

• 综 述 •

类鼻疽实验室诊断的研究进展*

许珊珊¹, 陈鑫苹², 肖 斌³综述, 符生苗^{1△} 审校

1. 海南医学院附属海南医院医学检验中心, 海南海口 570311; 2. 海南省肿瘤医院检验科/海南热带
肿瘤研究所, 海南海口 570312; 3. 广州医科大学附属第六医院/清远市
人民医院检验医学部, 广东清远 511518

摘 要:类鼻疽是由革兰阴性菌类鼻疽伯克霍尔德菌引起的人畜共患传染病, 已成为一个新的全球公共卫
生问题。传统的类鼻疽实验室诊断需要特殊的仪器设备, 且操作繁琐, 许多热带发展中国家缺乏实验室诊断工
具和相关临床经验, 延误了类鼻疽病的诊断和治疗。优化的血清学检测及分子生物学检测方法具有操作简便、
快速、高灵敏度、高特异度等特点, 对于类鼻疽的早期诊断具有重要意义。现就类鼻疽实验室诊断技术和研究
进展进行综述, 以便为该病制订最佳防控方案提供参考。

关键词:类鼻疽; 类鼻疽伯克霍尔德菌; 实验室诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.03.021 **中图法分类号:**R446.5

文章编号:1673-4130(2023)03-0360-05 **文献标志码:**A

Research progress on laboratory diagnosis of melioidosis*

XU Shanshan¹, CHEN Xinping², XIAO Bin³, FU Shengmiao^{1△}

1. Medical Laboratory Center, Affiliated Hainan Hospital of Hainan Medical University, Haikou,
Hainan 570311, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Hainan Cancer Hospital, Hainan
Tropical Cancer Institute, Haikou, Hainan 570312, China; 3. Department of Laboratory Medicine,
the Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Qingyuan People's
Hospital, Qingyuan, Guangdong 511518, China

Abstract: Melioidosis is a zoonotic infectious disease caused by the Gram-negative bacterium Burkholderia
melioides. This pathogen has become an emerging global public health problem. The traditional laboratory di-
agnosis of melioidosis requires special instruments and equipment, and the operation is cumbersome, which
leads to the lack of laboratory diagnostic tools and relevant clinical experience in many tropical developing
countries, delaying the diagnosis and treatment of melioidosis. The optimized serological and molecular biolog-
ical detection methods have the characteristics of simple operation, fast, high sensitivity and high specificity,
which are of great significance for the early diagnosis of melioidosis. This paper reviews the laboratory diag-
nostic technology and research progress of melioidosis in order to provide reference for formulating the best
prevention and control plan of the disease.

Key words: melioidosis; Burkholderia pseudomallei; laboratory diagnosis

类鼻疽伯克霍尔德菌(Bp)是一种引起类鼻疽病
的高致病性细菌, 主要流行于东南亚及澳大利亚北
部。近些年非流行地区零星报道病例增多, 据估计,
类鼻疽病每年造成的全球疾病负担约为 165 000 例,
其中 89 000 例死亡^[1]。类鼻疽感染与职业及自身基
础疾病存在相关性。在高危人群中糖尿病为关联性
最强的易感因素, 超过 50% 的类鼻疽患者都存在糖尿
病^[2-3]。类鼻疽平均潜伏期为 9 d, 但也有感染长达 20
年后发病, 即所谓“潜伏型类鼻疽”。其临床表现差异
大, 包括皮肤和软组织脓肿、肺炎和感染性休克, 后者

的病死率超过 80%, 一半的类鼻疽死亡发生在就诊后
的前 48 h 内^[4]。由于缺乏快速的实验室诊断方法, 只
能通过临床症状及流行病学史经验性地进行靶向治
疗。该细菌对多种抗菌药物存在天然耐药, 使用无效
的抗菌药的治疗可能导致病死率(CFR)超过 70%。
面对非特异性的临床表现, 及早诊断显得尤为重要,
故本文将对类鼻疽的实验室诊断方法进行介绍。

1 分离培养法

当前诊断类鼻疽的金标准仍是细菌培养。将被
正常菌群污染的样本接种到选择性培养基(如

* 基金项目: 海南省重点研发计划项目(ZDYF2021SHFZ085)。

△ 通信作者, E-mail: smfu2000@126.com。

Ashdown 琼脂或洋葱伯克霍尔德菌琼脂)上,提高了被正常菌群污染的标本中 Bp 检出率^[8]。培养法需要经验丰富的微生物学家和严格的实验室安全程序,耗时长、灵敏度差、阳性率低、早期诊断易漏诊。使用生化表型鉴定系统进行识别诊断的准确性约为 80%, VITEK 2 系统常将 Bp 误认为洋葱伯克霍尔德菌,且该系统在属级水平上的错误识别率很高。API 20NE 系统具有明显的地域差异,Bp 通常被错误鉴定为洋葱伯克霍尔德菌或紫色色杆菌,且该系统需要至少 24 h 才能得出结果,作为筛选方法不太令人满意^[6-7]。

2 血清学检测

血清学检测易于执行且价格低廉,可以减少实验室诊断的时间。即时诊断是早期诊断的关键,近些年正在开发和评估越来越多的非培养类鼻疽快速诊断技术,血清学检测用于开发即时诊断具有更广阔的前景。目前血清学检测主要包括间接血凝试验(IHA)^[8]、乳胶凝集试验(LAT)^[9-10]、免疫荧光分析(IFA)^[11-12]、快速免疫色谱检测(ICT)^[13]、酶联免疫吸附试验(ELISA)、侧向流动免疫测定法(LFI)^[14]和蛋白质微阵列技术^[15]等。

IHA 由于灵敏度不高,且对感染铜绿假单胞菌患者检测结果存在假阳性,因此该方法仅用于没有类鼻疽流行地区居住史并且曾进行过一次或少量离散到访而可能发生暴露的旅行者。LAT 与泰国伯克霍尔德菌和洋葱伯克霍尔德菌产生交叉反应,只能作为一种初筛试验^[10]。虽然 IFA 法具有较佳的灵敏度(92.6%)及特异度(100.0%)但不能直接检测全血或血清样本,且对设备及人员有较高的要求,适合在初筛的基础上使用该方法作为判断依据。ICT 检测的是溶血素共调节蛋白(Hcp1)的 IgG 抗体,其操作简便、耗时短,可用于流行病学调查及现场诊断。虽然 Hcp1 已被证实是宿主体液免疫反应的重要靶标,但在免疫功能低下或诊断时间过早时均有可能出现假阴性^[16]。针对性地检测 Hcp1 的 IgM 是否会提高类鼻疽诊断的灵敏度和特异度,或运用 Hcp1 的 IgG 和 IgM 能否可靠区分现症感染与既往感染有待进一步研究。

外膜蛋白(ompA)^[17]、伴侣蛋白(rGroEL)^[17]、荚膜多糖(CPS)^[18]、O-多糖(OPS)^[18]、鞭毛蛋白(FLAG300)、Hcp1^[19]等是常用的 Bp 抗原,其中 Hcp1 及 OPS 是开发快速即时检测的具有前景的候选靶抗原。处在流行地区的人群血清背景阳性率高,rGroEL 在健康人群中表现出较少的抗体反应,这一特征使其应用在流行地区具有很高的阴性预测价值,但与假单胞菌属和其他非发酵革兰阴性杆菌(GNF)存在交叉反应,需要进一步优化抗原以提高检测的准确性。免疫磁珠(IMB)联合 ELISA(IMB-ELISA)的方法灵敏度低,耗时久且与大肠杆菌显示出模糊的交叉反应故不推荐使用^[20]。单独应用 LFI 检测类鼻疽

灵敏度不高,CPS-LFI 和 Hcp1-ELISA 或 OPS-ELISA 联合诊断类鼻疽,可提高检测的灵敏度^[21]。InBios 公司开发的横向流动检测法(AMD-LFI)在检测尿液样本时显示假阳性结果,考虑是源于尿液中的 CPS 负荷低,可使用尿液浓缩器提高 AMD-LFI 的灵敏度^[22-23],随后优化出 AMD-Plus 检测系统,测试中未出现早期的假阳性尿带^[24]。Bp CPS 半衰期短且可快速排泄至尿液,使用尿液检测的 AMD-LFI 阳性可提示活动性的类鼻疽感染,根据这一特点,持续性检测 AMD-LFI 可监控患者病情进展及用药疗效。

基于 20 种类鼻疽抗原开发的蛋白质微阵列是对类鼻疽患者血清中短期和长期抗体的多重检测^[15]。其灵敏度(86.7%)明显高于 IHA(57.3%)。标准化的微阵列装置简单、检测方便、速度快,适于常规诊断实验室应用。

3 分子生物学检测

由于血清学检测方法依赖于抗体滴度,灵敏度及特异度不稳定。鉴于病原体检测的研究热点应是开发更加简便的分子生物学检测方法,缩短检测时间且不影响检测结果的准确性。

3.1 聚合酶链反应(PCR) 目前 PCR 常用靶标 III 型分泌系统研究基因簇(TTS1)内 orf2,最常见的是通过实时荧光定量 PCR(qPCR)方法直接从临床样本中检测病原体,qPCR 是当前定量最准确、重复性最好的核酸检测技术。ZUETER 等^[25]运用 TTS1 基因簇中的 orf1-stcQ 作为 PCR 扩增的靶标,检测菌株的灵敏度和特异度均为 100.00%,血培养中的检测限为 18.4×10^5 CFU/mL。但是基于单基因检测会出现假阴性结果,开发多基因多重靶点检测可以提高灵敏度。SEMAIL 等^[26]首次筛选 Bp 的 6 型分泌系统 5(T6SS-5),建立了测定 7 种基因(tss C-5、tag D-5、tss A-5、hcp -5、tss B-5、tss F-5 和 vgrG-5)的多重 PCR 检测方法。经优化后临床分离株的灵敏度为 93.80%,特异度为 100.00%。7 种基因中除 tss F-5 检出限为 10^5 CFU/mL 外,其他靶标基因均能检测到 10^3 CFU/mL,这与 RPA 的灵敏度相当。该多重 PCR 技术不仅可以应用于类鼻疽的实验室诊断,同时能进一步了解 Bp 的毒力机制,对类鼻疽的治疗提供新的思路。由于该方法未对临床样本进行检测,尚不能确定是否所有的 Bp 都存在 T6SS-5 基因,对其实际应用的可能性需进一步评估。

等温热隔绝式聚合酶链式反应(iiPCR)是一种基于荧光水解探针的低成本的对流 PCR,该方法已被开发应用于检测疟疾^[27]、登革热病毒^[28]等。CHUA 等^[29]开发的针对靶标 bimA 基因的二PCR 表现出高度特异度(100.00%)及灵敏度(97.52%),检测限为 14 ng/ μ L,bimA 在鼻疽伯克霍尔德菌及泰国伯克霍尔德菌中存在明显差异,这对于区分与 Bp 密切相关的伯克霍尔德菌属具有极大的价值。便携的核酸分

析仪可利用电池供电,适用于现场诊断。由于该方法检测的伯克霍尔德菌属菌株数量有限,且未对洋葱伯克霍尔德菌进行鉴定,未来应进一步证实 iPCR 的特异性。

3.2 环介导等温扩增(LAMP) CHANTRATITA 等^[30]以 TTS1 基因簇为靶点的环介导等温扩增法检测类鼻疽,结果表明 LAMP 比 qPCR 的灵敏度更高,检测限达到 38 拷贝/反应,如将 LAMP 与纳米生物传感器(LFB)结合可更便捷地读取结果^[31]。TZEL-ING 等^[32]使用两组不同的引物和特定双功能寡核苷酸(DFO)建立了一种多重实时 LAMP 检测,可同时检测类鼻疽和恶性疟原虫。DFO-LAMP 检测的 DNA 的最小浓度为 1 fg,比传统的多重 LAMP(10 fg/ μ L)更敏感,且未发生交叉反应,特异性为 100.00%。因此,多重 LAMP 为核酸诊断技术提供了一种简便、可靠、快速、高度灵敏和特异度的方法。

3.3 重组酶聚合酶扩增(RPA) RPA 能够在 25~50 °C 的温度范围内将 DNA 扩增至可检测水平,在低资源环境现场应用是一个很大的优势。PENG 等^[33]通过靶向 TTS1-orf2 基因建立重组酶聚合酶扩增技术结合横向流动试纸检测法(LF-RPA),LF-RPA 和 qPCR 检测临床样本的检测限均为 4.2×10^3 CFU/mL,且 LF-RPA 对血液中的抑制剂更具耐受性。SAXENA 等^[34]使用 Bp 菌株 K96243 的 BPSS1399 上游的 DNA 序列(251 bp)作为靶标序列,在血液和尿液样本中检测限为 4.8×10^4 CFU/mL 和 4.95×10^4 CFU/mL,与先前的 LF-RPA 相比表现更佳。气溶胶污染是困扰核酸检测的一大难题,在操作时应严格分区,否则容易造成假阳性,LI 等^[35]和 ZHAO 等^[36]不仅开发了一种简便可视装备与 LF-RPA 相结合既能减少假阳性,而且引物经优化后的检测结果更好,与实时 PCR 具有相同的灵敏度,与 16S rRNA 基因测序结果无显著差异,具有高度特异性(100.00%)。与 LAMP 相比,RPA 的引物设计较为简便。由此可见,LF-RPA 是当今基于 PCR 技术检测类鼻疽的替代方法。

3.4 多重交叉置换扩增(MCDA) WANG 等^[37]将 MCDA 技术与基于纳米颗粒的生物传感器(NB)相结合,在纯培养物 DNA 的检测限为 10 fg,特异性为 100.00%,且经临床样本评估 MCDA-NB 的诊断准确性与金标准培养法相符合。MCDA-NB 无需使用特殊的仪器设备便可快速获取结果,对于基层及现场应用具有极大帮助。

3.5 基因测序 16S rRNA 基因序列可以有效区分类鼻疽和鼻疽。对于 Bp 与泰国伯克霍尔德菌,groEL 基因核苷酸序列显示<97.6%的同一性,具有更高的鉴别价值^[38]。全基因测序不仅可以准确鉴别类鼻疽,及时发现突变的细菌,有效指导临床治疗,还可用于寻找传染源、传播途径,预测疾病传播风险,在流行病

防控方面具有重要意义^[39]。

3.6 自动化分子诊断平台 GASSIEP 等^[40]首次使用 Panther fusion 自动化分子诊断仪器直接检测全血样本中的 Bp,检测限为 1.64×10^3 CFU/mL,但由于灵敏度较低,该方法仅适用于血培养阳性诊断。自动化分子诊断平台可以有效降低劳动成本、处理样本时间、样本污染风险,未来可以寻找其他的分子靶点以提高检测的灵敏度。

4 其他检测方法

4.1 质谱法 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF MS)可以准确地鉴定 Bp 并区分其他的伯克霍尔德菌属,也可用于流行病学研究,对 Bp 及其相关物种的发现和分布,还能区分野生型和突变体。MALDI-TOF MS 在澳大利亚和中国的研究具有良好的灵敏度和特异性^[41-42],但由于 Bp 存在较高的遗传多态性,为了进一步评估 MALDI-TOF MS 的准确性,WATTTHANAWORAWIT 等^[43]在 RUO 模式下使用 Vitek MS 创建用于 Bp 鉴定的超光谱,并针对来自类鼻疽流行的 3 个国家的分离株进行研究,结果显示来自东南亚和澳大利亚的分离株 100.0%能正确识别。MALDI-TOF-MS 鉴定的准确性取决于数据库的信息量,需要不断完善相关数据库以提升微生物鉴定在临床中的诊断价值。

4.2 上转发光免疫层析法(Bps-UPT-LF) 利用上转发光材料结合双抗体夹心法制备出 Bps-UPT-LF 类鼻疽检测试纸,该技术灵敏度高,且对 $10^4 \sim 10^7$ CFU/mL 的 Bp 可进行精准定量^[44]。基于 Bps-UPT-LF 试纸耐受性强、操作简便、快速,运用于现场环境检测更有优势。

4.3 支持向量机(SVM) 研究发现中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞水平的变化与类鼻疽发生和发展密切相关^[45]。鉴于以上特点,XU 等^[46]建立了由 CD⁸⁺ T 细胞、静息 CD⁴⁺ 记忆 T 细胞、单核细胞、M2 巨噬细胞和活化肥大细胞组合而成的新型 SVM 模型用于检测败血症性类鼻疽。该方法的成本相对较低,表现出高度特异性及灵敏度,可以作为改进类鼻疽检测和诊断的补充。

5 结语与展望

随着人口和病原体的移动增加了新地区流行的风险,类鼻疽的全球负担不断增加。对类鼻疽的诊断不应局限于临床样本,环境样本也应纳入考虑,对环境进行检测可以扩大类鼻疽的全球风险图,有效监控疾病的发生。预防和降低受影响个体的死亡率是类鼻疽研究的两个关键课题。快速实验室诊断有助于早期使用恰当的抗菌药物进行治疗,从而可能降低因延迟治疗而导致的死亡率。实现对类鼻疽的早期发现、早期诊断、早期治疗是当前及未来的努力目标。由于目前还没有市售且可靠的类鼻疽即时诊断技术,因此开发简便、灵敏,能够快速识别分离株并直接检

测临床标本的诊断方法是未来主要的研究方向,其中,优化出简便的分子生物学方法将对类鼻疽流行地区和资源匮乏地区的病情进行监控,提供有效治疗,遏制疾病的蔓延均有极大的帮助。

参考文献

- [1] LIMMATHUROTSAKUL D, GOLDING N, DANCE D A, et al. Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis[J]. *Nat Microbiol*, 2016, 1(1):15008.
- [2] ALWARTHAN S M, ALDAJANI A A, AL ZAHIRANI I M, et al. Melioidosis: can tropical infections present in nonendemic areas? A case report and review of the literature[J]. *Saudi J Med Med Sci*, 2018, 6(2):108-111.
- [3] GASSIEP I, ARMSTRONG M, NORTON R. Human Melioidosis[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2020, 33(2):e00006-19.
- [4] CHAKRAVORTY A, HEATH C H. Melioidosis: an updated review[J]. *Aust J Gen Pract*, 2019, 48(5):327-332.
- [5] 吴华, 黄东良. 类鼻疽的临床和实验室研究进展[J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(42):3462-3464.
- [6] ZAKHAROVA I B, LOPASTEYSKAYA Y A, TOPORKOV A V, et al. Influence of biochemical features of *Burkholderia pseudomallei* strains on identification reliability by Vitek 2 system[J]. *J Glob Infect Dis*, 2018, 10(1):7-10.
- [7] LAU S K, SRIDHAR S, HO C-C, et al. Laboratory diagnosis of melioidosis: past, present and future[J]. *Exp Biol Med*, 2015, 240(6):742-751.
- [8] CHAICHANA P, JENJAROEN K, AMORNCHAI P, et al. Antibodies in melioidosis: the role of the indirect hemagglutination assay in evaluating patients and exposed populations[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2018, 99(6):1378-1385.
- [9] SUTTISUNHAKUL V, CHANTRATITA N, WIKR AIPHAT C, et al. Evaluation of polysaccharide-based latex agglutination assays for the rapid detection of antibodies to *Burkholderia pseudomallei*[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2015, 93(3):542-546.
- [10] MUANGSOMBUT V, WITHATANUNG P, CHANTRATITA N, et al. Rapid clinical screening of *Burkholderia pseudomallei* colonies by a bacteriophage tail fiber-based latex agglutination assay[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2021, 87(12):e03019-20.
- [11] TANDHAVANANT S, WONGSUVAN G, WUTHIEKANUN V, et al. Monoclonal antibody-based immunofluorescence microscopy for the rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in clinical specimens[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2013, 89(1):165-168.
- [12] LANTONG K, SONGSRI J, WISESSOMBAT S, et al. Use of Recombinant *Escherichia coli* strains in immunofluorescence assays for melioidosis diagnosis[J]. *Pathogens*, 2021, 10(5):559.
- [13] PHOKRAI P, KAROONBOONYANAN W, THAN AP-ATTARAPAIROJ N, et al. A rapid immunochromatography test based on hcp1 is a potential point-of-care test for serological diagnosis of melioidosis[J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(8):e00346-18.
- [14] WONGSUVAN G, HANTRAKUN V, TEPARRUKKUL P, et al. Sensitivity and specificity of a lateral flow immunoassay (LFI) in serum samples for diagnosis of melioidosis[J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2018, 112(12):568-570.
- [15] KOHLER C, DUNACHIE S J, MULLER E, et al. Rapid and sensitive multiplex detection of *Burkholderia pseudomallei*-specific antibodies in melioidosis patients based on a protein microarray approach[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016, 10(7):e0004847.
- [16] LIM Y T, JOBICHEN C, WONG J, et al. Extended loop region of Hcp1 is critical for the assembly and function of type VI secretion system in *Burkholderia pseudomallei*[J]. *Sci Rep*, 2015, 5(1):8235.
- [17] KRITSIRIWUTHINAN K, WAJANAROGANA S, CHOOSANG K, et al. Production and evaluation of recombinant *Burkholderia pseudomallei* GroEL and OmpA proteins for serodiagnosis of melioidosis[J]. *Acta Trop*, 2018, 178:333-339.
- [18] SUTTISUNHAKUL V, WUTHIEKANUN V, BRETT P J, et al. Development of rapid enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Burkholderia pseudomallei*[J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(5):1259-1268.
- [19] PUMPUANG A, DUNACHIE S J, PHOKRAI P, et al. Comparison of O-polysaccharide and hemolysin co-regulated protein as target antigens for serodiagnosis of melioidosis[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2017, 11(3):e0005499.
- [20] YATSOMBOON A, SERMSWAN R W, WONGRATANACHEEWIN S. Development of an immunomagnetic separation-ELISA for the detection of *Burkholderia pseudomallei* in blood samples[J]. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2021, 39(1):35-43.
- [21] AMORNCHAI P, HANTRAKUN V, WONGSUVAN G, et al. Evaluation of antigen-detecting and antibody-detecting diagnostic test combinations for diagnosing melioidosis[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2021, 15(11):e0009840.
- [22] PEETERS M, CHUNG P, LIN H, et al. Diagnostic accuracy of the InBiOS AMD rapid diagnostic test for the detection of *Burkholderia pseudomallei* antigen in grown blood culture broth[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2018, 37(6):1169-1177.
- [23] RIZZI M C, RATTANAVONG S, BOUTHASAVONG L, et al. Evaluation of the Active Melioidosis Detect™ test as a point-of-care tool for the early diagnosis of melioidosis: a comparison with culture in Laos[J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2019, 113(12):757-763.
- [24] CURRIE B J, WOERLE C, MAYO M, et al. What is the role of lateral flow immunoassay for the diagnosis of me-

- lioidosis[J]. Open Forum Infect Dis, 2022, 9(5): ofac149.
- [25] ZUETER A M, HARUN A B. Development and validation of conventional PCR for the detection of the *setQ* gene[J]. JJBS, 2018, 11(4): 435-439.
- [26] SEMAIL N, HARUN A, AZIAH I, et al. Development of multiplex PCR assay for screening of T6SS-5 gene cluster: the *Burkholderia pseudomallei* virulence factor[J]. Diagnostics, 2022, 12(3): 562.
- [27] CHUA K H, LEE P C, CHAI H C. Development of insulated isothermal PCR for rapid on-site malaria detection[J]. Malar J, 2016, 15: 134.
- [28] TSAI J J, LIU L T, LIN P C, et al. Validation of the poc-kit dengue virus reagent set for rapid detection of dengue virus in human serum on a field-deployable PCR system[J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(5): e01865-17.
- [29] CHUA K H, TAN E W, CHAI H C, et al. Rapid identification of melioidosis agent by an insulated isothermal PCR on a field-deployable device[J]. PeerJ, 2020, 8: e9238.
- [30] CHANTRATITA N, MEUMANN E, THANWISAI A, et al. Loop-mediated isothermal amplification method targeting the TTS1 gene cluster for detection of *Burkholderia pseudomallei* and diagnosis of melioidosis[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(2): 568-573.
- [31] 王毅, 王晓霞, 王立程, 等. 环介导恒温扩增结合纳米生物传感器快速检测类鼻疽伯克霍尔德菌的方法及临床应用[J]. 疾病监测, 2021, 36(8): 831-836.
- [32] TZELING J M W, SYAFIRAH E E N, IREKEOLA A A, et al. One-step, multiplex, dual-function oligonucleotide of loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of pathogenic *Burkholderia pseudomallei* [J]. Anal Chim Acta, 2021, 1171: 338682.
- [33] PENG Y, ZHENG X, KAN B, et al. Rapid detection of *Burkholderia pseudomallei* with a lateral flow recombinase polymerase amplification assay[J]. PLoS One, 2019, 14(7): e0213416.
- [34] SAXENA A, PAL V, TRIPATHI N K, et al. A recombinase polymerase amplification lateral flow assay for rapid detection of *Burkholderia pseudomallei*, the causative agent of melioidosis[J]. Braz J Microbiol, 2022, 53(1): 185-193.
- [35] LI J, ZHONG Q, SHANG M Y, et al. Preliminary evaluation of rapid visual identification of *Burkholderia pseudomallei* using a newly developed lateral flow strip-based recombinase polymerase amplification (LF-RPA) system[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 804737.
- [36] ZHAO L, WANG J, SUN X X, et al. Development and evaluation of the rapid and sensitive RPA assays for specific detection of *Salmonella* spp. in food samples[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 631921.
- [37] WANG X, WANG L, ZHU H, et al. Reliable detection of *Burkholderia pseudomallei* using multiple cross displacement amplification label-based biosensor[J]. BMC Microbiol, 2022, 22(1): 72.
- [38] WOO P C, LAU S K, WOO G K, et al. Seronegative bacteremic melioidosis caused by *Burkholderia pseudomallei* with ambiguous biochemical profile: clinical importance of accurate identification by 16S rRNA gene and *groEL* gene sequencing[J]. Clin Microbiol Infect, 2003, 41(8): 3973-3977.
- [39] LICHTENEGGER S, TRINH T T, ASSIG K, et al. Development and validation of a *Burkholderia pseudomallei* core genome multilocus sequence typing scheme to facilitate molecular surveillance[J]. J Clin Microbiol, 2021, 59(8): e0009321.
- [40] GASSIEP I, BAUER M J, PAGE M, et al. Comparative evaluation of panther fusion and real-time PCR for detection of *Burkholderia pseudomallei* in spiked human blood[J]. Access Microbiol, 2022, 4(3): 000333.
- [41] GASSIEP I, ARMSTRONG M, NORTON R E. Identification of *Burkholderia pseudomallei* by use of the Vitek mass spectrometer[J]. J Clin Microbiol, 2019, 57(5): e00081-19.
- [42] LI J, HU W, ZHANG F, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for identifying *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis* isolates[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2019, 38(1): 191-196.
- [43] WATTTHANAWORAWIT W, ROBERTS T, HOPKINS J, et al. A multi-country study using MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* [J]. BMC Microbiol, 2021, 21(1): 213.
- [44] 华菲, 张平平, 王晓英, 等. 基于上转发光免疫层析技术快速定量检测类鼻疽伯克霍尔德菌方法的建立[J]. 中华预防医学杂志, 2015, 49(2): 166-171.
- [45] JENJAROEN K, CHUMSENG S, SUMONWIRIYA M, et al. T-cell responses are associated with survival in acute melioidosis patients[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2015, 9(10): e0004152.
- [46] XU K, LIAN F, QUAN Y, et al. Septicemic melioidosis detection using support vector machine with five immune cell types[J]. Dis Markers, 2021, 2021: 8668978.

(收稿日期: 2022-06-05 修回日期: 2022-11-14)