

Л.В.Лемасова, Г.А.Ткаченко, С.С.Савченко, О.С.Бондарева, В.А.Антонов

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ *BURKHOLDERIA MALLEI* И *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

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

Цель. Разработать мультиплексную тест-систему для выявления и дифференциации возбудителей сапа и мелиоидоза методом ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени, обладающую высокой чувствительностью и специфичностью. **Материалы и методы.** В работе использовано 104 штамма микроорганизмов, из них: 56 штаммов *B. pseudomallei*, 14 – *B. mallei* и 34 – гетерологичных видов микроорганизмов. Для определения аналитической чувствительности реакции амплификации исследовали серии 10-кратных разведений бактериальных взвесей *B. pseudomallei* и *B. mallei* в концентрации от $1 \cdot 10^9$ м.к./мл до $1 \cdot 10^2$ м.к./мл. **Результаты и выводы.** Сконструирована мультиплексная ПЦР тест-система, которая включает две пары праймеров и флуоресцентно-меченные зонды, обеспечивающие одновременное обнаружение и дифференциацию двух близкородственных видов патогенных буркхольдерий. В качестве ДНК-мишеней выбраны видоспецифичный для возбудителя сапа *B. mallei* фрагмент гена *fliP*, который кодирует белок биосинтеза флагеллина, а для *B. pseudomallei* видоспецифичный участок гена, кодирующий белок gp68. Проверка при исследовании штаммов патогенных буркхольдерий, близкородственных и гетерологичных микроорганизмов показала 100 % специфичность разработанной амплификационной тест-системы. Аналитическая чувствительность сконструированной мультиплексной ПЦР тест-системы для выявления возбудителя сапа составила $1 \cdot 10^3$ м.к./мл, а для возбудителя мелиоидоза – $1 \cdot 10^4$ м.к./мл.

Ключевые слова: сап, мелиоидоз, тест-система, ПЦР в режиме реального времени, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*.

Корреспондирующий автор: Людмила Викторовна Лемасова, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

L.V.Lemasova, G.A.Tkachenko, S.S.Savchenko, O.S.Bondareva, V.A.Antonov

Development of Real-Time Multiplex PCR Assay for the Detection and Differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

Objective of the study was to develop a real-time multiplex PCR assay for the detection and differentiation of *B. mallei* and *B. pseudomallei*, characterized by high sensitivity and specificity. **Materials and Methods.** The primers and probes were designed to detect the species-specific sequence of the *fliP* gene of *B. mallei* and gp68 gene of *B. pseudomallei*, respectively. Species specificity was tested with a panel of 56 *B. pseudomallei* strains, 14 *B. mallei* strains and 34 strains of closely or distantly related species. To define the analytical sensitivity of the assay, the serially diluted bacterial suspension at concentrations of 10^9 – 10^2 cells/ml was used. **Conclusions.** The multiplex PCR assay with two primer pairs and fluorescently-labeled probes, allowing for simultaneous detection and differentiation between *B. mallei* and *B. pseudomallei* was designed. Species-specific for glanders agent, *B. mallei*, fragment of *fliP* gene, which encodes protein of flagellin biosynthesis, and species-specific gene region of *B. pseudomallei*, encoding gp68 protein, were identified as DNA targets. Testing of *Burkholderia* and non-*Burkholderia* bacterial species revealed 100 % specificity of the amplification assay. The minimum detection limit of the designed multiplex PCR test-system was $1 \cdot 10^3$ cells/ml for *B. mallei*, and $1 \cdot 10^4$ cells/ml for *B. pseudomallei*.

Keywords: glanders, melioidosis, PCR assay, real-time PCR, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*.

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

Corresponding author: Lyudmila V. Lemasova, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Citation: Lemasova L.V., Tkachenko G.A., Savchenko S.S., Bondareva O.S., Antonov V.A. Development of Real-Time Multiplex PCR Assay for the Detection and Differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 4:56–59. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-56-59

Burkholderia mallei и *Burkholderia pseudomallei* имеют важное медицинское значение, так как являются возбудителями тяжелых заболеваний человека и животных – сапа и мелиоидоза. Возбудитель мелиоидоза распространен в субтропических регионах мира, таких как Юго-Восточная Азия и Северная Австралия. В последние годы случаи заболевания регистрируются в Южном Китае, Тайване, Гонконге, Южной Индии и Бразилии [1, 2, 3, 4, 5, 11, 12]. Для

сапа эндемичными регионами являются Африка, Азия, Ближний Восток, Центральная и Южная Америка [9]. Заболеваемость сапом среди людей носит в основном спорадический характер, но существуют группы риска – ветеринары, зоологи, в частности иппологи, а также работники клинических лабораторий.

Развитие туризма, высокая миграционная активность населения, завоз экзотических животных увели-

чивает риск поражения людей опасными биологическими агентами, в том числе *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Данные микроорганизмы относятся ко второй группе патогенности и являются потенциальными агентами биотерроризма, что диктует необходимость использования ускоренных методов идентификации и дифференциации возбудителей сапа и мелиоидоза.

Зарубежными авторами предложено несколько генов-мишеней для амплификации возбудителей сапа и мелиоидоза: 16S рРНК [10], 23S рРНК, спейсерные области 16-23S рРНК, гены системы III типа секреции (TTS1) [6, 10], флагеллярный ген [7] кластер генов LPS, кодирующий капсульный липополисахарид [8].

В Российской Федерации в настоящее время также существуют ПЦР тест-системы, направленные на выявление ДНК патогенных буркхольдерий: набор реагентов для выявления ДНК возбудителей сапа (*Burkholderia mallei*) и мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «Амплиген Burk» [1] и набор реагентов для выявления патогенных буркхольдерий (*B. mallei* и *B. pseudomallei*) методом полимеразной цепной реакции «23S-Eph» [1]. Вышеуказанные наборы отличаются способом детекции, но не позволяют дифференцировать патогенные буркхольдерии.

Многими авторами проводятся исследования по поиску видоспецифичных ДНК-мишеней, присутствующих у возбудителя сапа, но отсутствующих у *B. pseudomallei*. Трудность создания высокоспецифичной амплификационной тест-системы для дифференциации ДНК патогенных буркхольдерий обусловлена значительным генетическим сходством *B. mallei* и *B. pseudomallei*.

Цель настоящего исследования состояла в разработке мультиплексной тест-системы для выявления и дифференциации возбудителей сапа и мелиоидоза методом ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени, обладающей высокой чувствительностью и специфичностью.

Материалы и методы

В работе использовано 104 штамма микроорганизмов, из них 14 штаммов *B. mallei*, 56 – *B. pseudomallei*, 34 – гетерологичных микроорганизмов: 5 – *Burkholderia thailandensis*, 15 – *Burkholderia cepacia*, 4 – *Pseudomonas putida*, 1 – *Pseudomonas testosteroni*, 1 – *Pseudomonas fluorescens*, 1 – *Pseudomonas aeruginosa*, 1 – *Yersinia pestis* EV, 3 – *Francisella tularensis*, 1 – *Bacillus anthracis*, 1 – *Escherichia coli*, 1 – *Staphylococcus aureus*, которые предоставлены коллекционным центром ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт».

Работу с бактериями проводили в соответствии с положениями санитарных правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)», СП 1.3.2322-08

«Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» и методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Культуры *B. pseudomallei*, *B. mallei* и гетерологичных видов микроорганизмов высевали на агар Хоттингера с 5 % глицерином и инкубировали в течение 24–48 ч при температуре (37±1) °С. Готовили взвеси каждого штамма в концентрации, соответствующей 10 МЕ по отраслевому стандартному образцу мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича (ОСО 42-28-59-85П), эквивалентной 1·10⁹ м.к./мл, и разводили 0,9 % раствором натрия хлорида таким образом, чтобы концентрация возбудителей сапа и мелиоидоза составляли 1·10², 1·10³, 1·10⁴ м.к./мл. Суспензии гетерологичных микроорганизмов разводили до концентрации 1·10⁷ м.к./мл.

Количество живых клеток в приготовленных разведениях проверяли методом высева по 0,1 мл микробной взвеси каждого тест-штамма из пробы, содержащей 1·10⁴ и 1·10³ м.к./мл на чашки с агаром Хоттингера с 5 % глицерином. Через 24–48 ч инкубации в термостате при температуре (37±1) °С подсчитывали количество колоний, выросших на поверхности агара.

Тестируемые микробные взвеси, содержащие по 1·10⁴, 1·10³, 1·10² м.к./мл *B. pseudomallei* и *B. mallei* и по 1·10⁷ м.к./мл гетерологичных микроорганизмов, обеззараживали согласно требованиям СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». По 1 мл тестируемых взвесей переносили в микроцентрифужные пробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 мин, надосадочную жидкость отбирали, а осадок ресуспендировали в 100 мкл бидистиллированной воды. Затем к 100 мкл суспензии добавляли лизирующий раствор, приготовленный на основе 6 М гуанидинизотионата натрия, в объеме, указанном в инструкции к набору для выделения ДНК, и инкубировали 15 мин при 65 °С.

Выделение ДНК из чистых культур *B. mallei* и *B. pseudomallei* осуществляли с помощью набора «АмплиПрайм РИБО-преп» (ООО «НекстБио», Москва). Работу проводили в соответствии с инструкцией к указанному набору.

Амплификацию продолжительностью 45 циклов проводили на приборе «Rotor-Gene 6000» («Corbett Research», Австралия) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени в микроцентрифужных пробирках (0,2 мл) в объеме 25 мкл с использованием «горячего старта» путем добавления термостабильной TaqF-полимеразы, которая активируется после прогревания при высокой температуре.

Дизайн праймеров и зондов к ДНК-мишеням

осуществляли с использованием программного обеспечения Gene Runner 3.0 и Oligo 4.0. Праймеры и олигонуклеотидные зонды синтезированы фирмой ЗАО «Синтол» (Москва).

Результаты и обсуждение

Конструирование тест-системы включало поиск наиболее специфичных, консервативных последовательностей возбудителя сапа и возбудителя мелиоидоза, представленных в зарубежной и отечественной литературе, а также депонированных в базе NCBI. В результате работы были подобраны две пары специфичных праймеров. Одна пара праймеров, обозначенных *Bm-ISfl-f/Bm-ISfl-r*, комплементарных фрагменту гена *fliP* (*flagellar biosynthetic protein*), обеспечивает амплификацию фрагмента ДНК возбудителя сапа. Праймеры *Bps-gp68-f/Bps-gp68-r*, комплементарные участку гена, кодирующего белок *gp68* *B. pseudomallei* из региона *RimL* (ацетилтрансферазы, включающие N-ацетилазы рибосомальных белков), обеспечивают амплификацию фрагмента ДНК только возбудителя мелиоидоза.

Для обнаружения ампликона *B. mallei* сконструирован специфичный зонд *Bm-ISfl-Pr*; меченный флуорофором FAM, характерное свечение которого детектируется на канале Green, и гасителем флуоресценции BHQ1. Зонд *gp68-Pr*; специфичный для *B. pseudomallei*, мечен с 5'-конца флуорофором TAMRA, характерное свечение которого детектируется на канале Yellow, и с 3'-конца гасителем флуоресценции BHQ2. Концевые последовательности каждого из зондов являются комплементарными и образуют «шпильку» по принципу «молекулярного маяка».

Предварительную оценку специфичности праймеров и зондов проводили с помощью программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). На момент проведения компьютерного анализа гомологии ДНК сконструированных олигонуклеотидов и ДНК гетерологичных (по отношению к *B. mallei* и *B. pseudomallei*) микроорганизмов не выявлено.

При подборе оптимальных условий проведения ПЦР в мультиплексном формате определяли следующие параметры реакции: состав реакционной смеси – концентрацию праймеров, зондов, TaqF-полимеразы, ионов Mg^{2+} , программу амплификации – температуру отжига праймеров, продолжительность каждого шага амплификации, количество циклов, длительность предварительной денатурации. После оптимизации условий мультиплексной ПЦР, обеспечивалось стабильное нарастание уровня флуоресценции по каналам детекции (Green, Yellow), не приводящее к искажению сигнала по другим каналам.

В результате выполненных экспериментов подобран оптимальный состав реакционной смеси для постановки мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. В состав реакционной смеси входили ПЦР-буфер, 0,2 мМ каждого дНТФ и TaqF-полимераза (ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии», Москва), 2,5 мМ

$MgCl_2$ (Thermo Fisher Scientific), 5 пмоль каждого зонда и по 10 пмоль праймеров. После окончания реакции приступали к анализу результатов. Были установлены значения пороговой линии: для каналов специфической детекции Green – 0,05, Yellow – 0,03. На основании проведенных исследований определена максимальная величина порогового цикла (Ct), при котором результат реакции считается положительным: < 33 для канала Green, < 33 для канала Yellow. Учет результатов осуществляли по каждому каналу отдельно.

Проведена оценка специфичности сконструированной тест-системы на чистых препаратах ДНК *B. pseudomallei*, *B. mallei* и гетерологичных микроорганизмах. При проведении ПЦР с разработанной тест-системой отмечалось нарастание уровня флуоресценции по каналу FAM/Green с ДНК всех исследованных штаммов сапного микроба; флуоресценция по каналу JOE/Yellow регистрировалась у всех штаммов *B. pseudomallei*. С ДНК всех исследованных гетерологичных микроорганизмов получены отрицательные результаты мультиплексной ПЦР в концентрации $1 \cdot 10^7$ м.к./мл и ниже.

Для определения аналитической чувствительности реакции амплификации исследовали серию 10-кратных разведений культур *B. pseudomallei* 100 и *B. mallei* 10230 в концентрации от $1 \cdot 10^9$ м.к./мл до $1 \cdot 10^2$ м.к./мл. В результате работы выявлено, что чувствительность составила для возбудителя сапа $1 \cdot 10^3$ м.к./мл (рис. 1) и для возбудителя мелиоидоза $1 \cdot 10^4$ (рис. 2).

Таким образом, в ходе работы сконструирована мультиплексная ПЦР тест-система, которая включает две пары праймеров и флуоресцентно-меченные зонды, обеспечивающие одновременное обнаружение и дифференциацию возбудителей сапа и мелиоидоза. В качестве ДНК-мишеней выбраны видоспецифичный для возбудителя сапа *B. mallei* фрагмент гена *fliP*, который кодирует белок биосинтеза флагеллина, а для *B. pseudomallei* видоспецифичный участок гена, кодирующий белок *gp68*. Проверка на штам-

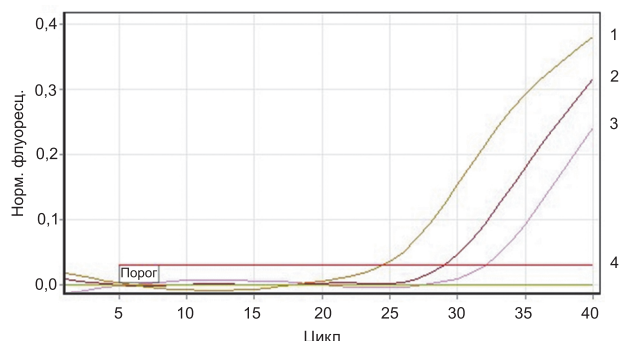


Рис. 1. Кривые накопления флуоресценции по каналу FAM/Green при определении чувствительности реакции мультиплексной ПЦР с ДНК возбудителя сапа:

1 – *B. mallei* 10230 в концентрации $1 \cdot 10^5$ м.к./мл; 2 – *B. mallei* 10230 в концентрации $1 \cdot 10^4$ м.к./мл; 3 – *B. mallei* 10230 в концентрации $1 \cdot 10^3$ м.к./мл; 4 – отрицательный контроль и кривые накопления флуоресценции проб *B. mallei* в концентрации меньше $1 \cdot 10^2$ м.к./мл, не пересекающие пороговую линию

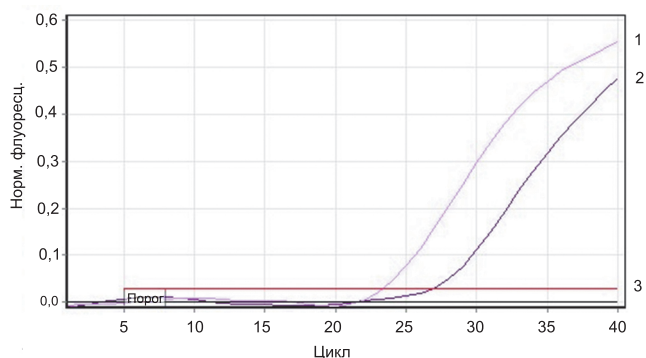


Рис. 2. Кривые накопления флуоресценции по каналу JOE/Yellow при определении чувствительности реакции мультиплексной ПЦР с ДНК возбудителя мелиоидоза:

1 – *B. pseudomallei* 100 в концентрации $1 \cdot 10^5$ м.к./мл; 2 – *B. pseudomallei* 100 в концентрации $1 \cdot 10^4$ м.к./мл; 3 – отрицательный контроль и кривые накопления флуоресценции проб *B. pseudomallei* в концентрации меньше $1 \cdot 10^3$ м.к./мл, не пересекающие пороговую линию

мах патогенных буркхольдерий, близкородственных и гетерологичных микроорганизмов показала 100 % специфичность разработанной тест-системы. При амплификации ДНК патогенных буркхольдерий определена аналитическая чувствительность сконструированной мультиплексной тест-системы, которая составила для возбудителя сапа – $1 \cdot 10^3$ м.к./мл, а для возбудителя мелиоидоза – $1 \cdot 10^4$ м.к./мл.

Разработанная мультиплексная тест-система в режиме реального времени позволяет обнаруживать *B. mallei* и *B. pseudomallei* и дифференцировать патогенные буркхольдерии с высокой чувствительностью и специфичностью. Данная тест-система может быть использована как в клинических лабораториях для установления этиологии заболевания, так и в работе специализированных противозoonемических формирований.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Прохвятилова Е.В., Антонов В.А., Викторов Д.В., Илюхин В.И., Храпова Н.П., Ткаченко Г.А., Захарова И.Б., Плеханова Н.Г., Новицкая И.В., Кулаков М.Я., Замарина Т.В., Корсакова И.И., Савченко С.С., Бондарева О.С., Батулин А.А., Лемасова Л.В., Тетерятникова Н.Н., Белицкая Л.И. 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. *Дальневосточный журн. инф. патологии.* 2014; 25(25):128–32.

2. 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.

3. Currie B.J., Dance D.A., Cheng A.C. The global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: an update. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102 Suppl 1:S1–4. DOI: 10.1016/S0035-9203(08)70002-6.

4. Chen Y.S., Lin H.H., Mu J.J., Chiang C.S., Chen C.H., Buu L.M., Lin Y.E., Chen Y.L. Distribution of melioidosis cases and viable *Burkholderia pseudomallei* in soil: evidence for emerging melioidosis in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1432–4. DOI:

10.1128/JCM.01720-09 48.

5. Jamkhandi D.M., Alex R., George K. Melioidosis: a report of two cases. *Natl. Med. J. India.* 2014; 27(4):202–3.

6. 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(5):374–84.

7. Sonthayanon P., Krasao P., Wuthiekanun V., Panyim S., Tungpradabkul S. A simple method to detect and differentiate *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis* using specific flagellin gene primers. *Mol. Cell. Probes.* 2002; 16(3):217–22.

8. Tomaso H., Pitt T.L., Landt O., Dahouk S.A., Scholz H.C., Reisinger E.C., Sprague L.D., Rathmann I., Neubauer H. Rapid presumptive identification of *Burkholderia pseudomallei* with real-time PCR assays using fluorescent hybridization probes. *Mol. Cell. Probes.* 2005; 19(1):9–20.

9. Whitlock G.C., Estes D.M., Torres A.G. Glanders: off to the races with *Burkholderia mallei*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007; 277(2):115–22.

10. Winstanley C., Hart C. A. Presence of type III secretion genes in *Burkholderia pseudomallei* correlates with Ara^r phenotypes. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(2):883–5.

11. Varma-Basil M., E-Hajj H, Marras S.A., Hazbón M.H., Mann J.M., Connell N.D., Kramer F.R., Alland D. Molecular beacons for multiplex detection of four bacterial bioterrorism agents. *Clin. Chem.* 2004; 50(6):1060–2.

12. Yang S. Melioidosis research in China. *Acta Trop.* 2000; 77(2):157–65.

References

1. Prokhvatilova E.V., Antonov V.A., Viktorov D.V., Ilyukhin V.I., Khrapova N.P., Tkachenko G.A., Zakharova I.B., Plekhanova N.G., Novitskaya I.V., Kulakov M.Ya., Zamarina T.V., Korsakova I.I., Savchenko S.S., Bondareva O.S., Baturin A.A., Lemasova L.V., Teteryatnikova N.N., Belitskaya L.I. [Assessment of efficiency of applying the reagent panel for the detection of melioidosis agent for the purposes of internal quality control of laboratory tests at the Reference Center for monitoring over glanders and melioidosis agents]. *Dal'nevostoch. Zh. Infek. Patol.* 2014; 25(25):128–32.

2. 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.

3. Currie B.J., Dance D.A., Cheng A.C. The global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: an update. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102 Suppl 1:S1–4. DOI: 10.1016/S0035-9203(08)70002-6.

4. Chen Y.S., Lin H.H., Mu J.J., Chiang C.S., Chen C.H., Buu L.M., Lin Y.E., Chen Y.L. Distribution of melioidosis cases and viable *Burkholderia pseudomallei* in soil: evidence for emerging melioidosis in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1432–4. DOI: 10.1128/JCM.01720-09 48.

5. Jamkhandi D.M., Alex R., George K. Melioidosis: a report of two cases. *Natl. Med. J. India.* 2014; 27(4):202–3.

6. 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(5):374–84.

7. Sonthayanon P., Krasao P., Wuthiekanun V., Panyim S., Tungpradabkul S. A simple method to detect and differentiate *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis* using specific flagellin gene primers. *Mol. Cell. Probes.* 2002; 16(3):217–22.

8. Tomaso H., Pitt T.L., Landt O., Dahouk S.A., Scholz H.C., Reisinger E.C., Sprague L.D., Rathmann I., Neubauer H. Rapid presumptive identification of *Burkholderia pseudomallei* with real-time PCR assays using fluorescent hybridization probes. *Mol. Cell. Probes.* 2005; 19(1):9–20.

9. Whitlock G.C., Estes D.M., Torres A.G. Glanders: off to the races with *Burkholderia mallei*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007; 277(2):115–22.

10. Winstanley C., Hart C. A. Presence of type III secretion genes in *Burkholderia pseudomallei* correlates with Ara^r phenotypes. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(2):883–5.

11. Varma-Basil M., E-Hajj H, Marras S.A., Hazbón M.H., Mann J.M., Connell N.D., Kramer F.R., Alland D. Molecular beacons for multiplex detection of four bacterial bioterrorism agents. *Clin. Chem.* 2004; 50(6):1060–2.

12. Yang S. Melioidosis research in China. *Acta Trop.* 2000; 77(2):157–65.

Authors:

Lemasova L.V., Tkachenko G.A., Savchenko S.S., Bondareva O.S., Antonov V.A. Volgograd Research Anti-Plague Institute, 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Об авторах:

Лемасова Л.В., Ткаченко Г.А., Савченко С.С., Бондарева О.С., Антонов В.А. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Поступила 28.07.16.