec GmbH). Анализ коллекционных штаммов патогенных буркхольдерий продемонстрировал возможность достоверного определения таксономической принадлежности исследуемых микроорганизмов до видового уровня. Пополненная база масс-спектральных характеристик в дальнейшем позволит проводить экспресс-идентификацию изолятов, подозрительных на принадлежность к возбудителям мелиоидоза и сапа, а также будет являться основой для разработки схем хемотипирования штаммов буркхольдерий методом масс-спектрометрии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возможности контактов граждан РФ с новыми, или «забытыми» патогенами, к числу которых относятся возбудители мелиоидоза и сапа, возрастают в связи с развитием транспортного сообщения между странами, расширением туристических направлений, в том числе, охватывающих эндемичные по редким инфекционным заболеваниям территории, а также значительным потоком трудовых мигрантов из этих регионов. Отдельного внимания заслуживает вероятность возникновения чрезвычайной ситуации, обусловленной применением возбудителя мелиоидоза в качестве средства биотеррористических атак.

Возбудители мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) и сапа (*Burkholderia mallei*) относятся к β - подклассу протеобактерий, семейству *Burkholderiaceae*, роду *Burkholderia*, включающего в настоящее время более 90 видов микроорганизмов и представляющего собой довольно гетерогенную таксономическую группу, объединяющую сапрофиты, фитопатогены и патогены теплокровных животных и человека.

Мелиоидоз эндемичен для ряда стран Юго-Восточной Азии (Таиланд, Малайзия, Камбоджа, Вьетнам, Лаос, Мьянма, Гонконг, Тайвань, Сингапур), территорий южного Китая, Индостана, а также северной Австралии, Папуа Новой Гвинеи, Западной и Центральной Африки, о. Мадагаскар, в западном полушарии – Пуэрто-Рико, Сальвадора, островов Карибского бассейна, стран Латинской Америки (Венесуэла, Бразилия, Эквадор), где возбудитель входит в состав микробиоты почвы и воды стоячих водоемов. Заражение людей происходит преимущественно через поврежденную кожу или слизистые оболочки при контакте с водой или почвой, содержащих возбудитель. Не исключено заражение мелиоидозом при употреблении пищи и воды, загрязненных выделениями больных животных. Описаны редкие случаи передачи ее от человека к человеку (контакт с кровью и биологическими

жидкостями больного). К факторам риска заражения мелиоидозом относят диабет, хронические заболевания почек, хронические легочные патологии, талассемию, онкологические заболевания, алкоголизм. Высокому риску заражения мелиоидозом подвержены лица, посещающие эндемичные территории с целью экологического туризма, военный персонал, работники добывающей и строительной индустрии, сельского хозяйства или другие лица, имеющие контакт с почвой и водой стоячих водоемов.

Сап – зоонозная инфекционная болезнь, поражающая в естественных условиях преимущественно непарнокопытных животных (лошади, ослы, мулы, верблюды), а также представителей семейства кошачьих. В настоящее время сап животных регистрируется в Монголии, Турции, Иране, Ираке, странах Аравийского полуострова, Китае, Индии, Индонезии, Филиппинах. Основным резервуаром и источником инфекции для человека являются больные животные с острыми формами болезни, сопровождающимися обильным выделением гноя из открытых язв. Восприимчивость людей к сапу оценивается как высокая.

Возбудители мелиоидоза и сапа – близкородственные виды. Секвенирование и аннотация их геномов во многом способствовали установлению истинной природы фенотипической близости и существующих между ними различий. Несмотря на то, что оба микроорганизма могут рассматриваться в рамках одного геномного вида, особенности их генетической структуры определили позицию этих буркхольдерий как самостоятельных биологических видов с различной экологией и как возбудителей различных инфекций, отличающихся распространением и эпидемиологией. Полученные сведения о структуре геномов *B. pseudomallei* и *B. mallei* стали основой для изучения у них механизмов формирования антибиотикорезистентности, факторов патогенности, молекулярных и клеточных основ патогенеза вызываемых ими инфекций, идентификации различных генов, ответственных за внутриклеточное выживание *in vivo* и *in*

vitro, проведения глобального транскрипционного анализа генов, участвующих в образовании биопленок, анаэробном дыхании, стрессовом ответе на изменения в окружающей среде.

Со второй половины XX-го века мелиоидоз признается заболеванием, имеющим важное значение для здравоохранения в ряде эндемичных регионов, где ежегодная заболеваемость составляет до 50 случаев на 100000 населения. Так, в Таиланде мелиоидоз занимает третье место по смертности от инфекционных болезней, уступая только ВИЧ-инфекции и туберкулезу, и первое место – по смертности от острого сепсиса. Хотя считается, что нозоареал мелиоидоза ограничен областью 20° с.ш. и 20° ю.ш., крупные вспышки заболевания среди сельскохозяйственных животных и случаи заболевания человека неоднократно отмечались и за пределами этой зоны.

В Таиланде и северных районах Австралии, где в настоящее время регистрируют наибольшее число заболевших, исследования образцов из внешней среды (почва, ил, вода поверхностных водоемов) выявляют широкое распространение возбудителя. Неоднократно описаны вспышки заболевания, связанные с контаминацией запасов питьевой воды. Серологические обследования, проведенные среди различных групп населения в эндемичных по мелиоидозу регионах (северная Австралия, Таиланд, КНР, Тайвань, Сингапур, Камбоджа, Малайзия, северная и центральная Бразилия) демонстрируют высокий процент серопозитивности (до 35 - 40 %) прежде всего в группах, связанных с сельскохозяйственным производством. Подъем заболеваемости населения мелиоидозом в эндемичных регионах, как правило, приурочен к влажному климатическому периоду года (сезон дождей). Природные аномалии и катастрофы, связанные с обширным обводнением территорий эндемичных регионов, также сопровождаются выраженным подъемом заболеваемости мелиоидозом. Так, локальные вспышки мелиоидоза были отмечены в Таиланде, Индонезии, Шри-Ланке, Индии в период после цунами 2004г., на юге Тайваня после тайфуна 2005г., в Бразилии (штат Сеара)

после наводнения в 2003г., на северных территориях Австралии после продолжительного дождливого сезона 2009-2010 гг.

Регистрация случаев мелиоидоза в странах умеренных широт практически всегда связана с завозом инфекции из эндемичных территорий. Большинство завозных случаев мелиоидоза (более 100) зарегистрировано в США среди ветеранов войны во Вьетнаме.

На долю США также приходится большинство из зарегистрированных случаев завоза инфекции за последние 10 лет. В последнее время случаи мелиоидоза регистрировали также в Бельгии, Испании, Великобритании, Норвегии, Швеции, Финляндии, ФРГ, Израиле; в эпиданамнезе заболевших отмечено посещение ими эндемичных по мелиоидозу территорий. На территории Российской Федерации мелиоидоз до настоящего времени не регистрировался.

Согласно опубликованным недавно результатам прогнозно-аналитических исследований профильных специалистов из университетов Oxford и Cambridge (Великобритания), Mahidol (Таиланд), Fortaleza (Бразилия), Департамента пандемических и эпидемических заболеваний ВОЗ (Швейцария), Национального института здоровья (США) и ряда других исследовательских центров, современная заболеваемость мелиоидозом в мире может быть оценена на уровне 165000 случаев/год, а уровень смертности от инфекции составляет порядка 80000 случаев ежегодно, что сравнимо с показателем ежегодной смертности от кори (96500 случаев/год) и превышает смертность от лептоспироза (50000 случаев/год) и лихорадки Денге (9100 – 12500 случаев/год), при этом более 90 % летальных случаев мелиоидоза приходится на регионы Южной, Юго-Восточной Азии и Океании.

Сап в настоящее время является в основном компетенцией ветеринарных служб. Последний случай заболевания сапом человека вызван лабораторным заражением и зарегистрирован в США в 2000 г. За период 2000–2015 гг. заболевания сапом среди людей не отмечены, но в ряде стран

(Бразилии, ОАЭ, Ираке, Иране, Бахрейне, Швейцарии, Германии, Мексике, США, Индии) выявлены вспышки сапа у сельскохозяйственных и диких животных, а также завозные случаи, связанные с импортом больных животных. Как и возбудитель мелиоидоза, возбудитель сапа входит в перечень потенциальных агентов биотерроризма. Известно, что он чрезвычайно опасен при аэрогенном заражении. Потенциальную опасность *B.pseudomallei* определяет также его природная полиантибиотикорезистентность высокого уровня. Описаны несколько случаев внутрилабораторного инфицирования мелиоидозом сотрудников диагностических и исследовательских лабораторий.

В конце 2014г. произошел инцидент, связанный с грубым нарушением требований биологической безопасности при лабораторных исследованиях возбудителя мелиоидоза в исследовательском центре Tulane National Primate Research Center (США), где произошло заражение обезьян (макаки резус), содержащихся в питомнике исследовательского центра. Согласно опубликованным данным официального расследования экспертов CDC и Агентства по охране окружающей среды США, заражение животных явилось следствием заноса штамма *Burkholderia pseudomallei* из лаборатории уровня BSL3 обслуживающим персоналом, не использовавшим при манипуляции с инфицированными животными в лаборатории соответствующих средств индивидуальной защиты.

Клиническая диагностика мелиоидоза и сапа весьма затруднена ввиду высокой полиморфности симптоматики. При внедрении возбудителей в кожу может развиваться местная острая гнойная инфекция с регионарным лимфаденитом. Острая легочная форма заболевания возникает как первичная инфекция или в результате распространения возбудителя из локализованных очагов гематогенным путем, тяжесть его колеблется от легкого бронхита до некротической пневмонии. При рентгенографии грудной клетки в верхних долях легких выявляют ограниченные затемнения и тонкостенные полости;

картина часто напоминает туберкулез. Гематогенная диссеминация инфекции с развитием септической формы чаще наблюдается на фоне тяжелых сопутствующих заболеваний. Септическая форма мелиоидоза и сапа имеет неуклонно прогрессирующее течение и без своевременно начатой интенсивной терапии обычно приводит к смерти. При хроническом мелиоидозе и сапе наблюдаются острые или хронические абсцессы кожи и абсцессы внутренних органов. При постановке диагноза обязателен учет данных эпидемиологического анамнеза (посещение эндемичных территорий, наличие контактов с почвой, водой стоячих водоемов, больными животными).

В Российской Федерации лабораторные исследования при подозрении на мелиоидоз могут быть выполнены в Региональных центрах по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней I-II групп патогенности, Центрах индикации и диагностики опасных инфекционных болезней (противочумные учреждения, курирующие прикрепленные субъекты Российской Федерации), Референс-центре по мониторингу за возбудителями мелиоидоза и сапа (ФКУЗ Волгоградский НИПЧИ Роспотребнадзора). В круг основных задач Референс-центра входят разработка новых диагностических препаратов и методов лабораторной диагностики мелиоидоза и сапа, повышение профессиональной подготовки специалистов по вопросам индикации и лабораторной диагностики данных инфекций, оказание консультативно-методической и практической помощи при проведении исследований по установлению этиологических факторов инфекционных болезней с тяжелым и атипичным клиническим течением, а также при расследовании вспышек инфекционных заболеваний неясной этиологии.

Микробиологическую идентификацию культур, подозрительных на принадлежность к возбудителям сапа и мелиоидоза, проводят обычно в два этапа, на которых последовательно определяют род и вид исследуемой культуры бактерий. При отборе культур, подозрительных на принадлежность к роду *Burkholderia* учитывают их агглютинабельность диагностическими

агглютинирующими сыворотками в титре не менее 1:200, положительную каталазную активность, положительную цитохромоксидазную активность, способность к окислению глюкозы без ферментации.

Установление принадлежности исследуемой культуры к виду *B. pseudomallei* или *B. mallei* проводят на основании отсутствия способности к образованию истинного диффундирующего пигмента на плотных питательных средах, наличия аргининдигидролазы и отсутствия способности к декарбоксилированию лизина и орнитина, способности к гидролизу желатина, характеру роста при 42°C, способности к росту на средах с полимиксином и гентамицином, отсутствия роста на средах с высокими концентрациями NaCl (2,5 % и выше), отсутствия признака ассимиляции L-арабинозы. Оценивают также способность культуры к денитрификации и гидролизу эскулина.

Возбудители сапа и мелиоидоза являются филогенетически тесно связанными между собой видами микроорганизмов, что подчеркивают результаты многочисленных исследований [Беляков, 1990; Илюхин, 1983; Anuntagool et al., 2002; Cravitz et al., 1950; Howe et al., 1971; Yabuuchi et al., 1992; Coenye et al., 2001; Vandamme, 2002]. Как следствие филогенетической близости, *B. pseudomallei* и *B. mallei* свойственно значительное сходство фенотипических признаков, что существенно затрудняет их дифференциацию методами классического микробиологического анализа. С другой стороны, как показано многими исследователями, ряд индивидуальных признаков биохимической активности обладает существенной изменчивостью, как на межвидовом, так и внутривидовом уровне.

Несмотря на то, что для большинства фенотипических свойств *B. pseudomallei* и *B. mallei*, имеющих диагностическое значение, характерна высокая степень однородности внутри вида, ряд признаков характеризуется заметной вариабельностью. Так, из всех биохимических тестов, используемых для внутривидовой дифференциации, вариабельность результатов тестов была

отмечена в отношении окисления рамнозы, ксилозы, целлобиозы, реакции денитрификации, секреции клетками уреазы и гидролиза эскулина [Поповцева, 1985; Сенина, 2004; Gilardi, 1968, 1971, 1976; Palleroni, 1984]. В исследовании Gilardi [Gilardi, 1968] отрицательные результаты реакции денитрификации отмечены у 14 % штаммов возбудителя мелиоидоза. В этой же работе показано, что 85 % штаммов возбудителя мелиоидоза окисляли ксилозу, а штаммы *B. mallei* не обладали такой способностью. В работе Palleroni [Palleroni, 1984] показано, что 80 % штаммов возбудителя мелиоидоза окисляют рамнозу. Тест окисления целлобиозы отмечен у 86 % штаммов возбудителя мелиоидоза [Gilardi, 1971].

Весьма выраженной вариабельностью обладают также признаки уреазной активности и способности к гидролизу эскулина. В исследовании Gilardi [Gilardi, 1976] уреазная активность выявлена у 43 % штаммов возбудителя мелиоидоза, при изучении уреазной активности *B. mallei* выявлено 30 % уреазоположительных штаммов. По другим данным, доля уреазоположительных штаммов *B. mallei* не превышает 17 % [Palleroni, 1984]. Отмечено, что эскулин гидролизуют 57 % штаммов возбудителя мелиоидоза [Gilardi, 1968].

Определенная вариабельность фенотипических свойств возбудителя сапа отмечена и в работе Al-Ani F.K. с соавторами [Al-Ani, 1998]. По биохимическому профилю авторам удалось разделить 14 штаммов *B. mallei*, выделенных от больных лошадей в Ираке, на три группы, одну из которых формировали штаммы, не гидролизующие мальтозу.

В коммерческих автоматизированных и полуавтоматизированных микробиологических анализаторах (API, Vitek, BioLOG, BBL Crystal и другие), прочно вошедших в практику рутинной диагностической бактериологии, для идентификации изолятов патогенных буркхольдерий могут быть использованы идентификационные биохимические наборы для грамотрицательных неферментирующих микроорганизмов. Неоднократно

отмечалось, что коммерческие идентификационные системы не позволяют достоверно определять видовую принадлежность сапных культур, вероятно вследствие замедленного роста на используемых в системах средах и вариабельности проявления на них биохимических свойств возбудителя. Также следует отметить, что применение автоматизированных и полуавтоматизированных биохимических идентификационных систем для определения возбудителей мелиоидоза и сапа должно соответствовать требованиям по безопасности работ с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности), определенным действующими санитарно-эпидемиологическими правилами.

В отношении патогенных буркхольдерий необходимо также упомянуть еще о нескольких важных моментах, определяющих сложность их идентификации с использованием микробиологических биохимических анализаторов. В первую очередь речь идет об ошибках идентификации в отношении близкородственных буркхольдерий со схожими биохимическими признаками [Howard, Inglis, 2003]. Кроме того, атипичные биохимические профили возбудителей сапа и мелиоидоза достаточно часто вводят в заблуждение сотрудников диагностических лабораторий [Inglis et al., 2005].

Lowe с соавторами [Lowe et al., 2002] отмечали высокую (99 %) точность идентификации *B. pseudomallei* с помощью системы API 20E. Однако другими исследователями при изучении изолятов возбудителя мелиоидоза с помощью данной системы достоверно микроорганизм идентифицирован лишь в 50 % случаев при визуальном контроле результатов и в 63 % случае при анализе с использованием программного обеспечения производителя.

Inglis с соавторами [Inglis et al., 1998] также отмечали случаи недостаточно корректной идентификации *B. pseudomallei* в API 20NE, которую с помощью этой системы определяли как *Chromobacterium violaceum*.

Проведенные нами исследования по сравнительной характеристике эффективности идентификации штаммов видов патогенных буркхольдерий с

использованием биохимических наборов широкой специфичности (Micronault IDS), а также наборов для идентификации грамотрицательных неферментирующих микроорганизмов (API 20NE и Vitek 2 GN) продемонстрировал следующее.

В случае использования Micronault IDS ошибки идентификации были связаны, прежде всего, с вариабельностью ряда биохимических признаков штаммов - активности фосфодиэстеразы (DIP), хитиназы (CHIT), пролинамидазы (PRO), ассимиляции мальтозы (MALA), ферментации глюкозы (GLUF).

С учетом того, что среди обозначенных варьирующих фенотипических признаков присутствовали и родоспецифические фенотипические признаки буркхольдерий (в частности, ферментации глюкозы, GLUF), становится очевидным неприменимость идентификационных наборов широкого спектра Micronault IDS и их аналогов для определения видовой принадлежности глюкозо-неферментирующих грамотрицательных оксидазоположительных подвижных аэробных микроорганизмов, подозрительных на принадлежность к роду *Burkholderia*.

Сходные данные были получены и при идентификации изолятов патогенных буркхольдерий с применением других систем биохимического анализа широкого спектра - BD Phoenix [Koh et al., 2003], а также Microbact [Thomas, 1983].

Следует также принимать во внимание многочисленные сведения о том, что при верификации результатов идентификации различных видов буркхольдерий с использованием API 20 NE молекулярно-генетическими методами в референтных лабораториях выявлено, что примерно в 10 % случаев имеют место быть ложноположительные результаты, а в 5 % - ложноотрицательные [Shelly D.V. et all, 2000]. Правомерно, на наш взгляд, сделать заключение о том, что идентификационные наборы API 20 NE безусловно имеют ценность для предварительной идентификации культур

буркхольдерий в диагностических лабораториях, однако, учитывая вероятность ошибки при использовании API 20 NE и ошибочного отнесения непатогенных сапрофитных видов буркхольдерий к патогенным представителям рода, в референтных лабораториях необходимо верифицировать результаты биохимической идентификации изолятов *Burkholderia* spp., полученные с помощью данной идентификационной системы.

Из используемых в настоящее время в диагностической практике систем автоматизированного микробиологического анализа наиболее широко распространена платформа Vitek 2 (Biomerieux). При идентификации изолятов возбудителей мелиоидоза и сапа данная система зарекомендовала себя достаточно эффективным инструментом, тем не менее, опыт ее использования свидетельствует о довольно высокой вероятности ошибок при определении видовой принадлежности *B. pseudomallei* и *B. mallei*.

Так, неоднократно были описаны случаи ошибочной идентификации изолятов *B. pseudomallei* при использовании автоматической системы Vitek 2 в различных клинических лабораториях [Deepak et al, 2008; Kiratisin et al, 2007; Podin et al, 2013; Zong et al, 2012].

Чаще всего штаммы *B. pseudomallei* и *B. mallei* определяются ложно как микроорганизмы комплекса *B. cepacia* и *S. paucimobilis*. Было выявлено, что такие штаммы патогенных буркхольдерий характеризуются нетипичными результатами отдельных биохимических тестов - BNAG(-), NAGA(-) и dCEL(+) – для мелиоидозных штаммов и SAC(+), dTRE(+), ProA(-), TugA(-), GlyA(+) – для сапных. Podin с соавторами отмечали, что отрицательные результаты тестов β -N-ацетилглюкозаминидазы (BNAG) и β -N-ацетилгалактозаминидазы (NAGA) у изолятов *B. pseudomallei*, как правило, приводили к их ложной идентификации как микроорганизмов комплекса *B. cepacia*. Большинство корректно идентифицированных штаммов *B. pseudomallei* обладали BNAG активностью, в то время как 12 % штаммов, у

которых видовая принадлежность была определена ошибочно, не обладали таковой [Podin et al, 2013].

В ходе выполнения данной работы на исследованной выборке штаммов с высокой статистической достоверностью показано, что совокупность отрицательных результатов тестов NAGA, VNAG, PHOS и положительных dCEL, TyrA и ProA приводит к идентификации штаммов *B. pseudomallei* с низкой дискриминацией, а сочетание положительного результата теста на активность D-целлобиазы и отрицательных тестов NAGA, TyrA и ProA ведет к ошибочной идентификации возбудителя мелиоидоза как *B. ceracia*.

Полученные нами результаты демонстрируют необходимость дальнейшего расширения базы идентификационных ключей платформы VITEK 2 в отношении штаммов *B. pseudomallei* с атипичными профилями биохимической активности. Более того, учитывая реальную возможность завоза в нашу страну данного опасного заболевания, очевидно, что инфекционисты и специалисты клинических диагностических лабораторий должны быть осведомлены о возможности ошибочной идентификации возбудителя мелиоидоза как *B. ceracia* с использованием микробиологических анализаторов, а также о необходимости направления клинических образцов от пациентов с неясным диагнозом, побывавших в эндемичных по мелиоидозу регионах, на исследование непосредственно в специализированные лаборатории, имеющие разрешение на работу с ПБА I-II групп патогенности (опасности).

Результаты проведенных нами исследований в отношении совершенствования методов бактериологической идентификации возбудителей мелиоидоза и сапа были использованы при подготовке новых редакций методических указаний по лабораторной диагностике мелиоидоза и сапа.

К одним из значимых диагностических признаков буркхольдерий в последнее время стали относить белковые спектры, объективность анализа

которых значительно повысилась в связи с применением специализированных компьютерных программ для обработки и характеристики протеинограмм.

Так, еще в 1994г. Li и Hayward на основе спектра суммарных клеточных белков разделили различные штаммы II РНК группы псевдомонад, включая возбудитель мелиоидоза, на 16 кластерных групп при 89 % уровне сходства [Li, Hayward, 1994]. Vandamme с соавторами [Vandamme et al., 2000; Vandamme et al., 2002] на основе различий в белковом спектре штаммов провели идентификацию и дифференциацию различных геномоваров комплекса *B.cereacia*.

Внедряющиеся в практику лабораторных исследований новые автоматизированные системы анализа белковых компонентов микробных клеток позволяют существенно сократить время и повысить эффективность проведения диагностических исследований.

Времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией является одним из таких методов [Афанасьев М.В. и др., 2014; МР 4.2.0089-14, 2014; Телесманич Н.Р. и др., 2014; Karger A. et al., 2012; Zhou N. et al., 2011]. Суть метода заключается в матрично-опосредованной ионизации клеточных белков исследуемого патогена с последующим определением отношения массы к заряду ионов; на основе этих данных формируются характерные спектры [Lasch P. et al., 2008; Vanlaere E. et al., 2008]. Собранные в процессе анализа спектры исследуемых микроорганизмов сравнивают с референсными спектрами, присутствующими в электронной базе данных, используемой для автоматической идентификации [Karger A. et al., 2012]. Аналитическая чувствительность метода составляет 1000 КОЕ/мл) [Zhou N. et al., 2011]. В настоящее время наиболее распространены два аппаратно-программных комплекса для идентификации и биотипирования микроорганизмов с помощью масс-спектрометрии – MALDI Biotyper (Bruker, США) и S.A.R.A.M.I.S.TM (Anagnostec GmbH, Германия), основанные на использовании MALDI-ToF масс-спектрометров линейек

Microflex™ (Bruker) и Axima™ Confidence (Shimadzu, Япония), соответственно. Обе идентификационные базы данных содержат масс-спектры порядка 5 тыс. видов микроорганизмов, включая мицелиальные грибы, дрожжи, грамотрицательные и грамположительные бактерии, но в них практически отсутствуют референсные масс-спектры возбудителей особо опасных инфекций.

В связи с этим, одной из задач настоящего исследования являлось создание референтных белковых масс-спектров *B. pseudomallei* и *B. mallei* и апробация метода матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации для идентификации данных возбудителей с использованием имеющейся в нашем распоряжении платформы Axima™ Confidence – S.A.R.A.M.I.S.™

В ходе выполнения данного раздела работы нами были испытаны различные методы пробоподготовки, включающие в себя как обеззараживание культуры, так и экстракцию белковых компонентов из клеток, а также их модификации, и на основе полученных результатов определен оптимальный вариант пробоподготовки для масс-спектрометрического анализа клеток патогенных буркхольдерий, предусматривающий экстракцию микробных белков смесью муравьиной кислоты и ацетонитрила после обработки этанолом.

На основе анализа воспроизводимости и компонентного состава клеточных масс-спектров штаммов возбудителя мелиоидоза и сапа были получены данные о предпочтительности использования Luria агара для культивирования анализируемых штаммов и оптимальном времени выращивания бактериальных культур не более 24 ч.

Нами было установлено, что надежная идентификация вида исследуемого штамма и дифференциация между *B. pseudomallei* и *B. mallei* с использованием стандартной конфигурации идентификационной базы данных была возможна в большинстве случаев. Вместе с тем, в отдельных случаях выявлены более высокие показатели 'score' между штаммами различных

видов, что говорило о необходимости формирования набора референтных характеристических масс-спектров с использованием большего числа штаммов каждого из исследуемых видов буркхольдерий и строго унифицированных условий культивирования микроорганизмов.

Отметим также, что в имеющемся релизе базы данных S.A.R.A.M.I.S.TM v. 3.62 референтные спектры микроорганизмов видов *B. pseudomallei* и *B. mallei* представлены масс-спектрам чистых препаратов рибосомальных протеинов, в то время как в данной работе регистрировали спектры полного набора клеточных белков, что предполагало предварительное создание соответствующих подразделов базы данных масс-спектров исследуемых микроорганизмов и формирование наборов спектров, используемых в качестве референтных при идентификации.

Для формирования референсных масс-спектров использовали по 5 типичных штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei*; спектры генерировали с 10-кратной повторностью по каждому из штаммов. Полученные референсные масс-спектры были использованы в дальнейшем для процедур автоматизированной идентификации изолятов и их группирования (типирования) на основе сходства/различия масс-спектрометрических характеристик.

Получение референсных масс-спектров суммарных клеточных белков *B. pseudomallei* и *B. mallei* и их импорт в базу данных обеспечили 100 % корректную идентификацию исследуемых «неизвестных» изолятов патогенных буркхольдерий. Кластерный анализ полученных масс-спектров коллекционных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* продемонстрировал четкое группирование исследованных штаммов в соответствии с их видовой принадлежностью на уровне сходства масс-спектров (показатель 'score'), соответствующем порогу валидной идентификации (≥ 75 %).

Аналогичным образом, Karger с соавторами [Karger A. et al., 2012] в исследовании по идентификации патогенных буркхольдерий методом

MALDI-TOF MS с использованием платформы MALDI Biotyper (Bruker) показали, что корректная дифференциация между *B. pseudomallei* и *B. mallei* представляется затруднительной в случае использования в качестве элемента сравнения лишь индивидуальных масс-спектров штаммов микроорганизмов, а дискриминирующая способность метода существенно возрастает при предварительном формировании MSP-спектров (референтных спектров) для каждого из видов буркхольдерий.

Таким образом, при выполнении данного раздела работы была осуществлена разработка методологического подхода к идентификации *B. pseudomallei* и *B. mallei* с использованием прямого масс-спектрометрического профилирования клеточных белков и сформирован набор референтных масс-спектров для идентификационной базы данных S.A.R.A.M.I.S.[™]. Пополненная база масс-спектральных характеристик в дальнейшем позволит проводить экспресс-идентификацию изолятов, подозрительных на принадлежность к возбудителям мелиоидоза и сапа, а также будет являться основой для разработки схем хемотипирования штаммов буркхольдерий методом масс-спектрометрии.

Результаты, полученные при выполнении данного раздела работы, были использованы при подготовке проекта методических рекомендаций «Создание баз данных референтных масс-спектров возбудителей I-II групп патогенности для проведения автоматической идентификации микроорганизмов методом масс-спектрометрии» (представлены к утверждению в Роспотребнадзор), а также при формировании единой базы 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).

В целом, в результате выполнения данной работы были предложены усовершенствованные алгоритмы идентификации и дифференциации

штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа с применением современных систем автоматизированного микробиологического анализа, которые внедрены в практику работы Референс-центра по мониторингу за возбудителями мелиоидоза и сапа на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора и могут быть использованы в работе диагностических лабораторий Региональных центров по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней I-II групп патогенности, Центров индикации и диагностики опасных инфекционных болезней (противочумные учреждения, курирующие прикрепленные субъекты Российской Федерации), а также Национальных центров по верификации диагностической деятельности с функцией Государственных коллекций микроорганизмов.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что при использовании биохимических наборов широкой специфичности (Micronault IDS и аналоги) ошибки идентификации *Burkholderia pseudomallei* и *B. mallei* связаны с вариабельностью биохимических признаков штаммов - активности фосфодиэстеразы (DIP), хитиназы (CHIT), пролинамидазы (PRO), ассимиляции мальтозы (MALA), ферментации глюкозы (GLUF).
2. Показано, что при использовании идентификационных наборов Vitek 2 GN, совокупность отрицательных результатов тестов NAGA, BNAG, PHOS и положительных dCEL, TyrA и ProA приводит к идентификации штаммов *B. pseudomallei* с низкой дискриминацией, а сочетание положительного результата теста на активность D-целлобиазы и отрицательных тестов NAGA, TyrA и ProA ведет к ошибочной идентификации возбудителя мелиоидоза как *B. ceracia*.
3. Разработан комплекс методических приемов пробоподготовки клеток патогенных буркхольдерий для MALDI-TOF масс-спектрометрии. Установлено, что наиболее эффективным методом пробоподготовки, обеспечивающим как обеззараживание, так и эффективную экстракцию белковых компонентов, является обработка муравьиной кислотой и ацетонитрилом.
4. Определено, что оптимальной схемой культивирования *B. pseudomallei* и *B. mallei*, обеспечивающей достаточный уровень воспроизводимости и высокие качественные характеристики клеточного масс-спектра (отклонения координат наиболее интенсивных пиков не более 0.3 кДа, колебания соотношения s/n не более 20 единиц) является выращивание клеток микроорганизмов в течение 18 - 24 ч при 37°C на агаре Luria.

5. Сформированы видовые референтные «суперспектры» общеклеточных белков *B. pseudomallei* и *B. mallei*, содержащие набор наиболее характерных и стабильно воспроизводимых спектральных пиков в анализируемом диапазоне молекулярных масс.
6. Разработаны оригинальные разделы электронной базы данных референтных MALDI-TOF спектров S.A.R.A.M.I.S.TM (виды *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei*, в структуре домен *Bacteria*, царство *Proteobacteria*, класс *Betaproteobacteria*, порядок *Burkholderiales*, семейство *Burkholderiaceae*, род *Burkholderia*), позволяющий проводить видовую идентификацию штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа с приемлемой достоверностью (показатель 'score' ≥ 75 %).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ПЦР – полимеразная цепная реакция
РСК – реакция связывания комплемента
РНГА – реакция непрямой гемагглютинации
РА – реакция агглютинации
СП – санитарные правила
ТИФМ – твердофазный иммуноферментный метод
ТСА – триптиказо-соевый агар
ТФУ – трифторуксусная кислота
MALDI TOF – времяпролётная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
ЛПС - липополисахарид
ООИ – особо опасные инфекции
ИХ - иммунохроматографический
кТИФМ - конкурентный вариант твёрдофазного иммуноферментного метода
НМФА - непрямой метод флуоресцирующих антител
ИЭФ - иммуноэлектрофорез
dot-ИФА (IgM-ELISA) - точечный твердофазный иммуноферментный анализ
kDa – килодальтон
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота
Real-time PCR – полимеразная цепная реакция в реальном времени
SNP – однонуклеотидный полиморфизм
GN- грамм-отрицательный
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
S.A.R.A.M.I.S.TM – спектральный архив и микробиологическая система идентификации
АГК - кислотный гидролизат казеина
ВОЗ – всемирная организация здравоохранения
MSP-спектры – референтные спектры

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агеева Н.П. Фенотипическая характеристика мутантов *Burkholderiamallei*, дефектных по синтезу внеклеточных протеолитических ферментов / Н.П. Агеева, Л. К. Меринова, Д. В. Викторов, Н. Г. Плеханова // Вестник ВолГМУ. – 2005. – № 2. – С. 11-15.
2. Адимов Л.Б. Бактериофаг возбудителя мелиоидоза. Диагностика особо опасных инфекций / Л.Б. Адимов. – Ростов н/Д, 1986. – С.33-36.
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. Беляков В.Д., Ряпис Л.А., Илюхин В.И. Псевдомонады и псевдомонозы / В.Д. Беляков, Л.А. Ряпис, В.И. Илюхин // М.: Медицина, 1990. – 224 с.
5. Илюхин В.И. Сап в XXI веке: распространение, научные достижения / В.И. Илюхин, Т.В. Сенина // Ветеринария. – 2014. – № 3. – С. 14-17.
6. Гришкина Т.А. Явление лизогении у *Pseudomonas pseudomallei* и сравнительная характеристика мелиоидозных фагов: дис. канд. мед. наук / Т.А. Гришкина // Волгоград. – 1996. – 118 с.
7. Жога Л.К. Транспортная среда для патогенных псевдомонад / Л.К. Жога, В.И. Илюхин, В.М. Самыгин // Клин. лаб. диагн. – М.: Медицина. – 1995. – С.38 -40.
8. Илюхин В. И. Идентификация *Pseudomonas pseudomallei* / В. И. Илюхин, Л. Д. Поповцева, Н. Н. Пивень // Лаб. дело – 1983.– №7.– С.61–62.
9. Илюхин В.И. Мелиоидоз. Диагностика возбудителей опасных инфекционных болезней / В.И. Илюхин, В.С. Замараев, В.П. Батманов и

- др. – Саратов, 1998. – Т.2. – С.115-143.
10. Илюхин В.И., Замараев В.С., Каплиев В.И. Микробиология *Pseudomonas mallei*: таксономия и бактериологическая диагностика. Сап / Под ред. Н.Г. Тихонова. – Волгоград. – 1995. – С.7–19.
 11. Илюхин В.И., Замараев В.С., Каплиев В.И. Микробиология *Pseudomonas mallei*: таксономия и бактериологическая диагностика. Сап. / Под ред. Н.Г. Тихонова. – Волгоград, 1995. - С.7–19.
 12. Каплиев В. И. Изучение морфологии возбудителя мелиоидоза при культивировании, взаимодействии с клетками макроорганизма и воздействии антибактериальных препаратов. Ультраструктурный аспект: дис. канд. мед. наук / В. И. Каплиев. – Саратов, 1989. – 139 с.
 13. Киприанова Е. А. Фенотипические признаки в идентификации некоторых видов рода *Pseudomonas* / Е. А. Киприанова, Б. Е. Айзенман, О. И. Бойко, А. Д. Гарагуля // Микробиол. журн. – 1976. – Т. 38, № 4. – С. 420-428.
 14. Онищенко Г.Г. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство / Под ред. акад. РАН Г.Г. Онищенко, акад. РАН В.В.Кутырева // Изд. 2-е, переработанное и дополненное. – М.: ЗАО «Шико». – 2013. – 560 с.
 15. Мелиоидоз: сб. науч. трудов / Под ред. Н. Г. Тихонова. – Волгоград: Ниж-Волж. кн. изд-во. – 1995. – 224 с.
 16. 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
 17. Михайлова Л. Проучвания върху R- и S-формы на *Pseudomonas pseudomallei*. Ультраструктурна характеристика / Л. Михайлова, С.

- Радоевска, Г. Радучева, Д. Велянов // Actamicrobiol. bulg. – 1983. – №13. – С. 3–10.
18. Молчанова Е.В., Агеева Н.П. Использование фитопатогенного эффекта для изучения вирулентности *Burkholderia* // Бюл. Экспер. Биол. Мед. – 2014. – Т.158, №10. – С. 522-525.
 19. Орлова Г. М. Слизистые варианты мелиоидозного микроба / Г. М. Орлова, Т. А. Кудрякова, Л. А. Ряпис, Л. Р. Черкасова // Вопросы теоретической и прикладной биологии. – Ростов н/Д. – 1973. – С. 10-106.
 20. Орлова Г. М. Сравнительная характеристика роста мелиоидозного микроба на некоторых плотных питательных средах / Г. М. Орлова, Н. Ф. Касаткин, Д. Т. Ширяев // Пробл. особо опасн. инф., Саратов. – 1971. – С. 158-162.
 21. Попов С. А. Особенности ультраструктуры возбудителя мелиоидоза и его взаимодействия с фагоцитами *in vivo* / С. А. Попов, Б.И. Мельников, В. Я. Курилов, В. Г. Божко // Микробиол. журн. – 1990. –Т.52, №2. – С. 18-22.
 22. Попов С. Ф. *Pseudomonas pseudomallei* и *Pseudomonas mallei* капсулообразующие бактерии / С. Ф. Попов, В. Я. Курилов, А. Т. Яковлев // Журн. микробиол. – 1995. – №5. – С. 32-36.
 23. Ряпис Л. А. Некоторые вопросы азотистого обмена возбудителей сапа и мелиоидоза: автореф. дис. канд. мед. наук / Л. А. Ряпис. – Саратов, 1968. –18 с.
 24. Ряпис Л. А. Сравнительная характеристика ультраструктуры возбудителей сапа и мелиоидоза / Л. А. Ряпис, С. М. Фарбер, Е. П. Голубинский, С. А. Токарев // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. –1975. – №5. – С. 41–43.
 25. Ряпис Л. А. К методу выделения возбудителя мелиоидоза / Л. А. Ряпис, Д. Т. Ширяев // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1974. – №1. – С. 138–141.

26. Ряпис Л.А. Лабораторная диагностика клинически значимых видов псевдомонад / Л.А. Ряпис, В.И. Илюхин, Е.И. Вострова // Лаб. дело. – 1988 . – №12. – С. 66 -71.
27. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118-13 Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) // Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – М., 2014. – 195 с.
28. Томов А.Ц. Лизогения у рода *Malleomyces* / А.Ц. Томов, Е.Д. Цветкова, Н.М. Милушева // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. – 1970. – №8. – С. 102-106.
29. Цветков Н.Е. Сап / Н.Е. Цветков, В.З. Черняк // Сельхозиздат. – 1947. – 257 с.
30. Ширяев Д. Т. Методы обнаружения возбудителя мелиоидоза в объектах внешней среды и другом материале / Д. Т. Ширяев, Л. А. Ряпис, А. П. Кочеткова // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1976. – №4. – С. 91–95.
31. Aiello S. E. The Merck Veterinary Manual, 8th ed. / Aiello S. E. // Merck. – 1998. – 502 p.
32. Al-Ani FK, Roberson J. Glanders in horses: a review of the literature / FK Al-Ani, J. Roberson // J. Vet.Arhib. – 2007. – Vol. 77. – P. 203–218.
33. Alibasoglu M. Glanders outbreak in lions in the Istanbul zoological garden / M. Alibasoglu, T. Yesildere, T. Calislar, T. Inal, U. Calsikan // Berl. Munch. Tierärztl. Wochenschr. – 1986. – Vol. 99. – P. 57–63.
34. Anuntagool N. Antigenic relatedness between *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* / N. Anuntagool, S. Sirisinha // Microbiol Immunol. – 2002. – Vol. 46. – P.143-150.

35. API 20 NE. Analytical profile index // Bio Merieux S.A., 6 ed. – 1997. – 254 p.
36. Appassakij H. Diagnostic value of the indirect hemagglutination test for melioidosis in an endemic area / H. Appassakij, K.R. Silpapojakul, R. Wansit, M. Pornpatkul // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 1990. – Vol. 42, № 3. – P. 248-53
37. 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.
38. Ashdown L.R. The prevalence of human melioidosis in Northern Queensland / L.R. Ashdown, R.W. Guard // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 1984. – Vol. 33. – P. 474 - 478.
39. Bauernfeind A. Molecular procedure for rapid detection of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* / A. Bauernfeind, C. Roller, D. Meyer, R. Jungwirth, I. Schneider // J. Clin. Microbiol. – 1998. – Vol. 36. – P. 2737-2741.
40. Becker K.H. Untersuchungen zur abgrenzung von pseudomallei gegen andere mesophile pseudomonaden mit neuzeitlichen diagnostischen methoden / K.H. Becker // Inaugural-Dissertation. Giessen. – 1981. – 189 p.
41. Bergey's manual of systematic bacteriology // Baltimor, London: Williams and Wilkins. – 1984.
42. Biegeleisen J.Z. A case of human melioidosis: clinical, epidemiological and laboratory findings / J.Z. Biegeleisen, R. Mosquera, W.B. Cherry // Am J Trop Med Hyg. – 1964. – № 13. – P. 89–99.
43. Birnie E. Melioidosis in Africa: should we be looking more closely? / E. Birnie, W. J. Wiersinga, D. Limmathurotsakul, M.P. Grobusch // Future Microbiol. – 2015. – № 10. – P.273-281.

44. Bossi P. Bichat guidelines for the clinical management of glanders and melioidosis and bioterrorism-related glanders and melioidosis / P. Bossi, A. Tegnell, A. Baka, F. Van Loock, J. Hendriks, A. Werner, H. Moidhof, G. Gouvras // Euro. Surveill. – 2004. – Vol. 9. – P. 17 - 18.
45. Bossi P. Emerging or re-emerging infections that can be used for bioterrorism / P. Bossi, A. Guihot, F. Bricare // Press Med. – 2005. – Vol. 34, № 2, Pt.2 – P.149-55.
46. Brett P.J. *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species / P.J. Brett, D. De Shazer, D.E. Woods // Intern J. Syst. Bacteriol. – 1998. – Vol. 48. – P.317-320.
47. Brisse S. Comparative evaluation of the BD Phoenix and VITEK 2 automated instruments for identification of isolates of the *Burkholderia cepacia complex* / S. Brisse, S. Stefani, J. Verhoef, A. Van Belkum, P. Vandamme, W. Goessens // J. Clin. Microbiol. – 2002. – Vol.40, № 5. – P.1743-1748.
48. Brook M.D. Isolation and identification of *Burkholderia pseudomallei* from soil using selective culture techniques and the polymerase chain reaction / M.D. Brook, B. Currie, P.M. Desmarchelier // J. Appl Microbiol. – 1997. – Vol. 82. – P.589 - 596.
49. Burtnick M. Identification of the acid phosphatase (acpA) gene homologues in pathogenic and non-pathogenic *Burkholderia spp.* facilitates Tn-phoA mutagenesis / M. Burtnick, A. Bolton, P. Brett, D. Watanabe, D. Woods // Microbiology. – 2001. – Vol. 147. – P. 111-120.
50. Cahn A. Imported melioidosis, Israel, 2008 / A. Cahn, B. Koslowsky, R. Nir-Paz, V. Temper, N. Hiller, A. Karlinsky, I. Gur, C. Hidalgo-Grass, S.N. Heyman, A.E. Moses, C. Block // Emerg Infect Dis. – 2009. – Vol.15, № 11. – P. 1809-11.

51. Carlson P. Melioidosis presenting as urinary tract infection in a previously healthy tourist / P. Carlson, M. Seppanen // Scand. J. Infect. Dis. – 2000. – Vol. 32. – P. 92.
52. CDC. Biological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response. Recommendations of the CDC Strategic Planning Workgroup // MMWR Recomm Rep. – 2000. – Vol. 49. – P. 1–14.
53. Chantratita N. Biological relevance of colony morphology and phenotypic switching by *Burkholderia pseudomallei* / N. Chantratita, V. Wuthiekanun, K. Boonbumrung, R. Tiyawisutsri, M. Vesaratchavest, D. Limmathurotsakul, W. Chierakul, S. Wongratanacheewin, S. Pukritiyakamee, N. White // J. Bacteriol. – 2007. – Vol. 189. – P.807-817.
54. Chaowagul W. Update on clinical aspects of melioidosis / W. Chaowagul // Abstracts of the 5th World Melioidosis Congress (21-23 november 2007), Thailand. – 2007. – P.52.
55. Chaowagul, W. Pitakwatchara N. Melioidosis: a major cause of community-acquired septicemia in northeastern Thailand / W. Chaowagul, N. J. White, D. A. Dance, Y. Wattanagoon, P. Naigowit, T. M. Davis, S. Looareesuwan, N. Pitakwatchara // J. Infect. Dis. – 1989. – Vol. 159. – P. 890–899.
56. Chen Y.L. The concentrations of ambient *Burkholderia pseudomallei* during typhoon season in endemic area of melioidosis in Taiwan / Y.L. Chen, Y.C. Yen, C.Y. Yang, M.S. Lee, C.K. Ho, K.D. Mena, P.Y. Wang, P.S. Chen // PLoS Negl Trop Dis. – 2014. – Vol. 8, №5. –P. 2877.
57. Chen Y.S. Phenotypic characteristics and pathogenic ability across distinct morphotypes of *Burkholderia pseudomallei* / Y.S. Chen, H.H. Lin, C.C. Hung, J.J. Mu, Y.S. Hsiao, Y.L. Chen // Microbiol. Immunol. – 2009. – Vol. 53. –P. 184-189.

58. Cheng A.C. Intensity of exposure and incidence of melioidosis in Thai children / A.C. Cheng, V. Wuthiekanun, D. Limmathurotsakul, W. Chierakul, S.J. Peacock // Abstracts of the 5th World Melioidosis Congress (21-23 november 2007), Thailand. – 2007. – P.115.
59. Cheng A.C. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management / A.C. Cheng, B.J. Currie // Clin Microbiol Rev. – 2005. – Vol. 18, №2. – P. 383-416.
60. Chierakul W. Melioidosis in 6 Tsunami survivors in southern Thailand / W. Chierakul, W. Winothai, C. Wattanawaitunechai, V. Wuthiekanun, T. Rugtaengan, J. Rattanalernavee, P. Jitpratoom, W. Chaowagul, P. Singhasivanon, N.J. White, N.P. Day, S.J. Peacock // Clin. Infect. Dis. – 2005. – Vol. 41. – P.982-990.
61. Chierakul W. Short report: disease severity and outcome of melioidosis in HIV coinfecting individuals / W. Chierakul, V. Wuthiekanun, W. Chaowagul, P. Amornchai, A.C. Cheng, N.J. White, N.P. Day, S.J. Peacock // Am.J.Trop.Med.Hyg. – 2005. – Vol. 73, № 6. – P. 1165-6.
62. Chierakul W. The changing pattern of bloodstream infections associated with the rise in HIV prevalence in northeastern Thailand / W. Chierakul, A. Rajanuwong, V. Wuthiekanun, N. Teerawattanasook, Gasiprong M., A. Simpson, W. Chaowagul, N.J. White // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. – 2004. – Vol. 98. – P. 678-686.
63. Clayton A.J. Melioidosis: a serological survey in military personnel / A.J. Clayton, R.S. Lisella, D.G. Martin // Mil. Med. – 1973. – Vol. 138. – P.24-26.
64. 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.

65. Cottew G.S. Melioidosis in sheep in Queensland. A description of the causal organism / G.S. Cottew // Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. – 1950. – Vol. 28. – P. 677-683.
66. Currie B. Melioidosis in Papua New Guinea: is it less common than in tropical Australia? / B. Currie // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. – 1993. – Vol. 87. – P. 417.
67. Currie B.J. The epidemiology of melioidosis in Australia and Papua New Guinea / B.J. Currie, D.A. Fisher, D.M. Howard, J.N. Burrow, S. Selvanayagam // Acta Trop. – 2000. – Vol. 74. – P.121-127.
68. Currie B.J. The global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: an update / B.J. Currie, A.B. Dance, A.C. Cheng // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. – 2008. – Vol. 102, № 1. – P.1-4.
69. 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 // J. Antimicrob.Chemother. – 1991. – Vol. 28. – P.321-324.
70. Dance D.A. Identification of *Pseudomonas pseudomallei* in clinical practice: use of simple screening tests and API 20NE / D.A. Dance, V. Wuthiekanun, P. Naigowit, N.J. White // J. Clin. Pathol. – 1989. – Vol. 42. – P.645-648.
71. Dance D.A. Imported melioidosis in England and Wales / D.A. Dance, M.D. Smith, H.M. Aucken, T.L. Pitt // Lancet. – 1999. – Vol. 353. – P.208.
72. Dance D.A. Melioidosis as an emerging global problem / D.A. Dance // Acta Trop. – 2000. – Vol.74. – P.115-119.
73. Darling R.G. USAMRIID's Medical Management of Biological Causalities

Handbook / R.G. Darling, J.B. Woods //Operational Medicine Department, U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Fort Detrick, MD, USA. – 2004.

74. de Castro A.F. Melioidosis and its causative agent: *Pseudomonas pseudomallei* / A.F. de Castro, O. Campedelli Filho, W. Giorgi, C.A. Rosa // Rev Inst Med Trop Sao Paul. – 1973. – Vol. 15. – P.43–49.
75. Deepak R.N. *Burkholderia pseudomallei* identification: a comparison between the API 20NE and VITEK 2 GN systems / R.N. Deepak, B. Crawley, E. Phang // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. – 2008. Dec; 102. – P.42-4.
76. Dejsirilert S. Growth and survival of *Pseudomonas pseudomallei* in acidic environments / S. Dejsirilert, E. Kondo, D. Chiewslip, K. Kanai // Jpn. J. Med. Sci. Biol. – 1991. – Vol. 15– Vol. 44 – P.63-74.
77. Deshazer D. Genomic diversity of *Burkholderia pseudomallei* clinical isolates: subtractive hybridization reveals a *Burkholderia mallei*-specific prophage in *B. pseudomallei* 1026b / D. Deshazer // J. Bacteriol. – 2004. – Vol. 186. – P.3938 - 3950.
78. Dharakul T. Detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in patients with septicemic melioidosis / T. Dharakul, S. Songsivilai, S. Viriyachitra, V. Luangwedchakarn, B. Tassaneetritap, W. Chaowagul // J. Clin. Microbiol. – 1996. – Vol. 34. – P.609-614.
79. Dharakul T. Phylogenetic analysis of Ara+ and Ara- *Burkholderia pseudomallei* isolates and development of a multiplex PCR procedure for rapid discrimination between the two biotypes / T. Dharakul, B. Tassaneetrithep, S. Trakulsomboon, S. Songsivilai // J. Clin. Microbiol. – 1999. – Vol. 37. – P.1906-1912.
80. Dorman S.E. *Burkholderia pseudomallei* infection in a Puerto Rican patient

- with chronic granulomatous disease: case report and review of occurrences in the Americas / S.E. Dorman, V.J. Gill, J.I. Gallin, S.M. Holland // Clin. Infect. Dis. – 1998. – Vol. 26. – P.889-894.
81. Dvorak G.D. Glanders / G.D.Dvorak, A.R. Spickler // J Am Vet Med Assoc. – 2008. – Vol. 233, № 4. – P. 570-7.
82. Faa A.G. Melioidosis in the Torres Strait Islands of Far North Queensland / A.G. Faa, P.J. Holt // Commun. Dis. Intell. – 2002. – Vol. 26. – P. 279-283.
83. Finkelstein R.A. *Pseudomonas (Burkholderia) pseudomallei* in Thailand, 1964-1967: geographic distribution of the organism, attempts to identify cases of active infection, and presence of antibody in representative sera / R.A. Finkelstein, P. Atthasampunna, M. Chulasamaya // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 2000. – Vol. 62. – P. 232-239.
84. Forbes Faulkner J.C. *Pseudomonas pseudomallei* infection in camels / J.C. Forbes Faulkner, W.L. Townsend, A.D. Thomas // Aust.Vet. J. – 1992. – Vol. 69. – P. 148.
85. Fournier J. Melioidosis and the Whitmore bacillus. Epidemiological and taxonomic controversies / J. Fournier // Bull. Soc. Pathol. Exot. – 1965. – Vol. 58. – P. 753-765.
86. Fritz D.L. Mouse model of sublethal and lethal intraperitoneal glanders (*Burkholderia mallei*) / D.L. Fritz, P. Vogel, D.R. Brown, D. Deshazer, D.M. Waag // Vet. Pathol. – 2000. – Vol. 37. – P.626-636.
87. Fritz D.L. The hamster model of intraperitoneal *Burkholderia mallei* (glanders) / D.L. Fritz, P. Vogel, D.R. Brown, D.M. Waag // Vet. Pathol. – 1999. – Vol. 36. – P.276–291.
88. Gal D. Contamination of hand wash detergent linked to occupationally acquired melioidosis / D. Gal, M. Mayo, P. Smith-Vaughan, P. Dasari, M.

- McKinnon, S.P. Jacups, A.I. Urquhart, M. Hassell, B.J. Currie // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 2004. – Vol. 71. – P.360-362.
89. Gee J.E. Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid identification and differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei* / J.E. Gee, C.T. Sacchi, M.B. Glass, B.K. De, P.N. Weyant, R.S. Levett, A.M. Whitney, A.R. Hoffmaster, T. Popovic // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41. – P.4647-4654.
90. Gilad J. *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*: the causative microorganisms of glanders and melioidosis / J. Gilad // *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* – 2007. – Vol. 2, № 3. – P. 233-41.
91. Gillardi G. L. *Pseudomonas* species in clinical microbiology / G.L. Gillardi // *Mt.Sinai J.Med.* –1976. – Vol. 43, № 6. – P. 710–726.
92. Gillardi G.L. Diagnostic criteria for differentiation of *Pseudomonas* pathogenic for man / G.L. Gillardi // *Appl. Microbiol.* – 1968. – Vol. 16, № 10. – P. 1497–1502.
93. 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 // *J. Clin. Microbiol.* – 2005. – Vol. 43. – P.479-483.
94. 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 // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41. – P. 2068-2079.
95. Gopalakrishnan R. Melioidosis: an emerging infection in India / R. Gopalakrishnan, D. Sureshkumar, M.A. Thirunarayan, V. Ramasubramanian // *J. Assoc Physicians India.* – 2013. – Vol. 61, № 9. – P. 612-4.
96. Green R.N. Laboratory acquired melioidosis / Green R.N. // *Am. J. Med.* –

1968. – Vol. 44. – P. 599-605.
97. Hanna J.N. Melioidosis in north Queensland, 2000-2009 / J.N. Hanna, J.L. Humphreys, D.L. Brookes, T. Messina, A. Rauli // *Commun Dis Intell Q Rep.* – 2010. – Vol. 34, № 4. – P. 444-7.
98. Henry D.A. Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex / D.A. Henry, E. Manenthiralingam, P. Vandamme // *J. Clin. Microbiol.* – 2001. – Vol. 39, № 3. – P. 1073 – 1078
99. Hornstra H. Molecular epidemiology of glanders, Pakistan / H. Hornstra, T. Pearson, S. Georgia, A. Liguori, J. Dale, E. Price, M. O'Neill, D. Deshazer, G. Muhammad, M. Saqib, A. Naureen, and P. Keim // *Emerg. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 39, №15. – P.2036–2039.
100. Howard K. Novel selective medium for isolation of *Burkholderia pseudomallei* / K. Howard, T.J. Inglis // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol.41. – P. 3312-3316.
101. Howe C. The pseudomallei group: a review / C. Howe, A. Sampath, M. Spotnitz // *J. Infect. Dis.* – 1971. – Vol.124. – P.598–606.
102. Imported melioidosis-South Florida // *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* – 2005. – Vol. 55. – P.873-876.
103. 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.
104. Inglis T.J.J. Environmental factors that affect the survival and persistence of *Burkholderia pseudomallei* / T.J.J. Inglis, J.L. Sagripanti // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – Vol. 72. – P. 6865 – 6875.
105. 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. – P.62–64.

106. Janmaat A. Melioidosis in an alpaca (*Lama pacos*) / A. Janmaat, Low J. Choy, B. J. Currie // Aust. Vet. J. – 2004. – Vol. 82. – P. 622-623.
107. Jeddelloh J.A. Biodefense-driven murine model of pneumonic melioidosis / J.A. Jeddelloh, D.L. Fritz, D.M. Waag, J.M. Hartings, G.P. Andrews // Infect. Immun. – 2003. – Vol. 71. – P. 584-587.
108. Kanai K. *Pseudomonas pseudomallei* and melioidosis, with special reference to the status in Thailand / K. Kanai, L. Deysirilert // Jpn. J. Med. Sci. Biol. – 1988. – №41. – P.123-157.
109. 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 // J. Infect. Dis. – 1993. – Vol.167. – P. 230-233.
110. 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.
111. Keluangkhot V. Melioidosis / V. Keluangkhot, R. Pethsouvanh, M. Strobel // Med Mal Infect. – 2005. – Vol.35, №10. – P. 469-75.
112. Ketterer P.J. Bovine melioidosis in South Eastern Queensland / P.J. Ketterer, B. Donald, R. J. Rogers // Aust. Vet. J. – 1975. – Vol.51. – P. 395-398.
113. Ketterer P.J. Melioidosis in intensive piggeries in South-Eastern Queensland / P.J. Ketterer, W.R. Webster, J. Shield, R.J. Arthur, P.J. Blackall, A.D. Thomas // Aust. Vet. J. – 1986. – Vol.63. – P. 146-149.
114. Ketterer P.J. Melioidosis in intensive piggeries in South-Eastern Queensland /

P.J. Ketterer, W.R. Webster, J. Shield, R.J. Arthur, P.J. Blackall, A.D. Thomas
// Aust. Vet. J. – 1986. – Vol.63. – P. 146-149.

115. Khan I. Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures / I. Khan, L.H. Wieler, F. Melzer, M.C. Elschner, G. Muhammad, S. Ali, L.D. Sprague, H. Neubauer, M. Saqib // Transbound Emerg Dis. – 2013. – DOI: 10.1111/j. 2012.01342.x. Epub. 2012 – Vol. 60, №3. – P. 204-21. – P. 1865-1682.
116. Kiertiburanakul S. *Burkholderia pseudomallei*: abscess in an unusual site / S. Kiertiburanakul, S. Sungkanuparph, S. Kositchiwat, M. Vorachit // J. Postgrad. Med. – 2002. – Vol.48. – P.124-126.
117. Koh T.H. Automated identification systems and *Burkholderia pseudomallei* / T.H. Koh, Y. Ng, J.L.F. Ho, L.H. Sng, G.C. Wang, R.V. Tzer Pin Lin // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol.41. – P.1809.
118. Ladds P.W. Melioidosis in a koala / P.W. Ladds, A.D. Thomas, R. Speare, A. S. Brown // Aust. Vet. J. – 1990. – Vol.67. – P.304-305.
119. 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.
120. Laws L.W. Melioidosis in animals in north Queensland. 1. Incidence and pathology, with special reference to central nervous system lesions. Queensland / L.W. Laws, T. K. Hall // J. Agric. Sci. – 1963. – Vol.20. – P.499-513.
121. 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, M. Harper, B. Adler, J.D. Boyce // FEMS Microbiol. Rev. – 2009. – Vol. 33. – P.1079–1099.

122. Lee N. *Pseudomonas pseudomallei* infection from drowning: the first reported case in Taiwan / N. Lee, J.L. Wu, C.H. Lee, W.C. Tsai // J. Clin. Microbiol. – 1985. – Vol. 22. – P.352-354.
123. Leelarasamee A. Melioidosis in Southeast Asia / A. Leelarasamee // Acta tropica. – 2000. – Vol.74. – P.129-132.
124. Leelarasamee A. Isolation rates of *Burkholderia pseudomallei* among the four regions in Thailand / A. Leelarasamee, S. Trakulsomboon, M. Kusum, S. Dejsirilert // Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. – 1997. – Vol. 28. – P.107-113.
125. Leelarasamee A. Melioidosis: review and update / A. Leelarasamee // Rev. Infect. Dis. – 1989. – Vol. 11. – P.413-25.
126. Legendre P., Borcard D., Peres-Neto P. Analyzing beta diversity: partitioning the spatial variation of community composition data // Ecol. Monogr. - 2005. – Vol. 75. – P. 435–450.
127. Limmathurotsakul D. Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis / Limmathurotsakul D., Golding N., Dance D., Messina J., Pigott D., Moyes C., Rolim D., Bertherat E., Day N., Peacock S., Hay S. // Nature Microbiol. - 2016. – Vol. 1. - DOI: 10.1038/NMICROBIOL.2015.8
128. Limmathurotsakul D., Peacock S.G. Melioidosis: a clinical overview. Br Med Bull. – 2011. – Vol. 99. – P.125-39.
129. Lo T.J., Ang L.W., James L., Goh K.T. Melioidosis in a tropical city state, Singapore // Emerg Infect Dis. – 2009 Oct. – Vol. 15, №10. – P.1645-7. – DOI: 10.3201/eid1510.090246.
130. Low Choy J. Animal melioidosis in Australia / J. Low Choy, M. Mayo, A.

Janmaat, B.J. Currie // *Acta Trop.* – 2000. – Vol. 74. – P.153-158.

131. Lowe P. Comparison of automated and nonautomated systems for identification of *Burkholderia pseudomallei* / P. Lowe, C. Engler, R. Norton // *J. Clin. Microbiol.* – 2002. – Vol.40, №12. – P.4625-4627.
132. 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 // *J.Clin.Microbiol.* – 2006. – Vol. 44. – P.854-856.
133. Maegraith B.G. Melioidosis: a case report / B.G. Maegraith, C.S. Leithead // *Lancet.* – 1964. – Vol.1. – P.862-863.
134. Malczewski A.B. Clinical presentation of melioidosis in Queensland, Australia / A.B. Malczewski, K.M. Oman, R.E. Norton, N. Ketheesan // *Trans R Soc Trop Med Hyg.* – 2005. – Vol. 99, №11. – P.856-60.
135. Malik P. Emergence and re-emergence of glanders in India: a description of outbreaks from 2006 to 2011 / Malik P., Singha H., Khurana S.K., Kumar R., Kumar S., Raut A.A., Riyesh T., Vaid R.K., Virmani N., Singh B.K., Pathak S.V., Parkale D.D., Singh B., Pandey S.B., Sharma T.R., Chauhan B.C., Awasthi V., Jain S., Singh R.K. // *Vet Ital.* – 2012. – Vol. 48, №2. – P.167-78.
136. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2015 // Chapter 2.5.11. Glanders. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2015. – P.1-11.
137. Masoud H. Characterization of the capsular polysaccharide of *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei* 304b / H. Masoud, Ho M., T. Schollaardt, M.B. Perry // *J. Bacteriol.* – P.1997. – Vol. 179. – P.5663–5669.

138. 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, M.S. Bari, M.I. Majumder, V. Wuthiekanan, A.M. Dondorp, R.L. Bailey, N.P. Day, M.A. Faiz // Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 2012 Sep. – Vol. 106, № 9. – P.576-578.
139. McBride W.J. Infections in travellers arriving from Australia / W.J. McBride // Trans R Soc Trop Med Hyg. – 2008. – Vol. 102, № 4. – P.312-3.
140. Meumann E.M. Clinical evaluation of a type III secretion system real-time PCR assay for diagnosing melioidosis / E.M. Meumann, R.T. Novak, D. Gal, M.E. Kaestli, M. Mayo, J.P. Hanson, E. Spencer, M.B. Glass, J.E. Gee, P.P. Wilkins, B.J. Currie // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44. – P.3028-3030.
141. Meumann E.M. Clinical features and epidemiology of melioidosis pneumonia: results from a 21-year study and review of the literature / E.M. Meumann, A.C. Cheng, L. Ward, B.J. Currie // Clin Infect Dis. – 2012. – Vol. 54, № 3. – P. 362-9.
142. Miralles I.S. *Burkholderia pseudomallei*: a case report of a human infection in Ceará, Brazil / I.S. Miralles, C. Maciel Mdo, M.R. Angelo, M.M. Gondini, L.H. Frota, C.M. dos Reis, E. Hofer // Rev Inst Med Trop Sao Paulo. – 2004. – Vol. 46. – P.51–54.
143. Mota R.A. Glanders in donkeys (*Equus asinus*) in the state of Pernambuco, Brazil: a case report / R.A. Mota, A.A.F. Oliveira, J.W.P. Junior, L.B.G. Silva, M.F. Brito, S.S.A. Rabelo // Braz J. of Microbiol. – 2010. – Vol. 41. – P.146-149.
144. Nachiangmai N. *Pseudomonas pseudomallei* in southern Thailand / N. Nachiangmai, P. Patamasucon, B. Tipayamonthein, A. Kongpon, S. Nakaviroj // Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. – 1985. – Vol. 16. – P.83-87.

145. Nasner-Posso K. Human melioidosis reported by ProMED / Nasner-Posso K., Cruz-Calderon S., Montu far-Andrade F., Dance D., Rodriguez-Morales A. // Int. J. Infect. Dis. - 2015. Vol. 35. – P. 103–106.
146. 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 // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43. – P.970-972.
147. Nierman W. C. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome / W.C. Nierman, D. DeShazer, H.S. Kim, H. Tettelin, K.E. Nelson // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101. – P.14246-14251.
148. Nigg C. Enhance of virulence of *Malleomyces pseudomallei* / C. Nigg, J. Ruch, E. Scott et al. // J. Bacteriol. – 1956. – Vol.71. – P.530.
149. Noonan C.N. The 1990-1991 outbreak of melioidosis in the Northern Territory of Australia: epidemiology and environmental studies.Southeast Asian / C.N. Noonan, D. Sharrock, P.A. Mock, B. Currie, A. Merianos, M. Patel, J. M. Lane // J. Trop. Med. Public Health. – 1993. – Vol.24– P.425-435.
150. Norazah A. Indirect hemagglutination antibodies against *Burkholderia pseudomallei* in normal blood donors and suspected cases of melioidosis in Malaysia. Southeast Asian / A. Norazah, M.Y. Rohani, P.T. Chang, A.G. Kamel // J. Trop. Med. Public Health. – 1996. – Vol.27, № 2. – P. 263-6.
151. O’Hara C.M. Manual and automated instrumentation for identification of *Enterobacteriaceae* and other aerobic Gram-negative Bacilli / C.M. O’Hara // Clin. Microbiol. Rev. – 2005. – Vol. 18, №1. – P.147-162.
152. 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, S.P. Jacups, B.J. Currie // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42. – P. 2239-2240.

153. Kiratisin P. Accuracy of commercial systems for identification of *Burkholderia pseudomallei* versus *Burkholderia cepacia* / P. Kiratisin, P. Santanirand, N. Chantratita & S. Kaewdaeng // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 59. – P.277–281.
154. Palleroni N. Family of *Pseudomonadaceae*. *Bergey's manual of systematic bacteriology* / Ed. by N. Krieg, G. Holt. – Baltimore. – 1984.
155. Palleroni N.J. General properties and taxonomy of the genus *Pseudomonas* / N.J. Palleroni // *Genet. Biochem. Pseudomonas*. London. – 1975. – P.1-36.
156. Palleroni N.J. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas* / N.J. Palleroni, R. Kunisawa, R. Contopoulou, M. Doudoroff // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1973. – Vol.23, №4. – P.333-339.
157. Palleroni N.J. Taxonomy of the aerobic pseudomonads: The properties of the *Pseudomonas stutzeri* group / N.J. Palleroni, M. Dodoroff, R.Y. Stanier, R.E. Solanes, M. Mandel // *J. Gen. Microbiol.* – 1970. – Vol. 60. – P.215-231.
158. 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, N. Teerawattanasook, W. Chierakul, N.P. Day, V. Wuthiekanun // *J. Clin. Microbiol.* – 2005. – Vol. 43. – P.5359-5361.
159. Phetsouvanh R. Melioidosis and Pandora's box in the Lao People's Democratic Republic / R. Phetsouvanh, S. Phongmany, P. Newton, M. Mayxay, A. Ramsay, V. Wuthiekanun, N.J. White // *Clin. Infect. Dis.* – 2001. – Vol. 32. – P. 653-654.
160. Piliouras P. Presented at the Australian Society of Antimicrobials Annual Scientific Meeting / P. Piliouras, G.C. Ulett, C. Ashurst-Smith et al. // Sydney,

Australia, 13-16 April 2000.

161. 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, A. Mohana, S.C. Wong, T. William, M. Mayo, R.W. Baird, B.J. Currie // *J. Clin. Microbiol.* – 2013. – Vol. 51, № 9. – P. 3076.
162. Puthucheary, S.D., Vadivelu / *J. Human melioidosis.* // Singapore University Press. – 2002. – 58 p.
163. 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.
164. Rolim D. Melioidosis, northeastern Brazil. *Emerg* / D.B. Rolim, D.C. Vilar, A.Q. Sousa, I.S. Miralles, O. De // *Infect.Dis.* – 2005. – Vol. 11. – P.1458-1460.
165. Rolim D.B. *Burkholderia pseudomallei* antibodies in individuals living in endemic regions in Northeastern Brazil / D.B. Rolim, D.C. Vilar, L.P. de Goes Cavalcanti, L.B. Freitas, T.J. Inglis, J.L. Nobre Rodrigues, A.T. Nagao-Dias // *Am.J.Trop. Med. Hyg.* – 2011. – Vol. 84, № 2. – P.302-305
166. Rotz L.D. Public health assessment of potential biological terrorism agents / L.D. Rotz, A.S. Khan, S.R. Lillibridge, S.M. Ostroff, J.M. Hughes // *Emerg. Infect. Dis.* – 2002. – Vol.8, № 2. – P.225-230.
167. Russell P. Comparison of efficacy of ciprofloxacin and doxycycline against experimental melioidosis and glanders / P. Russell, S.M. Eley, J. Ellis, M. Green, D.L. Bell, D.J. Kenny, R.W. Titball // *J.Antimicrob. Chemother.* – 2000. – Vol.45. – P.813-818.
168. 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

169. Shelly D.B. Utility of commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture / D.B. Shelly, T. Spilker, E.J. Gracely // J. Clin. Microbiol. – 2000. – Vol. 38. – P. 3112 – 3115
170. Sirisinha S. Recent developments in laboratory diagnosis of melioidosis / S. Sirisinha, N. Anuntagool, T. Dharakul, P. Ekpo, S. Wongratanacheewin, P. Naigowit, B. Petchclai, V. Thamlikitkul, Y. Suputtamongkol // Acta Trop. – 2000. – Vol. 74. – P. 235-245.
171. Sookpranee M. Contamination of Savlon solution with *Pseudomonas pseudomallei* at Srinagarind Hospital / M. Sookpranee, P. Lumbiganon, S. Puapermpoonsiri, A. Tattawasatra, J. Nopwinyoovongs, S. Punyagupta, T. Sirisanthana, B. Stapatayavong // Bangkok Medical Publisher, Bangkok, Thailand. – 1989. – P. 211-213.
172. Sprague L.D. Prevalence dependent use of serological tests for diagnosing glanders in horses / L.D. Sprague, R. Zachariah, H. Neubauer, R. Wernery, M. Joseph, H.C. Scholz, U. Wernery // BMC Vet. Res. – 2009. – Vol. 5, article 32.
173. Sprague L.D., Neubauer H. Melioidosis in animals: a review on epizootiology, diagnosis and clinical presentation / L.D. Sprague, H. Neubauer // J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health. – 2004. – Vol. 51. – P.305-320.
174. 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.
175. Strauss J.M. Melioidosis in Malaysia. II. Distribution of *Pseudomonas pseudomallei* in soil and surface water / J.M. Strauss, M.G. Groves, M. Mariappan, D.W. Ellison // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 1969. – Vol.18. – P. 698-702.

176. Suputtamongkol Y. Risk factors for melioidosis and bacteremic melioidosis / Y. Suputtamongkol, W. Chaowagul, P. Chetchotisakd, N. Lertpatanasuwun, S. Intaranongpai, T. Ruchutrakool, D. Budhsarawong, P. Mootsikapun, V. Wuthiekanun, N. Teerawatasook, A. Lulitanond // Clin. Infect. Dis. – 1999. – Vol.29. – P. 408-413.
177. Suputtamongkol Y. The epidemiology of melioidosis in Ubon Ratchatani, northeast Thailand / Y. Suputtamongkol, A.J. Hall, D.A. Dance W. Chaowagul, A. Rajchanuvong, M.D. Smith, N.J. White // Int. J. Epidemiol. – 1994. – Vol.23. – P. 1082-1090.
178. Sutmoller P. Melioidosis (*pseudomalleus*) in sheep, goats and pigs on Arubu (Netherland Antilles) / P. Sutmoller, F.C. Kraneveld, A. van der Schaaf // J. Am. Vet Med. Assoc. – 1957. – Vol.130. – P. 415-417.
179. 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 // J Antimicrob. Chemother. – 2004. – Vol. 54. – P. 1134 - 1138.
180. 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. 42. – P.5871-5874.
181. Thomas A.D. Evaluation of the API 20NE and Microbact 24E system for the identification of *Pseudomonas pseudomallei* / A.D. Thomas // Vet. Microbiol. – 1983. – Vol.8, № 6. – P.611-615.
182. Thomas A.D. Isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clay layers at defined depths / A.D. Thomas, J. Forbes Faulkner, M. Parker // Am. J. Epidemiol. – 1979. – Vol. 110. – P.515-521.

183. Thomas A.D. Melioidosis in a galah (*Cacatua roseicapilla*) / A.D. Thomas, J.H. Norton, B.W. Pott // Aust. Vet. J. – 1980. – Vol. 56. – P.192-193.
184. Thomas A.D. Melioidosis in a sulphur-crested cockatoo (*Cacatua galerita*) / A.D. Thomas, A.J. Wilson, J.N. Aubrey // Aust. Vet. J. – 1978. – Vol. 54. – P.306-307.
185. Thomas A.D. Prevalence of melioidosis in animals in northern Queensland / A.D. Thomas // Aust. Vet. J. – 1981. – Vol. 57. – P.146-148
186. Tong S. Laboratory investigation of ecological factors influencing the environmental presence of *Burkholderia pseudomallei* / S. Tong, S. Yang, Z. Lu, W. He // Microbiol. Immunol. – 1996. – Vol. 40. – P.451-453.
187. Trakulsomboon S. Epidemiology of arabinose assimilation in *Burkholderia pseudomallei* isolated from patients and soil in Thailand / S. Trakulsomboon, V. Vuddhakul, P. Tharavichitkul, N. Na-Gnam, Y. Suputtamongkol, V. Thamlikitkul // Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. – 1999. – Vol. 30. – P.756-759.
188. Vadivelu J. Serodiagnosis of melioidosis in Malaysia / J. Vadivelu, S.D. Puthuchery, G.S. Gendeh, N. Parasakhi // Singapore Med. J. – 1995. – Vol. 36, №3. – P.299-302.
189. 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, №131. – P.1-7
190. Vandamme P. Polyphasic Taxonomy in practice: the *Burkholderia cepacia* challenge / P. Vandamme // WFCC Newsletter. – 2002. – Vol. 34. – P.17-24.
191. 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.
192. 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 // *Clin. Infect. Dis.* – 2001. – Vol. 32. – P.15-16.
193. Waag D.M. Glanders: new insights into an old disease. Biological weapons defense: infectious diseases and counter bioterrorism / D.M. Waag, D. DeShazer, ed. by L.E. Lindler, F.J. Lebeda, G.W. Korch. N.J. Totowa // Humana Press. – 2004. – P. 209–237.
194. Wanvarie S. Melioidosis: certain interesting presentations and treatment / S. Wanvarie // *Trop. Geogr. Med.* – 1984. – Vol. 36. – P.165-168.
195. Warawa J. Melioidosis vaccines / J. Warawa, D.E. Woods // *Expert Rev Vaccines*. – 2002. – Vol. 1, №4. – P.477-82.
196. Warton D., Wright S., Wang Y. Distance-based multivariate analyses confound location and dispersion effects // *Methods Ecol. Evol.* - 2012. – Vol. 3(1). – P. 89–101.
197. Wattiau P. Identification of *Burkholderia pseudomallei* and related bacteria by MLST-derived PCR and real-time PCR / P. Wattiau, H.M. Van, H. Neubauer, R. Zachariah, U. Wernery // *J.Clin.Microbiol.* – 2007. – Vol. 45. – P.1045-1048.
198. Wernery R. Serodiagnosis of *Burkholderia.mallei* infections in horses: state of the art and perspectives / R. Wernery, U. Wernery, H.C. Scholz // *J. Vet. Med. B.* – 2005. – Vol. 52, № 2. – P.201-5.

199. Wernery U. Natural *Burkholderia mallei* infection in Dromedary, Bahrain / U. Wernery , R. Wernery , M. Joseph , F. Al-Salloom, B. Johnson, J. Kinne, S. Jose, S. Jose, B. Tappendorf, H. Hornstra, H.C. Scholz // Emerging Infectious Diseases. – 2011. – Vol. 17. – P.1277–1279.
200. Winstanley C. Presence of type III secretion genes in *Burkholderia pseudomallei* correlates with Ara (-) phenotypes / C. Winstanley, C.A. Hart // J Clin Microbiol. – 2000. – Vol. 38. – P.883-885.
201. Withiekanaun V. Melioidosis in Myanmar: forgotten but not gone? / V. Withiekanaun, S. Langa, W. Swaddiwudhipong, W. Jedsadapanpong, Y. Kaengnet, W. Chierakul, N.P. Day, S.J. Peacock // Abstracts of the 5th World Melioidosis Congress (21-23 november 2007), Thailand. – 2007. – P.119.
202. Wittig M.B. Glanders - a comprehensive review / M.B. Wittig, P. Wohlsein, R.M. Hagen, D.S. Al, H. Tomaso // Dtsch.Tierarztl.Wochenschr. – 2006. – Vol. 113. – P.323-330.
203. Wongratanacheewin S. Characterization of *Pseudomonas pseudomallei* antigens by SDS-polyacrilamide gel electrophoresis and western blot. Southeast Asian / S. Wongratanacheewin, U. Tattawasart, V. Lilitanond, S. Wongwajana, R.W. Sermswan, M. Sookpranee, K. Nuntirooj // J. Trop. Med. Pub. Hlth. – 1993. – Vol. 24. – P. 107-113.
204. Wongratanacheewin S. Use of culture-filtrated antigen in an ELISA and a dot immunoassay for diagnosis of melioidosis / S. Wongratanacheewin, S. Amornpunt, R.W. Sermswan, U. Tattawasart, S. Wongwajana // Southeast Asian J. Trop. Med.Public Health. – 1995. – Vol. 26, № 2 –P. 329-334.
205. Woo P.C. 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. Woo, S.K. Lau, G.K. Woo, A.M. Fung, A.H. Ngan, W.T. Hui, K.Y. Yuen // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41. – P. 3973 -3977.

206. Woods D.E. *Burkholderia thailandensis* E125 harbors a temperate bacteriophage specific for *Burkholderia mallei* / D.E. Woods, J.A. Jeddloh, D.L. Fritz, D. DeShazer // J. Bacteriol. – 2002. – Vol. 184. – P.4003 - 4017.
207. Wuthiekanun V. Blood culture techniques for the diagnosis of melioidosis / V. Wuthiekanun, D.A.B. Dance, W. Chaowagul, Y. Suputtamongkol, Y. Wattanagoon, N. White // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 1990. – Vol.9. – P.654-658.
208. Wuthiekanun V. Survival of *Burkholderia pseudomallei* in the absence of nutrients / V. Wuthiekanun, M.D. Smith, N.J. White // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. – 1995. – Vol. 89. – P.491.
209. 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. – 1992. – Vol.36. – P.1251-1275.
210. Yakandawala N. Characterization of the poly-1,6-Nacetylglucosamine polysaccharide component of *Burkholderia* biofilms / N. Yakandawala, P.V. Gawande, K. LoVetri, S.T. Cardona, T. Romeo, M. Nitz, S. Madhyastha // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – Vol.77. – P.8303–8309.
211. Yap E.N. Serodiagnosis of melioidosis off Singapore by the indirect hemagglutination test / E.N. Yap, Y.C. Chan, T.Y. Ti, T.W. Thong, A.L. Tan, M. Yeo, L.C. Ho, M. Singh // Singapore Med. J. – 1991. – Vol.32, №4. – P.211-213.
212. 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.

213. Zierdt C. H. Identification of *Pseudomonas pseudomallei* / C.H. Zierdt // J. Infect. Diseases. – 1972. – Vol. 125, №3. – P. 325–326.
214. Zierdt C.H. Identification of *Pseudomonas pseudomallei* / C.H. Zierdt, H.H. Marsh // Amer. J. Clin. Pathol. – P. 1971. – Vol. 55. – P. 596–603.
- Zong Z. Misidentification of *Burkholderia pseudomallei* as *Burkholderia cepacia* by the VITEK 2 system / Z. Zong, X. Wang, Y. Deng, T. Zhou // JMM. – 2012. – Vol. 61. – P. 1483–1484.