

# ВОЗМОЖНОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САПА И МЕЛИОИДОЗА ПРИ СОЧЕТАНИИ МЕТОДОВ ИММУНОБЛОТТИНГА И АМПЛИФИКАЦИИ ДНК

С.С. Ветчинин, И.Ю. Щит, А.Г. Шевяков, С.Ф. Бикетов

ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия

**Резюме.** В системах классификации опасных бактериальных патогенов возбудители мелиоидоза и сапа входят в число наиболее опасных для человека. Кроме того, *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei* являются потенциальными агентами биотерроризма. В связи с этим своевременная диагностика этих микроорганизмов является актуальной. В настоящей работе предпринята попытка разработать способ выявления патогенных буркхольдерий, основанный на сочетании видоспецифичной амплификации ДНК и штаммоспецифичного дот-блот анализа на основе моноклональных антител (МКАт). В работе использовали следующие штаммы патогенных буркхольдерий: *B. mallei* (С-4, С-5, t-12, В-120, Р-1, Муksuwar-11, Z-12, Zagreb, Ivanovich, 5534), *B. pseudomallei* (100, 102, 115, 116, 132, 135, 301, 51274, 60913, 61503). Детекцию патогенов проводили методами ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и дот-блота на основе моноклональных антител к поверхностным структурам буркхольдерий. Для ПЦР-РВ были сконструированы оригинальные праймеры к фрагменту ДНК IS407A-flhP *B. mallei* и к гену Orf12 *B. pseudomallei*. Для реакции ПЦР-РВ ДНК выделяли из суспензии бактериальных клеток в концентрации  $1 \times 10^4$  микробных клеток/мл. Накопление конечного продукта реакции регистрировали с использованием красителя SYBR Green I. Для определения специфичности реакции амплификации регистрировали температуры плавления ( $T_m$ ) полученных продуктов и проводили их электрофоретический анализ. Показано, что при использовании праймеров к фрагменту ДНК IS407A-flhP выявляются все 10 исследованных штаммов *B. mallei*, а праймеров к гену Orf12 — все 10 штаммов *B. pseudomallei*. Сигналов с ДНК гетерологичных микроорганизмов (выделенной из бактериальных суспензий с концентрацией  $1 \times 10^7$  м.к./мл), в ПЦР-РВ получено не было. Таким образом, ПЦР-РВ дает возможность проводить межвидовую дифференциацию патогенных буркхольдерий. В дот-блот анализе МКАт 3D3 связываются с клетками штаммов обоих возбудителей, то есть демонстрируют родоспецифичность. Моноклональные антитела 2D11, в отличие от МКАт 3D3, избирательно не связываются с клетками штаммов Р1 *B. mallei* и 100 *B. pseudomallei*, то есть обладают штаммоспецифическим профилем взаимодействия. Сделан вывод о том, что сочетание видоспецифичной амплификации ДНК (ПЦР-РВ) и иммунного анализа (дот-блот), с использованием набора моноклональных антител различного профиля взаимодействия со штаммами, перспективно для внутривидовой дифференциации патогенных буркхольдерий.

**Ключевые слова:** сап, мелиоидоз, моноклональные антитела, ПЦР-РВ, дот-блот.

## Адрес для переписки:

Шевяков Антон Георгиевич  
142279, Россия, Московская область, Серпуховский р-н,  
п. Оболенск, ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии.  
Тел.: 8 (4967) 36-07-73 (служебн.).  
E-mail: shevyakov@obolensk.org

## Contacts:

Anton G. Shevyakov  
142279, Russian Federation, Moscow Region, Serpukhov District,  
Obolensk, State Research Center for Applied Microbiology and  
Biotechnology.  
Phone: +7 (4967) 36-07-73 (office).  
E-mail: shevyakov@obolensk.org

## Библиографическое описание:

Ветчинин С.С., Щит И.Ю., Шевяков А.Г., Бикетов С.Ф. Возможность выявления штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза при сочетании методов иммуноблоттинга и амплификации ДНК // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 404–408. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-404-408

## Citation:

Vetchinin S.S., Shchit I.Yu., Shevyakov A.G., Biketov S.F. The possibility of identifying individual strains of glanders and melioidosis pathogens with a combination of immunoblotting and DNA amplification methods // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 404–408. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-404-408

## THE POSSIBILITY OF IDENTIFYING INDIVIDUAL STRAINS OF GLANDERS AND MELIOIDOSIS PATHOGENS WITH A COMBINATION OF IMMUNOBLOTTING AND DNA AMPLIFICATION METHODS

Vetchinin S.S., Shchit I.Yu., Shevyakov A.G., Biketov S.F.

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

**Abstract.** Causative agents of melioidosis and glanders are among the most dangerous bacterial pathogens for human. Moreover, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* are considered to be potential bioterrorism agents. In connection with this, timely diagnostics of such bacteria is of high importance. In our study, we made an attempt to develop an approach for detecting pathogenic *Burkholderia* spp. by combining species-specific amplification and strain-specific dot blotting assay with monoclonal antibodies. The following pathogenic *Burkholderia* strains were used in experiments: *B. mallei* (C-4, C-5, t-12, B-120, P-1, Muksuwar-11, Z-12, Zagreb, Ivanovich, 5534), and *B. pseudomallei* (100, 102, 115, 116, 132, 135, 301, 51274, 60913, 61503). Real-Time PCR (RT-PCR) and dot blotting with monoclonal antibodies against surface *Burkholderia* epitopes were used to detect such pathogens. RT-PCR was carried out by using primers designed to recognize DNA fragments in *B. mallei* IS407A-flp and the gene Orf12 from *B. pseudomallei*. For this, DNA was isolated from bacterial cells suspended at  $1 \times 10^4$  microbial cells/ml. accumulation of the end reaction products was visualized by staining with dye SYBR Green I. Specificity of amplification reaction was determined by measuring melting temperature ( $T_m$ ) for end products followed by running gel electrophoresis. It was demonstrated that all ten strains of either *B. mallei* or *B. pseudomallei* examined in the study were detected by using primers against IS407A-flp DNA fragment and the gene Orf12, respectively. It was demonstrated that all ten strains of either *B. mallei* or *B. pseudomallei* examined in the study were detected by using primers against IS407A-flp DNA fragment and the gene Orf12, respectively. Importantly, no signals specific to heterologous microbial DNA (isolated from bacterial cell suspension at concentration of  $1 \times 10^7$  microbial cells/ml) were detected by using RT-PCR. Thus, RT-PCR provides an opportunity for assessing an inter-species diversity among pathogenic *Burkholderia* species. A genus-specificity was observed by using monoclonal antibodies 3D3 which bind to both *Burkholderia* strains, whereas antibodies 2D11 exhibited no selective binding to strain P1 *B. mallei* and strain 100 *B. pseudomallei*, thereby displaying a strain-specific interaction. Thus, it allowed to conclude that combining a species-specific DNA amplification particularly RT-PCR together with immune-based assay such as dot blotting by using a panel of monoclonal antibodies seems to be a promising approach for assessing intra-species diversity among pathogenic *Burkholderia*.

**Key words:** glanders, melioidosis, monoclonal antibody, RT-PCR, dot-blot.

### Введение

Сап и мелиоидоз относятся к особо опасным заболеваниям, вызываемым патогенными буркхольдериями *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei*. Основными источниками заражения являются больные животные, контаминированные пищевые продукты, почва и вода. Невозможность вакцинопрофилактики, высокие контагиозность и смертность (при отсутствии лечения) позволяют отнести возбудителей сапа и мелиоидоза к потенциальным агентам биотерроризма [7, 9, 13].

Для выявления и идентификации возбудителей применяют классические бактериологические и биохимические методы, а также современные иммунохимические тесты, использующие моноклональные антитела (МКАт) и молекулярную диагностику на основе анализа специфических нуклеотидных последовательностей ДНК [1, 8, 12]. Опубликованы результаты применения амплификации ДНК для детекции и дифференциации *B. mallei* и *B. pseudomallei* посредством ПЦР, включая мультиплексный вариант [3, 11] и ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [14, 15]. На основе высокопроизводительного секвенирования активно разрабатываются подходы для внутривидовой дифференциации патогенных буркхольдерий.

Цель данной работы — установление возможности выявления и внутривидовой дифферен-

циации штаммов патогенных буркхольдерий при совместном использовании ПЦР-РВ и дот-блот анализа на основе (МКАт).

### Материалы и методы

В работе использованы по 10 штаммов *B. mallei* (C-4, C-5, t-12, B-120, P-1, Muksuwar-11, Z-12, Zagreb, Ivanovich, 5534) и *B. pseudomallei* (100, 102, 115, 116, 132, 135, 301, 51274, 60913, 61503) из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. В качестве контрольных гетерологичных микроорганизмов использовали следующие штаммы: *F. tularensis* 15/10, *B. abortus* 19, *Y. pestis* И-3449, *Y. pseudotuberculosis* C79, *Y. enterocolitica* C-126, *B. anthracis* СТИ-1, *V. cholerae* Eltor M878, *E. coli* JM83, *L. pneumophila* 33152, *P. aeruginosa* ATCC ВАА-427 (все из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk»).

Все работы с микроорганизмами I–II групп и ДНК микроорганизмов I–IV групп выполняли в соответствии с соответствующими нормативными документами [2, 4].

Для ПЦР ДНК выделяли из бактериальных суспензий *B. mallei* и *B. pseudomallei* с концентрацией  $1 \times 10^4$  м.к./мл микроорганизмов с помощью коммерческого набора «ДНК-сорб-В» (ОАО «ИнтерЛабСервис», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

**Таблица. Праймеры для детекции *B. pseudomallei* и *B. mallei* с помощью ПЦР в реальном времени**Table. Real-time PCR primers for detection of *B. pseudomallei* and *B. mallei*

Праймер Primers	Последовательность праймера Primer sequence	Мишень Target
F3-Bma54	5'-gcttcctcagaaacccgat-3'	IS407A-flIP <i>B. mallei</i>
B3-Bma54	5'-ggcagcagcctattcgttgag-3'	
F3-Bp27	5'-attcaggttgatgctggagg-3'	Orf12 области кластера генов TTS1 <i>B. pseudomallei</i> Orf12 regions in gene cluster TTS1
B3-Bp27	5'-cgataatgctctgccgcc-3'	

Нуклеотидные последовательности праймеров рассчитывали с помощью программы «Primer Explorer 3» ([www.primerexplorer.jp/elamp3.0.0/index.html](http://www.primerexplorer.jp/elamp3.0.0/index.html)) и проверяли на специфичность с использованием программы «BLAST» ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)). Праймеры синтезированы и очищены компанией «Синтол», Москва. Последовательности праймеров представлены в таблице.

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили на приборе «7500 Real-Time PCR Systems» (Applied Biosystems, США) в следующем режиме: первичная денатурация (95°C — 10 мин), 40 циклов: 95°C — 15 с, 60°C — 1 мин. Считывание флуоресценции. Построение кривой плавления интервале от 60 до 95°C. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 1x буфер Б с красителем SYBR Green I, 1,25 ед. Taq-полимеразы, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,25 мМ каждого дНТФ, праймеры 0,4 мкМ каждого, 5 мкл матрицы (0,1 мкг ДНК). Накопление специфического продукта амплификации — фрагмента ДНК *B. mallei* или *B. pseudomallei* — детектировалось по каналу FAM/SYBR Green dye. Анализ данных осуществляли с помощью программного обеспечения Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems. Накопление продукта регистрировали по изменению флуоресценции интеркалирующего красителя SYBR Green I, для определения специфичности реакции проводили анализ кривой плавления и вычисление температуры плавления (T<sub>m</sub>) полученных продуктов [6].

Моноклональные антитела 2D11 (гибридома получена после иммунизации мышей ЛПС из штамма С-5 *B. mallei*) [5], нарабатывали в асцитной жидкости и очищали методом аффинной хроматографии на белок А-сефарозе.

Для дот-блот анализа на полоски из нитроцеллюлозной бумаги наносили по 2 мкл суспензии бактериальных клеток с концентрацией 10<sup>9</sup> мк/мл. Полоски подсушивали, инкубировали при покачивании в 5% растворе альбумина, последовательно промывали в 0,1 М фосфатного буферного раствора рН 7,4 (ФБР) и ФБР с 10 мМ твин 20 (ФБРТ) инкубировали с МКАт в концентрации 1 мкг/мл или (в отрицательном контроле) с нормальной мышиной сывороткой в разведении 1:1000, а затем с пероксидазным конъюгатом кроличьих антител к IgG мыши в рабочем разведении. После промывки ФБРТ и деионизованной водой, полоски инкубировали с субстратом (0,2 мг/мл диаминобензидина) до появления видимых пятен.

## Результаты и обсуждение

В результате амплификации в ПЦР-РВ фрагментов генов-мишеней IS407A-flIP *B. mallei* и Orf12 *B. pseudomallei* были получены специфические продукты. Как видно из рисунка 1, на кривых плавления находятся единичные пики, соответствующие ожидаемым размерам продуктов амплификации.

Кроме того, при анализе продуктов ПЦР-РВ с помощью гель-электрофореза в геле были детектированы единичные полосы с ожидаемыми размерами: 202 п.н. в случае праймеров Bma54, 194 п.н. в случае праймеров Bp27. Таким образом Bma54 выявлял штаммы *B. mallei*, а Bp27 — *B. pseudomallei*. Аналитическая чувствительность ПЦР-РВ с указанными праймерами была определена в отдельных экспериментах и составила 1 × 10<sup>2</sup> м.к./мл. В реакции по определению специфичности брали ДНК выделенную из бактериальных суспензий штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei* с концентрацией 1 × 10<sup>4</sup> м.к./мл.

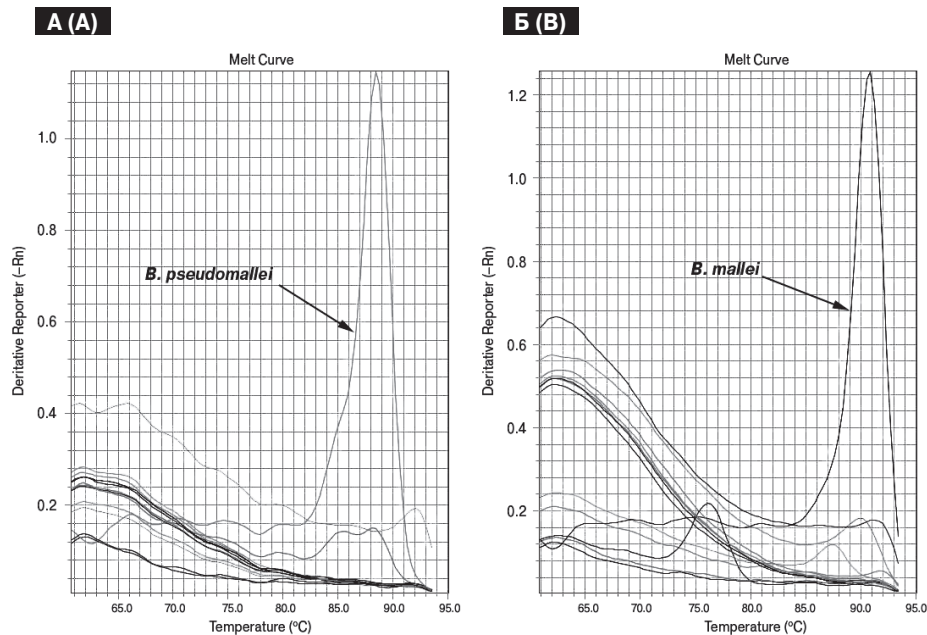
Сигналов с ДНК гетерологичных микроорганизмов (выделенной из бактериальных суспензий с концентрацией 1 × 10<sup>7</sup> м.к./мл), в ПЦР-РВ получено не было.

Таким образом, рассчитанные нами праймеры в реакции ПЦР-РВ обеспечивали видоспецифическую детекцию всех использованных штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза в концентрациях от 1 × 10<sup>2</sup> м.к./мл.

Результаты проверки взаимодействия МКАт 2D11 и МКАт 3D3 с бактериальными клетками тех же штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei* в дот-блот анализе показали следующее. Моноклональные антитела 3D3 связываются с клетками штаммов обоих возбудителей, то есть демонстрируют родоспецифичность. Моноклональные антитела 2D11, в отличие от МКАт 3D3, не связываются с клетками штаммов P1 *B. mallei* и 100 *B. pseudomallei*, то есть обладают штаммоспецифическим профилем взаимодействия (рис. 2).

В литературе имеются похожие сведения об избирательном взаимодействии МКАт (к капсульному полисахариду возбудителя мелиоидоза) со штаммами *B. pseudomallei* и *B. mallei* [10].

Мы предполагаем, что подобные антитела со штаммоспецифическим профилем при расширении их спектра и совместном использовании с видоспецифической ПЦР-РВ, могут дать дополнительные возможности для внутривидовой дифференциации штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза.



**Рисунок 1. Анализ температуры плавления продуктов амплификации после проведения ПЦР в реальном времени с использованием SYBR Green I и праймеров Bma54 (А) и Bp27 (Б)**

Figure 1. Analysis of the melting temperature of amplification products after real time-PCR using SYBR Green I and primers Bma54 (A) and Bp27 (B)

А. При определении специфичности праймеров Bma54 к мишени IS407A-flpP использовали следующие штаммы:

*B. pseudomallei* 100, *F. tularensis* 15/10, *B. abortus* 19, *Y. pestis* I-3449, *Y. pseudotuberculosis* C79, *Y. enterocolitica* C-126, *B. anthracis* СТИ-1, *V. cholerae* Eltor M878, *E. coli* JM83, *L. pneumophila* 33152, *P. aeruginosa* ATCC BAA-427.

Б. При определении специфичности праймеров Bp27 на ген Orf12 области кластера генов TTS1 *B. pseudomallei* использовали следующие штаммы: *B. mallei* C-5, *F. tularensis* 15/10, *B. abortus* 19, *Y. pestis* I-3449, *Y. pseudotuberculosis* C79, *Y. enterocolitica* C-126, *B. anthracis* СТИ-1, *V. cholerae* Eltor M878, *E. coli* JM83, *L. pneumophila* 33152, *P. aeruginosa* ATCC BAA-427.

A. The following strains were used to determine the specificity of the Bma54 primers for the IS407A-flpP target:

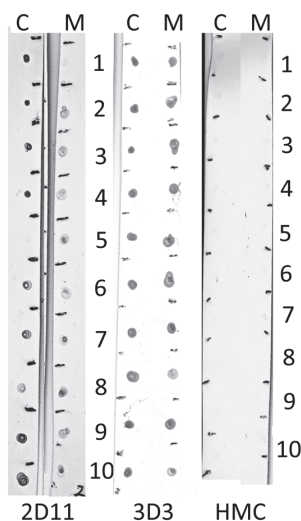
*B. pseudomallei* 100, *F. tularensis* 15/10, *B. abortus* 19, *Y. pestis* I-3449, *Y. pseudotuberculosis* C79, *Y. enterocolitica* C-126,

*B. anthracis* STI-1, *V. cholerae* Eltor M878, *E. coli* JM83, *L. pneumophila* 33152, *P. aeruginosa* ATCC BAA-427. B. The following

strains were used to determine the specificity of Bp27 primers for the Orf12 gene of the region TTS1 *B. pseudomallei* gene

cluster: *B. mallei* C-5, *F. tularensis* 15/10, *B. abortus* 19, *Y. pestis* I-3449, *Y. pseudotuberculosis* C79, *Y. enterocolitica* C-126,

*B. anthracis* STI-1, *V. cholerae* Eltor M878, *E. coli* JM83, *L. pneumophila* 33152, *P. aeruginosa* ATCC BAA-427.



**Рисунок 2. Дот-блот МКАт 2D11 и 3D3 с клетками *B. mallei* and *B. pseudomallei***

Figure 2. Dot-blot of Mabs 2D11 and 3D3 with cells of *B. mallei* and *B. pseudomallei*

**Примечание.** С — штаммы *B. mallei*: 1 — C-4; 2 — C-5;

3 — t-12; 4 — B-120; 5 — P-1; 6 — Muksuwar-11; 7 — Z-12;

8 — Zagreb; 9 — Ivanovich; 10 — 5534. М — штаммы

*B. pseudomallei*: 1 — 100; 2 — 102; 3 — 115; 4 — 116;

5 — 132; 6 — 135; 7 — 301; 8 — 51274; 9 — 60913; 10 — 61503.

HMC — сыворотка интактной мыши в разведении 1:1000,

МКАт с концентрацией 1 мг/мл в разведении 1:1000.

Note. С — *B. mallei* strains: 1 — C-4; 2 — C-5; 3 — t-12;

4 — B-120; 5 — P-1; 6 — Muksuwar-11; 7 — Z-12; 8 — Zagreb;

9 — Ivanovich; 10 — 5534. М — *B. pseudomallei* strains:

1 — 100; 2 — 102; 3 — 115; 4 — 116; 5 — 132; 6 — 135;

7 — 301; 8 — 51274; 9 — 60913; 10 — 61503. HMC — naive

mouse serum diluted to 1:1000, concentration of Mab 1 mg/ml

diluted to 1:1000.



## Список литературы/References

1. 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., Сорокина Ю.И., Алексеев В.В. Современные подходы к диагностике сапа и мелиоидоза. Идентификация и типирование *B. mallei* и *B. pseudomallei* // Проблемы особо опасных инфекций. 2012. № 2 (112). С. 46–50. [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. Modern approaches for detection of glanders and melioidosis. Identification and typing of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2012, no. 2 (112), pp. 46–50. (In Russ.)]
2. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности): санитарные правила СП 1.3.1285-03. [Safety of work with microorganisms of the I–II pathogenicity (hazard) groups: sanitary rules SP 1.3.1285-03]
3. Лемасова Л.В., Ткаченко Г.А., Савченко С.С., Бондарева О.С., Антонов В.А. Разработка мультиплексной тест-системы для обнаружения дифференциации *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* методом ПЦР в режиме реального времени // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. Вып. 4. С. 56–59. [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 infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2016, no. 4, pp. 56–59. (In Russ.)]
4. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности: методические указания МУ 1.3.2569-09. [Organization of work of laboratories using nucleic acid amplification methods when working with a material containing microorganisms of the I–IV pathogenicity groups: guidelines MU 1.3.2569-09.]
5. Федюкина Г.Н., Ветчинин С.С., Баранова Е.В., Рудницкий С.Ю., Соловьев П.В., Колосова Н.В., Бикетов С.Ф. Получение компонентов иммунохроматографического теста для выявления возбудителей сапа и мелиоидоза // Биотехнология. 2015. № 1. С. 85–93. [Fediukina G.N., Vetchinin S.S., Baranova E.V., Rudnitskii S.Yu., Soloviov P.V., Kolosova N.V., Biketov S.F. Obtaining of components of immunochromatography test for glanders and melioidosis causes detection. *Biotehnologiya = Biotechnology*, 2015, no. 1, pp. 85–93. (In Russ.)]
6. Andersen K., Dargis R., Kemp M., Christensen J.J. Detection of *Burkholderia pseudomallei* by SYBR green real time PCR. *Open Pathol. J.*, 2009, vol. 3, pp. 30–32.
7. Esters D.M., Dow S.W., Schweizer H.P., Torres A.G. Present and future strategies for melioidosis and glanders. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2010, vol. 8, no. 3, pp. 325–338.
8. Foong Y.C., Tan M.R., Bradbury R.S. Melioidosis: a review. *Rural Remote Health.*, 2014, vol. 14, p. 2763.
9. Gregory B.C., Waag D.M. Glanders. In: Medical aspects of biological warfare. Ed. Dembek Z.F. *Washington, DC: Borden Institute Walter Reed Army Medical Center*, 2007, pp. 121–146.
10. Houghton R.L., Reed D.E., Hubbard M.A., Dillon M.J., Chen H., Currie B.J., Mayo M., Sarovich D.S., Theobald V., Limmathurotsakul D., Wongsuvan G., Chantratita N., Peacock S.J., Hoffmaster A.R., Duval B., Brett P.J., Burtnick M.N., Aucoin D.P. Development of a prototype lateral flow immunoassay (LFI) for the rapid diagnosis of melioidosis. *PLOS Neglected Tropical Dis.*, 2014, vol. 8, no. 3, pp. 1–10.
11. Lee M.A., Wang D., Yap E.H. Detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* by multiplex PCR. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2005, vol. 43, pp. 413–417.
12. Lowe W., March J.K., Bannell A.J., O’Noill R.L., Robinson R.A. PCR-based methodologies used to detect and differentiate the *Burkholderia pseudomallei* complex: *B. mallei* and *B. pseudomallei* and *B. thailandensis*. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2013, vol. 22, no. 16 (2), pp. 23–54.
13. Sanford J.P. *Pseudomonas* species (including melioidosis and glanders). In: Principles and practice of infectious diseases. Eds. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. 8<sup>th</sup> ed. *New York, N.Y.: Churchill Livingstone*, 1995, pp. 2003–2009.
14. Tomaso H., Scholz H.C., Al Dahouk S., Eickhoff M., Treu T.M., Wernery R., Wernery U., Neubauer H. Development of a 5’-nuclease real-time PCR assay targeting *fliP* for the rapid identification of *Burkholderia mallei* in clinical samples. *Clin. Chem.*, 2006, vol. 52, no. 2, pp. 307–310.
15. Tomaso H., Scholz H.C., Al Dahouk S., Pitt T.L., Treu T.M., Neubauer H. Development of 5’ nuclease real-time PCR assays for the rapid identification of the *Burkholderia mallei*/*Burkholderia pseudomallei* complex. *Diagn. Mol. Pathol.*, 2004, vol. 13, pp. 247–253.

## Авторы:

**Ветчинин С.С.**, к.б.н., старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник сектора Лайм-боррелиоза отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦ ПМБ) Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия;

**Щит И.Ю.**, к.б.н., старший научный сотрудник сектора Лайм-боррелиоза отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия;

**Шевяков А.Г.**, младший научный сотрудник сектора Лайм-боррелиоза отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия;

**Бикетов С.Ф.**, к.б.н., зав. отделом иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия.

## Authors:

**Vetchinin S.S.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Leading Researcher, Lime-Borreliosis Sector, Department for Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;

**Shchit I.Yu.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Lime-Borreliosis Sector, Department for Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;

**Shevyakov A.G.**, Junior Researcher, Lime-Borreliosis Sector, Department for Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;

**Biketov S.F.**, PhD (Biology), Head of the Department for Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation.

Поступила в редакцию 28.05.2018  
Отправлена на доработку 11.03.2019  
Принята к печати 09.04.2019

Received 28.05.2018  
Revision received 11.03.2019  
Accepted 09.04.2019