

НОВЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI*



М.Л. Леденева, Г.А. Ткаченко, И.Б. Захарова

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия

Резюме. *Burkholderia pseudomallei* является возбудителем мелиоидоза — тяжелого инфекционного заболевания людей и животных, которое может длительное время не проявлять себя и быстро развиться до пневмонии и септицемии при снижении иммунитета и наличии предрасполагающих факторов. Мелиоидоз эндемичен для стран с тропическим и субтропическим климатом, где *B. pseudomallei* входит в состав микробиоты почвы и воды стоячих водоемов, а также ризосферы растений. Регистрация завозных случаев мелиоидоза в странах умеренного климатического пояса наряду с сохранением угрозы использования данного патогена в качестве агента биотерроризма свидетельствуют об актуальности исследований, направленных на разработку современных методов диагностики и типирования этого патогена. Тенденцией современных исследований при проведении внутривидовой дифференциации штаммов возбудителей инфекционных заболеваний является использование двух и более типов молекулярных маркеров. Перспективным направлением для генотипирования штаммов *B. pseudomallei* является использование комбинации VNTR-локусов, обеспечивающей высокую дискриминирующую способность метода мультилокусного анализа числа переменных tandemных повторов (MLVA), в сочетании с медленно эволюционирующими единичными нуклеотидными полиморфизмами (SNPs). Целью настоящей работы было выявление новых VNTR- и SNP-локусов, пригодных для использования в качестве генетических маркеров в молекулярном типировании возбудителя мелиоидоза. Объектами исследования служили 20 штаммов *B. pseudomallei* из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора и полногеномные последовательности 85 штаммов *B. pseudomallei* из базы данных GenBank NCBI. При типировании штаммов возбудителя мелиоидоза из базы данных GenBank NCBI по 4 VNTR-локусам выявлено 74 генотипа, из которых 64 были уникальными (индекс Хантера–Гастона 0,997). Установлено, что высокий аллельный полиморфизм VNTR-локусов ограничивал возможность с помощью схемы MLVA-4 определять географические и филогенетические связи изолятов *B. pseudomallei*, а выявленные нуль-аллели увеличивали риск возникновения гомоплазии. В связи с этим схему MLVA-4 дополнили VNTR-маркером в составе локуса BPSS1974, кодирующего коллагеноподобный белок, и SNP-маркерами в генах лауроилацилтрансферазы биосинтеза липида-А, сигма-фактора RpoH РНК-полимеразы и глутаминамидотрансферазы. Для амплификации выбранных локусов в составе разработанной схемы сконструированы праймеры и зонды, которые апробированы при типировании коллекционных штаммов *B. pseudomallei*. По результатам кластерного анализа 105 штаммов возбудителя мелиоидоза оптимальным оказался комплексный подход, позволяющий на основании VNTR-профилей осуществлять дифференциацию штаммов внутри SNP-групп. Разработанный методический подход к генетическому ти-

Адрес для переписки:

Леденева Маргарита Леонтьевна
400131, Россия, г. Волгоград, ул. Голубинская, 7,
ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора.
Тел.: 8 905 330-27-63.
E-mail: volresin@yandex.ru

Contacts:

Margarita L. Ledenyova
400131, Russian Federation, Volgograd, Golubinskaya str., 7,
Volgograd Plague Control Research Institute.
Phone: +7 905 330-27-63.
E-mail: volresin@yandex.ru

Для цитирования:

Леденева М.Л., Ткаченко Г.А., Захарова И.Б. Новые генетические маркеры для типирования штаммов *Burkholderia pseudomallei* // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1091–1102. doi: 10.15789/2220-7619-NGM-1965

Citation:

Ledenyova M.L., Tkachenko G.A., Zakharova I.B. New genetic markers for burkholderia pseudomallei strains typing // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1091–1102. doi: 10.15789/2220-7619-NGM-1965

пированию *B. pseudomallei*, основанный на комплексном анализе 4 SNP- и 5 MLVA-маркеров в нашей модификации, дает возможность дифференцировать штаммы в соответствии с географическими регионами их происхождения и устанавливать клональное происхождение изолятов при выявлении случаев мелиоидоза.

Ключевые слова: *Burkholderia pseudomallei*, генотипирование, MLVA, SNPs, филогеография, тандемные повторы.

NEW GENETIC MARKERS FOR *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* STRAINS TYPING

Ledenyova M.L., Tkachenko G.A., Zakharova I.B.

Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation

Abstract. *Burkholderia pseudomallei* is the causative agent of melioidosis, a serious infectious disease in humans and animals that may be asymptomatic long-term and quickly develop to pneumonia and septicemia in immunocompromised state and due to predisposing factors. Melioidosis is endemic in countries with tropical and subtropical climates, where *B. pseudomallei* is a part of the soil and water microbiota of stagnant water bodies, as well as the plant rhizosphere. The recording of imported melioidosis cases in countries with temperate climate zone, along with the continued threat of using this pathogen as a bioterrorism agent, indicate the relevance of research aimed at developing modern methods for its diagnosing and typing. Current research in the intraspecific differentiation of pathogenic strains of infectious diseases tends to use two or more types of molecular markers. A promising direction for the *B. pseudomallei* strains genotyping is based on using a combination of VNTR loci, which provides a high discriminating ability of the method of multi-locus variable tandem repeat number analysis (MLVA), and slowly evolving single nucleotide polymorphisms (SNPs). The aim of this work was to identify new VNTR and SNP loci suitable for use as genetic markers in molecular typing of the melioidosis causative agent. 20 strains of *B. pseudomallei* from the collection of the Volgograd Plague Control Research Institute and whole genome sequences of 85 *B. pseudomallei* strains from the GenBank NCBI database were analyzed. While typing melioidosis causative agent strains from the GenBank NCBI database for 4 VNTR loci, 74 genotypes were identified, of which 64 were unique (Hunter–Gaston index 0.997). It was found that the high allelic polymorphism of VNTR loci limited a potential to determine the geographical and phylogenetic relationships of *B. pseudomallei* isolates by using the MLVA-4 scheme, and the identified null alleles increased the risk of homoplasia. In this regard, the MLVA-4 scheme was supplemented with a VNTR marker in the BPSS1974 locus encoding a collagen-like protein as well as with SNP markers in the genes of lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase, RNA polymerase sigma factor RpoH, and glutamine amidotransferase. For amplification of the select loci, primers and probes were designed as part of the developed scheme, which were tested in the typing of *B. pseudomallei* collection strains. According to the results of a cluster analysis for 105 strains of the melioidosis causative agent, an integrated approach turned out to be optimal, allowing differentiation of strains within SNP groups based on VNTR profiles. The methodological approach developed for *B. pseudomallei* genetic typing, based on a comprehensive analysis of 4 SNP- and 5 MLVA-markers in our modification, allowed to differentiate strains according to the geographical regions of their origin and establish the clonal origin of isolates upon revealing cases of melioidosis.

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, genotyping, MLVA, SNPs, phylogeography, tandem repeats.

Введение

Burkholderia pseudomallei является этиологическим агентом мелиоидоза — особо опасного заболевания людей и животных с высокой летальностью. По оценочным данным в мире от мелиоидоза ежегодно погибает около 89 000 человек [15]. В настоящее время эндемичными по мелиоидозу признано около 50 стран, расположенных между 30-ми параллелями всех континентов, и этот список продолжает пополняться. Возможный занос с эндемичных территорий возбудителей редких инфекционных заболеваний является актуальной проблемой общественного здравоохранения.

В связи с высокой вирулентностью, низкой инфицирующей дозой и отсутствием эффективных вакцин возбудитель мелиоидоза включен в список потенциальных агентов биотерроризма как в Российской Федерации, так и за ру-

бежом, что определяет необходимость развития технологий молекулярного типирования для определения клонального происхождения изолятов [1, 12, 24].

Востребованным подходом для оценки генетического разнообразия штаммов *B. pseudomallei* является метод мультилокусного анализа числа переменных тандемных повторов — MLVA (Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis), основанный на использовании переменных по копийности микро- и минисателлитных повторов (Variable Number Tandem Repeats, VNTRs) [4, 25]. Подбор переменных локусов и определение их количества в схеме типирования являются критическими для оценки результатов анализа. При этом увеличение количества анализируемых VNTR-локусов может приводить к выявлению уникальных аллелей, которые скорее будут оценивать не популяционно-генетическую изменчивость, а ва-

риабельность самого маркера. Так, предложенная J.M. U'Ren и соавт. [23] 32-локусная схема MLVA-типирования дифференцирует близкородственные штаммы, включая последовательные изоляты от одного больного, что может повлечь получение искаженных данных, например, при определении характера вспышки и ее наиболее вероятного источника. С другой стороны, сокращение схем MLVA-типирования снижает дискриминирующую способность метода, в результате чего возрастает вероятность получения схожих профилей у неродственных штаммов в результате гомоплазии.

Проблема гомоплазии актуальна и при проведении мультилокусного сиквенс-типирования (Multilocus Sequence Typing, MLST), поскольку характерная для *B. pseudomallei* высокая частота рекомбинационных событий может приводить к единообразию сиквенс-типов (sequence type, ST) изолятов, несмотря на их генетическую и географическую гетерогенность [3].

Тенденцией современных исследований по внутривидовому типированию микроорганизмов является использование двух и более типов молекулярных маркеров, что повышает достоверность результатов исследования. В частности, перспективным представляется дополнение схемы MLVA анализом медленно эволюционирующих единичных нуклеотидных полиморфизмов (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs).

Целью данной работы являлось выявление новых VNTR- и SNP-локусов, пригодных для использования в качестве генетических маркеров в молекулярном типировании *B. pseudomallei*.

Материалы и методы

Объектами исследования служили 20 штаммов возбудителя мелиоидоза из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (табл. 1) и полногеномные последовательности 85 штаммов *B. pseudomallei* из базы данных GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>).

Экстракцию нуклеиновых кислот из предварительно обеззараженных в соответствии с МУ 1.3. 2569-09 суспензий клеток (10^8 м.к/мл) штаммов *B. pseudomallei* проводили с использованием коммерческого набора реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва), согласно инструкции производителя.

Для проведения мультилокусного VNTR-анализа штаммов *B. pseudomallei* по 4-локусной схеме (S389k, S1788k, L933k и L2341k) использовали олигонуклеотидные праймеры и условия ам-

плификации, предложенные в работе V.J. Currie и соавт. [6]. MLVA-генотип исследуемых штаммов *B. pseudomallei* определяли как совокупность аллельных вариантов каждого локуса и представляли в виде числового паттерна количества повторов по локусам S389k-S1788k-L933k-L2341k. Амплификацию тандемных повторов в составе дополнительного локуса BPSS1974 проводили с помощью разработанных ранее праймеров Burk0090s (5'-ATCGCAATCGGCA TTTCCACCC-3') и Burk0090as (5'-GTGGCGG AGACGACGGTGC-3') при следующих параметрах: 95°C — 10 мин, 40 циклов (94°C — 10 с, 66°C — 20 с, 72°C — 45 с), 72°C — 5 мин [2].

Для определения однонуклеотидных полиморфизмов методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) разработаны праймеры и TaqMan-зонды, нуклеотидные последовательности которых указаны в табл. 2. Амплификацию локусов с однонуклеотидными полиморфизмами проводили на термоциклере роторного типа «Rotor-Gene Q» (Qiagen, Германия) с детекцией флуоресценции по каналам FAM/Green и JOE/Yellow после каждой стадии элонгации. SNP-профиль штаммов *B. pseudomallei* представляли как последовательность нуклеотидов в каждом из четырех локусов — (SNP1-SNP2-SNP3-SNP4).

Нуклеотидные последовательности полученных ампликонов определяли методом капиллярного электрофореза с помощью генетического анализатора «ABI 3130 Genetic Analyzer» (Applied Biosystems, США).

Поиск кандидатных маркерных локусов проводили *in silico* путем множественного выравнивания и сравнительного анализа фрагментов геномов штаммов *B. pseudomallei* из базы данных GenBank NCBI с помощью модуля MUSCLE программы Unipro UGENE v40.0 [17]. Дизайн олигонуклеотидов осуществляли с использованием программного обеспечения Primer3Plus [22] и «OLIGO v6.71» (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, США).

Кластерный анализ и построение дендрограмм проводили при помощи программ FAMD v1.31 [19] и Mega v11.0.11 [21] с использованием коэффициента генетической дистанции Жаккарда (GD_{Jaccard}) и алгоритма объединения ближайших соседей (Neighbor-Joining, NJ). Для оценки вариабельности генетических локусов рассчитывали индекс аллельного полиморфизма (h) [20]. Дискриминирующую способность методов молекулярного типирования определяли на основании расчета индекса Хантера–Гастона (HGDI) [13].

При проведении *in silico* мультилокусного сиквенс-типирования штаммов *B. pseudomallei* из GenBank NCBI использовали базу данных

PubMLST (<https://pubmlst.org/bpseudomallei>). Группы изолятов, сиквенс-типы которых являлись одно- и двухлокусными вариантами (single- and double-locus variants, SLV/DLV), объединяли в клональные комплексы (clonal complexes, CC) с помощью алгоритма goeBURST (<https://www.phyloviz.net/goeburst>).

Результаты

Типирование 85 штаммов *B. pseudomallei* из базы данных GenBank NCBI по схеме MLVA-4 распределило исследованные штаммы по 74

MLVA-типам, 10 из которых включали от двух до трех штаммов и 64 были представлены одним изолятом. По данным MLST среди этих же штаммов обнаружено 57 различных сиквенс-типов, причем 22 из них являлись SLV с образованием 6 клональных комплексов (рис. 1А).

При сопоставлении MLST- и MLVA-профилей определены четыре группы штаммов *B. pseudomallei*. В первые две группы были распределены штаммы с общими сиквенс-типами и имеющие в пределах каждого ST идентичные MLVA-профили (группа ST/MLVA-I) и близкие MLVA-профили, отличающиеся по одному

Таблица 1 Штаммы *B. pseudomallei*, использованные в работе

Table 1. *B. pseudomallei* strains used in the study

Штаммы <i>B. pseudomallei</i> Strains of <i>B. pseudomallei</i>	Источник выделения Selection source	Место и год выделения Place and year of isolation
Tchad 97	больной человек, кровь sick person, blood	Чад, Африка, 1978 Chad, Africa, 1978
Iran Terre 98	больной человек, кровь sick person, blood	Иран, 1978 Iran, 1978
Dalat 100	больной человек, кровь sick person, blood	Далат, Центральный Вьетнам, 1978 Dalat, Central Vietnam, 1978
PI 54 107	нет данных no data	Дания, Копенгаген, 1983 Denmark, Copenhagen, 1983
Pearce 110	больной человек, кровь sick person, blood	Австралия, 1983 Australia, 1983
Skamandri 113	больной человек, мокрота больной человек, sputum	Австралия, 1983 Australia, 1983
128	нет данных no data	Австралия, 1986 Australia, 1986
131	клинический изолят clinical isolate	Таиланд, 1985 Thailand, 1985
132	клинический изолят clinical isolate	Таиланд, 1985 Thailand, 1985
134	клинический изолят clinical isolate	Таиланд, 1985 Thailand, 1985
136	клинический изолят clinical isolate	Таиланд, 1985 Thailand, 1985
51274	больной человек, гнойные абсцессы sick person, purulent abscesses	Вьетнам, 1950 Vietnam, 1950
56738	больной человек, кровь sick person, blood	Вьетнам, 1950 Vietnam, 1950
56770	больной человек, моча sick person, urine	Вьетнам, 1950 Vietnam, 1950
56812	больной человек, кровь sick person, blood	Вьетнам, 1950 Vietnam, 1950
57562	больной человек, гной сустава sick person, joint pus	Вьетнам, 1950 Vietnam, 1950
59361	гной яичка свиньи pig testicle pus	Южный Вьетнам, 1962 South Vietnam, 1962
59426	больной человек, кровь sick person, blood	Вьетнам, 1950 Vietnam, 1950
61503	больной человек, гной подкожного абсцесса sick person, subcutaneous abscess pus	Вьетнам, 1962 Vietnam, 1962
C-141 (CIP 6068)	больной человек, кровь sick person, blood	Сайгон, Вьетнам, 1948 Saigon, Vietnam, 1948

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, сконструированных для определения однонуклеотидных полиморфизмов

Table 2. Nucleotide sequences of primers and probes designed to detect single nucleotide polymorphisms

Локус/Условное обозначение SNPs Locus/Symbol of the SNPs	Наименование праймеров/ зонда Primers/Probe name	Нуклеотидная последовательность (5'→3') Nucleotide sequence (5'→3')
BPSL0211/ SNP1	<i>BpsSNP1s</i> <i>BpsSNP1as</i> <i>BpsSNP1prC</i> <i>BpsSNP1prT</i>	AATCGGGAAAGCAGAGTTG CGTTTCTCAAATTCCTCGC (FAM)-CTCGGCTGGCTGCTCTATCgGATCCCC-(BHQ) (HEX)-CTCGGCTGGCTGCTCTATCaGATCCCC-(BHQ)
BPSL0211/ SNP2	<i>BpsSNP2s</i> <i>BpsSNP2as</i> <i>BpsSNP2prC</i> <i>BpsSNP2prT</i>	CGAGGAATTTGAGAAACGC GACGGAGGATTCGCATG (FAM)-CGTCTCGGCACACgGCTTGC-(BHQ) (HEX)-CGTCTCGGCACACaGCTTGC-(BHQ)
BPSL0504/ SNP3	<i>BpsSNP3s</i> <i>BpsSNP3as</i> <i>BpsSNP3prC</i> <i>BpsSNP3prT</i>	CATCTTCTTCATCGCGCT TATCTCGCCGATTCGCAC (HEX)-AATCGCTCGACGcGCGAGCCGC-(BHQ) (FAM)-AATCGCTCGACGCaCGAGCCGC-(BHQ)
BPSL3430/ SNP4	<i>BpsSNP4s</i> <i>BpsSNP4as</i> <i>BpsSNP4prC</i> <i>BpsSNP4prT</i>	ATCAACTGCGAGCCGAGA CAGTTTCGAGCAGGTGCT (HEX)-CGTCGTCGGATACAGCcCGTCGTCGT-(BHQ) (FAM)-CGTCGTCGGATACAGctCGTCGTCGT-(BHQ)

Примечание. Вариабельные нуклеотиды обозначены строчными буквами.

Note. Variable nucleotides are indicated by lowercase letters.

локусу не более чем на два повтора (группа ST/MLVA-II). Штаммы одного ST, но различающиеся по двум и более VNTR-локусам, были отнесены в группу ST/MLVA-III. Четвертая группа являлась наиболее гетерогенной и включала штаммы, которые в соответствии с их сиквенс-типами объединены в клональные комплексы (ST/MLVA-IV).

В первую группу вошли штаммы с профилем ST975/(4-7-11-2) — MSHR5864 и MSHR6755 (Австралия, 2011 и 2012 гг.); ST126/(3-8-12-9) — MSHR435 и MSHR491 (Австралия, 1996 и 1997 гг.); ST1001/(4-5-3-9) — vgh16R и vgh16W (Тайвань, 2001 г.).

Во вторую группу были включены 11 штаммов, которым соответствовало 4 различных профиля ST/(S389k-S1788k-L933k-L2341k). При этом в трех случаях межштаммовые различия в пределах одного профиля обусловлены вариабельным числом повторов по локусу L933k: ST36/(3-7-8/7-3) — MSHR0305, MSHR520, MSHR3763 и MSHR4083 (Австралия, 1994, 1998 и 2010 гг.); ST553/(6-4-5/3-8) — MSHR5848 и MSHR5855 (Австралия, 2011 г.); ST667/(8-6-6/7-8) — A79A и B03 (Папуа — Новая Гвинея, 2011 г.). Штаммы с сиквенс-типом ST617 различались на 1 повтор по локусу S389k и были представлены профилем ST617/(5/6-9-2-6) — MSHR146, MSHR0511 и NAU20B-16 (Австралия, 1992, 1997 и 2007 гг.).

У штаммов группы ST/MLVA-III по результатам VNTR-типирования выявлена вариабельность числа повторов в каждом из четырех локусов. MLVA-профили штаммов 1106a и 1106b

(Таиланд, 1993 и 1996 гг.) отличались на три повтора по локусу L2341k и имели генотип ST70/(4-6-13-11/8), а отштамма BPC006 (Китай, 2008 г.) дополнительно по локусу S389k — ST70/(3-6-13-5). Штаммы MSHR5858 (Австралия, 2011 г.) и 350105 (Китай, 1976 г.), принадлежавшие к сиквенс-типу ST562, отличались по трем VNTR-локусам (6/8-8-8/11-10/11). Вариабельность MLVA-генотипов австралийских штаммов MSHR1435 и MSHR1655 (2002 и 2003 гг. соответственно), относящихся к сиквенс-типу ST131, обусловлена локусами S389k и S1788k — (4/0-8/9-5-6).

Группу ST/MLVA-IV составили 36 штаммов *B. pseudomallei* 22 сиквенс-типов, распределенных по 6 клональным комплексам. В наибольший по численности клональный комплекс (CC92) вошел 21 штамм *B. pseudomallei* сиквенс-типов ST92, ST95, ST12, ST10, ST518, ST1038, ST297, ST436, ST951 и ST698. В результате MLVA-типирования по 4 вышеназванным VNTR-локусам выявлена принадлежность штаммов CC92 к четырем крупным MLVA-кластерам (A, B, E и J), внутри которых штаммы дифференцировались на группы генотипов. При значении генетической дистанции 0,4 выявлено 11 таких групп — A1, A2, A3, A4, A5, B1, B3, E1, E2, J1 и J3 (рис. 1A).

Анализ результатов MLVA-типирования штаммов клонального комплекса CC92 показал, что сформированные группы в ряде случаев связаны с географическим происхождением штаммов. Так, в группу B1 вошли изолированные от домашних игуан в 2007 и 2013 гг.

в Калифорнии штаммы *B. pseudomallei* 2002734728 и 2013746777 с идентичным VNTR-профилем (6-6-9-2) и отличающиеся от них по локусам S389k и L933k штаммы 2010007509 (Аризона, 2009 г.) и 2011756189 (Швейцария, 2010 г.). При этом штаммы 2010007509 и 2011756189 отличались только по локусу L933k (9-6-8/10-2) и были выделены от больных людей, инфицированных

при посещении Коста-Рики и Мартиники соответственно [10, 11]. Принадлежность штаммов *B. pseudomallei* 2002734728, 2013746777 и 2010007509 к общему сиквенс-типу (ST518) и тот факт, что большинство игуан для торговли США импортируют из Центральной Америки, дают основания предполагать общность происхождения штаммов данной группы.

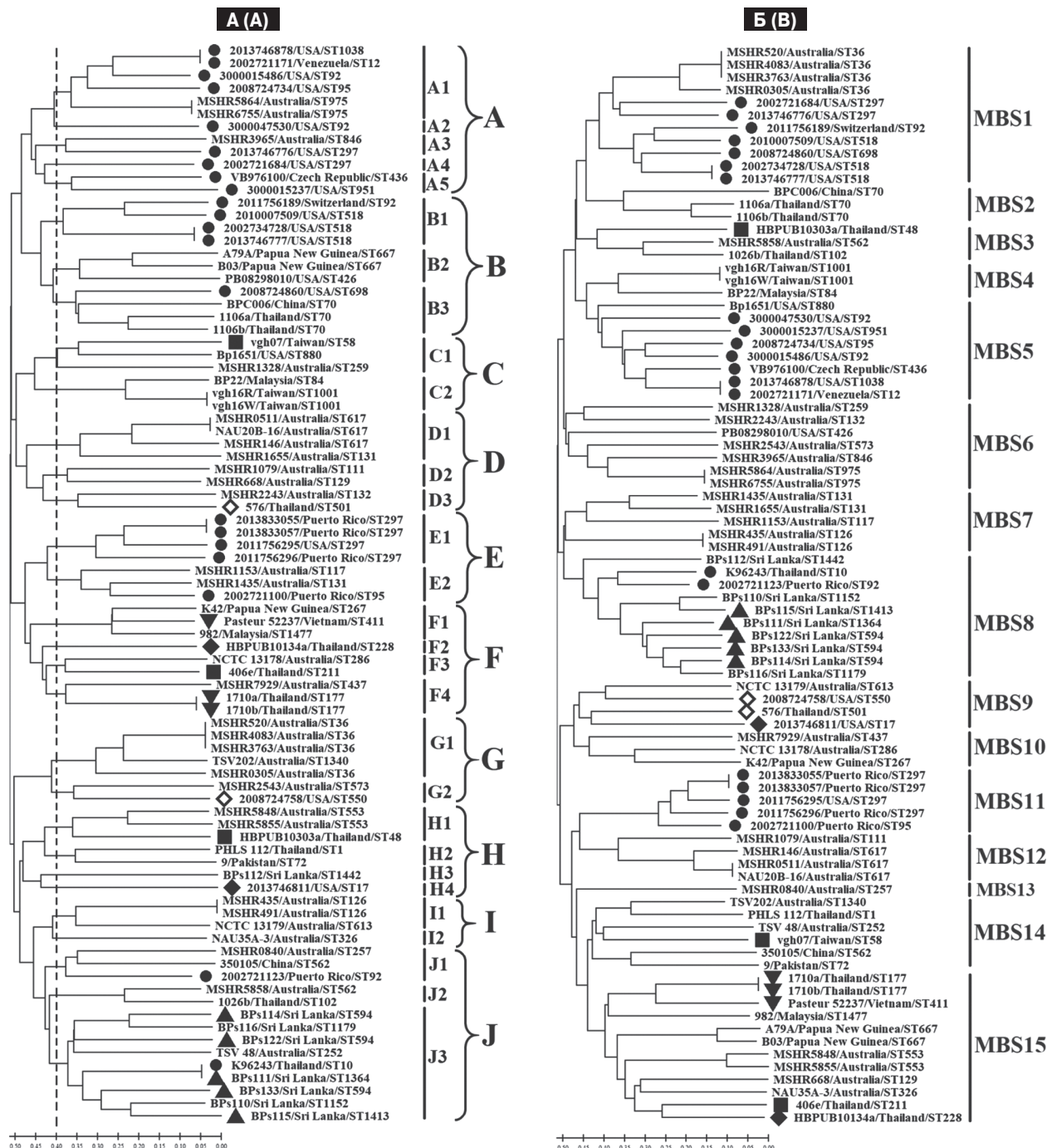


Рисунок 1. Сравнительный анализ результатов типирования 85 штаммов *B. pseudomallei* с помощью схемы MLVA-4 (А) и сочетанного использования схемы MLVA-4, локуса BPSS1974^{#1} и SNP1-4 (Б)

Figure 1. Comparative analysis of 85 *B. pseudomallei* strains typing by using the MLVA-4 scheme (A) as well as combined use of the MLVA-4 scheme, the BPSS1974^{#1} locus, and SNP1-4 (B)

Примечание. Штаммы одного клонального комплекса отмечены одинаковыми пиктограммами.

Note. Same clonal complex strains are denoted with similar pictograms.

В группу A1 по результатам MLVA-4 анализа объединены штаммы возбудителя мелиоидоза, выделенные в Венесуэле (*B. pseudomallei* 2002721171) и от больных людей в США, посещавших Гватемалу (*B. pseudomallei* 2013746878) и Мексику (*B. pseudomallei* 2008724734 и 3000015486). При этом штаммы из Венесуэлы и Гватемалы имели идентичный VNTR-профиль (5-5-11-2) и отличались по локусу S389k от штамма *B. pseudomallei* 3000015486 (4-5-11-2), а от штамма *B. pseudomallei* 2008724734 дополнительно по локусу L933k (4-5-15-2). Несмотря на близость VNTR-профилей, все штаммы из этой группы принадлежали к разным сиквенс-типам (ST12, ST1038, ST95, ST92).

Все штаммы группы E1 относились к сиквенс-типу ST297. В нее вошли клинический и два почвенных штамма, выделенные в Пуэрто-Рико, а также один штамм от пациента в США, посещавшего Республику Тринидад и Тобаго. Почвенные штаммы *B. pseudomallei* 2013833055 и 2013833057 имели одинаковый VNTR-профиль (4-10-12-6), который отличался от профилей клинических штаммов по локусам L933k и L2341k: *B. pseudomallei* 2011756296 (4-10-9-6) и *B. pseudomallei* 2011756295 (4-10-12-3).

К группе A5 с VNTR-профилем (6/8-5-16/19-2) были отнесены штаммы *B. pseudomallei* VB976100 (ST436) и 3000015237 (ST951), выделенные соответственно от зеленой игуаны в Праге и от больного человека в США, посещавшего Мексику.

Остальные штаммы клонального комплекса CC92, отнесенные по результатам VNTR-типирования к MLVA-кластерам A, B и E, были представлены на дендрограмме отдельными ветвями (A2, A4) или формировали общие группы со штаммами других сиквенс-типов (A3, B3 и E2). Вместе с тем два других штамма этого клонального комплекса — *B. pseudomallei* 2002721123 и K96243 — вошли в состав дистанцированного MLVA-кластера J. При этом в группу J3 наряду со штаммом *B. pseudomallei* K96243 были объединены 7 штаммов возбудителя мелиоидоза, выделенные в 2015 г. от больных людей в Шри-Ланке, в том числе 5 штаммов клонального комплекса (ST1364-ST594-ST1413). Для штаммов из других 4 клональных комплексов явной взаимосвязи VNTR-профилей с географическим происхождением выявлено не было.

Вариабельность VNTR-профилей у исследованных штаммов *B. pseudomallei* в ряде случаев была обусловлена не только копийностью мотива в составе минисателлитного локуса, но и INDELL-мутациями в составе коровой единицы. Так, аллельные варианты локусов S389k, L933k и L2341k у выделенных в 2015 г. в Шри-Ланке клинических изолятов обусловлены делециями нуклеотидов. При этом штамм *B. pseudomallei* BPs112 в результате делеции

трех нуклеотидов в коровой единице локуса L933k был отнесен к MLVA-кластеру H, в составе которого сформировал отдельную ветвь с *B. pseudomallei* 2013746811 (США, 2013 г.).

Анализ аллельного полиморфизма продемонстрировал высокую вариабельность локусов L933k и L2341k, для которых установлено наличие 20 ($h = 0,906$) и 16 аллелей ($h = 0,877$) соответственно. Локусы S389k ($h = 0,799$) и S1788k ($h = 0,825$) были представлены 10 вариантами каждый. Значение индекса Хантера–Гастона составило 0,997, что демонстрирует очень высокую разрешающую способность метода.

Полученные данные свидетельствуют о широком диапазоне аллельного разнообразия и высокой скорости мутирования VNTR-локусов, что ограничивает возможность схемы MLVA-4 для определения географических и филогенетических связей изолятов возбудителя мелиоидоза. В связи с этим был проведен поиск более консервативных локусов, включение которых в схему MLVA-4 позволит добиться большей точности в определении степени генетического родства изучаемых штаммов.

В качестве такого VNTR-маркера выбран минисателлит-содержащий регион в составе локуса BPSS1974 штамма *B. pseudomallei* K96243, аннотированного в базе данных GenBank NCBI как ген коллагеноподобного белка. Обнаруженный регион был обозначен как BPSS1974^{#1} и представлял собой вырожденный 9-нуклеотидный мотив $(TCX_1GGX_2ACX_3)_n$, где $X_1/X_2/X_3$ — вариабельные нуклеотидные позиции, n — число повторов. Мутации типа транзиций и трансверсий в положениях X_1 , X_2 и X_3 мотива соответствовали третьим позициям кодонов, кодирующих пептид $(Ser-Gly-Thr)_n$ и не приводили к замене аминокислот ($dN/dS = 0$), что свидетельствует о действии стабилизирующего отбора. У проанализированных 85 штаммов *B. pseudomallei* из базы данных GenBank NCBI в соответствии с копийностью мотива в составе локуса BPSS1974^{#1} выявлено 20 аллельных вариантов ($h = 0,8$).

В качестве кандидатных SNP-маркеров выбраны последовательности генов лауроилацилтрансферазы биосинтеза липида-A [Gene ID: 3093529 (BPSL0211)] — обозначены нами как SNP1 и SNP2; сигма-фактора RpoH РНК-полимеразы [Gene ID: 3094670 (BPSL0504)] — обозначен как SNP3; глутаминамидотрансферазы [Gene ID: 3091795 (BPSL3430)] — обозначен как SNP4 (табл. 2). Типирование этой же выборки штаммов с использованием предлагаемого набора однонуклеотидных полиморфизмов выявило 13 SNP-паттернов.

Сравнение генетических профилей по локусам BPSS1974^{#1} и SNP1–4 показало их идентичность у всех штаммов, принадлежащих одному сиквенс-типу и имеющих общий регион

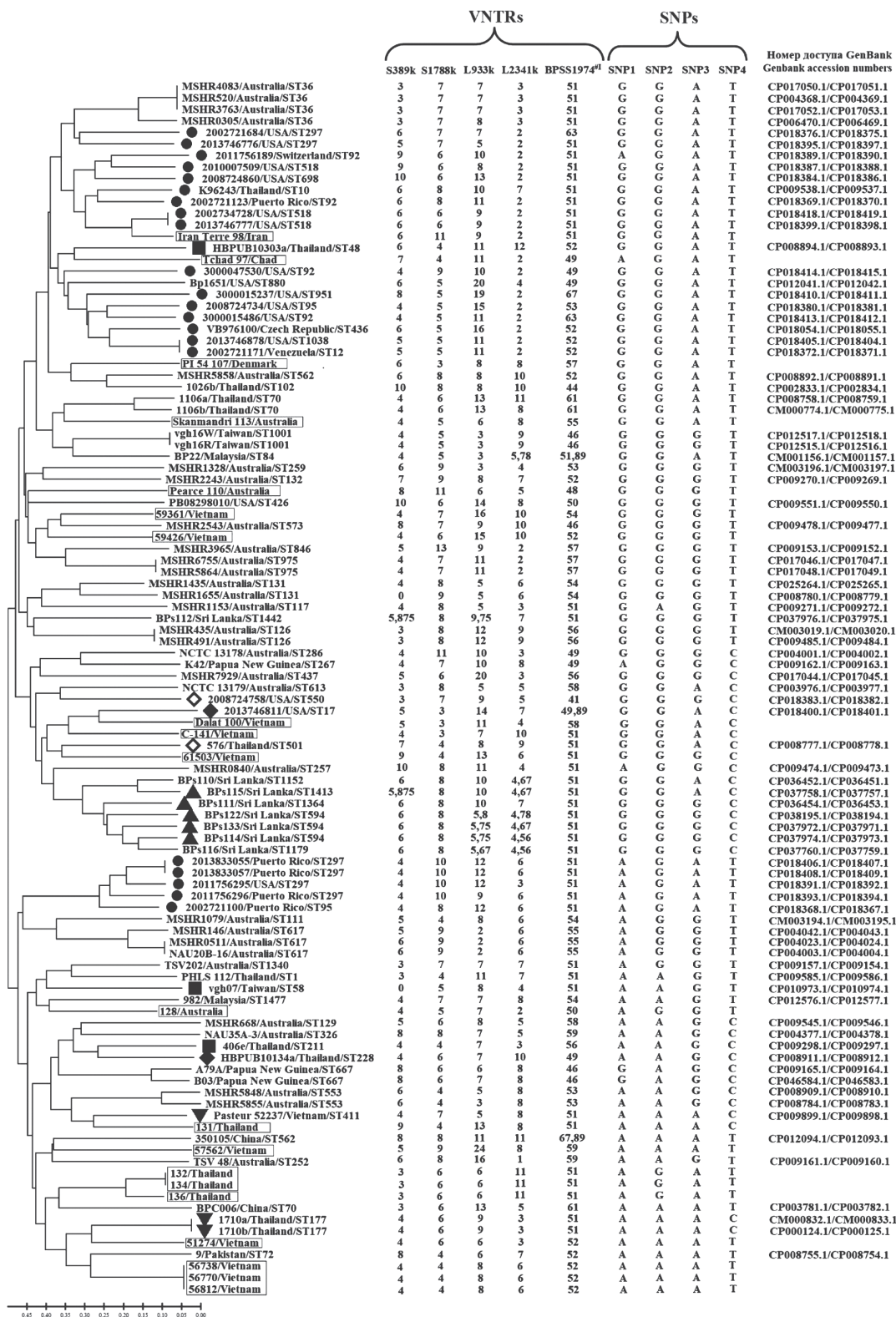


Рисунок 2. Дендрограмма, построенная с помощью алгоритма Neighbor-Joining, по результатам типирования 105 штаммов *B. pseudomallei* с использованием данных комплексного анализа на основе молекулярных маркеров 5 VNTR- и 4 SNP-локусов

Figure 2. Dendrogram constructed by using the Neighbor-Joining algorithm based on the results of 105 *B. pseudomallei* strains typing with complex analysis data using molecular markers of 5 VNTR and 4 SNP loci

Примечание. Штаммы одного клонального комплекса отмечены одинаковыми пиктограммами. Рамками обозначены штаммы из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Note. Same clonal complex strains are denoted with similar pictograms. The strains from the collection of the Volgograd Plague Control Research Institute are depicted in boxes.

выделения. Штаммы из одного клонального комплекса обладали по предлагаемым локусам идентичными или близкими профилями. Так, на основании полученных паттернов штаммы *B. pseudomallei* 1710a и 1710b (Таиланд, 1996 г. и 1999 г.) и *B. pseudomallei* Pasteur 52237 (Вьетнам, 1964 г) клонального комплекса ST177-ST411, отличающиеся по схеме MLVA-4 по трем VNTR-локусам, отнесены к одному генотипу. Штаммы клонального комплекса ST1364-ST594-ST1413, изолированные от больных людей на Шри-Ланке, также обладали идентичными профилями по локусам BPSS1974^{#1} и SNP1-4 за исключением *B. pseudomallei* BPs115, который отличался по локусу SNP3.

У штаммов клонального комплекса CC92 установлено шесть аллельных вариантов по локусу BPSS1974^{#1} и два SNP профиля, различающиеся по локусу SNP1 — (G/A-G-A-T). При этом SNP-профиль (A-G-A-T) был обнаружен только у почвенных и клинических штаммов, выделенных в Пуэрто-Рико (*B. pseudomallei* 2013833055, 2013833057, 2011756296 и 2002721100), а также от посещавших соседние острова туристов (*B. pseudomallei* 2011756295 и 2011756189). Аллельный вариант локуса BPSS1974^{#1} с числом повторов 52 выявлен среди штаммов CC92 только у *B. pseudomallei* 2013746878, 2002721171 и VB976100, что наряду с идентичным SNP-профилем (G-G-A-T) позволило выделить их в отдельную группу.

Интересно, что штаммы *B. pseudomallei* 1106a, 1106b (Таиланд) и BPC006 (Китай) группы ST/MLVA-III, принадлежащие к ST70, имели в локусе BPSS1974^{#1} 61 повтор, но отличались по локусам SNP1 и SNP2 в зависимости от региона выделения: для штаммов из Таиланда установлен SNP-профиль (G-G-A-T), а из Китая — (A-A-A-T). Необходимо отметить, что SNP-профиль (A-A-A-T) обнаружен всего у трех штаммов исследованной выборки, выделенных в соседних Китае у *B. pseudomallei* BPC006 (ST70) и 350105 (ST562) и Пакистане — *B. pseudomallei* 9 (ST72), причем ST562 и ST72 представляли собой двухлокусные варианты друг друга, тогда как ST70 отличался по всем аллелям.

Дополненная локусами BPSS1974^{#1} и SNP1-4 схема MLVA-4, обозначенная как MBS (MLVA-4, BPSS1974^{#1}, SNP1-4), позволила более точно разделить штаммы *B. pseudomallei* в соответствии с регионом их происхождения (рис. 1Б). Так, штаммы клонального комплекса CC92 были распределены по четырем отдельным кластерам с определенной географической приуроченностью. Наиболее крупные из них — MBS1 и MBS5 — объединяли штаммы из стран Центральной Америки, Мексики, Венесуэлы и островов Карибского бассейна, завезенные в США и Европу. Кластер MBS11 вклю-

чал штаммы из Пуэрто-Рико и Республики Тринидад и Тобаго. В самостоятельную ветвь внутри кластера MBS8 выделены штаммы *B. pseudomallei* 2002721123 (Пуэрто-Рико, 1998 г.) и K96243 (Таиланд, 1999 г.).

Штаммы из MLVA-кластера F по схеме MBS разделились на три разные группы, коррелирующие с их географическим происхождением и сиквенс-типами. Так, в отдельную группу выделены тайские штаммы *B. pseudomallei* 406e и HVPUB10134a, сиквенс-типы которых являлись двухлокусными вариантами. Штаммы 1710a, 1710b и Pasteur 52237 клонального комплекса ST177-ST411, изолированные в Таиланде и Вьетнаме, кластеризовались вместе с малайзийским штаммом *B. pseudomallei* 982. При этом обе группы вошли в состав кластера MBS15, в то время как третья группа штаммов из Австралии (*B. pseudomallei* NCTC_13178 и MSHR7929) и Папуа — Новой Гвинеи (*B. pseudomallei* K42) сформировали отдельный кластер MBS10.

Применение схемы MBS позволило выделить штаммы из Австралии в три отдельных кластера — MBS6, MBS7 и MBS12, в каждом из которых штаммы имели идентичные SNP-профили, но отличались по VNTR-локусам. Исключение составил лишь клинический штамм *B. pseudomallei* MSHR1153, отличающийся от доминирующего генотипа кластера MBS7 по локусу SNP2. У трех штаммов кластера MBS6 (*B. pseudomallei* MSHR3965, MSHR5864 и MSHR6755) в локусе BPSS1974^{#1} идентифицировано одинаковое число повторов, что позволило выделить их в отдельную группу этого кластера.

Разработанная схема типирования была экспериментально апробирована на коллекционных штаммах *B. pseudomallei* различного географического происхождения (табл. 1).

На основании комплексного анализа VNTR-и SNP-локусов, входящих в состав предлагаемой схемы MBS, проведено типирование 105 штаммов возбудителя мелиоидоза, включая 20 коллекционных (рис. 2). При этом характер кластеризации 85 штаммов *B. pseudomallei* из базы данных GenBank NCBI сохранялся, что свидетельствует о применимости разработанного методического подхода для филогенетического анализа при проведении эпидемиологического расследования случаев заболевания.

Обсуждение

Молекулярное типирование возбудителя мелиоидоза осуществляется с применением ряда методов, заключающихся в анализе отдельных генетических локусов, их комплексов или определении полной последовательности геномов. Вместе с тем использование отдельных подхо-

дов или их сочетания требует осторожности, поскольку установленная для *B. pseudomallei* высокая частота гомологичной рекомбинации между штаммами может не отражать эволюционную историю отдельных генов [5, 16].

Сочетание филогенетической информативности однонуклеотидных полиморфизмов и дискриминирующей способности метода MLVA позволило разработать схему из 4 SNP- и 5 VNTR-локусов, обозначенную как MBS. Предложенная схема в большинстве случаев обеспечивает группирование штаммов возбудителя мелиоидоза в зависимости от общности их географического происхождения. Показательно, что штаммы *B. pseudomallei* из стран Западного полушария сформировали три группы, конкретизирующие регион их происхождения: в одну группу вошли штаммы из Пуэрто-Рико и Республики Тринидад и Тобаго, а две другие были представлены завозными случаями преимущественно из Мексики, Центральной Америки и островов Карибского бассейна. Подобное распределение штаммов *B. pseudomallei* показано в работе J.E. Gee и соавт. [10] на основании анализа SNP-полиморфизмов всего генома. Примечательно, что как на уровне полного генома, так и по 9 локусам предложенной схемы MBS, штаммы из Мексики обладают большим генетическим разнообразием в сравнении с пуэрториканскими.

В нашем исследовании штаммы *B. pseudomallei* 2002721171 (ST12) и 2013746878 (ST1038), выделенные соответственно в Венесуэле и от посетившего Гватемалу пациента из США, кластеризовались вместе со штаммом VB976100 (ST436) неизвестного происхождения, изолированного в Праге из абсцесса зеленой игуаны [8]. Ранее сиквенс-тип ST436 был идентифицирован только у двух штаммов из Центральной Америки (Гватемалы и Перу). В соответствии со схемой MBS *B. pseudomallei* 2013746878 и 2002721171 имели идентичный генотип и отличались от *B. pseudomallei* VB976100 только по локусам S389k и L933k, что свидетельствовало в пользу центральноамериканского происхождения штамма VB976100.

Связь образованных групп с географическим происхождением штаммов дает основание рассматривать схему MBS в качестве полезного инструмента при расследовании случаев мелиоидоза у пациентов с неясной историей путешествий в эндемичные стра-

ны. Так, штаммы *B. pseudomallei* 2008724758, PB08298010 и 2013746811 выделены от больных, никогда не выезжавших за пределы континентальной части США [7, 9, 18], тем не менее проведенное типирование показало происхождение этих штаммов за пределами Западного полушария [10].

Существенный интерес представляет перспективность использования схемы MBS для оценки генетического разнообразия *B. pseudomallei* на эндемичных территориях. Так, результаты проведенного нами генотипирования штаммов, выделенных во время вспышки мелиоидоза в восточной части Шри-Ланки в 2015 г., полностью соответствовали результатам полногеномного анализа H.S. Jayasinghearachchi и соавт. [14].

Одной из проблем при проведении генотипирования является скрытый полиморфизм, обусловленный отсутствием продукта амплификации. Так, в ходе исследования выявлено отсутствие VNTR-локуса S389k у *B. pseudomallei* MSHR1655 (ST131), изолированного от больного в Австралии, который по схеме MLVA-4 кластеризовался с австралийскими штаммами ST617, выделенными из объектов окружающей среды. Вместе с тем при сравнении аллельных профилей по трем остальным локусам схемы MLVA-4 установлено, что VNTR-профиль MSHR1655 отличался на три повтора по локусу L933k от штаммов ST617, а от почвенного изолята MSHR1435 того же ST131, выделенного в Австралии годом ранее — на один повтор по локусу S1788k. Включение в схему MLVA-4 дополнительных молекулярных маркеров позволило выделить штаммы MSHR1655 и MSHR1435 в отдельную кластерную группу на основе идентичности их профилей по локусам BPSS1974^{#1} и SNP1–4.

Таким образом, предложен комплексный подход для типирования *B. pseudomallei*, позволяющий на основании MLVA-профилей осуществлять дифференциацию штаммов *B. pseudomallei* внутри SNP-групп, что может рассматриваться как эффективный способ для установления филогеографических взаимосвязей штаммов. Разработанный методический подход к генетическому типированию *B. pseudomallei*, основанный на сочетанном анализе SNP- и MLVA-маркеров, позволяет дифференцировать штаммы в соответствии с географическими регионами их происхождения и устанавливать клональность случаев мелиоидоза.

Список литературы/References

1. Онищенко Г.Г., Топорков А.В., Липницкий А.В., Викторов Д.В. Проблемы противодействия биологическому терроризму на современном этапе // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. 2016. Т. 1, № 14. С. 24–31. [Onishchenko G.G., Toporkov A.V., Lipnitsky A.V., Viktorov D.V. Problems of counteraction to biological terrorism at the present stage. *Infektsionnye bolezni: Novosti. Mneniya. Obuchenie* = *Infectious Diseases: News. Opinions. Training*, 2016, vol. 1, no. 14, pp. 24–31. (In Russ.)]

2. Патент № 2545702 Российская Федерация, МПК C12Q 1/68 (2006.01). Олигонуклеотидные праймеры Burk0090s/Burk0090as для оценки адаптационной изменчивости генома патогенных буркхолдерий: № 2013135429/10; заявлено 2013.07.26: опубликовано 10.04.2015. Бюл. № 10 / Савченко С.С., Ткаченко Г.А., Бондарева О.С., Шпак И.М., Леденева М.Л., Антонов В.А. Патентообладатель: Федеральное казенное учреждение здравоохранения Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 7 с. [Patent No. 2545702 Russian Federation, Int. Cl. C12Q 1/68 (2006.01). Oligonucleotide primers Burk0090s/Burk0090as for assessment of adaptive variability of genome of pathogenic burkholderia. No. 2013135429/10; application: 2013.07.26: date of publication 10.04.2015 / Savchenko S.S., Tkachenko G.A., Bondareva O.S., Shpak I.M., Ledeneva M.L., Antonov V.A. Proprietors: FSHE Volgograd Anti-Plague Institute of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare. 7 p.]
3. Aziz A., Sarovich D.S., Harris T.M., Kaestli M., McRobb E., Mayo M., Currie B.J., Price E.P. Suspected cases of intracontinental Burkholderia pseudomallei sequence type homoplasmy resolved using whole-genome sequencing. *Microb. Genom.*, 2017, vol. 3, no. 11: e000139. doi: 10.1099/mgen.0.000139
4. Baker A., Pearson T., Price E.P., Dale J., Keim P., Hornstra H., Greenhill A., Padilla G., Warner J. Molecular phylogeny of Burkholderia pseudomallei from a remote region of Papua New Guinea. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 3: e18343 doi: 10.1371/journal.pone.0018343
5. Challacombe J.F., Stubben C.J., Klimko C.P., Welkos S.L., Kern S.J., Bozue J.A., Worsham P.L., Cote C.K., Wolfe D.N. Interrogation of the Burkholderia pseudomallei genome to address differential virulence among isolates. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 12: e115951. doi: 10.1371/journal.pone.0115951
6. Currie B.J., Haslem A., Pearson T., Hornstra H., Leadem B., Mayo M., Gal D., Ward L., Godoy D., Spratt B.G., Keim P. Identification of melioidosis outbreak by multilocus variable number tandem repeat analysis. *Emerg. Infect. Dis.*, 2009, vol. 15, no. 2, pp. 169–174. doi: 10.3201/eid1502.081036
7. Doker T.J., Quinn C.L., Salehi E.D., Sherwood J.J., Benoit T.J., Glass Elrod M., Gee J.E., Shadomy S.V., Bower W.A., Hoffmaster A.R., Walke H.T., Blaney D.D., DiOrio M.S., Melioidosis Investigation Team. Fatal Burkholderia pseudomallei infection initially reported as a Bacillus species, Ohio, 2013. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2014, vol. 91, no. 4, pp. 743–746. doi: 10.4269/ajtmh.14-0172
8. Elschner M.C., Hnizdo J., Stamm I., El-Adawy H., Mertens K., Melzer F. Isolation of the highly pathogenic and zoonotic agent Burkholderia pseudomallei from a pet green Iguana in Prague, Czech Republic. *BMC Vet. Res.*, 2014, vol. 10: 283. doi: 10.1186/s12917-014-0283-7
9. Engelthaler D.M., Bowers J., Schupp J.A., Pearson T., Ginther J., Hornstra H.M., Dale J., Stewart T., Sunenshine R., Waddell V., Levy C., Gillice J., Price L.B., Contente T., Beckstrom-Sternberg S.M., Blaney D.D., Wagner D.M., Mayo M., Currie B.J., Keim P., Tuanyok A. Molecular investigations of a locally acquired case of melioidosis in Southern A.Z., USA. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2011, vol. 5, no. 10: e1347. doi: 10.1371/journal.pntd.0001347
10. Gee J.E., Gulvik C.A., Elrod M.G., Batra D., Rowe L.A., Sheth M., Hoffmaster A.R. Phylogeography of Burkholderia pseudomallei isolates, Western Hemisphere. *Emerg. Infect. Dis.*, 2017, vol. 23, no. 7, pp. 1133–1138. doi: 10.3201/eid2307.161978
11. Gétaz L., Abbas M., Loutan L., Schrenzel J., Iten A., Simon F., Decosterd A., Studer R., Sudre P., Michel Y., Merlani P., Emonet S. Fatal acute melioidosis in a tourist returning from Martinique Island, November 2010. *Euro Surveill.*, 2011, vol. 16, no. 1: 19758.
12. Gilad J., Harary I., Dushnitsky T., Schwartz D., Amsalem Y. Burkholderia mallei and Burkholderia pseudomallei as bioterrorism agents: national aspects of emergency preparedness. *Isr. Med. Assoc. J.*, 2007, vol. 9, no. 7, pp. 499–503.
13. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.*, 1988, vol. 26, no. 11, pp. 2465–2466. doi: 10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988
14. Jayasinghearachchi H.S., Francis V.R., Sathkumara H.D., Krishnananthasivam S., Masakorala J., Muthugama T., De Silva A.D., Corea E.M. Nonclonal Burkholderia pseudomallei population in melioidosis case cluster, Sri Lanka. *Emerg. Infect. Dis.*, 2021, vol. 27, no. 11, pp. 2955–2957. doi: 10.3201/eid2711.210219
15. Limmathurotsakul D., Golding N., Dance D.A., Messina J.P., Pigott D.M., Moyes C.L., Rolim D.B., Bertherat E., Day N.P., Peacock S.J., Hay S.I. Predicted global distribution of Burkholderia pseudomallei and burden of melioidosis. *Nat. Microbiol.*, 2016, vol. 1: 15008. doi: 10.1038/nmicrobiol.2015.8
16. Nandi T., Ong C., Singh A.P., Boddey J., Atkins T., Sarkar-Tyson M., Essex-Lopresti A.E., Chua H.H., Pearson T., Kreisberg J.F., Nilsson C., Ariyaratne P., Ronning C., Losada L., Ruan Y., Sung W.K., Woods D., Titball R.W., Beacham I., Peak I., Keim P., Nierman W.C., Tan P. A genomic survey of positive selection in Burkholderia pseudomallei provides insights into the evolution of accidental virulence. *PLoS Pathog.*, 2010, vol. 6, no. 4: e1000845. doi: 10.1371/journal.ppat.1000845
17. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 2012, vol. 28, no. 8, pp. 1166–1167. doi: 10.1093/bioinformatics/bts091
18. Sarovich D.S., Garin B., De Smet B., Kaestli M., Mayo M., Vandamme P., Jacobs J., Lompo P., Tahita M.C., Tinto H., Djaomalaza I., Currie B.J., Price E.P. Phylogenomic analysis reveals an Asian origin for African Burkholderia pseudomallei and further supports melioidosis endemicity in Africa. *mSphere*, 2016, vol. 1, no. 2: e00089-15. doi: 10.1128/mSphere.00089-15
19. Schluter P.M., Harris S.A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular. Ecology. Notes*, 2006, vol. 6, no. 2, pp. 569–572.
20. Selander R.K., Caugant D.A., Ochman H., Musser J.M., Gilmour M.N., Whittam T.S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, vol. 51, no. 5, pp. 873–884. doi: 10.1128/aem.51.5.873-884.1986
21. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.*, 2021, vol. 38, no. 7, pp. 3022–3027. doi: 10.1093/molbev/msab120
22. Untergasser A., Nijveen H., Rao X., Bisseling T., Geurts R., Leunissen J.A. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.*, 2007, vol. 35 (Web Server issue): W71–74. doi: 10.1093/nar/gkm306

23. U'Ren J.M., Schupp J.M., Pearson T., Hornstra H., Friedman C.L., Smith K.L., Daugherty R.R., Rhoton S.D., Leadem B., Georgia S., Cardon M., Huynh L.Y., DeShazer D., Harvey S.P., Robison R., Gal D., Mayo M.J., Wagner D., Currie B.J., Keim P. Tandem repeat regions within the *Burkholderia pseudomallei* genome and their application for high resolution genotyping. *BMC Microbiol.*, 2007, vol. 7: 23. doi: 10.1186/1471-2180-7-23
24. Wiersinga W.J., Currie B.J., Peacock S.J. Melioidosis. *N. Engl. J. Med.*, 2012, vol. 367, no. 11, pp. 1035–1044. doi: 10.1056/NEJMra1204699
25. Zhu X., Chen H., Li S., Wang L.C., Wu D.R., Wang X.M., Chen R.S., Li Z.J., Liu Z.G. Molecular characteristics of *Burkholderia pseudomallei* collected from humans in Hainan, China. *Front. Microbiol.*, 2020, vol. 11: 778. doi: 10.3389/fmicb.2020.00778

Авторы:

Леденева М.Л., научный сотрудник лаборатории генодиагностики ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;
Ткаченко Г.А., к.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории генодиагностики ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград, Россия;
Захарова И.Б., к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории патогенных буркхольдерий, г. Волгоград, Россия.

Authors:

Ledenyova M.L., Scientific Researcher of the Laboratory of Gene Diagnostics, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation;
Tkachenko G.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Gene Diagnostics, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation
Zakharova I.B., PhD (Biology), Associate Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Pathogenic *Burkholderia*, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russian Federation.

Поступила в редакцию 30.05.2022
Принята к печати 11.06.2022

Received 30.05.2022
Accepted 11.06.2022