

УДК 616.982.27+616.982.27-039:616-07

**В.А.Антонов, В.И.Илюхин, Н.П.Храпова, Е.В.Прохватилова, Д.В.Викторов, Т.В.Сенина,
А.А.Будченко, Г.А.Ткаченко, В.В.Алексеева, И.Б.Захарова, С.С.Савченко, О.В.Зинченко,
Ю.И.Сорокина, В.В.Алексеев**

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ САПА И МЕЛИОИДОЗА. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ТИПИРОВАНИЕ *BURKHOLDERIA MALLEI* И *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI*

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград

Проанализированы методические подходы, используемые для идентификации и типирования *B. mallei* и *B. pseudomallei*, предложены рекомендации по совершенствованию алгоритмов лабораторной диагностики сапа и мелиоидоза с учетом широкого спектра биохимических, иммунодиагностических и молекулярно-генетических тестов.

Ключевые слова: сап, мелиоидоз, генетическое типирование, диагностика, полимеразная цепная реакция.

**V.A.Antonov, V.I.Ilyukhin, N.P.Khrapova, E.V.Prokhvatilova, D.V.Viktorov, T.V.Senina, A.A.Budchenko,
G.A.Tkachenko, V.V.Alekseeva, I.B.Zakharova, S.S.Savchenko, O.V.Zinchenko, Yu.I.Sorokina, V.V.Alekseev**

Modern Approaches for Detection of Glanders and Melioidosis. Identification and Typing of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd

Analysed are the methodological approaches used for identification and typing of *B. mallei* and *B. pseudomallei*. Suggested are recommendations for improvements of algorithms of laboratory diagnosis of glanders and melioidosis including wide range of biochemical, immunodiagnostic and molecular genetic methods.

Key words: glanders, melioidosis, genetic typing, diagnostic, polymerase chain reaction.

Возбудители сапа и мелиоидоза относятся к β -подклассу протеобактерий, семейству *Burkholderiaceae*, роду *Burkholderia*. В настоящее время род *Burkholderia* включает более 50 видов микроорганизмов и представляет собой довольно гетерогенную таксономическую группу, объединяющую сапрофиты, фитопатогены и патогены теплокровных животных. К возбудителям особо опасных инфекций относятся два вида – *B. pseudomallei* и *B. mallei*, мелиоидозный и сапной микроб соответственно.

Мелиоидоз эндемичен для влажных тропических и субтропических регионов Юго-Восточной Азии, Северной Австралии, Западной Африки и Латинской Америки. Довольно большое число спорадических случаев заболевания, связанных с заносом из эндемичных регионов, в последнее время отмечено для ряда стран умеренного климатического пояса [11]. Летальность при септической и легочной форме мелиоидоза превышает 90 %. Несмотря на использование для лечения самых современных препаратов, смертность составляет более 40 %.

Сапной микроб *B. mallei* вызывает тяжелое инфекционное заболевание у человека и довольно широкого круга животных. Описанные случаи внутрилабораторного заражения человека свидетельствуют о его довольно высокой видовой чувствительности к этому возбудителю. Возбудитель сапа патогенен для непарнокопытных животных (лошадей, мулов,

ослов), кошек, собак, морских свинок и мышей. В экспериментальных условиях наиболее чувствительными к сапу животными являются кошки, золотистые хомячки и морские свинки. Кролики мало восприимчивы к сапу. Белые мыши и крысы – высокорезистентны [4]. В связи с уменьшением численности лошадей, являющихся основным резервуаром этой инфекции, сегодня в мире проблема сапа не стоит так остро, как ранее, однако сап по-прежнему наносит значительный экономический урон в животноводческих хозяйствах, практикующих разведение и использование непарнокопытных животных [17].

В России последние вспышки сапа были зарегистрированы в период второй мировой войны. На территории СССР сап считался полностью ликвидированным. В настоящее время это заболевание в России официально не регистрируется, однако вероятность заноса этой инфекции не может быть полностью исключена ввиду того, что возбудитель ее постоянно циркулирует в ряде сопредельных стран (Монголия, Турция, Иран и др.) [4].

Вид *B. mallei* отличается высокой генетической и фенотипической мономорфностью, внутри вида не существует общепризнанного подразделения на биовары и подтипы. Высокая близость геномов сапа и мелиоидоза, объединение штаммов возбудителя сапа в единый сиквенс-тип, входящий в клональный комплекс со штаммами возбудителя мелиоидоза, позво-

лили сделать предположение, что *B. mallei* является клоном *B. pseudomallei*, хотя на уровне экологии и эпидемиологии возбудители сапа и мелиоидоза – различные виды микроорганизмов, отличающиеся по микробиологическим свойствам [16].

На сегодняшний день можно констатировать, что существующие методы обнаружения патогенных буркхольдерий оказываются недостаточно эффективными для экспресс-диагностики, а идентификация возбудителей сапа и мелиоидоза по-прежнему является трудоемкой задачей.

До внедрения в лабораторную практику полуавтоматических и автоматических систем типа API, Vitek, а также генетических методов с применением ПЦР лабораторная диагностика и идентификация культур *B. pseudomallei* и *B. mallei* основывалась, главным образом, на изучении культурально-морфологических и биохимических свойств микроорганизмов [6, 15]. Установление принадлежности к большой группе так называемых неферментирующих глюкозу грамотрицательных бактерий (ГНФ) позволяло проводить дальнейшую идентификацию, используя простые, вполне доступные по набору тестов идентификационные ключи [46, 49].

Для дифференциации от фенотипически сходных микроорганизмов осуществляется дополнительная постановка 20–30 тестов [15, 32]. Принципиальное значение придается исследованию окисления моно- и дисахаридов, оксидазной, декарбоксилазной, желатиназной активности, гидролизу эскулина, определению бета-галактозидазы (ONPG), наличия гемолизина, ДНК-азы и способности к росту при 42 °С.

Современная идентификация бактерий рода *Burkholderia* является многоэтапной и относится к тем случаям, где необходима комбинация методов определения фенотипических и генотипических признаков, то есть использования полифазного таксономического подхода [46, 47, 49]. Так, при работе с микроорганизмами комплекса *B. ceracia* полуавтоматические системы не позволяют идентифицировать изоляты до вида (геномвара). При определении видовой принадлежности этих микроорганизмов достаточно часто возникают ошибки их дифференциации от *B. pseudomallei* [19, 23].

Тактика обнаружения, идентификации и внутривидового типирования патогенных микроорганизмов предусматривает применение ряда иммунодиагностических тестов с использованием моноклональных антител (МКА). В практической работе для экспресс-ускоренного выявления и последующей идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза чаще всего используют метод флуоресцирующих антител (МФА), реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА), твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА), реакцию двойной иммунодиффузии (РДД), иммуноблоттинг [8, 35]. В качестве дополнительного метода дифференциации патогенных и непатогенных буркхольдерий целесообразно использовать реакцию двойной иммунодиффузии с применением преципитирующих МКА заданной специфичности. Перспективной тенденцией совершенствования лабораторной диагностики сапа и

мелиоидоза считают сочетанное применение двух методов: ПЦР и ТИФА на основе МКА.

Из фенотипических методов известное значение имеет анализ белков в полиакриламидном геле-электрофорезе с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE). С применением компьютерных программ для анализа электрофореграмм этот метод позволяет не только разграничивать штаммы *B. pseudomallei* и *B. mallei* от буркхольдерий других видов, но и отражать внутривидовые особенности штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза [2].

Опыт зарубежных исследователей свидетельствует, что молекулярно-биологические методы обнаружения патогенных буркхольдерий целесообразно включать в качестве подтверждающих тестов в схему лабораторной диагностики при положительных находках в полуавтоматических системах идентификации [19].

Молекулярно-генетические подходы в настоящее время стали занимать главенствующее место и при типировании возбудителей сапа и мелиоидоза [10, 39, 40]. Такие методы, как геле-электрофорез в пульсирующем электрическом поле, различные варианты полимеразной цепной реакции и мультилокусного секвенирования, были использованы для внутривидовой дифференциации штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, выделенных из внешней среды, от животных и человека [17, 44], расшифровке вспышек инфекций [12] и оценке эффективности проводимой антибиотикотерапии [24, 45]. Применение автоматических секвенаторов и методологии биочипов позволило вплотную подойти к экспрессному секвенированию полного генома микроорганизмов [18, 21, 26]. Информация, полученная при секвенировании геномов патогенных буркхольдерий, может быть использована для разработки быстрых и точных методов диагностики и дифференциации возбудителей сапа и мелиоидоза от близкородственных микроорганизмов, а также для внутривидового типирования этих патогенов [20]. Поскольку секвенирование полного генома в лабораторных условиях является трудоемким и дорогостоящим методом, а методы ускоренной расшифровки полноразмерных геномов в настоящее время недоступны, гораздо больший интерес представляет выявление отдельных генетических локусов (размером 500–950 н.п.), анализ которых позволит решить поставленные перед исследователем задачи. Так, изучение наиболее консервативных последовательностей дает возможность устанавливать степень родства на уровне семейств, родов и видов, и как следствие – проводить идентификацию возбудителя инфекционного заболевания. Проведение дифференциации близкородственных микроорганизмов и внутривидовое разграничение может осуществляться при сопоставлении переменных последовательностей генома.

В последние годы наиболее предпочтительным методом идентификации буркхольдерий в хорошо оснащенных клинических лабораториях является полимеразная цепная реакция (ПЦР), в том числе с флуоресцентной детекцией [38, 47]. Специфическая флуоресцентная гибридизация в процессе амплифи-

кации может регистрироваться детектором флуоресценции как по окончании реакции, так и в режиме реального времени [40, 41].

Применение ПЦР в условиях ускоренной идентификации предусматривает обнаружение патогенных биологических агентов в любом биологическом материале и объектах окружающей среды как при работе с нативными пробами, так и после биологического накопления на питательных средах и в органах биопробных животных. В качестве ДНК мишеней были рекомендованы гены *16S pPHK* [13], *23S pPHK* [27], спейсерные области *16-23S pPHK* [25], кластер генов *LPS*, кодирующий капсульный липополисахарид [34], гены системы III типа секреции (*TTS1*) [29, 33, 50], флагеллярный ген [36]. В большинстве работ использовался ПЦР-анализ с электрофоретической детекцией.

ПЦР в режиме реального времени показала более высокую чувствительность, специфичность и быстроту в использовании по сравнению со стандартной ПЦР. R.Novak *et al.* [31], продолжая исследования предыдущих авторов, используя в качестве мишени *orf2* из кластера генов III типа секреции (*TTS1*), описали метод ПЦР в режиме реального времени, который со 100 % специфичностью детектировал чистые культуры штаммов *B. pseudomallei*. Позже эти праймеры и флуоресцентные зонды были апробированы на клинических образцах мокроты, мочи, крови, а также в мазках гноя и ран [29]. На основе гена *TTS1* M.Kaestli *et al.* [22] была сконструирована тест-система в режиме реального времени, позволявшая детектировать *B. pseudomallei* в образцах почвы. Разработкой праймеров для TaqMan зондов на основе генов, детерминирующих *16S pPHK* и флагеллин, занимались H.Tomaso *et al.* [41] и гена *IpxO* – A. Merritt *et al.* [28]. В работе F.M.Thibault *et al.* [40] исследователи использовали праймеры и гидролизующие зонды (TaqMan), сконструированные на основе кластеров генов *TTS1* и *TTS2*. H.Tomaso *et al.* [41] впервые удалось дифференцировать *B. mallei* от *B. pseudomallei* и других гетерологичных микроорганизмов, создав ПЦР-тест-систему в режиме реального времени, сконструированную на основе последовательности *fliP*. Для специфической детекции *B. mallei* были сконструированы тест-системы на основе гена *bimA* (*Burkholderia intracellular motility A*), который кодирует белок, участвующий в полимеризации актина [42, 43]. Авторы другого исследования с помощью технологии TaqMan разработали тест-системы, которые детектировали два новых гена, кодирующих гипотетические белки, уникальные для *B. pseudomallei* (GenBank [A0179](#) и [A1189](#)) [37]. С помощью этих тест-систем детектировали *B. pseudomallei* в образцах крови от больных септицемией. Используя технологию «молекулярных маячков», была разработана тест-система на основе консервативных последовательностей генов «домашнего хозяйства» *narK* и *gltB*. ПЦР-продукт *narK* детектировался при исследовании *B. mallei*, *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*, но отсутствовал у других видов *Burkholderia*. Амплификация *glbB* происходила при обнаружении всех штаммов *Burkholderia* за исключением

Burkholderia phenazinium и *Ralstonia metallidurans*. Для дифференциации между *B. mallei* и *B. pseudomallei* в данных последовательностях генов были выбраны единичные нуклеотидные замены [48].

Для идентификации патогенных буркхольдерий нами разработаны амплификационные тест-системы на основе нуклеотидных последовательностей генов *23S pPHK*, III типа секреции (*TTS I*) и флагеллярного гена *fliC* как в формате электрофорезной, так и флуоресцентной детекции, в том числе в формате реального времени [1, 7, 9]. Высокая специфичность и чувствительность данных тест-систем позволили нам рекомендовать их использование в алгоритме лабораторной диагностики сапа и мелиоидоза, а также при идентификации патогенных буркхольдерий по таксономическим признакам и эпидемической значимости. Причем использование двух ДНК мишеней – участков *16S pPHK* и *23S pPHK*, *orf13* или *fliC*, при сочетании ПЦР и секвенирования позволяет повысить достоверность ПЦР-диагностики и ускорить идентификацию *B. mallei* и *B. pseudomallei* и их дифференциацию от близкородственных видов микроорганизмов.

Проведенные исследования геномной организации различных штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза на основе секвенирования их полных геномов позволяют определять ДНК-маркеры, с которыми можно проводить сравнение остальных штаммов и изолятов, определять консервативные и варьируемые последовательности для идентификации и внутривидовой дифференциации штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei* [18, 30]. Аннотированные сиквенсы геномов патогенных буркхольдерий представлены на веб-серверах (<http://www.tigr.org>) и (<http://www.sanger.ac.uk>). На основе анализа литературных данных [10, 11, 14, 16, 44] и результатов собственных исследований нами показано, что для дифференциации штаммов возбудителя мелиоидоза эффективны методы пульс-электрофореза и мультилокусного сиквенс-типирования (MLST), амплификации полиморфной ДНК с произвольными праймерами (RAPD), анализ количества варьируемых тандемных повторов (VNTR-анализ), Rep-ПЦР и схема типирования на основе варьируемых ампликонов (VAT). Из методов генотипирования для штаммов *B. mallei* применим макрорестрикционный анализ ДНК в формате пульс-электрофореза, VNTR-анализ, амплификация с произвольными праймерами и анализ варьируемых ампликонов.

Разработка методов идентификации и типирования штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза, основанных на изучении их генетического полиморфизма, должна обеспечить возможность быстрого выявления генетических особенностей штаммов с целью определения их происхождения и связи с определенными эколого-эпидемическими районами. Более перспективным представляется использование в качестве маркерных систем полиморфных нуклеотидных последовательностей ДНК, включая различные тандемные повторы и варьируемые ампликоны.

В принципе, все данные фено- и генотипических методов, а также результаты филогенетических ис-

следований могут быть включены в расширенную схему идентификации и типирования, опирающуюся на принципы полифазной таксономии. Таких методов множество, но выбор оптимального сочетания наиболее эффективных подходов и формирование универсального алгоритма является актуальным для любых микроорганизмов, в том числе возбудителей сапа и мелиоидоза. Это обстоятельство определяет актуальность дальнейших исследований, направленных на совершенствование схем идентификации и внутривидовой дифференциации штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза. Важная роль в обеспечении этих исследований отводится созданному на базе ФКУЗ ВолгоградНИПЧИ Роспотребнадзора Референс-центру по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза, в задачи которого входит изучение биологических, молекулярно-генетических и биохимических свойств *B. mallei* и *B. pseudomallei*, в том числе штаммов с атипичными свойствами, анализ эффективности создаваемых диагностических препаратов и разработка идентификационных тестов и методов внутривидовой дифференциации штаммов патогенных буркхольдерий.

В Волгоградском научно-исследовательском противочумном институте имеется коллекция штаммов *B. mallei*, *B. pseudomallei* и близкородственных буркхольдерий – *B. thailandensis* и *B. cepacia*, выделенных в различных географических регионах. Сконструированные амплификационные тест-системы для идентификации патогенных буркхольдерий прошли внутриинститутские и приемотехнические испытания.

Проведен сравнительный анализ хромосом патогенных буркхольдерий с учетом их блочной реорганизации, получена и охарактеризована полная библиотека вариабельных фрагментов *B. mallei* и *B. pseudomallei*, которая может быть использована в качестве ДНК-маркеров при создании высокоэффективных систем внутривидового типирования возбудителей сапа и мелиоидоза.

Апробированы методы типирования штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei* с использованием производных праймеров (RAPD), рестрикционный анализ хромосомной ДНК (RFLP), в том числе пульс-электрофорез, VNTR-анализ и ПЦР-типирование на основе вариабельных ампликонов, ДНК-ДНК гибридизация, сравнительный анализ плазмидных профилей и белковых спектров. Создан банк перевиваемых линий гибридом-продуцентов МКА к антигенам *B. pseudomallei* и *B. mallei*, экспонированным на поверхности бактериальных клеток, что позволяет использовать индивидуальные образцы или их смеси для идентификации данных патогенов и их дифференциации от непатогенных представителей рода *Burkholderia*. В институте на постоянной основе осуществляется производство лиофилизированных препаратов для МФА в объемах, удовлетворяющих запросы медицинской службы ГО и учреждений Роспотребнадзора: иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих сапных моноклональных и иммуноглобулинов диагностических флуоресцирую-

щих мелиоидозных моноклональных, предназначенных для обнаружения и идентификации *B. mallei* и *B. pseudomallei* соответственно [3, 4, 5, 8].

Недостаточная защищенность человека от целого ряда природных инфекционных болезней усиливается угрозой возможного преднамеренного использования биологических агентов в целях терроризма. В этом случае, определяющее значение имеет скорость не только установления диагноза, но и расшифровки вспышки инфекции.

Объем и порядок проведения диагностических исследований по обнаружению патогенных биологических агентов опасных инфекционных болезней в микробиологических лабораториях регламентированы соответствующими для каждого вида возбудителя нормативно-методическими документами, вместе с тем, многие из них требуют корректировки. Проведенные исследования позволяют обозначить необходимый перечень биохимических, иммунодиагностических и молекулярно-генетических тестов для оптимизации существующих схем лабораторной диагностики возбудителей сапа и мелиоидоза и разработки стандартов лабораторной диагностики особо опасных инфекций для диагностических лабораторий территориального, регионального и федерального уровней.

Работа выполнена по государственному контракту № 54-Д/3 от 20.08.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009 – 2013 гг.)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алтухова В.В., Антонов В.А., Ткаченко Г.А. и др. Использование полимеразной цепной реакции для обнаружения возбудителей сапа и мелиоидоза при экспериментальной инфекции. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2007; 3:22–7.
2. Будченко А.А., Илюхин В.И., Викторов Д.В. Сравнительный анализ электрофорграмм суммарных клеточных белков патогенных буркхольдерий. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2005; 2:24–8.
3. Кулаков М.Я., Прохвятилова Е.В., Храпова Н.П. Моноклональный эритроцитарный диагностикум для обнаружения возбудителей сапа и мелиоидоза. В кн.: Эколого-эпидемиологический надзор за природно-очаговыми инфекциями в Северном Прикаспии. Астрахань; 1996. С. 146–7.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: «Медицина», «Шико»; 2009. 472 с
5. Прохвятилова Е.В., Храпова Н.П. О получении моноклональных люминесцирующих иммуноглобулинов для обнаружения возбудителя мелиоидоза. В кн.: Эколого-эпидемиологический надзор за природно-очаговыми инфекциями в Северном Прикаспии. Астрахань; 1996. С. 147–8.
6. Ряпис Л.А., Илюхин В.И., Вострова Е.И. и др. Лабораторная диагностика клинически значимых видов псевдомонад. Лаб. дело. 1988; 12:66–71.
7. Ткаченко Г.А., Антонов В.А., Замараев В.С., Илюхин В.И. Идентификация возбудителей сапа и мелиоидоза с помощью полимеразной цепной реакции. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2003; 3:7–11.
8. Храпова Н.П., Тихонов Н.Г., Рыбкин В.С. и др. Иммунологическая диагностика мелиоидоза. В кн.: Мелиоидоз. Волгоград; 1995. С. 57–68.
9. Antonov V.A., Tkachenko G.A., Altukhova V.V. et al. Molecular identification and typing of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*: when is enough enough? Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2008; 102(Suppl 1):134–9.
10. Chantratita N., Vesaratchavest M., Wuthiekanun V. et al. Pulsed-field gel electrophoresis as a discriminatory typing technique for the biothreat agent *Burkholderia mallei*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2006; 74:345–7.
11. Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology,

- pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 2:383–416.
12. Currie B.J., Mayo M., Anstey N.M. et al. A cluster of melioidosis cases from an endemic region is clonal and is linked to the water supply using molecular typing of *Burkholderia pseudomallei* isolates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001; 65:177–9.
 13. Dharakul T., Songsvilai S., Viriyachitra S. et al. Detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in patients with septicemic melioidosis. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(3):609–14.
 14. Duangsonk K., Gal D., Mayo M. et al. Use of a variable amplicon typing scheme reveals considerable variation in the accessory genomes of isolates of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:1323–34.
 15. Gilardi G.L. Identification of *Pseudomonas* and related bacteria In: Glucose nonfermenting Gramnegative bacteria in clinical microbiology. 1978. P. 16–44.
 16. Godoy D., Randle G., Simpson A.J. et al. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:2068–79.
 17. Harvey S.P., Minter J.M. Ribotyping of *Burkholderia mallei* isolates. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2005; 1:91–7.
 18. Holden M.T.G., Titball R.W., Peacock S. et al. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 39:14240–245.
 19. Inglis T.J.J., Merritt A., Chidlow G. et al. Comparison of diagnostic laboratory methods for identification of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 5:2201–06.
 20. Janda J.M., Abbot S.L. Bacterial identification for publication: When is enough enough? *J. Clin. Microbiol.* 2002; 6:1887–91.
 21. Jones S.W., Dobson M.E., Francesconi S.C. et al. DNA assays for detection, identification, and individualization of select agent microorganisms. *Croat. Med. J.* 2005; 46:522–9.
 22. Kaesli M., Mayo M., Harrington G. et al. Sensitive and specific molecular detection of *Burkholderia pseudomallei*, the causative agent of melioidosis, in the soil of tropical northern Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 2:6891–7.
 23. Koh T.H., Ng L.S. Y., Ho J.L.F. et al. Automated identification systems and *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:1809.
 24. Koonpaew S., Ubol M.N., Sirisinha S. et al. Genome fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis of isolates of *Burkholderia pseudomallei* from patients with melioidosis in Thailand. *Acta Trop.* 2000; 74:87–191.
 25. Kunakorn M., Markham R.B. Clinically practical seminested PCR for *Burkholderia pseudomallei* quantitated by enzyme immunoassay with and without solution hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 1995;33:2131–5.
 26. Layne S.P., Beugelsdijk T.J. High-throughput laboratories for Homeland and National Security. Biosecurity and bioterrorism: biodefence, strategy, practice and science. 2003; 2:123–30.
 27. Lew A.E., Desmarchelier P.M. Detection of *Pseudomonas pseudomallei* by PCR and hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32:1326–32.
 28. Merritt A., Inglis T.J.J., Chidlow G. et al. PCR-based identification of *Burkholderia pseudomallei*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 2006; 5:239–244.
 29. Meumann E.M., Gal D., Novak R.T. et al. Clinical evaluation of a type III secretion system real-time PCR assay for diagnosing melioidosis. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:3028–30.
 30. Niernan W.C., DeShazer D., Kim H.S. et al. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 39:14246–251.
 31. Novak R.T., Glass M.B., Gee J.E. et al. Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting the type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:85–90.
 32. Palleroni N.J. Family of *Pseudomonadaceae*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore; 1984. P. 141–99.
 33. Rainbow L., Hart C.A., Winstanley G. Distribution of type III secretion gene clusters in *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis* and *B. mallei*. *J. Med. Microbiol.* 2002; 51:374–84.
 34. Rattanathongkom A., Sermwan R.W., Wongratanaheewin S. Detection of *Burkholderia pseudomallei* in blood samples using polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes.* 1997; 11:25–31.
 35. Sirishihha S., Anuntagool N., Dharakul T. et al. Recent developments in laboratory diagnosis of melioidosis. *Acta Tropica.* 2000; 74:235–45.
 36. Sonthayanon P., Krasao P., Wuthiekanun V. et al. A simple method to detect and differentiate *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis* using specific flagellin gene primers. *Mol. Cell. Probes.* 2002; 3:217–22.
 37. Supaprom C., Wang D., Leelayuwat C. et al. Development of Real-Time PCR assays and evaluation of their potential use for rapid detection of *Burkholderia pseudomallei* in clinical blood specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 9:2894–901.
 38. Suppiah G., Bagali P.G., Vadivelu G. Development of polymerase chain reaction assay to detect *Burkholderia genus* and to differentiate the species in clinical specimens. In: The 5-th world melioidosis congress. Thailand, Khon Kaen; 2007. P. 245.
 39. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 1997; 18:426–39.
 40. Thibault F.M., Valade E., Vidal D. R. Identification and discrimination of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, and *B. thailandensis* by real-time PCR targeting type III secretion system genes. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42:5871–4.
 41. Tomaso H., Scholz H.C., Al Dahouk S. et al. Development of 5- nuclease real-time PCR assays for the rapid identification of the *Burkholderia mallei*/*Burkholderia pseudomallei* complex. *Diagn. Mol. Pathol.* 2004; 13(4):247–53.
 42. Ulrich M.P., Norwood D.A., Christensen D.R. et al. Using real-time PCR to specifically detect *Burkholderia mallei*. *J. Med. Microbiol.* 2006; 55:551–9.
 43. Ulrich R., Ulrich M., Schell M. et al. Development of a polymerase chain reaction assay for the specific identification of *Burkholderia mallei* and differentiation from *Burkholderia pseudomallei* and other closely related *Burkholderiaceae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2006; 1:37 – 45.
 44. U'Ren J.M., Schupp J.M., Pearson T. et al. Tandem repeat regions within the *Burkholderia pseudomallei* genome and their application for high resolution genotyping. *BMC. Microbiol.* 2007; 7:23.
 45. Vadivelu J., Puthuchery S.D., Mifsud A. et al. Ribotyping and DNA macrorestriction analysis of isolates of *Burkholderia pseudomallei* from cases of melioidosis in Malaysia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1997; 91:358–60.
 46. Vandamme P., Pot B., Gillis M. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 1996; 60:407–38.
 47. Van Pelt C., Verduin C.M., Goessens W.H.F. et al. Identification of *Burkholderia spp.* in the clinical microbiology laboratory: comparison of conventional and molecular methods. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 7:2158–64.
 48. Wattiau P., Van Hesse M., Neubauer H. et al. Identification of *Burkholderia pseudomallei* and related bacteria by Multiple-Locus Sequence Typing-derived PCR and Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45:1045–8.
 49. Wilcox W.R., Lapage S.P., Holmes B. A review of numerical methods in bacterial identification. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1980; 46:233–99.
 50. Winstanley C., Hart C.A. Presence of type III secretion genes in *Burkholderia pseudomallei* correlates with Ara- phenotypes. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38:883–5.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Altukhova V.V., Antonov V.A., Tkachenko G.A. et al. [The use of polymerase chain reaction for detection of glanders and melioidosis using experimental infection]. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* 2007; 3:22–7.
2. Budchenko A.A., Ilyukhin V.I., Viktorov D.V. [Comparative analysis of total cell protein electrophoregrams of pathogenic burkholderia]. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* 2005; 2:24–8.
3. Kulakov M.Ya., Prokhvatilova E.V., Khrapova N.P. [Monoclonal erythrocytic diagnosticum for detection of causative agents of glanders and melioidosis]. In: [Ecological and Epidemiological Surveillance of Natural Foci Infections in the North Caspian Region]. Astrakhan; 1996. P. 146–7.
4. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnosis of Dangerous Infectious Diseases]. Practical guidance. M.: Izd. Meditsina, Izd. Shiko; 2009. P. 472.
5. Prokhvatilova E.V., Khrapova N.P. [On the producing of monoclonal luminescent immunoglobulins for detection of causative agent of melioidosis]. In: [Ecological and Epidemiological Surveillance of Natural Foci Infections in the North Caspian Region]. Astrakhan; 1996. P. 147–8.
6. Riapis L.A., Ilyukhin V.I., Vostrova E.I. et al. [Laboratory diagnosis of clinically important types of pseudomonads]. *Lab. Delo.* 1988; 12:66–71.
7. Tkachenko G.A., Antonov V.A., Zamaraev V.S., Ilyukhin V.I. [Detection and identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* by PCR]. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* 2003; 3:7–11.
8. Khrapova N.P., Tikhonov N.G., Rybkin V.S. et al. [Immunologic diagnosis of melioidosis]. In: [Melioidosis]. Volgograd; 1995. P. 57–68.

Authors:

Antonov V.A., Ilyukhin V.I., Khrapova N.P., Prokhvatilova E.V., Viktorov D.V., Senina T.V., Budchenko A.A., Tkachenko G.A., Alekseeva V.V., Zakharova I.B., Savchenko S.S., Zinchenko O.V., Sorokina Yu.I., Alekseev V.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. Golubinskaya St., 7, Volgograd, 400131, Russia. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Об авторах:

Антонов В.А., Илюхин В.И., Храпова Н.П., Прохвятилова Е.В., Викторов Д.В., Сенина Т.В., Будченко А.А., Ткаченко Г.А., Алексеева В.В., Захарова И.Б., Савченко С.С., Зинченко О.В., Сорочкина Ю.И., Алексеев В.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru