А.А.Будченко, И.Ю.Мазурова, В.И.Илюхин, Н.П.Храпова

РОС-АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МЕЛИОИДОЗА И САПА ТВЕРДОФАЗНЫМ ИММУНОФЕРМЕНТНЫМ МЕТОДОМ

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград,
Российская Федерация

Анализ ROC-кривых, построенных по результатам тестирования бинарных классификаторов, используется для сравнительной оценки эффективности сравниваемых методов лабораторной диагностики инфекции и идентификации возбудителя. В работе проведен анализ ROC-кривых вариантов твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) с иммунными сыворотками для выявления наиболее эффективных при идентификации *B. pseudomallei* и *B. mallei*. Показано, что среди вариантов ТИФА с иммунными сыворотками к клеточным антигенам наиболее эффективным был ТИФА с сыворотками к гомологичным антигенам. Среди вариантов ТИФА с иммунными сыворотками к ЭЦА наиболее эффективным был ТИФА с сыворотками к ЭЦА штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Выявлена перспектива эффективного применения ТИФА с иммунными сыворотками к перекрестным антигенам штаммов *B. thailandensis* и *B. cepacia* для идентификации и типирования возбудителей сапа и мелиоидоза. Показана целесообразность применения для сравнительной оценки эффективности разрабатываемых методов идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза построения ROC-кривых и их анализа.

Ключевые слова: ROC-анализ, буркхольдерии, твердофазный иммуноферментный анализ, клеточные и экстрацеллюлярные антигены, сыворотка, *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*.

A.A.Budchenko, I.Yu.Mazurova, V.I.Ilyukhin, N.P.Khrapova

ROC-Analysis of the Results as regards *B. pseudomallei* and *B. mallei* Agents Detection Using Solid-Phase ELISA

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

Analyzed are operational characteristic curves (ROC-curves) of solid-phase ELISA variants with immune sera to cellular and extracellular *Burkholderia* antigens with the aim to determine the most effective ones for *B. pseudomallei* and *B. mallei* antigen detection. It is shown that among solid-phase ELISA variants with immune sera to cellular and extracellular antigens, those with sera to homologous antigens are the most effective. Demonstrated is the possibility of application of solid-phase ELISA variants with immune sera to antigens of *B. thailandensis* and *B. cepacia* strains for identification and typing of glanders and melioidosis agents. Assessed are prospects of extracellular antigen application for differentiation between closely related species of "pseudomallei" group.

Key words: ROC-analysis, *Burkholderia*, enzyme-linked immunosorbent assay, cellular and extracellular antigens, serum, *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*.

Современным удобным средством оценки эффективности (полезности) диагностических тест-систем является метод, основанный на анализе операционной характеристической кривой (*ROC Receiver Operating Characteristic curve*), широко известный в научных кругах [4]. ROC-кривая показывает зависимость количества верно классифицированных тест-системой положительных проб от количества неверно классифицированных отрицательных проб при выбранной точке отсечения (*cut-off value*). Для построения ROC-кривой для каждого значения точки отсечения, которое меняется от 0 до 1, с определенным шагом рассчитываются значения чувствительности (*Se*) и специфичности (*Sp*) теста и строится график их зависимости. Анализ классификаций с применением ROC-кривых называется ROC-анализом [4]. Анализ ROC-кривых успешно применялся для оценки эффективности методов диагностики буркхольдерий [9, 10]. В эндемичных по мелиоидозу районах в практической медицине при выявлении

антигенов *B. pseudomallei* и антител к ним серологические методы являются основными [7]. Однако их чувствительность и специфичность не достаточны при диагностике различных форм мелиоидоза у людей [12, 13]. Продолжается поиск антигенов, применение которых в твердофазном иммуноферментном анализе (ТИФА) и реакции пассивной гемагглютинации обеспечило бы тест-системам высокие значения чувствительности и специфичности [5, 6]. Так, М.Купакогн и соавт., используя анализ ROC-кривых, оценили эффективность выявления антител в сыворотках больных мелиоидозом в Таиланде вариантами ТИФА с 5 антигенами разного молекулярного веса, выделенными из клеток *B. pseudomallei* [9]. Ранее мы сообщали об использовании полученных иммунных кроличьих сывороток к клеточным и экстрацеллюлярным антигенам (ЭЦА) штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. cepacia*, *B. thailandensis* для выявления различий составов ЭЦА буркхольдерий группы «*pseudomallei*» и *B. cepacia* в реакции иммунодиффу-

зии (РИД) и иммуноэлектрофорезе (ИЭФ) [1].

Цель работы – сравнить с помощью ROC-анализа прогностическую способность вариантов ТИФА с иммунными кроличьими сыворотками к клеточным антигенам и к ЭЦА буркхольдерий при выявлении антигенов возбудителей сапа и мелиоидоза.

Материалы и методы

В работе использовали 21 штамм буркхольдерий (*Burkholderia pseudomallei* – 9, *B. mallei* – 4, *B. cepacia* – 6, *B. thailandensis* – 2) и 6 штаммов псевдомонад (*Pseudomonas alcaligenes* 4138, *P. fragi* 898, *P. fluorescens* B1602, *P. aeruginosa* 4000 и РАО, *P. stutzeri* 903) из коллекционного центра Волгоградского НИПЧИ. Бактерии выращивали на F-агаре «Difco» (США). Клеточные антигены получали из высушенных в ацетоне клеток, обработанных ультразвуком [2]. ЭЦА выделяли по методике P.Liu [11]. Иммунные кроличьи сыворотки получали к клеточным антигенам и ЭЦА типичных штаммов буркхольдерий: *B. mallei* 10230, *B. pseudomallei* C141, *B. cepacia* 25416, *B. thailandensis* 264. Кроликов иммунизировали внутривенно антигенами (концентрация 2 мг/мл) с неполным адъювантом Фрейнда в соотношении 1:1 дозой 2 мл за три цикла [3]. Одно введение состояло из инъекций 0,2 мл антигенной смеси в 10 точек животному вдоль позвоночника. Интервалы между введениями составляли 7 сут, между циклами – 30. Кровь отбирали при титре антител в РИД не менее 1:32. При постановке ТИФА использовали 96-луночные планшеты для иммунологических реакций «Dynatech» (Швейцария), сенсibilизированные клеточными антигенами исследуемых штаммов, (концентрация 10 мкг/мл). Свободные сайты блокировали 1 % раствором бычьего сывороточного альбумина. Затем в лунки последовательно вносили анализируемые сыворотки в разведении от 10^{-1} до 10^{-7} и меченные пероксидазой антитела против кроличьих иммуноглобулинов (Медгамал, Россия) в разведении 1:8000. В качестве субстрата применяли тетраметилбензидин. Реакцию учитывали на приборе «Stat Fax 2100» (Awareness Technology, США) при длине волны 450 нм. Положительным считали результат, при котором значения оптической плотности исследуемых образцов превышают в 2 раза и более значение критической оптической плотности контроля конъюгата (0,2). При анализе ROC-кривых, построенных для вариантов ТИФА с сыворотками против антигенов типичных штаммов буркхольдерий, был использован расчет по правилу трапеций площадей под кривыми AUC (Area Under Curve) [14].

Результаты и обсуждение

В данной работе был проведен ROC-анализ вариантов ТИФА на определение наиболее эффективных из них при выявлении антигенов *B. pseudomallei* и *B. mallei*: ТИФА с сыворотками к клеточным анти-

генам и ЭЦА *B. pseudomallei* C141 и *B. thailandensis* 264; ТИФА с сыворотками к ЭЦА четырех типичных штаммов буркхольдерий. Для этого варианты ТИФА тестировались антигенами известных штаммов буркхольдерий и псевдомонад, распределенных на 5 групп: 1-я – *B. pseudomallei* (9 штаммов), 2-я – *B. mallei* (4), 3-я – *B. cepacia* (6), 4-я – *B. thailandensis* (2), 5-я – псевдомонады (6). Для определения точки отсечения проводили ТИФА с нормальной кроличьей сывороткой (НКС), титр которой при выявлении анализируемых антигенов составил 10^{-3} и 10^{-4} . Точку отсечения определяли как сумму среднего значения титров НКС и трех среднеквадратичных отклонений [8]. Вычисленная точка отсечения составила минус 3,3 десятичного логарифма. Значения чувствительности вариантов ТИФА с сыворотками к клеточным антигенам *B. pseudomallei* C141 и *B. thailandensis* 264 при выявлении антигенов штаммов *B. pseudomallei* оказались выше (100 и 100 %), чем значения чувствительности вариантов ТИФА с сыворотками к ЭЦА (88,8 и 88,8 %). Значения специфичности вариантов ТИФА с сыворотками к клеточным антигенам этих штаммов при выявлении антигенов штаммов *B. pseudomallei* были ниже (37,5 и 42,9 %), чем значения специфичности вариантов ТИФА с сыворотками к ЭЦА (62,5 и 71,4 %). Низкая специфичность вариантов ТИФА с сыворотками к клеточным антигенам *B. pseudomallei* C141 обуславливается высоким сходством составов антигенов микроорганизмов *B. mallei* и *B. thailandensis*, взятых в качестве отрицательных проб, с антигенами штаммов *B. pseudomallei* – положительными пробами. Анализ скаттерграмм (рис. 1)

Рис. 1. Скаттерграммы титров в ТИФА иммунных кроличьих сывороток к клеточным антигенам *B. pseudomallei* C141 (А) и к ЭЦА *B. pseudomallei* C141 (Б) при выявлении антигенов 6 групп штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia*, псевдомонады:

— — — — — линия отсечения

позволил составить матрицы сопряженности с вычисленными значениями чувствительности (Se – доля истинно положительных проб) и специфичности (Sp – доля истинно отрицательных проб) в точках отсечения, взятых через интервал в один десятичный логарифм [4]. По данным матриц, были построены ROC-кривые рассматриваемых вариантов ТИФА при выявлении антигенов штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* (рис. 2). Анализ ROC-кривых проводили, учитывая, что ROC-кривая «идеального классификатора» проходит через верхний левый угол графика, где доля истинно положительных проб составляет 100 % (идеальная чувствительность), а доля ложноположительных проб равна нулю (специфичность равна 100 %) и поэтому чем ближе кривая к верхнему левому углу, тем выше прогностическая способность тест-системы, а значит выше ее эффективность; диагональная пунктирная линия соответствует «бесполезному» классификатору, то есть, полной неразличимости двух классов проб – неэффективности тест-системы [15].

Построенная ROC-кривая варианта ТИФА с сывороткой к клеточным антигенам *B. pseudomallei* C141 – $f1(x)$ оказалась ближе к углу (0 %, 100 %), а значит и более эффективной в обнаружении антигенов штаммов *B. pseudomallei*, чем вариант ТИФА с сывороткой к внеклеточным антигенам, ее кривая – $f2(x)$ расположена ближе к диагонали (рис. 2, А). Визуальный анализ ROC-кривых вариантов ТИФА с сыворотками к клеточным антигенам и ЭЦА *B. thailandensis* 264 при идентификации антигенов *B. pseudomallei* не дал явного ответа, какой из вариантов более эффективен. Поэтому был применен количественный метод сравнения ROC-кривых – вычисление и оценка AUC. Анализ AUC проводили, учитывая, что теоретически AUC изменяется от 0 до 1; так как диагностическая модель всегда характеризуется кривой, расположенной выше диагонали, то реально AUC изменяется от 0,5 («бесполезный» классификатор) до 1 («идеальная» модель), а значит, чем больше AUC приближается к 1, тем эффективнее тест-система [14]. В нашем случае AUC вариан-

та ТИФА с сывороткой к ЭЦА *B. thailandensis* 264 равна 0,78, а AUC варианта ТИФА с сывороткой к клеточным антигенам *B. thailandensis* 264 равна 0,75. Так как AUC первого варианта больше AUC второго, то из этого следует, что этот вариант ТИФА более эффективен при выявлении антигенов штаммов *B. pseudomallei*, чем второй. Эти варианты ТИФА с AUC от 0,7 до 0,8 по экспертной шкале относятся к моделям хорошего качества [14].

Визуальный анализ ROC-кривых этих же вариантов ТИФА при выявлении антигенов штаммов *B. mallei* показал, что более эффективными оказались варианты с сыворотками к клеточным антигенам *B. pseudomallei* C141 и *B. thailandensis* 264 (ROC-кривые $f1(x)$ и $f3(x)$ соответственно), так как их кривые на графике располагались ближе к углу с параметрами 0 %, 100 % (рис. 2, В). При этом вариант ТИФА с сывороткой к ЭЦА *B. thailandensis* 264 для выявления антигенов оказался совсем непригодным, так как его ROC-кривая ($f4(x)$) расположилась ниже диагонали. Как отмечалось выше, эти классификаторы относятся к «бесполезным». Такие результаты связаны с тем, что в качестве отрицательных проб были взяты антигены штаммов *B. pseudomallei*, вида близкородственного *B. mallei*, которые выявляются этим вариантом ТИФА как положительные пробы. Это значительно снизило специфичность варианта ТИФА. Значения чувствительности вариантов ТИФА с сыворотками к клеточным антигенам *B. pseudomallei* C141 и *B. thailandensis* 264 при обнаружении антигенов *B. mallei* составили 100 %, а значения специфичности – 58,3 и 31,6 % соответственно. Чувствительность при выявлении антигенов *B. mallei* вариантом ТИФА с сыворотками к ЭЦА *B. pseudomallei* C141 составила 100 %, а вариантом ТИФА с сывороткой к ЭЦА *B. thailandensis* 264 – 25 %. Значения специфичности были соответственно 83,3 и 52,7 %. Низкое значение чувствительности варианта ТИФА с сывороткой к ЭЦА *B. thailandensis* 264 указывает на значимые различия в составе ЭЦА *B. thailandensis* 264 и *B. mallei* 10230, ранее выявленные нами в ИЭФ [1].

Рис. 2. Сравнение ROC-кривых выявления антигенов штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei* вариантами ТИФА с сыворотками к клеточным антигенам и ЭЦА *B. pseudomallei* C141 и *B. thailandensis* 264:

ROC-кривые выявления антигенов штаммов *B. pseudomallei* ТИФА с сывороткой к клеточным антигенам ($f1(x)$) и к ЭЦА ($f2(x)$) *B. pseudomallei* C141 (А); ROC-кривые выявления антигенов штаммов *B. pseudomallei* ТИФА с сывороткой к клеточным антигенам: ($f1(x)$) и к ЭЦА ($f2(x)$) *B. thailandensis* 264 (Б); ROC-кривые выявления антигенов штаммов *B. mallei* ТИФА с сыворотками: к клеточным антигенам ($f1(x)$) и к ЭЦА ($f2(x)$) *B. pseudomallei* C141: к клеточным антигенам ($f3(x)$) и к ЭЦА ($f4(x)$) *B. thailandensis* 264(В). Sp – значение специфичности

Рис. 3. Сравнение ROC-кривых выявления антигенов штаммов *B. pseudomallei* (А), *B. mallei* (Б) вариантами ТИФА с иммунными сыворотками к ЭЦА:

$f1(x)$ – *B. pseudomallei* C141; $f2(x)$ – *B. mallei* 10230; $f3(x)$ – *B. thailandensis* 264; $f4(x)$ – *B. cepacia* 25416. Sp – значение специфичности

Был проведен сравнительный анализ ROC-кривых вариантов ТИФА с сыворотками к ЭЦА 4 видов буркхольдерий при выявлении антигенов *B. pseudomallei* и *B. mallei*. При обнаружении антигенов *B. pseudomallei* более эффективным оказался ТИФА с сывороткой к ЭЦА *B. thailandensis* 264, так как его ROC-кривая располагалась ближе остальных к углу графика с параметрами 0 %, 100 % (рис. 3, А). Наименее эффективным оказался вариант ТИФА с сывороткой к ЭЦА *B. cepacia* 25416, так как его ROC-кривая располагалась ближе других кривых к диагонали (рис. 3, А). Это объясняется значительными различиями составов ЭЦА *B. pseudomallei* и *B. cepacia* [1]. При обнаружении антигенов *B. mallei* наиболее эффективным оказался вариант ТИФА с сывороткой к ЭЦА *B. mallei*, так как его ROC-кривая на графике ближе других расположилась к углу с координатами 0 %, 100 %. Анализ определил бесполезным вариант для выявления антигенов штаммов *B. mallei* ТИФА с сывороткой к ЭЦА *B. thailandensis* 264, о чем говорилось выше (рис. 3, Б). Интересным явился тот факт, что при выявлении антигенов штаммов *B. mallei* эффективность варианта ТИФА с сывороткой к ЭЦА *B. cepacia* 25416 оказалась выше, чем ТИФА с сывороткой к ЭЦА *B. thailandensis* 264, что коррелирует с данными по различиям составов ЭЦА *B. thailandensis* 264 и ЭЦА *B. cepacia* 25416 [1].

Таким образом, проведенные исследования показали, что ROC-анализ применим для оценки прогностической способности вариантов ТИФА с сыворотками к разным антигенам буркхольдерий при выявлении антигенов *B. pseudomallei*, *B. mallei*. Анализ ROC-кривых позволил сделать вывод, что более эффективными при выявлении антигенов патогенных буркхольдерий являются варианты ТИФА с сыворотками к гомологичным клеточным антигенам. Изучение ROC-кривых вариантов ТИФА с сыворотками к ЭЦА четырех штаммов буркхольдерий выявило различия в эффективности их при идентификации антигенов патогенных буркхольдерий, связанные с различиями составов ЭЦА анализируемых видов. Эти факты определили перспективность дальнейшего изучения состава ЭЦА штаммов анализируемых видов с целью выявления индивидуальных и перекрестных антигенов, которые будучи выделенными, могли быть использованы в создании эффек-

тивных тест-систем идентификации *B. pseudomallei*, *B. mallei*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Будченко А.А., Мазурова И.Ю., Илюхин В.И. Исследование внеклеточных антигенов иммунодиффузионными методами в дифференциации патогенных буркхольдерий. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2012; 1:54–60.
2. Пивень Н.Н., Авророва И.В., Жукова С.И., Алексеев В.В., Храпова Н.П., Корсакова И.И., Ломова Л.В., Напалкова Г.М., Дрефс И.Т., Прошина О.Б. Иммуногенность поверхностных и капсульных антигенов *Burkholderia mallei*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 1:47–52.
3. Пивень Н.Н., Смирнова В.И., Каплиев В.И., Подзолкова Г.Г., Храпова Н.П. Роль поверхностных антигенов *Pseudomonas pseudomallei* в патогенезе мелиоидоза. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1991; 10:8–12.
4. Файнзильберг Л.С., Жук Т.Н. Гарантированная оценка эффективности диагностических тестов на основе усиленного ROC-анализа. Управляющие системы и машины. 2009; 5:3–13.
5. Allwood E.M., Logue C.-A., Hafner G.J., Ketheesan N., Norton R.E., Peak I.R., Beacham I.R. Evaluation of recombinant antigens for diagnosis of melioidosis. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2008; 54:144–53.
6. Ashdown L.R., Johnson R.W., Koehler J.M., Cooney C.A. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of clinical and subclinical melioidosis. J. Infect. Dis. 1989; 160(2):253–60.
7. Chantrattita N., Wuthiekanun V., Thanwisai A., Limmathurotsakul D., Cheng A.C., Chierakul W., Day N.P., Peacock S.J. Accuracy of enzyme-linked immunosorbent assay using crude and purified antigens for serodiagnosis of melioidosis. Clin. Vaccine Immunol. 2007; 14(1):110–13.
8. Chenthamarakshan V., Kumutha M.V., Vadivelu J., Puthucherry S.D. Distribution of immunoglobulin classes and IgG subclasses against a culture filtrate antigen of *Burkholderia pseudomallei* in melioidosis patients. J. Med. Microbiol. 2001; 50:55–61.
9. Kunakorn M., Boonma P., Khupulsup K., Petchclai B. Enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M specific antibody for the diagnosis of melioidosis. J. Clin. Microbiol. 1990; 28(6):1249–53.
10. Limmathurotsakul D., Chantrattita N., Teerawattanasook N., Piriyagitpaiboon K., Thanwisai A., Wuthiekanun V., Day N.P., Cooper B., Peacock S.J. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of melioidosis: better than we thought. Clin. Infect. Dis. 2011; 52(8):1024–28.
11. Liu P. Identification of pathogenic *Pseudomonas* by extracellular antigens. J. Bacteriol. 1961; 81(7):28–35.
12. O'Brien M., Freeman K., Lum G., Cheng A.C., Jacups S.P., Currie B.J. Further evaluation of a rapid diagnostic test for melioidosis in an area of endemicity. J. Clin. Microbiol. 2004; 42:2239–40.
13. Sermswan R.W., Wongratanchewin S., Anuntagool N. Comparison of the polymerase chain reaction and serologic tests for diagnosis of septicemic melioidosis. J. Trop. Med. Hyg. 2000; 63:146–9.
14. Van den Hout W.B. The area under an ROC curve with limited information. Med. Decis. Making. 2003; 23(2):160–66.
15. Zweig M.H., Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. Clin. Chem. 1993; 39(4):551–77.

References

1. Budchenko A.A., Mazurova I.Yu., Ilyukhin V.I. [Investigations of extracellular antigens using immune-diffusion methods for differentiation between pathogenic *Burkholderia*]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.

2012; 1:54–60.

2. Piven N.N., Avrorova I.V., Zhukova S.I., Alekseev V.V., Khrapova N.P., Korsakova I.I., Lomova L.V., Napalkova G.M., Drefs I.T., Proshina O.B. [Immunogenicity of the surface and capsular *Burkholderia mallei* antigens]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2007; 1:47–52.

3. Piven N.N., Smirnova V.I., Kapliev V.I., Podzolkova G.G., Khrapova N.P. [Function of the surface *Pseudomonas pseudomallei* antigens in melioidosis pathogenesis]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1991; 10:8–12.

4. Fainzil'berg L.S., Zhuk T.N. [Assured assessment of the efficacy as regards diagnostic assays on the basis of amplified ROC-analysis]. Upravl. Sistemy i Machiny. 2009; 5:3–13.

5. Allwood E.M., Logue C.-A., Hafner G.J., Ketheesan N., Norton R.E., Peak I.R., Beacham I.R. Evaluation of recombinant antigens for diagnosis of melioidosis. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2008; 54:144–53.

6. Ashdown L.R., Johnson R.W., Koehler J.M., Cooney C.A. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of clinical and subclinical melioidosis. J. Infect. Dis. 1989; 160(2):253–60.

7. Chantratita N., Wuthiekanun V., Thanwisai A., Limmathurotsakul D., Cheng A.C., Chierakul W., Day N.P., Peacock S.J. Accuracy of enzyme-linked immunosorbent assay using crude and purified antigens for serodiagnosis of melioidosis. Clin. Vaccine Immunol. 2007; 14(1):110–13.

8. Chenthamarakshan V., Kumutha M.V., Vadivelu J., Puthucherry S.D. Distribution of immunoglobulin classes and IgG subclasses against a culture filtrate antigen of *Burkholderia pseudomallei* in melioidosis patients. J. Med. Microbiol. 2001; 50:55–61.

9. Kunakorn M., Boonma P., Khupulsup K., Petchclai B. Enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M specific antibody for the diagnosis of melioidosis. J. Clin. Microbiol. 1990; 28(6):1249–53.

10. Limmathurotsakul D., Chantratita N., Teerawattanasook N., Piriyagitpaiboon K., Thanwisai A., Wuthiekanun V., Day N.P.J., Cooper B., Peacock S.J. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of me-

lioidosis: better than we thought. Clin. Infect. Dis. 2011; 52(8):1024–28.

11. Liu P. Identification of pathogenic *Pseudomonas* by extracellular antigens. J. Bacteriol. 1961; 81(7):28–35.

12. O'Brien M., Freeman K., Lum G., Cheng A.C., Jacups S.P., Currie B.J. Further evaluation of a rapid diagnostic test for melioidosis in an area of endemicity. J. Clin. Microbiol. 2004; 42:2239–40.

13. Šermšwan R.W., Wongratanacheewin S., Anuntagool N. Comparison of the polymerase chain reaction and serologic tests for diagnosis of septicemic melioidosis. J. Trop. Med. Hyg. 2000; 63:146–9.

14. Van den Houw W.B. The area under an ROC curve with limited information. Med. Decis. Making. 2003; 23(2):160–66.

15. Zweig M.H., Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. Clin. Chem. 1993; 39(4):551–77.

Authors:

Budchenko A.A., Mazurova I.Yu., Ilyukhin V.I., Khrapova N.P. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Об авторах:

Будченко А.А., Мазурова И.Ю., Илюхин В.И., Храпова Н.П. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 16.07.12.