

НОВЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI.

Леденева М.Л.¹

Ткаченко Г.А.¹

Захарова И.Б.²

¹Лаборатория генодиагностики ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

²Лаборатория патогенных буркхольдерий ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

NEW GENETIC MARKERS FOR BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI STRAINS TYPING.

Ledenyova M.L.^a

Tkachenko G.A.^a

Zakharova I.B.^b

^aLaboratory of gene diagnostics Volgograd Plague Control Research Institute.

^bLaboratory of pathogenic *Burkholderia* Volgograd Plague Control Research Institute.

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 тандемных повторов (MLVA), в сочетании с медленно эволюционирующими единичными нуклеотидными полиморфизмами (SNPs). Целью настоящей работы являлось 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 типированию *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.

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.

1 **Введение**

2 *Burkholderia pseudomallei* является этиологическим агентом мелиоидоза
3 – особо опасного заболевания людей и животных с высокой летальностью. По
4 оценочным данным в мире от мелиоидоза ежегодно погибает около 89 000
5 человек [15]. В настоящее время эндемичными по мелиоидозу признано около
6 50 стран, расположенных между 30-ми параллелями всех континентов, и этот
7 список продолжает пополняться. Возможный занос с эндемичных территорий
8 возбудителей редких инфекционных заболеваний является актуальной
9 проблемой общественного здравоохранения.

10 В связи с высокой вирулентностью, низкой инфицирующей дозой и
11 отсутствием эффективных вакцин возбудитель мелиоидоза включен в список
12 потенциальных агентов биотерроризма как в Российской Федерации, так и за
13 рубежом, что определяет необходимость развития технологий молекулярного
14 типирования для определения клонального происхождения изолятов [1, 12,
15 24].

16 Востребованным подходом для оценки генетического разнообразия
17 штаммов *B. pseudomallei* является метод мультилокусного анализа числа
18 переменных тандемных повторов – MLVA (Multiple-Locus Variable Number
19 Tandem Repeat Analysis), основанный на использовании переменных по
20 копияности микро- и минисателлитных повторов (Variable Number Tandem
21 Repeats, VNTRs) [25]. Подбор переменных локусов и определение их
22 количества в схеме типирования являются критичными для оценки
23 результатов анализа. При этом увеличение количества анализируемых VNTR-
24 локусов может приводить к выявлению уникальных аллелей, которые скорее
25 будут оценивать не популяционно-генетическую изменчивость, а
26 изменчивость самого маркера. Так, предложенная J.M. U'Ren с соавт. [23] 32-
27 локусная схема MLVA-типирования дифференцирует близкородственные
28 штаммы, включая последовательные изоляты от одного больного, что может
29 повлечь получение искаженных данных, например, при определении

30 характера вспышки и ее наиболее вероятного источника. С другой стороны,
31 сокращение схем MLVA-типирования снижает дискриминирующую
32 способность метода, в результате чего возрастает вероятность получения
33 схожих профилей у неродственных штаммов в результате гомоплазии.

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

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

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

48 **Материалы и методы**

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

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

55 Экстракцию нуклеиновых кислот из предварительно обеззараженных в
56 соответствии с МУ 1.3. 2569-09 суспензий клеток (10^8 м.к/мл) штаммов

57 *B. pseudomallei* проводили с использованием коммерческого набора реагентов
58 «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва),
59 согласно инструкции производителя.

60 Для проведения мультилокусного VNTR-анализа штаммов
61 *B. pseudomallei* по 4-локусной схеме (S389k, S1788k, L933k и L2341k)
62 использовали олигонуклеотидные праймеры и условия амплификации,
63 предложенные в работе В.Ж. Currie с соавт. [6]. MLVA-генотип исследуемых
64 штаммов *B. pseudomallei* определяли как совокупность аллельных вариантов
65 каждого локуса и представляли в виде числового паттерна количества
66 повторов по локусам S389k-S1788k-L933k-L2341k. Амплификацию
67 тандемных повторов в составе дополнительного локуса BPSS1974 проводили
68 с помощью разработанных ранее праймеров Burk0090s
69 (5'-ATCGCAATCGGCATTTCCACCC-3') и Burk0090as
70 (5'-GTGGCGGAGACGACGGTGC-3') при следующих параметрах: 95 °С – 10
71 мин, 40 циклов (94 °С – 10 с, 66 °С – 20 с, 72 °С – 45 с), 72 °С - 5 мин [2].

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

82 Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов,
83 сконструированных для определения однонуклеотидных полиморфизмов
84 Примечание. Вариабельные нуклеотиды обозначены строчными буквами

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

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

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

102 При проведении *in silico* мультилокусного сиквенс-типирования
103 штаммов *B. pseudomallei* из GenBank NCBI использовали базу данных
104 PubMLST (<https://pubmlst.org/bpseudomallei>). Группы изолятов, сиквенс-типы
105 которых являлись одно- и двухлокусными вариантами (single- and double-locus
106 variants, SLV/DLV), объединяли в клональные комплексы (clonal complexes,
107 CC) с помощью алгоритма goeBURST (<https://www.phyloviz.net/goeburst>).

108 **Результаты исследований**

109 Типирование 85 штаммов *B. pseudomallei* из базы данных GenBank NCBI
110 по схеме MLVA-4 распределило исследованные штаммы по 74 MLVA-типам,
111 10 из которых включали от двух до трех штаммов и 64 были представлены
112 одним изолятом. По данным MLST среди этих же штаммов обнаружено 57

113 различных сиквенс-типов, причем 22 из них являлись SLV с образованием 6
114 клональных комплексов (рис. 1а).

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

118 Примечание. Штаммы одного клонального комплекса отмечены
119 одинаковыми пиктограммами

120 При сопоставлении MLST- и MLVA-профилей определены четыре
121 группы штаммов *B. pseudomallei*. В первые две группы были распределены
122 штаммы с общими сиквенс-типами и имеющие в пределах каждого ST
123 идентичные MLVA-профили (группа ST/MLVA-I) и близкие MLVA-профили,
124 отличающиеся по одному локусу не более чем на два повтора (группа
125 ST/MLVA-II). Штаммы одного ST, но различающиеся по двум и более
126 VNTR-локусам, были отнесены в группу ST/MLVA-III. Четвертая группа
127 являлась наиболее гетерогенной и включала штаммы, которые в соответствии
128 с их сиквенс-типами объединены в клональные комплексы (ST/MLVA-IV).

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

133 Во вторую группу были включены 11 штаммов, которым
134 соответствовало 4 различных профиля ST/(S389k-S1788k-L933k-L2341k). При
135 этом в трех случаях межштаммовые различия в пределах одного профиля
136 обусловлены переменным числом повторов по локусу L933k:
137 ST36/(3-7-8/7-3) – MSHR0305, MSHR520, MSHR3763 и MSHR4083
138 (Австралия, 1994, 1998 и 2010 гг.); ST553/(6-4-5/3-8) – MSHR5848 и
139 MSHR5855 (Австралия, 2011 г.); ST667/(8-6-6/7-8) – A79A и B03 (Папуа-Новая
140 Гвинея, 2011 г.). Штаммы с сиквенс-типом ST617 различались на 1 повтор по

141 локусу S389k и были представлены профилем ST617/(5/6-9-2-6) – MSHR146,
142 MSHR0511 и NAU20B-16 (Австралия, 1992, 1997 и 2007 гг.).

143 У штаммов группы ST/MLVA-III по результатам VNTR-типирования
144 выявлена вариабельность числа повторов в каждом из четырех локусов.
145 MLVA-профили штаммов 1106a и 1106b (Таиланд, 1993 и 1996 гг.) отличались
146 на три повтора по локусу L2341k и имели генотип ST70/(4-6-13-11/8), а от
147 штамма ВРС006 (Китай, 2008 г.) дополнительно по локусу S389k –
148 ST70/(3-6-13-5). Штаммы MSHR5858 (Австралия, 2011 г.) и 350105 (Китай,
149 1976 г.), принадлежавшие к сиквенс-типу ST562, отличались по трем VNTR-
150 локусам (6/8-8-8/11-10/11). Вариабельность MLVA-генотипов австралийских
151 штаммов MSHR1435 и MSHR1655 (2002 и 2003 гг., соответственно),
152 относящихся к сиквенс-типу ST131, обусловлена локусами S389k и S1788k –
153 (4/0-8/9-5-6).

154 Группу ST/MLVA-IV составили 36 штаммов *B. pseudomallei* 22 сиквенс-
155 типов, распределенных по 6 клональным комплексам. В наибольший по
156 численности клональный комплекс (CC92) вошел 21 штамм *B. pseudomallei*
157 сиквенс-типов ST92, ST95, ST12, ST10, ST518, ST1038, ST297, ST436, ST951
158 и ST698. В результате MLVA-типирования по 4 вышеназванным VNTR-
159 локусам выявлена принадлежность штаммов CC92 к четырем крупным
160 MLVA-кластерам (А, В, Е и J), внутри которых штаммы дифференцировались
161 на группы генотипов. При значении генетической дистанции 0,4 выявлено 11
162 таких групп – А1, А2, А3, А4, А5, В1, В3, Е1, Е2, J1 и J3 (рис. 1а).

163 Анализ результатов MLVA-типирования штаммов клонального
164 комплекса CC92 показал, что сформированные группы в ряде случаев связаны
165 с географическим происхождением штаммов. Так, в группу В1 вошли
166 изолированные от домашних игуан в 2007 и 2013 гг. в Калифорнии штаммы
167 *B. pseudomallei* 2002734728 и 2013746777 с идентичным VNTR-профилем
168 (6-6-9-2) и отличающиеся от них по локусам S389k и L933k штаммы
169 2010007509 (Аризона, 2009г.) 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.

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.

198 Остальные штаммы клонального комплекса CC92, отнесенные по
199 результатам VNTR-типирования к MLVA-кластерам А, В и Е, были
200 представлены на дендрограмме отдельными ветвями (А2, А4) или
201 формировали общие группы со штаммами других сиквенс-типов (А3, В3 и Е2).
202 Вместе с тем, два других штамма этого клонального комплекса –
203 *B. pseudomallei* 2002721123 и К96243 – вошли в состав дистанцированного
204 MLVA-кластера J. При этом в группу J3 наряду со штаммом *B. pseudomallei*
205 К96243 были объединены 7 штаммов возбудителя мелиоидоза, выделенные в
206 2015 г. от больных людей в Шри-Ланке, в том числе 5 штаммов клонального
207 комплекса (ST1364-ST594-ST1413). Для штаммов из других 4 клональных
208 комплексов явной взаимосвязи VNTR-профилей с географическим
209 происхождением выявлено не было.

210 Вариабельность VNTR-профилей у исследованных штаммов
211 *B. pseudomallei* в ряде случаев была обусловлена не только копийностью
212 мотива в составе минисателлитного локуса, но и INDELL-мутациями в составе
213 коровой единицы. Так, аллельные варианты локусов S389k, L933k и L2341k у
214 выделенных в 2015 г. в Шри-Ланке клинических изолятов обусловлены
215 делециями нуклеотидов. При этом штамм *B. pseudomallei* ВРs112 в результате
216 делеции трех нуклеотидов в коровой единице локуса L933k был отнесен к
217 MLVA-кластеру Н, в составе которого сформировал отдельную ветвь с
218 *B. pseudomallei* 2013746811 (США, 2013 г.).

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

225 Полученные данные свидетельствуют о широком диапазоне аллельного
226 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 минисателлитсодержащий 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 X₁/X₂/X₃ – переменные нуклеотидные позиции, n – число повторов. Мутации типа транзиций и трансверсий в положениях X₁, X₂ и X₃ 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 выделения. Штаммы из одного клонального

256 комплекса обладали по предлагаемым локусам идентичными или близкими
257 профилями. Так, на основании полученных паттернов штаммы *B. pseudomallei*
258 1710a и 1710b (Таиланд, 1996 г. и 1999 г.) и *B. pseudomallei* Pasteur 52237
259 (Вьетнам, 1964 г) клонального комплекса ST177-ST411, отличающиеся по
260 схеме MLVA-4 по трем VNTR-локусам, отнесены к одному генотипу.
261 Штаммы клонального комплекса ST1364-ST594-ST1413, изолированные от
262 больных людей на Шри-Ланке, также обладали идентичными профилями по
263 локусам BPSS1974^{#1} и SNP1-4 за исключением *B. pseudomallei* BPs115,
264 который отличался по локусу SNP3.

265 У штаммов клонального комплекса CC92 установлено шесть аллельных
266 вариантов по локусу BPSS1974^{#1} и два SNP профиля, различающиеся по
267 локусу SNP1 – (G/A-G-A-T). При этом SNP-профиль (A-G-A-T) был
268 обнаружен только у почвенных и клинических штаммов, выделенных в
269 Пуэрто-Рико (*B. pseudomallei* 2013833055, 2013833057, 2011756296 и
270 2002721100), а также от посещавших соседние острова туристов
271 (*B. pseudomallei* 2011756295 и 2011756189). Аллельный вариант локуса
272 BPSS1974^{#1} с числом повторов 52 выявлен среди штаммов CC92 только у *B.*
273 *pseudomallei* 2013746878, 2002721171 и VB976100, что наряду с идентичным
274 SNP-профилем (G-G-A-T) позволило выделить их в отдельную группу.

275 Интересно, что штаммы *B. pseudomallei* 1106a, 1106b (Таиланд) и
276 BPC006 (Китай) группы ST/MLVA-III, принадлежащие к ST70, имели в локусе
277 BPSS1974^{#1} 61 повтор, но отличались по локусам SNP1 и SNP2 в зависимости
278 от региона выделения: для штаммов из Таиланда установлен SNP-профиль
279 (G-G-A-T), а из Китая – (A-A-A-T). Необходимо отметить, что SNP-профиль
280 (A-A-A-T) обнаружен всего у трех штаммов исследованной выборки,
281 выделенных в соседних Китае у *B. pseudomallei* BPC006 (ST70) и
282 350105(ST562) и Пакистане – *B. pseudomallei* 9 (ST72), причем ST562 и ST72
283 представляли собой двухлокусные варианты друг друга, тогда как ST70
284 отличался по всем аллелям.

285 Дополненная локусами BPSS1974^{#1} и SNP1-4 схема MLVA-4,
286 обозначенная как MBS (*MLVA-4*, *BPSS1974^{#1}*, *SNP1-4*), позволила более точно
287 разделить штаммы *B. pseudomallei* в соответствии с регионом их
288 происхождения (рис. 1б). Так, штаммы клонального комплекса CC92 были
289 распределены по четырем отдельным кластерам с определенной
290 географической приуроченностью. Наиболее крупные из них MBS1 и MBS5
291 объединяли штаммы из стран Центральной Америки, Мексики, Венесуэлы и
292 островов Карибского бассейна, завезенные в США и Европу. Кластер MBS11
293 включал штаммы из Пуэрто-Рико и Республики Тринидад и Тобаго. В
294 самостоятельную ветвь внутри кластера MBS8 выделены штаммы
295 *B. pseudomallei* 2002721123 (Пуэрто-Рико, 1998 г.) и K96243 (Таиланд, 1999 г.).

296 Штаммы из MLVA-кластера F по схеме MBS разделились на три разные
297 группы, коррелирующие с их географическим происхождением и сиквенс-
298 типами. Так, в отдельную группу выделены тайские штаммы *B. pseudomallei*
299 406e и HVPUB10134a, сиквенс-типы которых являлись двухлокусными
300 вариантами. Штаммы 1710a, 1710b и Pasteur 52237 клонального комплекса
301 ST177-ST411, изолированные в Таиланде и Вьетнаме, кластеризовались
302 вместе с малазийским штаммом *B. pseudomallei* 982. При этом обе группы
303 вошли в состав кластера MBS15, в то время как третья группа штаммов из
304 Австралии (*B. pseudomallei* NCTC_13178 и MSHR7929) и Папуа-Новой Гвинеи
305 (*B. pseudomallei* K42) сформировали отдельный кластер MBS10.

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

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

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

324 Рисунок 2. Дендрограмма, построенная с помощью алгоритма Neighbor-
325 Joining, по результатам типирования 105 штаммов *B. pseudomallei* с
326 использованием данных комплексного анализа на основе молекулярных
327 маркеров 5 VNTR- и 4 SNP-локусов. Рамками отмечены штаммы из коллекции
328 ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт
329 Роспотребнадзора

330 Примечание. Штаммы одного клонального комплекса отмечены
331 одинаковыми пиктограммами. Рамками обозначены штаммы из коллекции
332 ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт
333 Роспотребнадзора

334 **Обсуждение**

335 Молекулярное типирование возбудителя мелиоидоза осуществляется с
336 применением ряда методов, заключающихся в анализе отдельных
337 генетических локусов, их комплексов или определении полной
338 последовательности геномов. Вместе с тем, использование отдельных
339 подходов или их сочетания требует осторожности, поскольку установленная
340 для *B. pseudomallei* высокая частота гомологичной рекомбинации между

341 штаммами может не отражать эволюционную историю отдельных генов [5,
342 16].

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

359 В нашем исследовании штаммы *B. pseudomallei* 2002721171 (ST12) и
360 2013746878 (ST1038), выделенные соответственно в Венесуэле и от
361 посетившего Гватемалу пациента из США, кластеризовались вместе со
362 штаммом VB976100 (ST436) неизвестного происхождения, изолированного в
363 Праге из абсцесса зеленой игуаны [8]. Ранее сиквенс-тип ST436 был
364 идентифицирован только у двух штаммов из Центральной Америки
365 (Гватемалы и Перу). В соответствии со схемой MBS *B. pseudomallei*
366 2013746878 и 2002721171 имели идентичный генотип и отличались от
367 *B. pseudomallei* VB976100 только по локусам S389k и L933k, что
368 свидетельствовало в пользу центральноамериканского происхождения
369 штамма VB976100.

370 Связь образованных групп с географическим происхождением штаммов
371 дает основание рассматривать схему MBS в качестве полезного инструмента
372 при расследовании случаев мелиоидоза у пациентов с неясной историей
373 путешествий в эндемичные страны. Так, штаммы *B. pseudomallei* 2008724758,
374 PB08298010 и 2013746811 выделены от больных, никогда не выезжавших за
375 пределы континентальной части США [9, 18, 7], тем не менее, проведенное
376 типирование показало происхождение этих штаммов за пределами Западного
377 полушария [10].

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

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

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

ТАБЛИЦЫ

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
Skammandri 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

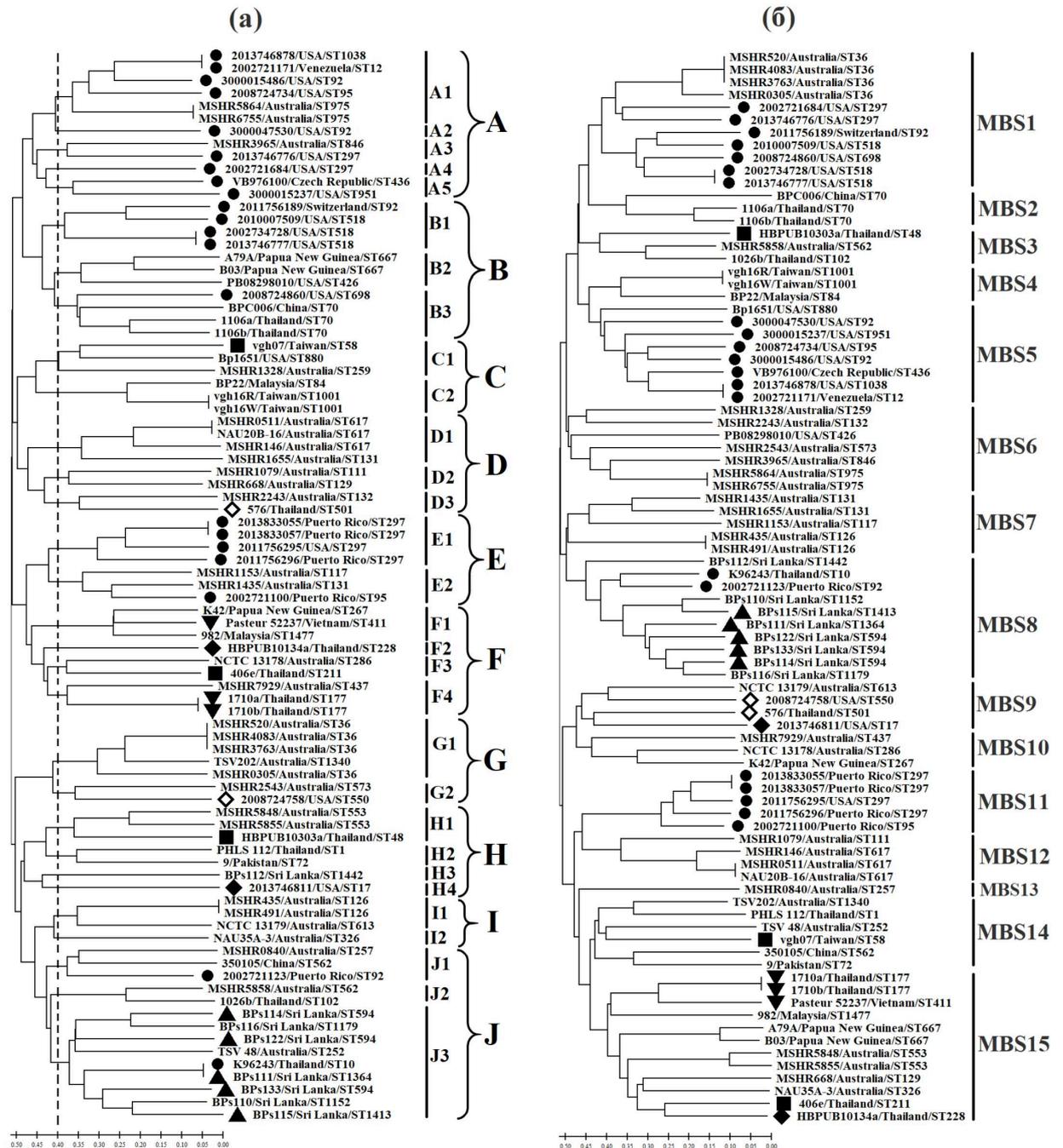
Локус/ Условное обозначение SNPs Locus/Symbol of the SNPs	Наименование праймеров/зонд а Primers/Probe name	Нуклеотидная последовательность (5'→3') Nucleotide sequence (5'→3')
BPSL0211/ SNP1	<i>BpsSNP1s</i> <i>BpsSNP1as</i> <i>BpsSNP1prC</i> <i>BpsSNP1prT</i>	AATCGGGAAAGCAGAGTTG CGTTTCTCAAATTCCTCGC (FAM)-CTCGGCTGGCTGCTCTATC g GATCCCC- (BHQ) (HEX)-CTCGGCTGGCTGCTCTATC a GATCCCC- (BHQ)
BPSL0211/ SNP2	<i>BpsSNP2s</i> <i>BpsSNP2as</i> <i>BpsSNP2prC</i> <i>BpsSNP2prT</i>	CGAGGAATTTGAGAAACGC GACGGAGGATTCGCATG (FAM)-CGTCTCGGCACAC g GCTTGC -(BHQ) (HEX)-CGTCTCGGCACAC a GCTTGC-(BHQ)
BPSL0504/ SNP3	<i>BpsSNP3s</i> <i>BpsSNP3as</i> <i>BpsSNP3prC</i> <i>BpsSNP3prT</i>	CATCTTCTTCATCGCGCT TATCTCGCCGATTCGCAC (HEX)-AATCGCTCGACGC g CGCAGCCGC-(BHQ) (FAM)-AATCGCTCGACGC a CGCAGCCGC-(BHQ)
BPSL3430/ SNP4	<i>BpsSNP4s</i> <i>BpsSNP4as</i> <i>BpsSNP4prC</i> <i>BpsSNP4prT</i>	ATCAACTGCGAGCCGAGA CAGTTTCGAGCAGGTGCT (HEX)-CGTCGTCGGATACAGC c CGTCGTCGT- (BHQ)

		(FAM)-CGTCGTCGGATACAGCtCGTCGTCGT- (BHQ)
Примечание. Вариабельные нуклеотиды обозначены строчными буквами Note. Variable nucleotides are indicated by lowercase letters		

РИСУНКИ

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 t 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)

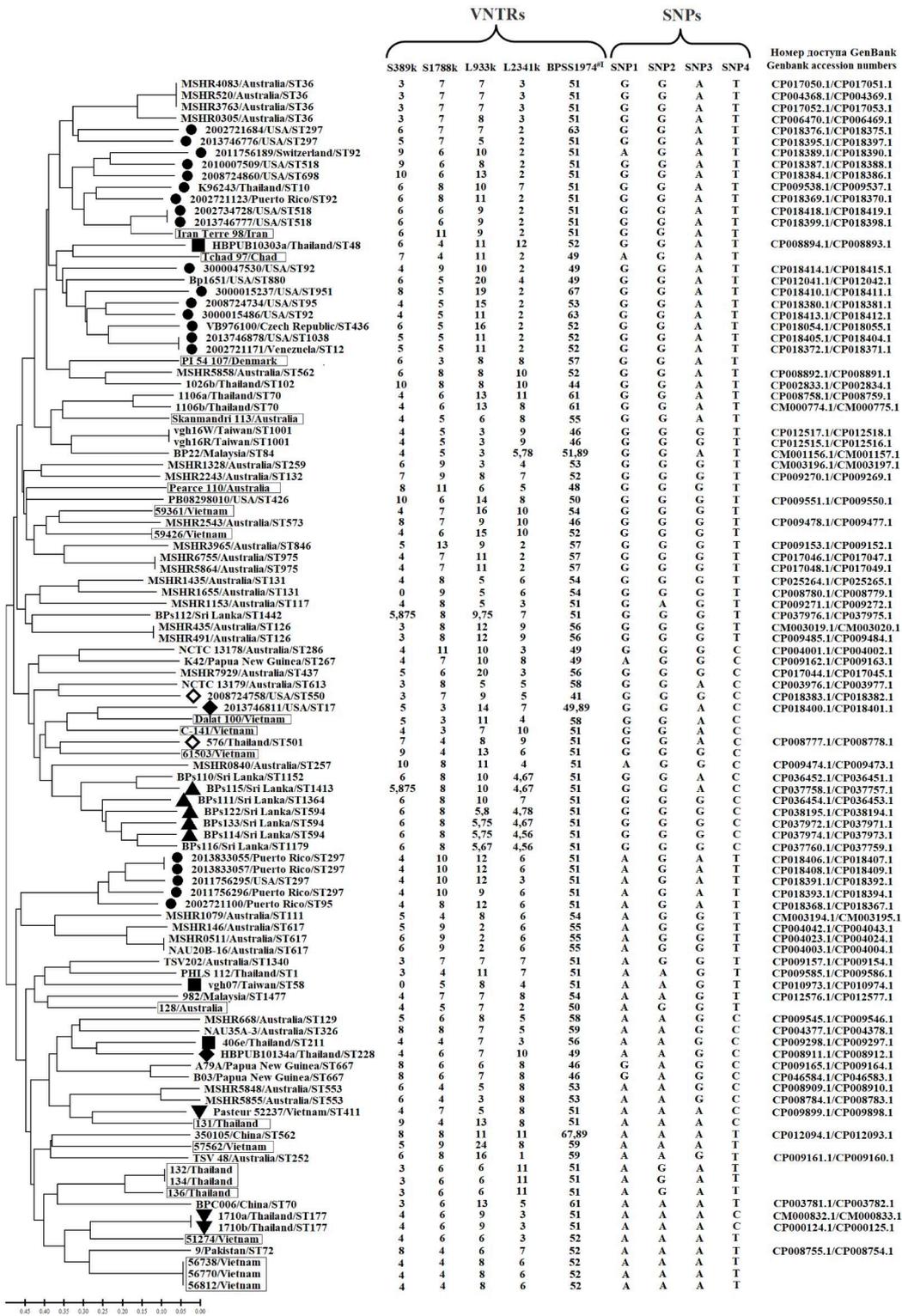


Примечание. Штаммы одного клонального комплекса отмечены одинаковыми пиктограммами

Note. Same clonal complex strains are denoted with similar pictograms

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.

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Леденева Маргарита Леонтьевна, научный сотрудник лаборатории генодиагностики. 400131, Россия, г. Волгоград, ул. Голубинская, 7, ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. тел.: 89053302763, факс: (8442) 39-33-36, e-mail: volresin@yandex.ru.

Ledenyova Margarita Leontievna, scientific researcher of the laboratory of gene diagnostics. 400131, Russian Federation, Volgograd, Golubinskaya str., 7, Volgograd Plague Control Research Institute.

Tel.: 89053302763, fax: (8442) 39-33-36, e mail: volresin@yandex.ru.

Блок 2. Информация об авторах

Леденева М.Л., научный сотрудник лаборатории генодиагностики.

Ledenyova M.L., scientific researcher of the laboratory of gene diagnostics.

Email: volresin@yandex.ru, ORCID iD: 0000-0001-5923-4774.

Ткаченко Г.А., кандидат медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории генодиагностики.

Tkachenko G.A., candidate of medical science, docent, leading researcher of the laboratory of gene diagnostics.

Email: tkachenko_g@mail.ru, ORCID iD: 0000-0003-0199-3342.

Захарова И.Б., кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории патогенных буркхольдерий.

Zakharova I.B., candidate of biological science, docent, leading researcher of the laboratory of pathogenic *Burkholderia*.

Email: zib279@gmail.com, ORCID iD: 0000-0002-7808-7658.

Блок 3. Метаданные статьи

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

Маркеры типирования *B. pseudomallei*

B. pseudomallei typing markers

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

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

Оригинальная статья

Количество страниц текста – 14, количество таблиц – 2, количество рисунков – 2.

30.05.2022

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или
[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. Infectious Diseases: News. Opinions. Training, 2016, vol. 1, no. 14, pp. 24-31.	https://infect-disease-journal.ru/ru/jarticles_infection/284.html?SSr=2901348a6e22ffffff27c__07e6051a161d20-6f0d
[2]	Патент № 2545702 Российская Федерация, МПК C12Q 1/68 (2006.01). Олигонуклеотидные праймеры Burk0090s/ Burk0090as для оценки адаптационной изменчивости генома патогенных буркхольдерий: № 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-	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	https://edrid.ru/rid/216.013.3786.html

	исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 7 с.	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 <i>Burkholderia pseudomallei</i> sequence type homoplasmy resolved using whole-genome sequencing. <i>Microb. Genom.</i> , 2017, vol. 3, no. 11: e000139	-	https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/mgen/10.1099/mgen.0.000139 [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 <i>Burkholderia pseudomallei</i> from a remote region of Papua New Guinea. <i>PLoS One</i> , 2011, vol. 6, no. 3: e18343	-	https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0018343 [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 <i>Burkholderia pseudomallei</i> genome to address differential virulence among	-	https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0115951 [doi: 10.1371/journal.pone.0115951]

	isolates. PLoS One, 2014, vol. 9, no. 12: e115951.		
[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. <i>Emerg. Infect. Dis.</i> , 2009, vol. 15, no. 2, pp. 169-174.	-	https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/15/2/08-1036_article [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 <i>Burkholderia pseudomallei</i> infection initially reported as a <i>Bacillus</i> species, Ohio, 2013. <i>Am. J. Trop. Med. Hyg.</i> , 2014, vol. 91, no. 4, pp. 743-746.	-	https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/91/4/article-p743.xml [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 <i>Burkholderia pseudomallei</i> from a pet green Iguana in Prague, Czech Republic. <i>BMC Vet. Res.</i> , 2014, vol. 10: 283.	-	https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-014-0283-7 [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., Gillece 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 AZ, USA. PLoS Negl. Trop. Dis., 2011, vol. 5, no. 10: e1347.	-	https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001347 [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 <i>Burkholderia pseudomallei</i> isolates, Western Hemisphere. Emerg. Infect. Dis., 2017, vol. 23, no. 7, pp. 1133-1138.	-	https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/23/7/16-1978_article [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.	-	https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.16.01.19758-en

[12]	Gilad J., Harary I., Dushnitsky T., Schwartz D., Amsalem Y. <i>Burkholderia mallei</i> and <i>Burkholderia pseudomallei</i> as bioterrorism agents: national aspects of emergency preparedness. <i>Isr. Med. Assoc. J.</i> , 2007, vol. 9, no. 7, pp. 499-503.	-	https://www.ima.org.il/MedicineIMAJ/viewarticle.aspx?year=2007&month=07&page=499
[13]	Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. <i>J. Clin. Microbiol.</i> , 1988, vol. 26, no. 11, pp. 2465-2466.	-	https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed [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 <i>Burkholderia pseudomallei</i> population in melioidosis case cluster, Sri Lanka. <i>Emerg. Infect. Dis.</i> , 2021, vol. 27, no. 11, pp. 2955-2957.	-	https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/27/11/21-0219_article [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	-	https://www.nature.com/articles/nmicrobiol20158 [doi: 10.1038/nmicrobiol.2015.8]

	<i>Burkholderia pseudomallei</i> and burden of melioidosis. Nat. Microbiol., 2016, vol. 1: 15008.		
[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 <i>Burkholderia pseudomallei</i> provides insights into the evolution of accidental virulence. PLoS Pathog., 2010, vol. 6, no. 4: e1000845.	-	https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000845 [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.	-	https://academic.oup.com/bioinformatics/article/28/8/1166/195474?login=false [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 <i>Burkholderia pseudomallei</i> and further supports	-	https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mSphere.00089-15?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org [doi: 10.1128/mSphere.00089-15]

	melioidosis endemicity in Africa. mSphere, 2016, vol. 1, no. 2: e00089-15.		
[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.	-	https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01225.x
[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.	-	https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.51.5.873-884.1986 [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.	-	https://academic.oup.com/mbe/article/38/7/3022/6248099?login=true [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.	-	https://academic.oup.com/nar/article/35/suppl_2/W71/2922185 [doi: 10.1093/nar/gkm306]

[23]	U'Ren J.M., Schupp JM., 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 <i>Burkholderia pseudomallei</i> genome and their application for high resolution genotyping. BMC Microbiol., 2007, vol. 7: 23.	-	https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-7-23 [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.	-	https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1204699?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed [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 <i>Burkholderia pseudomallei</i> collected from humans in Hainan, China. Front. Microbiol., 2020, vol. 11: 778.	-	https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00778/full [doi: 10.3389/fmicb.2020.00778]