

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-133-138

УДК 616.98:579.841.11(597)

Д.М. Фролов¹, Н.Н. Тетерятникова¹, Т.Л.А. Вуй², И.Б. Захарова¹, Н.П. Храпова¹**РАЗРАБОТКА ТЕСТА ЛАТЕКС-АГГЛЮТИНАЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ И ЕГО АПРОБАЦИЯ В ЭНДЕМИЧНЫХ РЕГИОНАХ ВЬЕТНАМА**¹ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград, Российская Федерация;²Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр, Ханой, Социалистическая Республика Вьетнам

Цель работы – разработка латекс-теста для выявления возбудителя мелиоидоза, где в качестве сенситина использовались моноклональные антитела, а также апробация лиофильно высушенного экспериментального препарата на бактериальных изолятах из объектов внешней среды, собранных на территории Социалистической Республики Вьетнам. **Материалы и методы.** Носителями специфических антител являлись окрашенные полиакролеиновые латексные частицы с активными альдегидными группами на поверхности. Для контроля специфичности диагностикума использовали типичные штаммы возбудителей мелиоидоза и сапа с полноценной антигенной структурой, а также штаммы *Burkholderia thailandensis*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas putida*. Реакцию латекс-агглютинации выполняли с бактериальными взвесями $1-2 \cdot 10^9$ м.к./мл на пластиковых чашках Петри. Результаты реакции оценивали визуально на темном фоне по 4-крестовой системе в течение 5–8 мин. Положительной считали реакцию на 3–4 креста. Подозрительные на принадлежность к патогенным буркхольдериям колонии из первичных посевов переносили на L-агар с полимиксином В и выращивали 36 часов при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Видовую принадлежность отобранных колоний определяли методом мультиплексной ПЦР с использованием набора реагентов «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL В/Д – ЕРh». **Результаты и обсуждение.** С коллекционными штаммами экспериментальный препарат продемонстрировал высокую чувствительность, агглютинировал 97,7 % штаммов *B. pseudomallei* и все штаммы *B. mallei*, реакция с *B. thailandensis*, *B. cepacia*, *P. aeruginosa* и *P. putida* была отрицательной. При скрининге бактериальных культур, изолированных из объектов внешней среды, чувствительность диагностикума составила 89,4 %. Таким образом, использование латекс-теста на этапе первичного скрининга большого количества образцов существенно сокращает время выделения чистых культур возбудителей мелиоидоза и сапа и их идентификацию.

Ключевые слова: моноклональные антитела, латексные микрочастицы, патогенные буркхольдерии, реакция латекс-агглютинации, чувствительность, специфичность.

Корреспондирующий автор: Фролов Дмитрий Михайлович, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Для цитирования: Фролов Д.М., Тетерятникова Н.Н., Вуй Т.Л.А., Захарова И.Б., Храпова Н.П. Разработка теста латекс-агглютинации для выявления патогенных буркхольдерий и его апробация в эндемичных регионах Вьетнама. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 4:133–138. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-133-138

Поступила 26.08.20. Отправлена на доработку 04.09.20. Принята к публ. 23.12.20.

D.M. Frolov¹, N.N. Teteryatnikova¹, T.L.A. Bui², I.B. Zakharova¹, N.P. Khrapova¹**Development of a Latex Agglutination Test for Detecting Pathogenic Burkholderia and its Approbation in the Endemic Regions of Vietnam**¹Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation;²Russian-Vietnamese Tropical Research and Technology Center, Hanoi, Vietnam

Abstract. The aim of the work was development of a monoclonal antibody-based latex agglutination test to identify the causative agent of melioidosis, and the approbation of a freeze-dried experimental preparation for screening of environmental bacterial isolates in Vietnam. **Materials and methods.** The carriers of specific antibodies were polyacrolein latex particles with active aldehyde groups on the surface. Typical strains of the causative agents of melioidosis and glanders with a full-fledged antigenic structure, as well as the strains *Burkholderia thailandensis*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Pseudomonas putida* were used to control the test specificity. The latex agglutination reaction was carried out on plastic Petri dishes with daily bacterial cultures, from which suspensions were prepared at a concentration of $1-2 \cdot 10^9$ m.c./ml. The results of the reaction were registered visually for 5–8 min using a 4-cross system against a dark background under lighting. The reaction to 3–4 crosses was recorded as positive. Colonies suspected of belonging to pathogenic *Burkholderia* from primary inoculations were transferred to L-agar with polymyxin B and grown for 36 hours at $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. The species of the selected suspicious colonies was determined by multiplex PCR. **Results and discussion.** With collection strains, latex test demonstrated high sensitivity agglutinating 97.7 % of *B. pseudomallei* and all *B. mallei* strains. At the same time, it was negative with *B. thailandensis*, *B. cepacia*, *P. aeruginosa* and *P. putida*. In microbiological screening of bacterial cultures isolated from environmental objects, the latex test had a diagnostic sensitivity of 89.4 %. Using the latex test at the stage of primary screening, it is possible to significantly reduce the time when processing a lot of samples received for analysis, as well as to reduce the consumption of reagents used at the subsequent stages of identification.

Key words: monoclonal antibodies, latex microparticles, *Burkholderia*, latex agglutination test, sensitivity, specificity.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Dmitry M. Frolov, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Citation: Frolov D.M., Teteryatnikova N.N., Bui T.L.A., Zakharova I.B., Khrapova N.P. Development of a Latex Agglutination Test for Detecting Pathogenic *Burkholderia* and its Approbation in the Endemic Regions of Vietnam. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2020; 4:133–138. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-4-133-138

Received 26.08.20. Revised 04.09.20. Accepted 23.12.20.

Frolov D.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5025-0791>

Teteryatnikova N.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8928-2152>

Возбудитель мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) – грамотрицательный сапрофитный микроорганизм, который относят ко II группе патогенных биологических агентов (ПБА). Его естественной средой обитания являются почва и стоячие водоемы в тропической и субтропической климатических зонах. Он способен вызывать инфекционное заболевание у человека и животных с разнообразными клиническими проявлениями: пневмонию с септициемией или без нее, а также локальные поражения кожи и внутренних органов [1–3].

Выделяют три основных пути инфицирования человека: через поврежденную поверхность кожи или слизистые оболочки, воздушно-пылевой и алиментарный [4]. Заболевание может протекать в латентной, острой или хронической форме. Рецидивы инфекции случаются у 5–28 % пациентов, что, предположительно, связано со способностью *B. pseudomallei* к внутриклеточному выживанию, в том числе и в макрофагах [5, 6]. Возможности терапии мелиоидоза ограничены природной множественной антибиотикорезистентностью возбудителя, и в настоящее время в схему лечения входит ограниченное число препаратов: цефтазидим, триметаприм/сульфаметаксозол и карбапенемы [4].

Долгое время считалось, что эндемичными территориями по мелиоидозу являются регионы Юго-Восточной Азии и северная часть Австралии, но в последние годы наблюдается явная тенденция к расширению географической зоны обитания *B. pseudomallei* за пределы Азиатско-Тихоокеанского региона [7, 8]. Все чаще регистрируют завозные случаи мелиоидоза в США и в некоторых странах Западной Европы, что обусловлено туристическими и миграционными потоками, а также торгово-экономическими связями [8, 9]. Поэтому не исключается возможность завоза инфекции и на территорию Российской Федерации.

Также существует вероятность применения *B. pseudomallei* в качестве агента биологического терроризма, что признано как отечественными, так и зарубежными специалистами [10, 11]. Степень риска преднамеренного использования патогена не определена, в связи с чем значительное внимание уделяется вопросам эффективности, доступности и безопасности методов экспресс-обнаружения и последующей достоверной идентификации возбудителя мелиоидоза [12, 13].

Этиологический агент мелиоидоза – *B. pseudomallei* – может оказаться трудным объектом для надежной идентификации. В обычных клинических лабораториях быстрому обнаружению *B. pseudomallei*

препятствует отсутствие у микробиологов опыта работы с буркхольдериями, относящимися ко II группе ПБА. Подозрительные изоляты из лабораторий первичного уровня необходимо направлять в центры индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности или референс-центр, в которых для окончательной идентификации применяют специально разработанные схемы с использованием широкого спектра диагностических методов [14].

В Российской Федерации Референс-центр по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза функционирует на базе Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, в котором уже 50 лет ведутся исследовательские работы, посвященные возбудителям этих инфекционных болезней. С 2017 г., в рамках реализации распоряжений Правительства Российской Федерации от 19.08.2017 № 1789-р, от 13.06.2019 № 1536-р, ведутся совместные с профильными учреждениями Социалистической Республики Вьетнам (СРВ) научно-исследовательские проекты, включающие исследование возбудителей опасных инфекционных болезней. Это предоставляет возможность отечественным специалистам более детально исследовать *B. pseudomallei* в условиях естественного обитания.

В настоящее время в перечень иммунодиагностических тестов, используемых для диагностики опасных инфекционных болезней, стали активно внедряться препараты, основанные на суспензионных полимерных носителях. Этому способствует ряд причин: повышение качества синтетических носителей, накопление сведений о преимуществах применения моноклональных антител в качестве детектирующего агента в реакции латекс-агглютинации (РЛА) по сравнению с поликлональными, доказательства успешной лиофилизации суспензионных частиц, нагруженных МКА, без потери иммунологической активности.

Целью работы явилась разработка экспресс-варианта диагностикума для выявления патогенных буркхольдерий, основанного на реакции латекс-агглютинации, с использованием моноклональных антител и его апробация при исследовании проб из объектов окружающей среды в эндемичных регионах Вьетнама.

Материалы и методы

Для работы использовали панели моноклональных антител из коллекции лаборатории иммунодиагностики Волгоградского научно-исследовательского противочумного института. В предыдущих исследо-

ваниях нами определено МКА к антигену 8 возбудителя мелиоидоза, которое используется в качестве сенситина в латекс-тесте, распознающего антиген клеток-мишеней [15].

Носителями специфических антител являлись полиакролеиновые латексные частицы, окрашенные родамином Ж, с диаметром частиц от 0,8 до 1,3 мкм и активными альдегидными группами на поверхности (Акролар к-3, произведен в Институте биорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН).

Диагностический препарат готовили из 10 % латексной суспензии по модифицированной методике. Для этого 50 мкл микрочастиц дважды отмывали центрифугированием в 0,9 % растворе NaCl (pH 7,2±0,2) при 5000 об/мин в течение 10 мин. Затем полиакролеин сенсibilizировали МКА в количестве 100 мкг на 500 мкл 1 % суспензии полимера в 0,9 % растворе NaCl (pH 7,2±0,2), в течение 2 часов при комнатной температуре. Далее нагруженный латекс дважды отмывали 1 % раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) при 5000 об/мин 10 мин. До конечной 1 % концентрации препарат доводили раствором 1 % БСА и оставляли на 16 часов при температуре (4±1) °С.

Для контроля специфичности диагностикума использовали типичные штаммы возбудителей мелиоидоза и сапа с полноценной антигенной структурой из коллекции Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, а также штаммы *B. thailandensis*, *B. cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa* и *P. putida*. Бактериальные культуры высевали в бульон Хоттингера с 5 % глицерина, pH (7,0±0,2) и инкубировали при температуре (37±1) °С в течение 18–24 часов. Затем подросшие культуры переносили на агар Хоттингера с 5 % глицерина и инкубировали в течение 24–48 часов при температуре (37±1) °С. Постановку РЛА осуществляли с суточными бактериальными культурами, из которых готовили взвеси в концентрации 1–2·10⁹ м.к./мл.

Для тестирования использованы почвенные изоляты, выделенные во Вьетнаме в 2019 г., видовую принадлежность которых определяли методом мультиплексной ПЦР с использованием набора реагентов для выявления и дифференциации буркхольдерий группы «*pseudomallei*» в формате мультиплексной полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL B/D – EPh» (ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Россия) [16]: *B. pseudomallei* (4 штамма), *B. thailandensis* (72 штамма) и *B. cepacia* (27 штаммов).

ДНК выделяли из предварительно обеззараженной согласно МУ 1.3.2569-09 бактериальной суспензии с применением комплекта реагентов для очистки нуклеиновых кислот Gene JET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Литва) в соответствии с инструкцией производителя.

Реакцию латекс-агглютинации выполняли на пластиковых чашках Петри. К бактериальным взвесям и отрицательному контролю (0,9 % раствор NaCl, pH 7,2±0,2), предварительно нанесенным на поверхность чашки в виде капли, добавляли 20 мкл экспериментального препарата латекса в соотношении 1:1. Результаты РЛА учитывали визуально в течение 5–8 мин. Учет проводили по 4-крестовой системе на темном фоне при достаточном освещении (табл. 1).

Результаты РЛА интерпретировали следующим образом: реакцию на 3–4 креста считали положительной, а на 1–2 креста – отрицательной. При положительном результате в опытной капле при смешивании латекс-теста со взвесью микробных клеток *B. pseudomallei* и *B. mallei* наблюдали образование четко видимого крупно- или мелкозернистого агглютината розового цвета на фоне прозрачной жидкости.

Результаты и обсуждение

Полиакролеиновый латекс как носитель антигенов обладает рядом преимуществ: низкий уровень неспецифического связывания с белками и другими лигандами, химическая стабильность, необходимое распределение частиц по размерам и функциональным группам, которые образуют ковалентную связь с первичными аминогруппами белков.

Учет результатов РЛА осуществляют визуально, поэтому у неокрашенных латексов определение перехода от отрицательной реакции к положительной может вызвать затруднение. Для улучшения контрастности картины РЛА в настоящей работе использовали окрашенную в розовый цвет полиакролеиновую суспензию. Среднее время, за которое результаты реакции становились различимы, составило 8 минут.

Таблица 1 / Table 1

Критерии качественной оценки результатов реакции латекс-агглютинации

Criteria for the qualitative assessment of latex agglutination test results

Визуальная оценка результата реакции агглютинации Visual assessment of the agglutination test results	Качественная оценка Qualitative assessment
Крупно- или мелкозернистая агглютинация (крупные и средние агрегаты латексных частиц) розового цвета при полном просветлении жидкости Coarse- or fine-grained agglutination (large and medium aggregates of latex particles) of pink color with full clarification of the liquid	++++
Мелкозернистая агглютинация розового цвета при легкой опалесценции жидкости Fine-grained agglutination of pink color with light opalescence of the liquid	+++
Слабая мелкозернистая агглютинация розового цвета на фоне мутной жидкости Weak fine-grained agglutination of pink color against the background of turbid liquid	++
Следы агглютинации розового цвета на фоне мутной жидкости Traces of pink agglutination against the background of a cloudy liquid	+

Таблица 2 / Table 2

Результаты реакции латекс-агглютинации экспериментального диагностического препарата с бактериальной взвесью коллекционных штаммов буркхольдерий и псевдомонад

The latex agglutination reaction results for an experimental diagnostic preparation with bacterial suspension of collection strains of *Burkholderia* and *Pseudomonades*

Виды микроорганизмов, концентрация бактериальной взвеси 1,0·10 ⁹ м.к./мл Species of microorganisms, concentration of bacterial suspension 1,0·10 ⁹ m.c./ml	Общее число штаммов Overall number of strains	Результат РЛА Result of the LAR	
		положительный positive	отрицательный negative
<i>B. pseudomallei</i>	44	43	1
<i>B. mallei</i>	4	4	0
<i>B. thailandensis</i>	3	0	3
<i>B. cepacia</i>	4	0	4
<i>P. aeruginos</i>	4	0	4
<i>P. putida</i>	1	0	1

Сводные данные РЛА с коллекционными штаммами *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia*, *P. aeruginosa* и *P. putida* представлены в табл. 2.

В результате экспериментальных исследований с разработанным препаратом продемонстрированы высокие показатели диагностической чувствительности (97,9 %) и специфичности (100 %). Реакция агглютинации наблюдалась в 97,7 % случаев с коллекционными штаммами *B. pseudomallei* и всеми штаммами *B. mallei* при отрицательных результатах с культурами *B. thailandensis*, *B. cepacia*, *P. aeruginos* и *P. putida*. Таким образом, показано, что экспресс-вариант диагностикума моноклонального жидкого может использоваться для выявления буркхольдерий II группы патогенности.

Одной из задач совместной российско-вьетнамской исследовательской программы по изучению возбудителя мелиоидоза является анализ распространенности *B. pseudomallei* в экосистемах Вьетнама. В рамках совместной НИР Волгоградского противочумного института и Российско-Вьетнамского Тропического научно-исследовательского и технологического центра (г. Ханой, СРВ) организованы мониторинговые исследования проб воды и почвы из различных провинций страны [17].

Предварительную подготовку собранных в ходе экспедиции образцов почвы осуществляли согласно практическому руководству [18]. Далее проводили бактериологические тесты (рост на агаре Эшдауна при температуре 42 °С, устойчивость к полимиксину и гентамицину, характер морфологии колоний, положительный тест на оксидазу) для выявления подозрительных на принадлежность к буркхольдериям II группы патогенности колоний. В итоге в работу взято 103 почвенных изолята. Далее первичные посевы переносили на L-агар с полимиксином В (50 ЕД/мл) и выращивали 36 часов при температуре (37±1) °С. После этого из полученных культур готовили взвеси и ставили реакцию латекс-агглютинации по вышеописанной методике. Параллельно с этим выделяли ДНК, с которой осуществляли постановку мультиплексной ПЦР генодиагностическим набором

«Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL B/D – EPh» для определения видовой принадлежности бактерий. Опираясь на результаты ПЦР, оценивали чувствительность и специфичность экспериментального препарата в реакции агглютинации с почвенными изолятами.

При тестировании латекс-тестом 103 почвенных изолятов 4 штамма (3,9 %) агглютинировали на 4 креста, 11 штаммов (10,6 %) – на 3 креста и у 88 штаммов (85,5 %) наблюдали отрицательные результаты реакции. Параллельная идентификация в мультиплексной ПЦР показала, что 4 штамма, оцененные на 4 креста, являются *B. pseudomallei*, а из штаммов на 3 креста один оказался *B. cepacia* и 10 – *B. thailandensis*. Среди отрицательных в РЛА изолятов идентифицировано 52 штамма *B. thailandensis*, 22 – *B. cepacia* и 14 штаммов, не относящихся к буркхольдериям, идентификация которых предусмотрена использованным генодиагностическим набором (рисунк). Чувствительность экспериментального препарата при тестировании почвенных изолятов составила 100 %, а специфичность – 90 %.

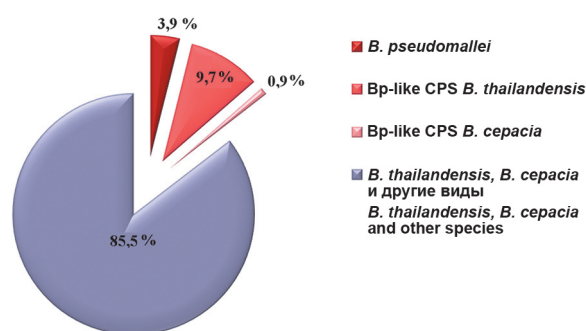


Диаграмма результатов реакции латекс-агглютинации почвенных изолятов, подозрительных на принадлежность к патогенным буркхольдериям:

Оттенками красного обозначены штаммы, положительные в РЛА. Фиолетовым обозначены штаммы, отрицательные в РЛА

Diagram of the latex agglutination reaction of soil isolates suspected of belonging to pathogenic *Burkholderia*:

Red shades stand for LAR-positive strains. Violet shades mark LAR-negative strains

По литературным данным, в популяции *B. thailandensis* присутствуют штаммы патогена, экспрессирующие капсульный полисахарид, подобный *B. pseudomallei* (BTCV – от англ. *B. thailandensis* capsular variant). Такие штаммы были обнаружены в экосистемах Вьетнама, Таиланда [19, 20], и одним из характерных признаков BTCV штаммов является положительный результат в РЛА с МКА к капсульному полисахариду возбудителя мелиоидоза. У отдельных штаммов *B. ceracia*, *B. cenoceracia* III A и *B. multivorans*, входящих в комплекс *B. ceracia*, также обнаружен функциональный кластер генов биосинтеза и экспорта капсульного полисахарида, обладающий высоким сходством с ортологичным кластером возбудителей сапа и мелиоидоза. Позднее обнаружено, что перекрестную реактивность в РЛА показывают и отдельные штаммы *B. pseudomultivorans* и *B. territorii* [21].

Показатели диагностической чувствительности и специфичности латекс-тестов, используемых в эндемичных странах, по данным разработчиков, составляют 97,25 % (94,5–100 %) и 98,6 % (97,2–100 %) соответственно [22, 23], при этом авторы отмечают, что ложноположительные результаты наблюдались у вариантных штаммов *B. thailandensis* и *B. ceracia*. Необходимо отметить, что в одной из цитируемых работ в панель протестированных гетерологичных видов (36 штаммов) вошел единственный BTCV штамм *B. thailandensis* и не обнаружено ни одного штамма перечисленных выше видов комплекса *B. ceracia*. Во второй работе РЛА применяли в качестве теста сравнения при исследовании непосредственно клинических образцов иммунохроматографическим методом (AMD, InBios International, США) и приведены данные только анализа гемокультур, данные анализа нестерильных в норме образцов не приводятся. В этом исследовании наблюдали положительный результат РЛА с *B. ceracia*. Однако, несмотря на наличие перекрестной реактивности, МКА к капсульному полисахариду общепризнаны оптимальными для выявления возбудителя мелиоидоза.

В результате проведенной работы создан экспериментальный диагностический препарат для выявления патогенных буркхольдерий, основанный на реакции латекс-агглютинации, с применением в качестве сенситина моноклональных антител к антигену 6 *B. pseudomallei*. Показатели диагностической чувствительности и специфичности разработанного латекс-теста составили 97,9 и 100 % для музейных штаммов, а для почвенных изолятов – 100 и 90 % соответственно. Также сокращено время получения результатов до 8 минут относительно ранее разработанного препарата с использованием в качестве носителя полистирольной полимерной суспензии.

Итоговые данные свидетельствуют о перспективности применения теста латекс-агглютинации для отбора подозрительных колоний при исследовании нестерильных в норме клинических образцов или

проб окружающей среды на наличие *B. pseudomallei* и *B. mallei*. Учитывая возможность перекрестной реактивности со штаммами BTCV, определение принадлежности к патогенным буркхольдериям при помощи разработанного латекс-теста ориентировочно и требует подтверждения генодиагностическими методами.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Brilhante R.S., Bandeira T.J., Cordeiro R.A., Grangeiro T.B., Lima R.A., Ribeiro J.F., Castelo-Branco D.S., Rodrigues J.L., Coelho I.C., Magalhães F.G., Rocha M.F., Sidrim J.J. Clinical-epidemiological features of 13 cases of melioidosis in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(10):3349–52. DOI: 10.1128/JCM.01577-12.
2. Dance D.A., Limmathurotsakul D. Global burden and challenges of melioidosis. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2018; 3(1):13. DOI: 10.3390/tropicalmed3010013.
3. Currie B.J. Melioidosis: an important cause of pneumonia in residents of and travellers returned from endemic regions. *Eur. Respir. J.* 2003; 22(3):542–50. DOI: 10.1183/09031936.03.00006203.
4. Lipsitz R., Garges S., Aurigemma R., Baccam P., Blaney D.D., Cheng A.C., Currie B.J., Dance D., Gee J.E., Larsen J., Limmathurotsakul D., Morrow M.G., Norton R., O'Mara E., Peacock S.J., Pesik N., Rogers L.P., Schweizer H.P., Steinmetz I., Tan G., Tan P., Wiersinga W.J., Wuthiekanun V., Smith T.L. Workshop on treatment of and postexposure prophylaxis for *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei* infection. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(12):e2. DOI: 10.3201/eid1812.120638.
5. Perumal Samy R., Stiles B.G., Sethi G., Lim L.H.K. Melioidosis: Clinical impact and public health threat in the tropics. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11(5):e0004738. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004738.
6. Wiersinga W.J., Virk H.S., Torres A.G., Currie B.J., Peacock S.J., Dance D.A.B., Limmathurotsakul D. Melioidosis. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2018; 4:17107. DOI: 10.1038/nrdp.2017.107.
7. Limmathurotsakul D., Golding N., Dance D.A., Messina J.P., Pigott D.M., Moyes C.L., Rolim D.B., Bertherat E., Day N.P., Peacock S.J., Hay S.I. Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis. *Nat. Microbiol.* 2016; 1:15008. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2015.8.
8. Захарова И.Б. Актуальные вопросы современной эпидемиологии мелиоидоза: обзор литературы и анализ случаев завоза инфекции в не эндемичные регионы. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2018; 23(3):126–133. DOI: 10.18821/1560-9529-2018-23-3-126-133.
9. Benoit T.J., Blaney D.D., Doker T.J., Gee J.E., Elrod M.G., Rolim D.B., Inglis T.J., Hoffmaster A.R., Bower W.A., Walke H.T. A review of melioidosis cases in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2015; 93(6):1134–9. DOI: 10.4269/ajtmh.15-0405.
10. Stone R. Infectious disease. Racing to defuse a bacterial time bomb. *Science.* 2007; 317(5841):1022–4. DOI: 10.1126/science.317.5841.1022.
11. Federal Select Agent Program. 2014. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.selectagents.gov/> (дата обращения 15.05.2015).
12. Lau S.K., Sridhar S., Ho C.C., Chow W.N., Lee K.C., Lam C.W., Yuen K.Y., Woo P.C. Laboratory diagnosis of melioidosis: past, present and future. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 2015; 240(6):742–51. DOI: 10.1177/1535370215583801.
13. Gilad J., Schwartz D., Amsalem Y. Clinical features and laboratory diagnosis of infection with the potential bioterrorism agents *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Int. J. Biomed. Sci.* 2007; 3(3):144–52.
14. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Изд. 2-е, перераб. и доп. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
15. Фролов Д.М., Сенина Т.В., Замакина Т.В., Храпова Н.П. Использование реакции латекс-агглютинации в ускоренном определении патогенных буркхольдерий. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 3:106–10. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-106-110.
16. Zakharova I., Teteryatnikova N., Toporkov A., Viktorov D. Development of a multiplex PCR assay for the detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia thailandensis*, and *Burkholderia cepacia* complex. *Acta Trop.* 2017; 174:1–8. DOI:10.1016/j.actatropica.2017.06.016.
17. Попова А.Ю., Топорков А.В., редакторы. Актуальные

направления и перспективы российско-вьетнамского сотрудничества в сфере обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия. Волгоград: Волга-Пресс; 2019. 400 с.

18. Топорков А.В., Кузнецов А.Н., Нгуен Х. Зы, редакторы. Лабораторный скрининг и идентификация *Burkholderia pseudomallei*: практическое руководство. Волгоград: Волга-Пресс; 2018. 95 с.

19. Vasilieva K.V., Teteryatnikova N.N., Kuzutina Y.A., Bui Lan Anh T., Ustinov D.V., Viktorov D.V., Victorov A.V., Zakharova I.B. The variability of a gene composition of capsular polysaccharide biosynthesis cluster in *Burkholderia thailandensis*. In: 9th World melioidosis congress, Local Action through Global Knowledge. Hanoi, Vietnam, 15–18 October 2019. Institute of Microbiology and Biotechnology; 2019. P. 186.

20. Parsons Y.N., Banasko R., Detsika M.G., Duangsonk K., Rainbow L., Hart C.A., Winstanley C. Suppression-subtractive hybridization reveals variations in gene distribution amongst the *Burkholderia cepacia* complex, including the presence in some strains of a genomic island containing putative polysaccharide production genes. *Arch. Microbiol.* 2003; 179(3):214–23. DOI: 10.1007/s00203-003-0518-7.

21. Songsri J., Kinoshita Y., Kwanhian W., Wisessombat S., Tangpong J., Rahman-Khan M.S., Tuanyok A. Cross-reactivity of latex agglutination assay complicates the identification of *Burkholderia pseudomallei* from soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 2018; 365(22). DOI: 10.1093/femsle/fny256.

22. Duval B.D., Elrod M.G., Gee J.E., Chantratita N., Tandhavanant S., Limmathurotsakul D., Hoffmaster A.R. Evaluation of a latex agglutination assay for the identification of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014; 90(6):1043–6. DOI: 10.4269/ajtmh.14-0025.

23. Woods K.L., Boutthasavong L., NicFhogartaigh C., Lee S.J., Davong V., AuCoin D.P., Dance D. Evaluation of a rapid diagnostic test for detection of *Burkholderia pseudomallei* in the Lao People's Democratic Republic. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56(7):e02002-17. DOI: 10.1128/JCM.02002-17.

References

1. Brilhante R.S., Bandeira T.J., Cordeiro R.A., Grangeiro T.B., Lima R.A., Ribeiro J.F., Castelo-Branco D.S., Rodrigues J.L., Coelho I.C., Magalhães F.G., Rocha M.F., Sidrim J.J. Clinical-epidemiological features of 13 cases of melioidosis in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(10):3349–52. DOI: 10.1128/JCM.01577-12.

2. Dance D.A., Limmathurotsakul D. Global burden and challenges of melioidosis. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2018; 3(1):13. DOI: 10.3390/tropicalmed3010013.

3. Currie B.J. Melioidosis: an important cause of pneumonia in residents of and travellers returned from endemic regions. *Eur. Respir. J.* 2003; 22(3):542–50. DOI: 10.1183/09031936.03.00006203.

4. Lipsitz R., Garges S., Aurigemma R., Baccam P., Blaney D.D., Cheng A.C., Currie B.J., Dance D., Gee J.E., Larsen J., Limmathurotsakul D., Morrow M.G., Norton R., O'Mara E., Peacock S.J., Pesik N., Rogers L.P., Schweizer H.P., Steinmetz I., Tan G., Tan P., Wiersinga W.J., Wuthiekanun V., Smith T.L. Workshop on treatment of and postexposure prophylaxis for *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei* infection. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(12):e2. DOI: 10.3201/eid1812.120638.

5. Perumal Samy R., Stiles B.G., Sethi G., Lim L.H.K. Melioidosis: Clinical impact and public health threat in the tropics. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11(5):e0004738. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004738.

6. Wiersinga W.J., Virk H.S., Torres A.G., Currie B.J., Peacock S.J., Dance D.A.B., Limmathurotsakul D. Melioidosis. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2018; 4:17107. DOI: 10.1038/nrdp.2017.107.

7. Limmathurotsakul D., Golding N., Dance D.A., Messina J.P., Pigott D.M., Moyes C.L., Rolim D.B., Bertherat E., Day N.P., Peacock S.J., Hay S.I. Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis. *Nat. Microbiol.* 2016; 1:15008. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2015.8.

8. Zakharova I.B. [Topical issues of modern epidemiology of melioidosis: literature review and analysis of cases of infection importation to non-endemic regions]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2018; 23(3):126–33. DOI: 10.18821/1560-9529-2018-23-3-126-133.

9. Benoit T.J., Blaney D.D., Doker T.J., Gee J.E., Elrod M.G., Rolim D.B., Inglis T.J., Hoffmaster A.R., Bower W.A., Walke H.T. A review of melioidosis cases in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2015; 93(6):1134–9. DOI: 10.4269/ajtmh.15-0405.

10. Stone R. Infectious disease. Racing to defuse a bacterial time bomb. *Science.* 2007; 317(5841):1022–4. DOI: 10.1126/science.317.5841.1022.

11. Federal Select Agent Program. 2014. (Cited 15 May 2015). [Internet]. Available from: <http://www.selectagents.gov/>.

12. Lau S.K., Sridhar S., Ho C.C., Chow W.N., Lee K.C., Lam C.W., Yuen K.Y., Woo P.C. Laboratory diagnosis of melioidosis: past, present and future. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2015; 240(6):742–51. DOI: 10.1177/1535370215583801.

13. Gilad J., Schwartz D., Amsalem Y. Clinical features and laboratory diagnosis of infection with the potential bioterrorism agents *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Int. J. Biomed. Sci.* 2007; 3(3):144–52.

14. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory diagnostics of dangerous infectious diseases. Practice guidelines]. Ed. 2nd, reprint. Moscow: "Shiko"; 2013. 560 p.

15. Frolov D.M., Senina T.V., Zamarina T.V., Khrapova N.P. [Application of latex-agglutination for rapid detection of pathogenic *Burkholderia*]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 3:106–10. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-106-110.

16. Zakharova I., Teteryatnikova N., Toporkov A., Viktorov D. Development of a multiplex PCR assay for the detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia thailandensis*, and *Burkholderia cepacia* complex. *Acta Trop.* 2017; 174:1–8. DOI:10.1016/j.actatropica.2017.06.016.

17. Popova A.Yu., Toporkov A.V., editors. [Current trends and prospects of Russian-Vietnamese cooperation in the field of ensuring sanitary and epidemiological well-being]. Volgograd: Volga-Press; 2019; 400 p.

18. Toporkov A.V., Kuznetsov A. N., Nguyen Kh. Zy, editors. [Laboratory screening and identification of *Burkholderia pseudomallei*: a practice guidelines]. Volgograd: Volga-Press; 2018. 95 p.

19. Vasilieva K.V., Teteryatnikova N.N., Kuzutina Y.A., Bui Lan Anh T., Ustinov D.V., Viktorov D.V., Victorov A.V., Zakharova I.B. The variability of a gene composition of capsular polysaccharide biosynthesis cluster in *Burkholderia thailandensis*. In: 9th World melioidosis congress, Local Action through Global Knowledge. Hanoi, Vietnam, 15–18 October 2019. Institute of Microbiology and Biotechnology; 2019. P. 186.

20. Parsons Y.N., Banasko R., Detsika M.G., Duangsonk K., Rainbow L., Hart C.A., Winstanley C. Suppression-subtractive hybridization reveals variations in gene distribution amongst the *Burkholderia cepacia* complex, including the presence in some strains of a genomic island containing putative polysaccharide production genes. *Arch. Microbiol.* 2003; 179(3):214–23. DOI: 10.1007/s00203-003-0518-7.

21. Songsri J., Kinoshita Y., Kwanhian W., Wisessombat S., Tangpong J., Rahman-Khan M.S., Tuanyok A. Cross-reactivity of latex agglutination assay complicates the identification of *Burkholderia pseudomallei* from soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 2018; 365(22). DOI: 10.1093/femsle/fny256.

22. Duval B.D., Elrod M.G., Gee J.E., Chantratita N., Tandhavanant S., Limmathurotsakul D., Hoffmaster A.R. Evaluation of a latex agglutination assay for the identification of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014; 90(6):1043–6. DOI: 10.4269/ajtmh.14-0025.

23. Woods K.L., Boutthasavong L., NicFhogartaigh C., Lee S.J., Davong V., AuCoin D.P., Dance D. Evaluation of a rapid diagnostic test for detection of *Burkholderia pseudomallei* in the Lao People's Democratic Republic. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56(7):e02002-17. DOI: 10.1128/JCM.02002-17.

Authors:

Frolov D.M., Teteryatnikova N.N., Zakharova I.B., Khrapova N.P. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Bui T.L.A. Russian-Vietnamese Tropical Research and Technology Center. Hanoi, Vietnam. E-mail: tropcenterhanoi@mail.ru.

Об авторах:

Фролов Д.М., Тетерятникова Н.Н., Захарова И.Б., Храпова Н.П. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Буй Т.Л.А. Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр. Социалистическая Республика Вьетнам, Ханой. E-mail: tropcenterhanoi@mail.ru.