

На правах рукописи

ЛЕМАСОВА ЛЮДМИЛА ВИКТОРОВНА

**ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САПА И МЕЛИОИДОЗА
МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Волгоград - 2018

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

Научный руководитель: **Ткаченко Галина Александровна,**
кандидат медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты: **Водопьянов Сергей Олегович,** доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующий лабораторией биохимии микробов

Портенко Светлана Анатольевна, кандидат биологических наук, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующая отделом диагностики инфекционных болезней

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится «**20**» **сентября 2018 г.** в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.078.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте <http://www.microbe.ru/disser/dissert> Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Автореферат разослан « ____ » _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Микшис Наталья Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень разработанности

Высокопатогенные для человека и различных видов животных возбудители *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* вызывают особо опасные инфекционные заболевания – сап и мелиоидоз [Whitlock et al., 2007; Wiersinga et al., 2012; Мелиоидоз и сап, 2016]. Данные микроорганизмы включены в список потенциальных агентов биотерроризма как в Российской Федерации, так и за рубежом [Алексеев и др., 2003; Онищенко и др., 2003; Rotz et al., 2002; Bossi et al., 2004; Cheng et al., 2005; Whitlock et al., 2007; Wiersinga et al., 2012].

Сап – зоонозная «возвращающаяся» инфекция, в естественных условиях поражает преимущественно непарнокопытных животных. За последнее время в мире возросло количество вспышек на эндемичных территориях в странах Среднего Востока, Азии, Африки и Южной Америки [Wittig et al., 2006; Verma et al., 2014]. Вероятность заражения сапом человека существует при контакте с больными животными, у которых инфекция может протекать как в острой, так и хронической форме [Van Zandt et al., 2013]. Описано несколько случаев внутрилабораторного заражения сотрудников на территории США и России [МУ 4.2.2831-11; Srinivasan et al., 2001; Van Zandt et al., 2013].

Возбудитель мелиоидоза является сапрофитом, свободноживущим в почве и воде географических регионов с влажным субтропическим климатом [Currie et al., 2010]. В настоящее время мелиоидоз встречается в 43 странах. Среди людей предполагаемая заболеваемость в мире составляет 165000 случаев в год, наибольшее число случаев выявлено в Таиланде и Северной Австралии [Limmathurotsakul et al., 2011; Baker et al., 2016; Chewapreecha et al., 2017; Schully et al., 2017]. Заражение человека происходит при контакте с почвой через мелкие раны и ссадины, а также при вдыхании микроорганизма в периоды тайфунов и дождей или путем употребления инфицированных продуктов и воды [Ngauy et al., 2005; Currie et al., 2010; Perumal Samy et al., 2017]. Возбудитель мелиоидоза способен поражать многие виды животных [Sprague et al., 2004].

В настоящее время в России не зарегистрированы случаи заболевания, вызванные патогенными буркхольдериями, что может быть связано с отсутствием у клиницистов информированности в отношении данных инфекций и, как следствие, настороженности к лицам, которые посетили эндемичные территории. Тяжелое

течение сапа и мелиоидоза, сложность постановки правильного диагноза из-за полиморфизма клинических проявлений, высокая летальность и отсутствие специфических препаратов для профилактики обуславливают необходимость совершенствования диагностических средств для идентификации *B. mallei* и *B. pseudomallei* [Ngauy et al., 2005; Whitlock et al., 2007; Limmathurotsakul et al., 2011; Wiersinga et al., 2012; Saikh et al., 2017]. Фенотипическое и генетическое сходство возбудителей сапа и мелиоидоза является причиной многих трудностей и ошибок в видовой идентификации патогенных буркхольдерий. Важную роль в диагностике играет полимеразная цепная реакция (ПЦР), особенно при латентном и хроническом течении инфекций, а также трудно выявляемых персистирующих форм *B. mallei* и *B. pseudomallei*.

Сложность разработки набора реагентов, позволяющего не только выявлять, но и дифференцировать близкородственные виды патогенных буркхольдерий, связана с наличием множества высокомолекулярных участков хромосом у *B. mallei* и *B. pseudomallei* [Holden et al., 2004; Nierman et al., 2004]. На протяжении последних лет в зарубежных публикациях появились данные об успешном применении ПЦР, в том числе и мультиплексного варианта, для дифференциации буркхольдерий комплекса «*pseudomallei*» [Lowe et al., 2014]. На момент начала исследований в Российской Федерации не было сообщений о тест-системах, позволяющих проводить дифференциацию возбудителей сапа и мелиоидоза. В связи с этим вопрос о разработке и внедрении в практику набора реагентов для обнаружения и дифференциации *B. pseudomallei* и *B. mallei* является актуальным при проведении молекулярно-генетических исследований.

Цель работы - разработка методического подхода для выявления и ускоренной дифференциации возбудителей сапа и мелиоидоза на основе мультиплексной ПЦР в режиме реального времени.

Задачи исследования

1. Выбрать на основании сравнительного анализа геномов патогенных буркхольдерий перспективные ДНК-мишени для видовой идентификации *B. mallei* и *B. pseudomallei* методом ПЦР и сконструировать специфичные праймеры и флуоресцентно-меченые зонды.

2. Разработать набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза, определить условия амплификации в

мультиплексном формате с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов, обеспечивающие высокие показатели аналитической чувствительности и специфичности при анализе широкого набора гомологичных и гетерологичных видов микроорганизмов.

3. Оценить возможность выявления и дифференциации ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза при исследовании проб клинического, биологического материала и объектов окружающей среды методом ПЦР-РВ с использованием созданного набора реагентов.

4. Изучить диагностическую эффективность мультиплексной ПЦР в режиме реального времени с использованием разработанного набора реагентов при исследовании биологического материала от животных, экспериментально зараженных возбудителями сапа и мелиоидоза.

Научная новизна

На основании проведенного анализа *in silico* выбраны уникальные ДНК-мишени, позволяющие дифференцировать возбудителей сапа и мелиоидоза методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени.

Впервые сконструированы олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченый зонд, комплементарные фрагменту гена *fliP* (*flagellar biosynthetic protein*), кодирующего белок биосинтеза флагеллина *B. mallei*, для идентификации и дифференциации возбудителя сапа от мелиоидоза. Научная новизна сконструированных олигонуклеотидов подтверждена патентом на изобретение «Набор олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда для идентификации *Burkholderia mallei* и дифференциации его от *Burkholderia pseudomallei*» (№ 2551208 от 20.05.2015 г. бюл. № 14).

Впервые разработана пара праймеров и флуоресцентно-меченый зонд, которые специфичны участку генома, кодирующего белок *gp68* из региона *RimL* (ацетилтрансферазы, включающие N-ацетилазы рибосомальных белков), присутствующий только у *B. pseudomallei*, для идентификации возбудителя мелиоидоза и дифференциации его от возбудителя сапа. На данные олигонуклеотиды получен патент на изобретение «Набор олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда для идентификации *Burkholderia pseudomallei*» (№ 2556810 от 20.07.2015 г. бюл. № 20).

С использованием сконструированных олигонуклеотидов разработан набор реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB» в формате мультиплексной ПЦР для обнаружения и дифференциации возбудителей сапа и мелиоидоза с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Получены доказательства высокой диагностической эффективности набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB» при исследовании чистых культур сапного и мелиоидозного микробов, проб биологического материала и объектов окружающей среды, искусственно контаминированных возбудителями сапа и мелиоидоза. Аналитическая чувствительность набора составила от 1×10^2 - 1×10^4 м.к./мл, специфичность – 100%, воспроизводимость – 100%.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработан методический подход на основе мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени, позволяющий за короткий срок выявлять и дифференцировать ДНК *B. mallei* и *B. pseudomallei* в пробах чистых культур, клинического, биологического материала и объектов окружающей среды.

Сконструирован «Набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей сапа (*Burkholderia mallei*) и мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB».

Продемонстрирована возможность использования разработанного набора реагентов при экспериментальной инфекции, а также при исследовании клинического материала.

Проведены контрольные лабораторные испытания для оценки показателей аналитической чувствительности и специфичности разработанного набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB» в мультиплексном формате (Протокол № 1/15 от 30.05.2015 г., утвержден директором института ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский институт Роспотребнадзора 30.05.2015 г.).

Проведены технические испытания для подтверждения функциональных технических характеристик набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB» для представления к государственной регистрации в Федеральную службу по надзору в сфере здравоохранения в качестве медицинских изделий (Акт технических испытаний № ТИ-02/16 от 30.11.2016 г., утвержден директором института ФКУЗ

РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора 30.11.2016 г.).

Разработаны и согласованы в ходе технических испытаний техническая и эксплуатационная документация по производству и применению набора – Технические условия ТУ 9398-013-01898084-2016 и инструкция по применению.

Разработанный методический подход применяется в работе сотрудников Референс-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 21.04.2016 г.), а также сотрудниками лаборатории молекулярной биологии института тропической медицины Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра (г. Ханой, Социалистическая Республика Вьетнам).

Полученные результаты диссертационной работы используются при проведении теоретических и практических занятий по лабораторной диагностике сапа и мелиоидоза на курсах профессиональной переподготовки и повышения квалификации на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 20.02.2017 г.).

Методология и методы исследования. В работе использовали различные методы исследования: микробиологические (культивирование штаммов микроорганизмов), биологический (моделирование инфекции путем заражения экспериментальных животных), молекулярно-генетические (ПЦР, секвенирование) и биоинформационный анализ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Набор олигонуклеотидов, включающий прямые, обратные праймеры и флуоресцентно-меченые зонды, сконструированные на основе фрагментов гена *fliP*, специфичного *B. mallei*, и уникальных участков гена *B. pseudomallei*, кодирующего белок *gp68*, позволяет методом мультиплексной ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени выявлять ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза и дифференцировать их между собой.

2. Применение разработанного набора реагентов «Амплиген *Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» при исследовании проб клинического, биологического материала и объектов окружающей среды позволяет обнаружить и дифференцировать ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза с высокой аналитической чувствительностью от 1×10^2 до 1×10^4 м.к./мл и аналитической специфичностью – 100%.

3. Использование созданного набора реагентов для диагностики сапа и мелиоидоза обеспечивает обнаружение ДНК *B. mallei* и *B. pseudomallei* у животных на ранних стадиях развития инфекционного процесса.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов данной работы подтверждена постановкой экспериментов в нескольких повторах. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе, подкреплены убедительными фактическими данными, наглядно представленными в приведенных таблицах. Результаты экспериментальных исследований обработаны с использованием методов статистического анализа. Работа выполнена на сертифицированном и прошедшем метрологическую поверку оборудовании.

Материалы диссертации представлены на ежегодных научно-практических конференциях: на III, VI и VIII Ежегодных Всероссийских Конгрессах по инфекционным болезням (Москва, 2011, 2014, 2016 гг.); очном осеннем итоговом отборе победителей программы «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» (Волжский, 2012 г.) и очном весеннем итоговом отборе победителей программы «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» (Волгоград, 2013 г.); конференциях ФКУЗ Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора (Волгоград, 2013, 2015, 2016, 2017 гг.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы обеспечения противоэпидемических мероприятий в зоне ЧС» на базе ФКУЗ Иркутского ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока (Иркутск, 2014 г.); VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Ставрополь, 2014 г.); Международной конференции «Перспективы сотрудничества государств-членов ШОС в противодействии угрозе инфекционных болезней» (Сочи, 2015 г.); VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» в секции Эпидемиологии доклад занял 1 место в номинации «Лучшая работа молодого ученого» (Москва, 2016 г.); XIII Межгосударственной научно-практической конференции (Саратов, 2016 г.); IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием

«Молекулярная диагностика 2017» (Москва, 2017 г.). Материалы диссертации вошли в научные отчеты по законченным техническим испытаниям набора реагентов.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, 2 из них в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК РФ. Получены 2 патента на изобретение.

Связь работы с научными программами и личный вклад автора в исследования. Работа выполнена на базе лаборатории генодиагностики в отделе диагностики инфекционных болезней ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора в рамках плановых научно-исследовательских тем: «Идентификация и типирование возбудителей сапа и мелиоидоза на основе принципов полифазной таксономии» (шифр темы 052-2-10, № гос. регистрации 01201001191), «Разработка новых подходов к диагностике заболеваний, вызываемых патогенными *Burkholderia*, на основе принципов полифазной таксономии. Создание и совершенствование средств индикации и идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза» (шифр темы 066-6.6-11, № гос. регистрации 01201168596), «Конструирование диагностических наборов реагентов и внедрение их в практику для ускоренной диагностики некоторых особо опасных инфекций методом мультилокусной ПЦР» (шифр темы 086-2-16, № гос. регистрации АААА-А17-117022850059-6), в данной теме соискатель являлся ответственным исполнителем.

Личный вклад автора Лемасовой Л.В. состоит в анализе литературных данных по проблеме, написании статей, оформлении патентов, в получении и обработке экспериментальных данных, выполнении работы по выбору оптимальных ДНК-мишеней для выявления и дифференциации сапного и мелиоидозного микробов, подбору на их основе специфичных праймеров и зондов, разработке препарата для генной диагностики *B. mallei* и *B. pseudomallei* с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени, апробации созданного набора реагентов при проведении контрольных лабораторных и технических испытаний, определении диагностической эффективности тест-системы при исследовании методом ПЦР проб биологического материала от экспериментально зараженных животных возбудителем сапа и мелиоидоза и объектов окружающей среды. Отдельные этапы исследования выполнены совместно с научными сотрудниками Леденовой М.Л., Батуриным А.А., Бондаревой О.С., Шпаком И.М., к.м.н. Савченко

С.С., к.б.н. Плехановой Н.Г., к.м.н. Прохвятиловой Е.В. Совместно с сотрудниками ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора (г. Саратов) проведены технические испытания, в результате которых подтверждены аналитические характеристики набора «Амплиген *Burk-mallei/pseudomallei*-PB».

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 134 листах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, перечня сокращений и списка литературы, включающего 220 источников, в том числе 29 отечественных и 191 – зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 7 рисунками и 15 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы. Материалом для исследования служили бактериальные взвеси чистых культур возбудителей сапа и мелиоидоза и гетерологичных микроорганизмов, пробы биологического материала от животных (кровь, печень, селезенка, легкие, лимфатические узлы), а также пробы биологического материала от человека, искусственно контаминированные возбудителями сапа и мелиоидоза (цельная кровь, сыворотка крови, слюна), пищевые продукты (рис), объекты окружающей среды (вода, почва) и пробы клинического материала от больного с подозрением на мелиоидоз (мокрота, трахеобронхиальный смыв и цельная кровь).

Работа выполнена с использованием 109 штаммов микроорганизмов: 14 – *B. mallei*; 50 – *B. pseudomallei* и 32 штамма близкородственных буркхольдерий и псевдомонад, из них: 13 – *Burkholderia cepacia*, 5 – *Burkholderia thailandensis*, 4 – *Pseudomonas putida*, 4 – *Pseudomonas fluorescens*, 3 – *Pseudomonas spp.*, 1 – *Pseudomonas testosteroni*, 1 – *Pseudomonas alcaligenes*, 1 – *Pseudomonas aeruginosa*, а также 13 штаммов гетерологичных микроорганизмов, включая: 1 – *Yersinia pestis*, 1 – *Brucella abortus*, 1 – *Brucella melitensis*, 1 – *Brucella suis*, 1 – *Brucella ovis*; 1 – *Bacillus anthracis*, 2 – *Vibrio cholerae*, 4 – *Francisella tularensis*, 1 – *Echerichia coli*. Все исследуемые штаммы имели типичные культуральные, морфологические, биохимические и генетические свойства. Работу с культурами возбудителей проводили в соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13, СП 1.3.2322-08, МУ 4.2.2787-10, МУ 4.2.2831-11, проведение ПЦР – согласно МУ 1.3.2569-09.

Анализ нуклеотидных последовательностей ДНК осуществляли с использованием генетической базы данных GenBank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Выравнивание последовательностей осуществляли с помощью алгоритма AlignX,

оценку их гомологии – алгоритма BLASTN [Chen et al. 2015]. Сравнение хромосом микроорганизмов проводили с помощью программы Mauve v.2.3.1 на интернет-сайте (<http://asap.ahabs.wisc.edu/mauve/>). При конструировании праймеров и зондов применяли программы Mega 7, Oligo 4.0, Ugene [Rychlik et al., 2007; Okonechnikov et al., 2012; Kumar et al., 2016]. Для вычисления оптимальной температуры отжига праймеров использовали компьютерные программы Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) и Primer-Quest (<http://eu.idtdna.com/site>).

Экстракцию ДНК из подготовленных культур *B. mallei*, *B. pseudomallei* и других гетерологичных видов микроорганизмов, а также проб воды, слюны проводили с помощью коммерческого набора «АмплиПрайм Рибо-преп» (ООО НекстБио, Москва). Из проб риса, почвы, органов (лимфатический узел, печень, селезенка, легкое) и крови выделяли ДНК с использованием «АмплиПрайм Рибо-золь» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва) и «АмплиПрайм Рибо-преп». Работу проводили в соответствии с инструкциями к указанным наборам. Для проведения ПЦР-РВ использовали амплификаторы роторного типа Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q («Corbett Research», Австралия; «Qiagen», Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработка набора реагентов для дифференциации возбудителей сапа и мелиоидоза методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени

При выборе перспективных ДНК-мишеней были проанализированы работы авторов, посвященные разработке способов идентификации ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза с помощью мультиплексной ПЦР и нуклеотидные последовательности патогенных буркхольдерий, представленные в генетической базе данных GenBank NCBI. Затем *in silico* проведен сравнительный анализ геномов микроорганизмов с помощью программы Mauve v.2.3.1 и найдены специфичные локусы ДНК, присутствующие у *B. mallei*, но отсутствующие у *B. pseudomallei*, а также уникальные для возбудителя мелиоидоза.

В качестве перспективных мишеней для амплификации видоспецифичного фрагмента возбудителя сапа на большой хромосоме выбран ген *fliP*, кодирующий белок биосинтеза флагеллина *B. mallei*, имеющий вставку, фланкированную IS407A, а для возбудителя мелиоидоза – участок генома на малой хромосоме, кодирующий экспрессию белка *gp68* из региона *RimL* (ацетилтрансферазы, включающие N - ацетилазы рибосомальных белков). Для разработки ПЦР-РВ в мультиплексном

формате к выбранным локусам ДНК сконструированы две пары специфичных праймеров *Bm-ISfl-f/Bm-ISfl-r* и *Bps-gp68-f/Bps-gp68-r*, а также гибридационно-флуоресцентные зонды *Bm-ISfl-Pr* и *Bps-gp68-Pr* по типу «молекулярного маяка», комплементарные фрагментам генома *B. mallei* и *B. pseudomallei* соответственно. Флуоресцентные красители зондов подбирали таким образом, чтобы их спектр различался длиной излучения, а результат фиксировали по разным каналам. ДНК возбудителя сапа детектировали по каналу Green с помощью зонда *Bm-ISfl-Pr*, который мечен с 5'-конца флуоресцентной меткой FAM, с 3'-конца – молекулой гасителя флуоресценции BHQ1. Другой зонд *Bps-gp68-Pr* мечен с 5'-конца флуоресцентной меткой TAMRA, с 3'-конца – молекулой гасителя флуоресценции BHQ2 для детекции по каналу Yellow ДНК возбудителя мелиоидоза.

Установлено, что для проведения ПЦР-РВ оптимальная концентрация праймеров в составе реакционной смеси составляла по 12 пмоль каждого, зондов – по 6 пмоль, дНТФ (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ) каждого в концентрации 0,2 мМ, ионов Mg^{2+} – 3,0 мМ, Taq-F-ДНК полимеразы – 2,5 ед. Программа амплификации включала предварительную денатурацию при температуре 95 °С в течение 15 минут, 5 циклов без детекции при 95 °С – 10 секунд, 62 °С – 35 секунд, далее 40 циклов с детекцией флуоресценции, включающих 95 °С – 10 секунд, 62 °С – 35 секунд, определение флуоресценции проводили при 62 °С. Оптимальное значение пороговой линии (Threshold) по каналу Green составляло 0,05 для *B. mallei*, а по каналу Yellow – 0,03 для *B. pseudomallei*, максимальная величина граничного значения порогового цикла (Ct) – не более 33 для обоих возбудителей.

Для определения аналитической чувствительности мультиплексной ПЦР-РВ исследовали серии 10-кратных разведений культур *B. mallei* и *B. pseudomallei* в концентрации от 1×10^1 до 1×10^4 м.к./мл (Рисунок 1). Рассчитана величина эффективности и экспоненциальной амплификации мультиплексной ПЦР-РВ при выявлении и дифференциации возбудителей сапа и мелиоидоза. Установлены характеристики стандартной кривой при использовании праймеров *Bm-ISfl-f/Bm-ISfl-r* и зонда *Bm-ISfl-Pr* для *B. mallei*: величина угла наклона кривой составила $K=-2,925$, значение экспоненциальной амплификации – 2,18. Эффективность реакции соответствовала $E=1,18$ (или 118%), коэффициент корреляции $R^2=1$ (Рисунок 1 А). Стандартная кривая при использовании праймеров *Bps-gp68-f/Bps-gp68-r* и зонда *Bps-gp68-Pr* для *B. pseudomallei* имела величину наклона $K=-3,465$. Значение величины

экспоненциальной амплификации 1,945 и эффективность реакции $E=0,945$ (или 94,5%), коэффициент корреляции $R^2=0,999$. (Рисунок 1 Б).

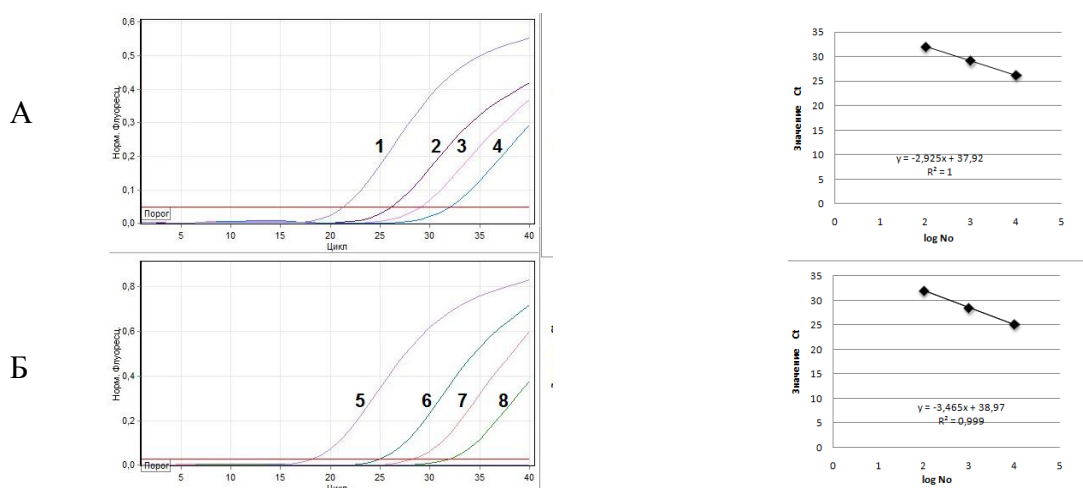


Рисунок 1 – Кривые накопления флуоресценции и график зависимости значения порогового цикла от исходной концентрации матриц при определении чувствительности реакции мультиплексной ПЦР-РВ с ДНК возбудителя сапа – детекция по каналу Green (А) и мелиоидоза – детекция по каналу Yellow (Б).

1 – Положительный контроль *B. mallei*, Ct 21,38; 2 – *B. mallei* 10230, 1×10^4 м.к./мл, Ct 26,24; 3 – *B. mallei* 10230, 1×10^3 м.к./мл, Ct 29,13; 4 – *B. mallei* 10230, 1×10^2 м.к./мл, Ct 32,09; 5 – Положительный контроль *B. pseudomallei*, Ct 18,37; 6 – *B. pseudomallei* C-141, 1×10^4 м.к./мл, Ct 25,15; 7 – *B. pseudomallei* C-141, 1×10^3 м.к./мл, Ct 28,51; 8 – *B. pseudomallei* C-141, 1×10^2 м.к./мл, Ct 32,08.

В ходе экспериментов установлено, что ПЦР-РВ с разработанными праймерами и зондами при исследовании ДНК *B. mallei* и *B. pseudomallei* характеризовалась высокой аналитической чувствительностью до 1×10^2 м.к./мл. При амплификации с ДНК близкородственных и других гетерологичных микроорганизмов в концентрации 1×10^7 м.к./мл зарегистрированы отрицательные результаты.

Получение высоких аналитических характеристик ПЦР-РВ с разработанными нами оригинальными праймерами и зондами позволило создать на их основе «Набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей сапа (*Burkholderia mallei*) и мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ».

Для проверки заявляемых показателей аналитической чувствительности и специфичности, определения области предназначения экспериментального набора реагентов проведены контрольные лабораторные испытания разработанного набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ». Проанализированы две серии препарата, одна из них в двух повторах. Исследовано 153 пробы, из них 81 проба бактериальных суспензий патогенных буркхольдерий (14 штаммов *B. mallei* и 13

штаммов *B. pseudomallei*) в концентрациях 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 м.к./мл каждого штамма и 45 проб гетерологичных микроорганизмов в концентрации 1×10^7 м.к./мл. Кроме того, проведен анализ 14 проб *B. mallei* и 13 проб *B. pseudomallei* в концентрации 1×10^7 м.к./мл.

По результатам испытаний установлено, что при проведении мультиплексной ПЦР-РВ с набором реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» отмечена специфическая флуоресценция по каналу Green при исследовании проб чистых культур возбудителя сапа в концентрации 1×10^3 м.к./мл в 100% случаев, в концентрации 1×10^2 м.к./мл – 35,75%. Зарегистрирована флуоресценция по каналу Yellow при амплификации чистых культур возбудителя мелиоидоза в 100% случаев в концентрации 1×10^3 м.к./мл, 66,66% – в концентрации 1×10^2 м.к./мл. Полученные результаты подтвердили заявленную аналитическую чувствительность набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» – 1×10^3 м.к./мл. Отсутствие положительных ответов ПЦР-РВ с гетерологичными микроорганизмами в концентрации 1×10^7 м.к./мл указывало на высокую специфичность разработанного набора реагентов – 100%.

Оценка диагностической эффективности сконструированной мультиплексной амплификационной тест-системы

Затем проведена оценка диагностической эффективности метода ПЦР-РВ с разработанным набором реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» при инфекционном процессе в разные сроки наблюдения. Для этого моделировали сапную и мелиоидозную инфекции в острой форме на золотистых хомячках, высоко восприимчивых к данным возбудителям. Методом ПЦР-РВ исследовали образцы биологического материала (кровь, печень, селезёнка, лёгкие и лимфатический узел), полученные от экспериментально зараженных животных на 4, 7, 9 сутки. В качестве метода сравнения использовали бактериологический посев.

В ходе работы установлено, что при экспериментальном сапе методом мультиплексной ПЦР-РВ с помощью набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» обнаружена ДНК *B. mallei* в 76,66%, а при бактериологическом посеве в 61,66% случаев. Показано статистически достоверное преимущество использования метода ПЦР-РВ для выявления *B. mallei* в биопробном материале ($p < 0,01$). При экспериментальном мелиоидозе ДНК возбудителя

обнаружена в 90,0%, а культура *B. pseudomallei* выделена в 88,33% образцов. При статистическом анализе показано, что метод ПЦР и бактериологический посев одинаково эффективны для выявления *B. pseudomallei* ($p > 0,05$) (Таблица 1).

Отмечено, что на ранних сроках развития инфекционного процесса эффективность метода ПЦР выше по сравнению с бактериологическим посевом. Полученные данные при моделировании инфекции подтверждают возможность применения разработанного набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ», который с высокой чувствительностью и специфичностью позволяет выявлять и дифференцировать патогенные буркхольдерии в пробах различного биологического материала.

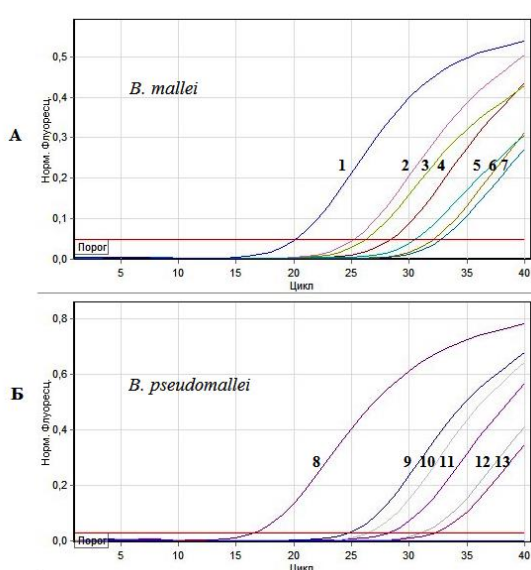
Таблица 1 – Сводные данные диагностической ценности мультиплексной ПЦР-РВ и бактериологического метода

Формы инфекций	Количество проб	Положительные результаты (% ± m)		Уровень достоверности различий
		ПЦР	бактериологический метод	
острый сап	60	76,66 ± 5,46	61,66 ± 6,27	($p < 0,01$)
острый мелиоидоз	60	90,0 ± 3,87	88,33 ± 4,14	($p > 0,05$)

В дальнейшем проведена апробация разработанного набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» при исследовании проб, содержащих возбудителей сапа и мелиоидоза. Для этого в качестве объектов окружающей среды были выбраны пробы риса, почвы и воды, контаминированные *B. pseudomallei*, поскольку возбудитель сапрофит, свободноживущий во внешней среде. Установлены высокие показатели чувствительности ПЦР-РВ для выявления возбудителя мелиоидоза в пробах почвы, риса в концентрации 1×10^4 м.к./мл в 100% случаев и пробах воды в концентрации 1×10^2 м.к./мл в 100%, специфичность реакции составила 100%.

При исследовании контаминированных проб крови с помощью набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» ДНК возбудителя сапа обнаружена с чувствительностью 1×10^3 м.к./мл, а ДНК возбудителя мелиоидоза – 1×10^4 м.к./мл в 100 % случаев. Показано, что анализ можно дополнить изучением проб слюны, в которой ДНК *B. mallei* при контаминации может быть обнаружена с высокой

чувствительностью 1×10^3 м.к./мл в 100% случаев, что позволит повысить информативность мультиплексной ПЦР-РВ при проведении диагностики сапа. Отсутствие перекрестных реакций с геномной ДНК человека свидетельствовало о возможности использования набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» для исследования клинического материала в случае появления больных с подозрением на сап и мелиоидоз. Для внедрения разработанного набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» в клиническую лабораторную практику проведены технические испытания на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора и ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Подготовлены две экспериментальные серии набора реагентов, для оценки воспроизводимости результатов анализа одна из них исследована в двух повторах. В качестве образцов для контроля использовали по 2 штамма *B. mallei* и *B. pseudomallei* в концентрациях 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 м.к./мл, а также по 1 штамму гетерологичных микроорганизмов *B. thailandensis* и *B. cepacia* в концентрации 1×10^7 м.к./мл (Рисунок 2).



№ ПП	Образцы	Концентрация м.к./мл	Канал	
			Green <i>B. mallei</i>	Yellow <i>B. pseudomallei</i>
1.	ПКО <i>B. mallei</i>	-	20,21	-
2.	<i>B. mallei</i> 10230	1×10^4	25,29	-
3.	<i>B. mallei</i> Ц-4	1×10^4	26,25	-
4.	<i>B. mallei</i> 10230	1×10^3	28,49	-
5.	<i>B. mallei</i> Ц-4	1×10^3	30,16	-
6.	<i>B. mallei</i> 10230	1×10^2	32,14	-
7.	<i>B. mallei</i> Ц-4	1×10^2	32,83	-
8.	ПКО <i>B. pseudomallei</i>	-	-	16,56
9.	<i>B. pseudomallei</i> 100	1×10^4	-	24,75
10.	<i>B. pseudomallei</i> 110	1×10^4	-	26,51
11.	<i>B. pseudomallei</i> 100	1×10^3	-	28,22
12.	<i>B. pseudomallei</i> 110	1×10^3	-	31,12
13.	<i>B. pseudomallei</i> 100	1×10^2	-	32,16
14.	<i>B. pseudomallei</i> 110	1×10^2	-	-
15.	<i>B. thailandensis</i> E 299	1×10^7	-	-
16.	<i>B. cepacia</i> ATCC 25416	1×10^7	-	-
17.	ОКВ	-	-	-
18.	КПЦР-	-	-	-

Рисунок 2 – Кривые накопления флуоресценции с ДНК возбудителя сапа, детекция по каналу Green (А) и возбудителя мелиоидоза, детекция по каналу Yellow (Б) и сводная таблица результатов ПЦР-РВ с одной из серий набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ»

В результате технических испытаний подтверждены функциональные характеристики набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ», которые соответствовали аналитической чувствительности от 1×10^2 до 1×10^4 м.к./мл и специфичности равной 100% при исследовании ДНК гетерологичных микроорганизмов. По результатам составлен акт технических испытаний № ТИ-02/16

от 30.11.2016 г., утвержден директором института ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора 30.11.2016. Разработана и согласована с экспертами эксплуатационная документация – инструкция по применению, макет маркировки внешней и внутренней упаковки, паспорт и техническая документация (ТУ 9398-013-01898084-2016). В ходе работы появилась возможность апробировать сконструированный набор реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB» на клиническом материале, поступившем в Референс-центр, от пациента с неустановленным диагнозом, но по эпидемиологическому анамнезу посещавшего эндемичную территорию по мелиоидозу.

Методом ПЦР-PB проведено исследование проб мокроты, трахеобронхиального смыва и цельной крови больного. Во всех анализируемых пробах только по каналу Yellow наблюдалась специфическая флуоресценция, что свидетельствовало об обнаружении ДНК возбудителя мелиоидоза. При секвенировании полученных ампликонов и сравнении их с нуклеотидными последовательностями, представленными в генетической базе данных GenBank NCBI, биоинформационный анализ показал 100% гомологию с участками генома штаммов *B. pseudomallei*, что подтверждало специфичность продукта ПЦР-PB с разработанным набором реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB».

Методом бактериологического посева выделить культуру не удалось, что могло быть связано с длительной персистенцией в организме больного *B. pseudomallei* и, следовательно, переходом в хроническую форму инфекции. Кроме того, прием антибиотиков мог способствовать формированию некультивируемых L-форм бактерий. Использование даже специализированных питательных сред не всегда гарантирует получение чистой культуры *B. pseudomallei* при выделении из клинического материала, что было отмечено A. Goel с соавторами [Goel et al., 2016].

Полученные данные о выявлении ДНК *B. pseudomallei* в анализируемых нами пробах клинического материала от больного и регистрация завозных случаев в странах Европы (Испания, Бельгия, Финляндия, Швеция и др.) указывают на возможность появления мелиоидоза на территории Российской Федерации и необходимость мониторинга за возбудителем.

Низкая осведомленность врачей о клинических проявлениях сапа и мелиоидоза, отсутствие опыта и настороженности при выделении культур патогенных буркхольдерий в обычных бактериологических лабораториях может

привести не только к неправильной диагностике, но и увеличивает риск внутрилабораторного заражения персонала при несоблюдении правил безопасности. В связи с этим, материал от больных с подозрением на сап и мелиоидоз следует немедленно направлять в Референс-центр, где будет проведена дифференциальная диагностика заболеваний.

Таким образом, в ходе исследований разработан набор реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ», позволяющий выявлять и дифференцировать ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией при исследовании проб биологического (клинического) материала и объектов окружающей среды. Высокая чувствительность и специфичность подтверждены при проведении технических испытаний. В перспективе данный набор реагентов может быть использован как в клинических лабораториях для установления правильного диагноза, так и специализированных противоэпидемических формированиях для выявления возможных источников инфекции и в случаях появления вспышек сапа и мелиоидоза.

Выводы

1. Для выявления и дифференциации патогенных буркхольдерий методом мультиплексной ПЦР-РВ выбраны две ДНК-мишени – фрагмент гена *fliP*, специфичный *B. mallei*, и уникальный участок гена *B. pseudomallei*, кодирующий белок *gp68*, на основе которых сконструированы видоспецифичные праймеры и флуоресцентно-меченые зонды.

2. На основе разработанного подхода создан набор реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» для выявления и дифференциации ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза методом мультиплексной ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов, который характеризуется высокой чувствительностью (от 1×10^4 м.к./мл до 1×10^2 м.к./мл) и специфичностью (100%) при исследовании культур микроорганизмов, проб биологического материала и объектов окружающей среды.

3. Установлено, что на ранних сроках инфекционного процесса при исследовании проб биологического материала от животных, зараженных возбудителями сапа и мелиоидоза, ПЦР-РВ с разработанным набором реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» более эффективна, чем бактериологический метод.

4. Проведена апробация сконструированного набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» в ходе технических испытаний. Разработан комплект

нормативных документов на основные производственные этапы изготовления и контроля набора реагентов.

Практические рекомендации

1. Использование разработанного набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» позволит с высокой специфичностью и чувствительностью за короткий срок выявить ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза в пробах биологического (клинического) материала и объектах окружающей среды при проведении мониторинга на территории РФ.

2. Предложенный методический подход, основанный на детекции гена *fliP* *B. mallei* и участка гена *B. pseudomallei*, кодирующего белок *gp68*, с помощью ПЦР-РВ, следует рекомендовать для внедрения в широкую практику при установлении диагноза сапа и мелиоидоза, что позволит начать этиологическое лечение в более ранние сроки болезни.

Перспективы дальнейшей разработки темы

1. Необходимо продолжить исследование в рамках клинических испытаний с целью установления диагностической эффективности и чувствительности реакции разработанного набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» для дальнейшего внедрения в практику клинических лабораторий.

2. Продолжение изучения различных видов образцов биологического материала при разных формах сапа и мелиоидоза с использованием разработанного набора реагентов расширит информацию о локализации очагов инфекции и возможности повышения эффективности выявления ДНК возбудителей.

Список работ по теме диссертации

1. Бондарева, О.С. Генотипирование штаммов *Burkholderia mallei* на основе метода амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК / О.С. Бондарева, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, М.Л. Леденева, **Л.В. Лемасова**, В.А. Антонов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2016, № 1, Т. 34. – С. 33-37 (из перечня ВАК).

2. **Лемасова, Л.В.** Разработка мультиплексной тест-системы для обнаружения и дифференциации *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* методом ПЦР в режиме реального времени / **Л.В. Лемасова**, Г.А. Ткаченко, С.С. Савченко, О.С. Бондарева, В.А. Антонов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016, Вып. 4. – С. 56-59 (из перечня ВАК).

3. Патент 2551208 Российская Федерация, МПК C12Q1/68, C12P19/30 Набор олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда для идентификации *Burkholderia mallei* и дифференциации его от *Burkholderia pseudomallei* / **Л.В. Лемасова**, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, В.А. Антонов, заявитель и патентообладатель Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2014116384/10; заявл. 22.04.2014; опубл. 20.05.2015, Бюл. №14 – 8 с.

4. Патент 2556810 Российская Федерация, МПК C12Q1/68 Набор олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда для идентификации *Burkholderia pseudomallei* / **Л.В. Лемасова**, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, В.А. Антонов, заявитель и патентообладатель Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2014116185/10; заявл. 22.04.2014; опубл. 20.07.2015, Бюл. № 20 – 8с.

5. Савченко, С.С. Молекулярные подходы к анализу дифференциально-экспрессирующих генов *Burkholderia mallei* при пассажах *in vivo* и *in vitro* / С.С. Савченко, В.А. Антонов, Ю.И. Сорокина, О.С. Ульянова, М.О. Нехезина, **Л.В. Соколова*** // Матер. III Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням. – М., 2011.– С. 323.

6. Савченко, С.С. Разработка гибридационно-флуоресцентной амплификационной тест-системы для идентификации возбудителя сапа / С.С. Савченко, В.А. Антонов, **Л.В. Соколова***, О.В. Зинченко // Матер. III Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням. – М., 2011.– С. 323.

7. **Лемасова, Л.В.** Применение ПЦР для детекции *Burkholderia pseudomallei* при экспериментальном хроническом мелиоидозе / **Л.В. Лемасова**, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, Р.О. Абдрахманова, А.С. Куликова, В.А. Антонов // Матер. VI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням. – М., 2014.– С. 172-173.

8. Савченко, С.С. Реаранжировки геномов патогенных буркхольдерий при существовании в различных экологических нишах / С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко,

О.С. Бондарева, **Л.В. Лемасова**, М.Л. Леденева, И.М. Шпак, А.А. Батулин, А.И. Абуева, Ю.О. Муратова, Н.Г. Плеханова, Р.О. Абдрахманова, О.В. Дандина, В.А. Антонов // Молекулярная диагностика – 2014: сб. тр. VIII Всероссийской научно-практической с международным участием. – М., 2014. – Т. 1. – С. 484-485.

9. **Лемасова, Л.В.** Индикация и дифференциация патогенных буркхольдерий в контаминированных образцах методом мультиплексной ПЦР / **Л.В. Лемасова**, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, В.А. Антонов // Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины: матер. VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора / Под ред. проф. А.Н. Куличенко. – Ставрополь, 2014. – С. 92-93.

10. Савченко, С.С. Сборка генома *Burkholderia pseudomallei* 110 на основе данных массового параллельного секвенирования / С.С. Савченко, И.М. Шпак, М.Л. Леденева, О.С. Бондарева, Г.А. Ткаченко, **Л.В. Лемасова**, А.И. Абуева, В.А. Антонов // Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины: матер. VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора / Под ред. проф. А.Н. Куличенко. – Ставрополь, 2014. – С. 102-104.

11. Прохвятилова, Е.В. Оценка эффективности применения наборов реагентов для обнаружения возбудителя мелиоидоза при проведении внутреннего контроля качества лабораторных исследований в Референс-центре по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза / Е.В. Прохвятилова, В.А. Антонов, Д.В. Викторов, В.И. Илюхин, Н.П. Храпова, Г.А. Ткаченко, И.Б. Захарова, Н.Г. Плеханова, И.В. Новицкая, М.Я. Кулаков, Т.В. Замарина, И.И. Корсакова, С.С. Савченко, О.С. Бондарева, А.А. Батулин, **Л.В. Лемасова**, Н.Н. Тетерятникова, Л.И. Белицкая // Дальневосточный Журнал инфекционной патологии. – 2014, № 25.– С. 128-131.

12. **Лемасова, Л.В.** Анализ праймеров и зондов, позволяющих дифференцировать *B. mallei* и *B. pseudomallei* методом ПЦР / **Л.В. Лемасова**, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, В.А. Антонов // Дальневосточный Журнал инфекционной патологии. –2014, № 25.– С. 132-134.

13. **Лемасова, Л.В.** Оценка диагностической ценности набора реагентов для ускоренной идентификации и дифференциации *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* методом ПЦР в режиме реального времени / **Л.В. Лемасова**, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, М.Л. Леденева, Р.О. Абдрахманова, В.А. Антонов // Перспективы сотрудничества государств-членов Шанхайской организации

сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных болезней: матер. Международной научно-практической конференции / Под ред. проф. А.Ю. Поповой. – Сочи, 2015. – С. 256-260.

14. **Лемасова, Л.В.** Применение полимеразной цепной реакции в реальном времени для обнаружения возбудителя сапа при моделировании острой формы инфекции / **Л.В. Лемасова**, Г.А. Ткаченко, С.С. Савченко, Р.О. Абдрахманова, В.А. Антонов // Матер. VIII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием. – М., 2016. – С. 161-162.

15. **Лемасова, Л.В.** Обнаружение ДНК возбудителя мелиоидоза в клиническом материале методом ПЦР в режиме реального времени / **Л.В. Лемасова**, Г.А. Ткаченко, М.Л. Леденева, С.С. Савченко, И.М. Шпак, В.А. Антонов // Современные проблемы эпидемиологии и гигиены: матер. VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора / Под ред. проф. А.Ю. Поповой. – М., 2016. – С. 123-124.

16. Ткаченко, Г.А. Совершенствование диагностики сапа и мелиоидоза на основе современных методов амплификации нуклеиновых кислот / Г.А. Ткаченко, М.Л. Леденева, **Л.В. Лемасова**, О.С. Бондарева, С.С. Савченко, В.А. Антонов // Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005 г.) до 2016 года: матер. XIII Межгосударственной научно-практической конференции / Под ред. проф. А.Ю. Поповой, академика РАН В.В. Кутырева. – Саратов, 2016. – С. 233-235.

17. **Лемасова, Л.В.** Определение диагностической эффективности ПЦР с использованием набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» при экспериментальном сапе и мелиоидозе / **Л.В. Лемасова**, Г.А. Ткаченко, М.Л. Леденева, С.С. Савченко, Н.Г. Плеханова // Молекулярная диагностика – 2017: сб. тр. IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – М., 2017. – Т. 1. – С. 319-320.

«*» – фамилия Соколова изменена на Лемасова.

Благодарности

Выражаю глубокую признательность и благодарность научному руководителю работы к.м.н., доценту Ткаченко Г.А. за профессиональные советы и поддержку в процессе работы. Благодарю директора ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора Топоркова А.В. за предоставленную возможность выполнения работы. Выражаю искреннюю благодарность сотрудникам ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора д.б.н. Викторову Д.В., д.м.н., профессору Храповой Н.П., д.м.н., профессору Мериновой Л.К., к.м.н. Плехановой Н.Г., к.м.н. Агеевой Н.П., к.м.н. Савченко С.С., к.м.н. Молчановой Е.В., Шпак И.М., за помощь на различных этапах работы и обсуждении результатов исследования.