

пользования РЛА для обеспечения эффективной дифференциации *B. pseudomallei* от авирулентных родственных бактерий и выявления возбудителя на ранних стадиях заболевания за относительно короткие промежутки времени, что делает ее перспективным методом диагностики мелиоидоза, потенциально смертельной инфекции, требующей раннего начала соответствующей антибиотикотерапии.

Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 84—92

Ключевые слова: реакция латекс-агглютинации, *Burkholderia pseudomallei*, моноклональные антитела

*N.P.Khrapova, L.K.Merinoва, T.V.Zamarina, D.M.Frolov, T.V.Senina, I.I.Korsakova*

## APPLICATION OF MONOCLONAL ANTIBODY-BASED LATEX AGGLUTINATION TEST FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF THE AGENT OF MELIOIDOSIS IN CLINICAL AND ENVIRONMENTAL OBJECTS

Volgograd Research Institute for Plague Control, Russia

The review summarizes the basic information on the development and diagnostic capabilities of the latex agglutination test (LAT), used for detection and subsequent identification of melioidosis pathogen. According to the published literature, the use of melioidosis monoclonal antibodies of various epitope direction for coat the latex beads (suspension carrier), the main detection ingredient of this reaction, contributes to an increase in the diagnostic capabilities of this method: its sensitivity and specificity, which has been repeatedly confirmed by specialists working both in endemic zone distribution of *Burkholderia pseudomallei* and outside these territories. As most authors of the publications noted, after introduction of this reaction into practical work of profile laboratories, low-cost commercial products (test set of reagents for latex agglutination reaction) can find wide application both in stationary and mobile laboratories. The undoubted merits of the method are its simplicity, clarity, suitability for working with various samples from objects of the external environment and biological material, as well as obtained evidence of the suitability of LAT to ensure effective differentiation of *B. pseudomallei* from avirulent related bacteria and detection of the causative agent in the early stages of the disease for relatively short intervals, which makes it a promising method for diagnosing melioidosis, a potentially fatal infection requiring an early onset appropriate antibiotic therapy.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 1, P. 84—92

Key words: latex agglutination, *Burkholderia pseudomallei*, monoclonal antibody

Возбудитель мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) — микроорганизм II группы патогенности (опасности) для человека, внесенный в список «В» вероятных агентов биотерроризма [9, 17]. Согласно зарубежной градации этот микроорганизм классифицируют как «агент выбора первого уровня» (Tier 1 select agent) [15, 20]. В род *Burkholderia* входят также филогенетически близкие виды *Burkholderia mallei* и *Burkholderia thailandensis*, отличающиеся от возбудителя мелиоидоза по признакам патогенности и способности к существованию во внешней среде [1, 21].

Степень риска предполагаемой реализации применения *B. pseudomallei* в качестве биологического агента неизвестна, поэтому основное внимание специалистов, занимающихся вопросами индикации возбудителей особо опасных инфекционных болезней, сконцентрировано на вопросах эффективности, доступности и безопасности лабораторных методов экспресс-обнаружения и последующей достоверной идентификации возбудителя мелиоидоза.

Эндемичные территории распространения *B. pseudomallei* находятся,

преимущественно, в северо-восточном Таиланде и в районе северной территории Австралии [10, 12]. Не остаются без внимания сведения о тенденции глобального распространения *B. pseudomallei* и расширения географических зон обитания этого микроорганизма [11, 13]. Все чаще появляются сообщения о регистрируемом росте числа спорадических случаев заболевания мелиоидозом в различных странах за пределами Азиатско-Тихоокеанского региона, в том числе в Европе, Индии, Северной и Южной Америке, Западной Африке, что вызывает повышенную настороженность профильных специалистов, занимающихся вопросами эпиднадзора за мелиоидозной инфекцией [21].

В гиперэндемичных регионах Таиланда при септицемической форме мелиоидоза в течение первых 48 ч после госпитализации летальность может достигать 90% при отсутствии лечения [10]. В связи с этим, врачи уделяют повышенное внимание вопросам ранней диагностики заболевания, так как она способствует своевременному началу антибиотикотерапии и в ряде случаев может привести к существенному снижению летальности, по крайней мере наполовину [31]. В то же время, следует обратить внимание на мнение профессионалов, анализирующих состояние диагностики мелиоидоза в клинических лабораториях различного уровня, работающих за пределами эндемичных регионов, сотрудники которых не располагают всем набором современных средств (питательных сред, диагностических наборов), необходимых для работы с первичными образцами проб, предположительно контаминированных патогенными буркхольдериями. В подобных случаях неидентифицированные изоляты из лабораторий первичного уровня необходимо направлять в Референс-центры для окончательной идентификации полученной пробы [17]. T. Inglis et al. отметили также, что этиологический агент мелиоидоза, *B. pseudomallei*, может оказаться трудным объектом для надежной идентификации в обычных клинических лабораториях вследствие ограниченного опыта микробиологов в части практической работы с патогенными буркхольдериями и недостатка утвержденных диагностических реагентов. Все это препятствует быстрому обнаружению *B. pseudomallei* [18].

Современные схемы индикации и идентификации возбудителя мелиоидоза, перечни методов и средств, применяемых на этапах проведения диагностики, включающей клинические, эпидемиологические и диагностические (этиологические) критерии тестирования различных проб, постоянно пополняются вновь разрабатываемыми и апробируемыми не только высокотехнологичными методами, но и относительно простыми в исполнении методами, доступными для применения как в стационарных лабораториях любой степени оснащенности, так и в полевых условиях [2, 3, 7, 21, 26].

В последнее время заметно повысился интерес к внедрению в практику суспензионных латексных носителей для методов обнаружения возбудителей особо опасных инфекций, в том числе возбудителя мелиоидоза. Этому способствовал ряд причин: повышение качества синтетических носителей, в частности, латексных частиц целевого назначения, накопление сведений о преимуществах применения моноклональных антител (МКА) по сравнению с поликлональными антителами в качестве детектирующего агента в реакции латекс-агглютинации [6, 27], а также доказательства успешной лиофилизации суспензионных частиц, нагруженных МКА заданной специфичности, без потери иммунологической активности, что особенно важно для работы в условиях чрезвычайных ситуаций. Известно, что для постановки правильного диагноза необходимым условием является выделение чистой культуры, «золотого стандарта диагностики», которое при традиционном выполнении

культивирования изучаемых образцов материала требует не менее 3 — 4 суток. Стала очевидной необходимость разработки быстрого, эффективного, высокочувствительного и специфичного метода, отвечающего современным требованиям, воспроизводимого как в условиях стационарной, так и мобильной лаборатории, простого в постановке и учете результатов.

Как свидетельствуют данные многочисленных исследований, проводившихся большей частью специалистами, работавшими в зонах эндемичного распространения возбудителя мелиоидоза, этим критериям соответствовала реакция латекс-агглютинации (РЛА) с применением МКА к диагностически значимым антигенным мишеням, чаще всего к экзополисахариду 200 kDa, ЛПС или белку наружной мембраны 30 kDa *B. pseudomallei* [14, 16, 29]. Одной из первых публикаций, посвященных разработке теста латекс-агглютинации на основе МКА к экзополисахариду с м.м.  $\geq 150$  kDa для ускоренной идентификации *B. pseudomallei*, была статья I. Steinmetz et al. [29]. Авторы этой работы с помощью РЛА изучили 74 штамма *B. pseudomallei*, изолированные из внешней среды и клинического материала, отобранные в районах Юго-Восточной Азии, северной территории Австралии и Африки. Четкая специфическая агглютинация была зарегистрирована в реакциях с вирулентными  $Aga^+$  штаммами *B. pseudomallei*, но не с *Burkholderia* подобными авирулентными изолятами ( $Aga^+$ ), в частности не с *B. thailandensis* и другими видами бактерий. Впервые о возможности дифференциации таких штаммов в лабораторных условиях сообщили V. Wuthiekanum et al. [32, 34] и M.D. Smith et al. [28], которые установили, что авирулентные штаммы ( $Aga^+$ ), изолированные из внешней среды, способные ассимилировать L-арабинозу, отличаются от вирулентных клинических изолятов *B. pseudomallei* ( $Aga^-$ ) тем, что они не обладают таким свойством. Позже после получения МКА к экзополисахариду *B. pseudomallei* с м.м. 200 kDa и их использования для диагностических целей было установлено, что дифференциацию вирулентных ( $Aga^-$ ) и авирулентных ( $Aga^+$ ) штаммов *B. pseudomallei* можно осуществлять по признаку наличия или отсутствия этого антигена на поверхности бактериальной клетки соответственно [8, 25], что впоследствии было многократно подтверждено специалистами, работавшими в эндемичных районах распространения возбудителя мелиоидоза [29, 32]. Преимущества использования МКА для приготовления латексного диагностикума стали очевидны в сравнении с применением поликлональных антител, так как ранее РЛА, разработанная с применением поликлональной смеси иммуноглобулинов, не обеспечивала эффективную дифференциацию *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* [6, 27]. Важным итогом этих работ явились доказательства того, что РЛА на основе МКА — простой, быстрый и высокоспецифичный способ идентификации культур *B. pseudomallei*, изолированных из проб клинического материала и образцов почвы, собранных в различных географических регионах [25, 30].

Мишенями для идентификации *B. pseudomallei* в пробах клинического материала могут служить различные диагностически значимые антигены возбудителя мелиоидоза, в том числе, белок наружной мембраны с м.м. 30 kDa, локализованный на поверхности этих бактерий [16, 22]. Антиген 30 kDa, по данным авторов, накапливается в жидкой среде культивирования буркхольдерий. Установлено, что МКА к данному белку в реакции агглютинации (РА) взаимодействовали с *B. pseudomallei*, но не с *B. thailandensis* [22]. Использование этих МКА в реакции агглютинации с клиническими изолятами позволило авторам в 243 случаях получить положительные результаты [23]. РА с другими видами грамотрицательных бактерий оказались негативными, за

исключением положительной РА с одним штаммом возбудителя сапа *B. mallei*. Отмечено также, что МКА этого типа обладали кросс-реактивностью в отношении грамположительных *Bacillus spp.* и *Streptococcus pyogenes*. При использовании вышеназванных МКА в качестве основы при разработке РЛА чувствительность реакции достигла 100%, а специфичность колебалась в диапазоне от 85,96 до 96,49% в зависимости от режима предварительного подращивания тестируемой пробы. Получены доказательства того, что сочетанное применение культурального метода в режиме подращивания исследуемого материала с последующей постановкой РЛА можно применять для ускоренной диагностики мелиоидоза в обычной бактериологической лаборатории. Этот метод позволяет сокращать время обнаружения искомым бактерий в пробе крови, по крайней мере, на 2 дня по сравнению с традиционным культуральным методом.

Диагностическая ценность РЛА была подтверждена также двумя независимыми группами исследователей из Таиланда. Первая группа [14] для быстрой идентификации *B. pseudomallei* разработала тест-набор для РЛА на основе МКА Vps-L1 к липополисахаридному (ЛПС) антигену возбудителя мелиоидоза. Этот набор реагентов был использован при проверке 88 образцов проб крови пациентов, предположительно больных мелиоидозом. В 96,8% случаев в исследованных образцах был выявлен ЛПС возбудителя мелиоидоза и подтверждена специфичность использованных диагностических реагентов. Оценивая полученные результаты, авторы работы пришли к заключению о том, что выявление ЛПС *B. pseudomallei* в РЛА с применением суспензионного носителя, нагруженного МКА, гомологичными данному антигену, целесообразно применять для быстрой идентификации бактерий в образцах культивируемых проб крови больных с септикопиемической формой заболевания. Работа участников второй группы [24] также была связана с обследованием больных септицемическим мелиоидозом. После разработки теста латекс-агглютинации (Mab-LA) на основе смеси из трех вариантов МКА различной эпитопной направленности его применили для тестирования 396 гемокультур с положительным бактериальным ростом, из числа которых 75 культур, согласно данным общепринятых биохимических тестов, являлись представителями вида *B. pseudomallei*. Чувствительность и специфичность теста Mab-LA составила 95% и 100% соответственно. Метод был признан надежным и удобным для ускоренной диагностики острой формы мелиоидоза, позволяющим сократить время, которое обычно используют для воспроизведения традиционной схемы лабораторного анализа (3 — 4 дня), до 30 ч. При этом отмечено, что большая часть этих 30 ч уходит на подращивание достаточного количества бактерий для постановки реакции Mab-LA, которая сама по себе требует не более 5 минут.

Одно из наиболее масштабных исследований проб клинического материала больных с приобретенной септиемией было проведено в Таиланде [5]. Для быстрой идентификации *B. pseudomallei* авторы публикации использовали тест латекс-агглютинации, разработанный на основе одного из вариантов МКА, взаимодействующих с антигеном 200 kDa возбудителя мелиоидоза. Исследованию подлежали 1369 изолятов, выделенных после культивирования образцов крови больных септиемией, поступивших из 12 госпиталей, находившихся на территории северо-восточного региона Таиланда. В результате культивирования исследуемого материала процент идентифицированных штаммов *B. pseudomallei* из общего числа 1369 изолятов составил 15% (204 изолята). При проверке этих штаммов в реакции латекс-агглютинации были

получены 194 положительных результата. Чувствительность реакции достигла 95%, что сравнимо с чувствительностью методик выделения чистых культур, а также совпала с результатами биохимических тестов. Авторы подтвердили высокую степень воспроизводимости данного метода, не требующего дорогого и сложного оборудования, его экономичность и простоту в исполнении.

Позже сопоставимое по объему исследование, направленное на выявление и идентификацию *V. pseudomallei* в пробах крови септицемических больных, было предпринято Ekro P. et al., которые использовали РЛА на основе МКА к белку 30 kDa для обнаружения *V. pseudomallei* в культивируемых образцах крови 1139 пациентов с приобретенной септициемией [16]. Согласно более ранним исследованиям, примененный диагностикум выявлял только вирулентные, не утилизирующие арабинозу (Ara<sup>-</sup>) клинические изоляты, и не взаимодействовал с другими грамотрицательными бактериями, включая *V. thailandensis*. Чувствительность и специфичность реакции были равны 96,75% и 99,61% соответственно. При проведении исследования авторы использовали ранее разработанную методику подращивания образцов крови больных, доставленных из 11 госпиталей регионального и провинциального уровня, расположенных на северо-востоке Таиланда [24]. Из 1139 протестированных образцов 123 были идентифицированы как *V. pseudomallei*, из которых в РЛА 119 образцов продемонстрировали положительные результаты. Четыре образца выдали ложноположительные ответы, похожие на результаты, зарегистрированные ранее, обусловленные перекрестной активностью МКА 30 kDa в отношении стрептококка группы А и *Bacillus* spp. При использовании РЛА для идентификации *V. pseudomallei* напрямую без подращивания в 309 образцах среды культивирования крови, полученных из двух региональных больниц, были зарегистрированы положительные результаты, при этом показатели чувствительности и специфичности соответствовали 95,24 и 99,65%. Один образец с ложноположительным результатом в РЛА сравнили с результатами биохимических тестов и установили, что перекрестная активность была обусловлена присутствием в пробе стрептококка группы А. Ранее авторы данной работы установили повышение специфичности РЛА при исследовании проб, прошедших два этапа подращивания: первый — в среде для культивирования проб крови больного, второй — дополнительный этап подращивания в сердечно-мозговом бульоне (ВНВ), по сравнению с тестированием первичного высева на этапе культивирования (96,49% против 85,96%). При сравнении данных, полученных в исследовании, о котором идет речь, с ранее опубликованными результатами группы N. Anuntagool et al. [5], применявшими для изготовления латексного диагностикума МКА к 200 kDa антигену, установлено, что как в первом, так и во втором исследовании результаты РЛА были сопоставимыми. В целом, РЛА с применением МКА к белку наружной мембраны 30 kDa *V. pseudomallei* хорошо себя проявила в условиях диагностических лабораторий в сельской местности, обеспеченных минимумом оборудования и относительно мало подготовленным персоналом. Авторам удалось получить доказательства пригодности РЛА для обеспечения эффективной дифференциации *V. pseudomallei* от авирулентных родственных бактерий и выявления возбудителя на ранних стадиях заболевания за относительно короткие промежутки времени, что делает ее перспективным методом диагностики мелиоидоза [16].

Простой, надежный и оригинальный способ дифференциации *V. pseudomallei* и *V. thailandensis* был предложен V. Wuthiekanun et al. [32]. Его особен-

ность состояла в одновременном применении двух тест-систем для латекс-агглютинации, приготовленных на основе МКА. Анти-ЛПС система взаимодействовала как с *B. pseudomallei*, так и с *B. thailandensis*, в то время как МКА к экзополисахариду агглютинировали только возбудитель мелиоидоза. В сравнении с классическими биохимическими тестами этот метод обладает высокой степенью воспроизводимости результатов и точностью. Он особенно полезен для идентификации буркхольдерий в образцах внешней среды, которые могут содержать как тот, так и другой микроорганизмы, например, образцы почвы из района эндемичного распространения *B. pseudomallei*, в которой возможно присутствие *B. thailandensis*.

Несмотря на то, что многие исследователи сообщали об эффективности применения РЛА для идентификации *B. pseudomallei* и отмечали ее высокую чувствительность и специфичность, этот метод пока не вышел за пределы регионов эндемичного распространения *B. pseudomallei*. Коммерческий диагностический набор реагентов для РЛА был разработан и апробирован, по видимому, только в Австралии [18].

Большой интерес представляют исследования, посвященные сравнительному анализу методов, применяемых для точной идентификации *B. pseudomallei* [4], в частности системы API 20NE и реакции латекс-агглютинации с применением МКА к экзополисахариду 200 kDa. При апробации API 20NE системы для идентификации *Burkholderia* spp. корректная идентификация *B. pseudomallei* была получена в 99% случаев при тестировании 800 изолятов этого микроорганизма, а при тестировании 19 изолятов *B. serasia* правильный ответ был получен в 17 случаях (89%). При этом стало очевидно, что данная система не позволяет дифференцировать *B. pseudomallei* и *B. mallei*, а также не пригодна для идентификации изолятов *B. thailandensis*. В то же время, реакция латекс-агглютинации была положительной в 796 из 800 (99,5%) случаев при работе с *B. pseudomallei* и отрицательной при проверке других 120 оксидазо-положительных грамотрицательных бактерий. Обобщая результаты работы, авторы данной публикации подчеркнули несколько важных моментов, сопряженных с характером выполненных исследований. Важно иметь в виду, что прямое сравнение РЛА с системой API 20NE невозможно, так как она не обеспечивает альтернативную бактериальную идентификацию негативных изолятов; РЛА — высокочувствительная и специфичная реакция для идентификации *B. pseudomallei*, но она не способна дифференцировать *B. pseudomallei* и *B. mallei*. После внедрения этой реакции в практическую работу профильных лабораторий низкочатратная коммерческая продукция (тестовый набор реагентов для реакции латекс-агглютинации) может найти широкое применение как в стационарных, так и мобильных лабораториях.

Альтернативой автоматизированным методам обнаружения буркхольдерий является прямое тестирование пробы с целью выявления в ней антигена с помощью иммунофлуоресцентного метода или реакции агглютинации [19, 33]. Быстрое иммунофлуоресцентное обнаружение *B. pseudomallei* и *B. mallei* применяют при исследовании клинических образцов до того, как будет выделена чистая культура. Как было установлено, прямой метод флуоресцирующих антител (МФА) высокоспецифичен при поиске *B. pseudomallei* в образцах клинического материала (>99%). Однако, по данным V.Wuthiekanun et al. [33], чувствительность этого метода в конкретных условиях оказалась ниже (66%). При этом РЛА на основе поли- и моноклональных антител против *B. pseudomallei* проявила 100% чувствительность и 90% специфичность при тестировании образцов культуральной среды, в которую была засеяна проба крови больного [19]. В связи с этим, следует согласиться с суждением о том, что

быстрый и высокочувствительный тест необходим для клинических лабораторий и оперативного применения в полевых условиях [15, 26]. Относительно недавно В. Duval et al. разработали тест латекс-агглютинации, с помощью которого возможна идентификация как *B. pseudomallei*, так и *B. mallei* изолятов [15]. В этом тесте авторы использовали МКА, которые специфичны в отношении капсульного полисахарида, продуцируемого *B. pseudomallei* и *B. mallei*, но отсутствующего у близкородственных видов буркгольдерий. Всего были протестированы 110 штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* и 36 штаммов близкородственных бактерий. При постановке реакции с *B. pseudomallei* и *B. mallei* (110) были получены 109 положительных результатов, чувствительность реакции составила 99,1%. По мнению авторов, именно быстрые диагностические тесты для идентификации патогенных буркгольдерий явятся существенным подспорьем для специалистов в условиях состоявшегося биотеррористического события. В целом, разработанная реакция окажется наиболее востребованной в клинических лабораториях [15].

Что касается лабораторий первичного уровня, то до тех пор, пока современные диагностические системы не станут для них доступными, основной объем работы с пробами материала, подозрительного на принадлежность к *B. pseudomallei*, будет состоять из определения минимального набора фенотипических признаков этого микроорганизма и выполнения биохимических тестов, применяемых при постановке ориентировочного диагноза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Илюхин В.И., Сенина Т.В., Плеханова Н.Г., Антонов В.А., Меринова Л.К., Сеимова И.К. *Burkholderia thailandensis*: биологические свойства, идентификация и таксономическая позиция. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2002, 1: 7-11.
2. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Г.Г.Онищенко, В.В.Кутырев (ред.). М., ЗАО «Шико», 2013.
3. Специфическая индикация патогенных биологических агентов: Практическое руководство. Г.Г.Онищенко, В.В.Кутырев (ред.). Саратов, ООО «Буква», 2014.
4. Amornchai P., Chierakul W., Wuthiekanun V. et al. Accuracy of *Burkholderia pseudomallei* identification using the API 20NE system and a latex agglutination test. J. Clin. Microbiol. 2007, 45 (11): 3774-3776.
5. Anuntagool N., Naigowit P., Petkanchanapong V. et al. Monoclonal antibody-based rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in blood culture fluid from patients with community-acquired septicemia. J. Med. Microbiol. 2000, 49 (12): 1075-1078.
6. Anuntagool N., Intachote P., Wuthiekanun V. et al. Lipopolysaccharide from nonvirulent Ara<sup>+</sup> *Burkholderia pseudomallei* isolates in immunologically indistinguishable from lipopolysaccharide from virulent Ara<sup>-</sup> clinical isolates. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1998, 5 (2): 225-229.
7. Anuntagool N., Intachote P., Naigowit P. et al. Rapid antigen detection assay for identification of *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei* infection. J. Clin. Microbiol. 1996, 34 (4): 975-976.
8. Anuntagool N., Panichakul T., Aramsri P. et al. Shedding of lipopolysaccharide and 200-kDa surface antigen during the in vivo growth of virulent Ara<sup>-</sup> and avirulent Ara<sup>+</sup> *Burkholderia pseudomallei*. Acta. Trop. 2000, 74 (2-3): 221-228.
9. Bossi P., Guihot A., Bricare F. Emerging or re-emerging infections that can be used for bioterrorism. Presse Med. 2005, 34 (2 Pt 2): 149-155.
10. Chaowagul W., White N.J., Dance D.A. et al. Melioidosis: a major cause of community acquired septicemia in northeastern Thailand. J. Infect. Dis. 1989, 159 (5): 890-899.
11. 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 (1): 1-4.
12. Currie B.J., Fisher D.A., Howard D.M. et al. Endemic melioidosis in tropical northern Australia: a 10-year prospective study and review of the literature. Clin. Infect. Dis. 2000, 31 (4): 981-986.
13. Dance D.A. Melioidosis as an emerging global problem. Acta. Trop. 2000, 74 (2-3): 115-119.

14. Dharakul T., Songsivilai S., Smithikarn S. et al. Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in blood cultures by latex agglutination using lipopolysaccharide-specific monoclonal antibody. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999, 61 (4): 658-662.
15. Duval B.D., Elrod M.G., Gee J.E. et al. Evaluation of a latex agglutination assay for the identification of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014, 90 (6): 1043-1046.
16. Ekpo P., Rungpanich U., Pongsunk S. et al. Use of protein-specific monoclonal antibody-based latex agglutination for rapid diagnosis of *Burkholderia pseudomallei* infection in patients with community-acquired septicemia. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007, 14 (6): 811-812.
17. 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): 144-152.
18. Inglis T.J., Merritt A., Chidlow G. et al. Comparison of diagnostic laboratory methods for identification of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43 (5): 2201-2206.
19. Jedudason M.V., Balaji V., Sirisinha S. et al. Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in blood culture supernatants by a coagglutination assay. *Clin. Microbiol. Infect.* 2005, 11: 925-936.
20. Khan A.S., Levitt A.M., Sage M.J. Biological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response. *MMWR Recomm. Rep.* 2000, 49 (RR-4): 1-14.
21. Lau S.K., Sridhar S., Ho C.C. et al. Laboratory diagnosis of melioidosis: past, present and future. *Exp. Biol. Med.* 2015, 240: 742-751.
22. Pongsunk S., Ekpo P., Dharakul T. Production of specific monoclonal antibodies to *Burkholderia pseudomallei* and their diagnostic application. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 1996, 14 (1): 43-47.
23. Pongsunk S., Thirawattanasuk N., Piyasangthong N. et al. Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in blood cultures by a monoclonal antibody assay. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37 (11): 3662-3667.
24. Samosornsuk N., Lulitanond A., Saenla N. et al. Shot report: evaluation of a monoclonal antibody-based latex agglutination test for rapid diagnosis of septicemic melioidosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999, 61 (5): 735-737.
25. Sirisinha S., Anuntagool N., Intachote P. J. et al. Antigenic differences between clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiol. Immunol.* 1998, 42 (11): 731-737.
26. Sirisinha S., Anuntagool N., Dharakul T. et al. Recent developments in laboratory diagnosis of melioidosis. *Acta Trop.* 2000, 74 (2-3): 235-245.
27. Smith M.D., Wuthiekanun V., Walsh A.L. et al. Latex agglutination test for identification of *Pseudomonas pseudomallei*. *J. Clin. Pathol.* 1993, 46: 374-375.
28. Smith M.D., Angus B.J., Wuthiekanun V. et al. Arabinose assimilation defines a nonvirulent biotype of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect. Immun.* 1997, 65 (10): 4319-4321.
29. Steinmetz I., Reganzerowski A., Brenneke B. et al. Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* by latex agglutination based on an exopolysaccharide-specific monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37 (1): 225-228.
30. Thephai C., Dharakul T., Smithikarn S. et al. Differentiation between non-virulent and virulent *Burkholderia pseudomallei* with monoclonal antibodies to the Ara<sup>+</sup> and Ara<sup>-</sup> biotypes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001, 65 (1): 10-12.
31. White N.J., Dance D.A., Chaowagul W. et al. Halving of mortality of severe melioidosis by ceftazidime. *Lancet.* 1989, 2 (8665): 697-701.
32. Wuthiekanun V., Anuntagool N., White N. et al. Shot report: a rapid method for the differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002, 66 (6): 759-761.
33. Wuthiekanun V., Desakorn V., Wongsuvan G. et al. Rapid immunofluorescence microscopy for diagnosis of melioidosis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 2005, 12: 555-556.
34. Wuthiekanun V., Smith M.D., Dance D.A. et al. Biochemical characteristics of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas pseudomallei*. *J. Med. Microbiol.* 1996, 45: 408-412.

*Поступила 24.07.17*

Контактная информация: Корсакова Ирина Игоревна, к.м.н.,  
400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7, р.т. (8442)37-36-74



## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ТОКСИНОВ**

Ростовский-на Дону научно-исследовательский противочумный институт

Токсины — высокомолекулярные соединения, образуемые микроорганизмами, животными, растениями и обладающие антигенными свойствами. В последнее время в связи с возникшей угрозой террористических действий идентификация ряда бактериальных токсинов становится особенно актуальной. Новый подход в идентификации токсинов связан с развитием масс-спектрометрии и позволяет успешно проводить анализ большинства природных токсинов. Метод MALDI-MS позволяет проводить детекцию таких токсинов, как Shiga-toxin *Escherichia coli*, delta-toxin *Staphylococcus aureus*, цитотоксин *Bacillus cereus*, ботулинический нейротоксин, холерный токсин. Аналитические и диагностические характеристики метода, простота и скорость исследования свидетельствуют о перспективе внедрения метода в практику лабораторной диагностики при определении токсинопродукции исследуемых микроорганизмов.

Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 93—101

Ключевые слова: MALDI-MS спектрометрический анализ, времяпролетная масс-спектрометрия, бактериальные токсины, матрица, калибратор, Mascot, идентификация

*M.V.Poleeva, O.S.Chemisova*

## **THE USE OF MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS FOR THE DETECTION OF BACTERIAL TOXINS**

Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control, Russia

Toxins — molecular weight compounds produced by microorganisms, animals, plants and possessing antigene properties. Recently due to the perceived threat of terrorist actions identification of a number of bacterial toxins is especially important. A new approach in the identification of toxins associated with the development of mass spectrometry and can be successfully used for analysis of most environmental toxins. The method of MALDI-MS allows the detection of toxins such as Shiga-toxin *Escherichia coli*, delta-toxin of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* particular, botulinum neurotoxin, cholera toxin. Analytical and diagnostic characteristics of the method, the simplicity and speed studies indicate the long term implementation of a method in the practice of laboratory diagnostics in determining toxinproducing of the studied microorganisms.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 1, P. 93—101

Key words: MALDI-MS spectrometric analysis, time-of-flight mass spectrometry, bacterial toxins, matrix, calibrant, Mascot, identification

Токсины — высокомолекулярные соединения, образуемые микроорганизмами, животными, растениями, обладающие антигенными свойствами и сильным токсическим действием на человеческий организм. Наиболее токсичными являются бактериальные токсины. К сильным токсинам, продуцируемым микроорганизмами, относятся ботулинический, столбнячный, холерный токсины [14]. Они определяют основные симптомы инфекционных болезней человека и животных, а также рассматриваются в качестве биологического оружия [6, 39].