



Совершенствование схемы MLVA-типирования штаммов *Burkholderia mallei*

Леденева М.Л.[✉], Бондарева О.С., Ткаченко Г.А., Устинов Д.В., Захарова И.Б.

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, Волгоград, Россия

Аннотация

Введение. Регистрация на территории России отдельных случаев сапа у лошадей, возбудителем которого является *Burkholderia mallei*, определяет важность разработки алгоритмов генотипирования этого патогена. Перспективным остается метод MLVA (multilocus-variable tandem repeat analysis), основанный на сравнительном анализе количества варьируемых тандемных повторов (VNTR — variable number tandem repeats). По мере увеличения числа полногеномных последовательностей в международных базах данных изменяется информативная ценность VNTR-локусов, что требует пересмотра существующих схем типирования.

Цель работы — оценить перспективность включения VNTR-локуса BPSS1974[#] в схему MLVA-6 для внутривидовой дифференциации *B. mallei*.

Материалы и методы. Исследование 64 штаммов *B. mallei* проводили *in silico* и *in vitro* с помощью методов MLVA, амплификации дифференцирующих регионов, полногеномного секвенирования и биоинформатического анализа.

Результаты. Генотипирование *B. mallei* при использовании схемы MLVA-6 не позволило определить *in silico* VNTR-профили 13 штаммов из базы данных GenBank NCBI по одному или нескольким локусам ввиду низкого покрытия ридов соответствующих областей генома или их полного отсутствия (нуль-аллели). Эффективное число аллелей (ne) и индекс полиморфного информационного содержания (PIC) для локусов схемы MLVA-6 варьировали в диапазонах 3,842–8,103 и 0,740–0,877 соответственно. Перспективность включения в эту схему VNTR-локуса BPSS1974[#] определена на основе молекулярной стабильности мотива в его составе и высоких показателей ne и PIC, составивших 4,299 и 0,767 соответственно. VNTR-профили коллекционных штаммов по локусу BPSS1974[#] были идентичны соответствующим штаммам из базы данных GenBank. Результаты кластерного анализа при сочетанном использовании схемы MLVA-6 и локуса BPSS1974[#] соответствовали филогенетическим реконструкциям, полученным с использованием других молекулярно-генетических методов.

Заключение. VNTR-локус BPSS1974[#] можно расценивать как маркер, включение которого в схему MLVA-6 позволит повысить точность генотипирования и установления регионов происхождения вновь выделенных штаммов *B. mallei*.

Ключевые слова: *Burkholderia mallei*, сап, генотипирование, MLVA, тандемные повторы

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Леденева М.Л., Бондарева О.С., Ткаченко Г.А., Устинов Д.В., Захарова И.Б. Совершенствование схемы MLVA-типирования штаммов *Burkholderia mallei*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2025;102(5):615–625.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-720>

EDN: <https://www.elibrary.ru/LXJQDU>

Original Study Article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-720>

Improvement of the MLVA typing scheme for *Burkholderia mallei* strains

Margarita L. Ledenyova[✉], Olga S. Bondareva, Galina A. Tkachenko, Dimitriy V. Ustinov, Irina B. Zakharova

Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia

Abstract

Introduction. The registration of sporadic cases of glanders in horses in Russia, caused by *Burkholderia mallei*, highlights the importance of developing genotyping algorithms for this pathogen. The MLVA method (multilocus-variable tandem repeat analysis), based on a comparative analysis of the number of variable tandem repeats (VNTRs), remains a promising genotyping tool. As the number of whole-genome sequences in international databases increases, the informative value of VNTR loci changes, necessitating a revisiting of existing typing schemes.

The aim of this study was to assess the feasibility of including the VNTR locus BPSS1974[#] in the MLVA-6 scheme for intraspecies differentiation of *B. mallei*.

Materials and methods. The study of 64 strains of *B. mallei* was conducted *in silico* and *in vitro* using MLVA, differentiating region amplification, whole-genome sequencing, and bioinformatic analysis.

Results. Genotyping *B. mallei* using the MLVA-6 scheme failed to determine *in silico* VNTR profiles of 13 strains from the GenBank NCBI database for one or more loci due to low read coverage of the corresponding genomic regions or their complete absence (null alleles). The effective number of alleles (ne) and the polymorphic information content (PIC) index for the MLVA-6 scheme loci ranged from 3.842–8.103 and 0.740–0.877, respectively. The potential for including the VNTR locus BPSS1974[#] in this scheme was determined based on the molecular stability of the motif within it and a high values for ne and PIC, which were 4.299 and 0.767, respectively. VNTR profiles of the collection strains at locus BPSS1974[#] were identical to the corresponding strains in the GenBank database. The results of the cluster analysis using a combined MLVA-6 scheme and the BPSS1974[#] locus were consistent with the phylogenetic reconstructions obtained using other molecular genetic methods.

Conclusion. The VNTR locus BPSS1974[#] can be considered a marker, the inclusion of which in the MLVA-6 scheme will improve the accuracy of genotyping and the determination of the regions of origin of newly isolated *B. mallei* strains.

Keywords: *Burkholderia mallei*, glanders, genotyping, MLVA, tandem repeats

Funding source. The authors declare that there was no external funding for the study.

Conflict of interest. The authors declare the absence of any explicit or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Ledeneva M.L., Bondareva O.S., Tkachenko G.A., Ustinov D.V., Zakharova I.B. Improvement of the MLVA typing scheme for *Burkholderia mallei* strains. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2025;102(5):615–625.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-720>

EDN: <https://www.elibrary.ru/LXJQDU>

Введение

Грамотрицательная бактерия *Burkholderia mallei* является возбудителем сапа — потенциально смертельного антропозооноза, поражающего в основном непарнокопытных животных: лошадей, мулов и ослов [1, 2]. Заболевание людей связано с их профессиональной деятельностью и возникает при тесном контакте с инфицированными животными, например, у зоотехнических и ветеринарных работников [3]. Известны случаи заражения сотрудников бактериологических лабораторий, проводящих работы с культурами *B. mallei* [4, 5]. В России возбудитель сапа относят к микроорганизмам II группы патогенности, а за рубежом — к потенциальным агентам биотерроризма группы В, что обусловлено возможностью возникновения чрезвычайной ситуации в области общественного здравоохранения при использовании *B. mallei* в качестве биологического оружия [6–8].

В настоящее время вспышки или случаи сапа происходят спорадически в ряде регионов Азии и Ближнего Востока, Северной Африки, а также Центральной и Южной Америки [9, 10]. Регистрация завозных случаев сапа у животных в странах, свободных от этого заболевания, создаёт угрозу зара-

жения местного поголовья скота, людей и возможность реинтродукции инфекции [11, 12].

Случаи сапа регистрируют в сопредельных с Россией странах, что требует настороженности ветеринарных служб в отношении данного заболевания, особенно в регионах Сибири и Дальнего Востока. Вспышка сапа в 2023 г. среди лошадей на территории Читинской государственной заводской конюшни с ипподромом им. Хосаена Хакимова, зарегистрированная Всемирной организацией здравоохранения животных¹, свидетельствует о важности эпидемиологического мониторинга сапа на территории России.

Современные методы внутривидового типирования позволяют получать подробную генетическую характеристику возбудителя для решения таких задач, как расследование случаев заболевания людей или животных, определение эволюционных и филогенетических связей штаммов микроорганизма [13–15]. Однако в случае сапа поиск эффективных ДНК-мишеней осложняется высокой консер-

¹ Russia — *Burkholderia mallei* (Inf. with) (Glanders) — Follow up report 1 [FINAL]. URL: <https://wahis.woah.org/#/in-review/4915>

вативностью генома *B. mallei*. Высокая плотность микро- и мини-сателлитных повторов (Variable Number Tandem Repeats, VNTRs) в геноме возбудителя сапа определяет перспективность применения схем дифференциации штаммов на основе мультилокусного анализа числа вариабельных тандемных повторов (Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis, MLVA). В зарубежных источниках с этой целью наиболее часто используют схему из 23 VNTR-локусов, первоначально предложенную для возбудителя мелиоидоза — *B. pseudomallei*, клоном которого, как предполагается, является возбудитель сапа [16]. Однако эта схема не оптимизирована для возбудителя сапа. Большое количество локусов типирования повышает общую стоимость анализа.

Для снижения трудоёмкости и себестоимости метода MLVA актуальной является разработка сокращённых схем, позволяющих при использовании меньшего числа локусов сохранять дискриминирующую силу и достоверность молекулярно-эпидемиологических исследований. Подобранный нами ранее комбинация из 6 VNTR-локусов позволяла дифференцировать штаммы *B. mallei* с высокой дискриминирующей силой [17]. Вместе с тем информативная ценность VNTR-локусов изменяется по мере увеличения количества новых полногеномных последовательностей в международных базах данных, что требует пересмотра существующих схем типирования.

В недавней работе нами была показана перспективность применения схемы из 5 VNTR- и 4 SNP-локусов для установления географических регионов происхождения штаммов *B. pseudomallei* и определения клональности изолятов при выявлении случаев мелиоидоза [18]. Предложенный в этом исследовании новый VNTR-локус BPSS1974^{#1}, расположенный в участке гена *BPS_RS29560*, характеризовался стабильностью амплификации и наличием ампликонов у всех исследуемых штаммов возбудителя мелиоидоза. Последовательность тандемного повтора (мотива) состояла из 9 пар нуклеотидов и имела вырожденную структуру, которая находилась под действием стабилизирующего отбора. Присутствие в геноме возбудителя сапа ортогологичного гена определяет возможность использования локуса BPSS1974^{#1} для совершенствования 6-локусной схемы MLVA-типирования *B. mallei*.

Цель исследования — оценить перспективность включения VNTR-локуса BPSS1974^{#1} в схему MLVA-6 для генетического типирования штаммов *B. mallei*.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись полногеномные последовательности 56 штаммов возбу-

дителя сапа из базы данных GenBank NCBI². Сформированная нами выборка включала нуклеотидные последовательности штаммов *B. mallei*, изолированных в эндемичных странах (Индия, Пакистан, Бразилия), некоторых частях Азии и Ближнего Востока, где вспышки или случаи происходят спорадически (Турция, Китай, Мьянма, Бахрейн), а также в США и ряде европейских стран (Венгрия, Югославия).

Для оценки стабильности ДНК-локусов в составе генотипирующих систем использовали 7 штаммов *B. mallei* из коллекции Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора. Коллекционным штаммам P-1, Muksuwar-11, B-120, Ц-4 и Ц-5 соответствовали дубликаты штаммов, депонированные в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур под номерами SCPM-O-B-4688, SCPM-O-B-7093, SCPM-O-B-7146, SCPM-O-B-4682 и SCPM-O-B-4683. В свою очередь коллекционным штаммам Muksuwar-11, Bogor-37 и Zagreb соответствовали штаммы, нуклеотидные последовательности которых депонированы в GenBank NCBI под номерами GCA_033870375.1, GCA_033870395.1 и GCA_033870355.1. Также в исследование включён коллекционный штамм *B. mallei* 16050, изолированный от лошади в 2023 г. в период вспышки сапа на государственной конюшне в Чите. Нуклеотидные последовательности геномов коллекционных штаммов депонированы в Российскую платформу агрегации информации о геномах возбудителей инфекционных и паразитарных заболеваний «VGARus» (Virus Genome Aggregator of Russia). Всего в исследовании проанализировано 64 штамма возбудителя сапа.

Для постановки полимеразных цепных реакций (ПЦР) при проведении MLVA-типирования и амплификации дифференцирующих регионов генома (Different Region Analysis, DFR) ДНК выделяли с помощью набора реагентов «РИБО-преп» (ЦНИИ Эпидемиологии). Полногеномную ДНК для проведения секвенирования выделяли с помощью набора «Биолабмикс-DU-250» («Биолабмикс») согласно инструкции производителя.

Праймеры и параметры амплификации при типировании с использованием схемы MLVA-6 и локуса BPSS1974^{#1} описаны нами ранее [17, 18]. VNTR-профиль штаммов определяли как совокупность аллельных вариантов по каждому локусу и представляли в виде числового паттерна количества повторов в схеме «L933k/L3145k/L3652k/L20k/L1217k/S2862k/BPSS1974^{#1}».

DFR-генотипы определяли методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени по 9 фрагментам:

² URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>

BmVAT1, BmVAT2, BmVAT3, BmVAT4, BmVAT5, BmVAT6, BmVAT7, BmVAT8, BmVAT9, используя последовательности олигонуклеотидов и схему генотипирования, описанные О.С. Бондаревой и соавт. [19]. Результаты DFR-типирования конвертировали в двоичную матрицу, в которой наличие ампликона обозначалось «1», а его отсутствие — «0».

Приготовление библиотек для полногеномного секвенирования осуществляли с помощью набора реагентов «Nextera XT library prep kit», секвенирование проводили на платформе «MiSeq» с использованием набора «MiSeq Reagent Kit v3» (все — «Illumina Inc.»). Исходные нуклеотидные прочтения (риды) обработаны с помощью утилиты Trimmomatic со стандартными параметрами для «Illumina». Обработанные риды собирали с помощью SPAdes v3.15.4 с использованием опции «--isolate» и стандартными параметрами командной строки [20].

Кластерный анализ и построение дендрограмм проводили с использованием программ FAMD v. 1.31 [21] и Mega v. 11.0.11 [22] при помощи алгоритма объединения ближайших соседей и коэффициента генетической дистанции Жаккарда. Для оценки дискриминирующей способности схем типирования использовали индекс Хантера–Гастона (Hunter Gaston discriminatory index, HGDI) [23]. При анализе информативности мини-сателлитных локусов определяли количество аллелей, эффективное число аллелей (ne) и индекс полиморфного информационного содержания (PIC).

Результаты

Анализ *in silico* показал, что в геноме референтного штамма *B. mallei* ATCC 23344 (GCA_033956065.1) весь ампликон локуса BPSS1974^{#1} размером 692 пары нуклеотидов (п. н.) в положении 1627686–1628377 приходился на ген *BMA_RS16575* длиной 1755 п. н., расположенный на второй хромосоме. Как и в геноме *B. pseudomallei*, ген *BMA_RS16575* аннотирован в базе данных GenBank NCBI как коллагеноподобный белок, содержащий повтор тройной спирали (WPJ46631.1, 584 п. н.). Сайт для прямого праймера занимал положения 1627686–1627707 в геноме *B. mallei* ATCC 23344 и 28–49 в последовательности гена *BMA_RS16575*, для обратного праймера — положения 1628359–1628377 и 701–719 соответственно. Как и в геноме возбудителя мелиоидоза, 3-, 6- и 9-я позиции мотива в составе локуса BPSS1974^{#1} находились под действием стабилизирующего отбора.

При типировании *in silico* 56 штаммов *B. mallei* из базы данных GenBank NCBI с использованием праймеров к локусу BPSS1974^{#1} выявлены 10 аллельных вариантов, наиболее распространёнными из которых являлись повторы с копийностью 56 и 54 — на их долю приходилось по 17 штаммов.

По 55 и 53 повтора имели 9 и 5 штаммов соответственно, для 2 штаммов количество повторов составило 58, остальные 5 вариантов были уникальными. У *B. mallei* SCPM-O-B-4686 места посадки праймеров отсутствовали (нуль-аллель).

С использованием схемы MLVA-6 нуль-аллели выявлены по локусу L1217k у 14 штаммов из базы данных GenBank NCBI. Анализ молекулярной природы нуль-аллелей показал, что отсутствие продуктов амплификации по локусам BPSS1974^{#1} и L1217k обусловлено делецией соответствующих фрагментов генома. Нуль-аллели по локусу L1217k, выявленные в 4 полных геномах штаммов *B. mallei* 6, 34, BMQ и 23344, учтены в дальнейшей работе как одни из аллельных вариантов. Однако геномы штаммов *B. mallei* BM-1, BM-5, BM-6, Turkey5, NCTC 3709, SCPM-O-B-4682, SCPM-O-B-4683, SCPM-O-B-4684, SCPM-O-B-4688 и SCPM-O-B-4686 представлены набором контигов разной длины, что не исключает отсутствие ПЦР-продукта при анализе *in silico* по причине неполной нуклеотидной последовательности. Поэтому в дальнейшем эти штаммы были исключены из анализа.

Применение схемы MLVA-6 не позволило определить *in silico* генотипы штаммов *B. mallei* BM-1, BM-3, BM-6 и BM-9 по локусу L20k и *B. mallei* 3076 по локусу L3652k, поскольку целевая VNTR-область оказалась локализованной на разных контигах. В связи с этим данные штаммы также были удалены из исследования.

Исключение 13 штаммов из выборки привело к потере 3 уникальных аллельных вариантов по локусу BPSS1974^{#1} и одного — по локусу L20k. В табл. 1 представлены штаммы *B. mallei*, которые в дальнейшем были использованы при проведении кластерного анализа.

В результате амплификации VNTR-локусов у коллекционных штаммов *B. mallei* получены ПЦР-продукты, представляющие на электрофореграмме единичные полосы. При этом продукт амплификации по локусу L1217k отсутствовал у 3 штаммов из коллекции (*B. mallei* P-1, Ц-4 и Ц-5). Последующее секвенирование ампликонов позволило установить соответствующее число повторов для каждого локуса. В дальнейшем при расчёте показателей полиморфизма VNTR-локусов проводили совместный учёт MLVA-профилей штаммов из GenBank NCBI и коллекции Волгоградского научно-исследовательского противочумного института (табл. 1).

При расчёте эффективного числа аллелей (ne) и индекса полиморфного информационного содержания (PIC) для локуса BPSS1974^{#1} установлены значения 4,299 и 0,767 соответственно. В скорректированной выборке штаммов количество аллелей по локусам схемы MLVA-6 было распределено следующим образом: минимальное число в локусах

Таблица 1. Результаты MLVA- и DFR-типирования штаммов *B. mallei*

Название штамма <i>B. mallei</i> (номер в GenBank или VGARus)	Место; год выделения	MLVA-профиль*	Номер MLVA- профиля/ кластера**	DFR- тип***
6 (GCA_000755845.1)	Турция; 1950	14/7/8/4,86/-/7/50	1/A	17
Ц-4 (vnip002737)****	Монголия; 1967	11/7/6/17/-/8/54	2/A	06
Ц-5 (vnip002738)****	Монголия; 1967	11/7/6/17/-/8/54	2/A	06
BMQ (GCA_000755885.1)	Индия; 1932	2/4/7/9/-/5/54	1/B	12
23344 (GCA_000755865.1)	Мьянма; 1944	2/4/7/29/-/5/54	2/B	12
NCTC 3708 (GCA_003590195.1)	Индия; 1932	2/6/10/5/7,9/10/55	1/C	24
16050 (vnip002404)****	Россия, Чита; 2023	5/6/11/17/5/10/54	2/C	06
mongolia_1	Монголия; 2022	9/5/16/17/5/6/55	3/C	06
B-120 (vnip002736)****	Россия, Улан-Удэ; 1985	10/6/8/17/5/6/55	4/C	06
SCPM-O-B-7146 (GCA_003627695.1)	Россия, Улан-Удэ; 1985	10/6/8/17/5/6/55	4/C	06
BM-2 (GCA_028621615.1)	Китай, Хэбэй; нет данных	6/8/10/19/4,9/6/55	1/D	16
2002721277 (GCA_003590185.1)	США; 1956	10/8/7/17/4,9/12/55	2/D	16
China5 (GCA_000757315.2)	Китай; 1956	10/8/8/16/4,9/10,4/55	3/D	16
2000031063 (GCA_000756025.2)	Венгрия; нет данных	10/8/8/16/4,9/12/55	4/D	16
P-1 (vnip002735)****	Югославия; нет данных	6/5/11/7/-/6/55	1/E	09
SAVP1 (GCA_000015465.1)	Индия; нет данных	4/5/9/7/9,9/11/55	2/E	04
2000031066 (GCA_003590125.1)	Индия; нет данных	4/5/7/7/13,9/12/54	3/E	21
NCTC 10247 (GCA_000762285.1)	Турция, Анкара; 1960	5/9/12/7/4,9/7/54	1/F	03
34 (GCA_939576165.1)	Нет данных; 1972	10/9/16/7/-/6/54	2/F	20
Bahrain1 (GCA_001729545.1)	Бахрейн; 2011	2/10/14/15/5,9/6/54	1/G1	22
BM-4 (GCA_028621665.1)	Китай, Хэбэй; нет данных	6/10/10/18/8/13/54	1/G2	23
11 (GCA_000959405.1)	Турция; 1949	8/10/10/8/4,9/3/54	2/G2	19
NCTC 10229 (GCA_000015605.1)	Венгрия, Будапешт; 1961	10/10/14/9/4,9/8/54	1/G3	02
2002734299 (GCA_000959165.1)	Венгрия; 1961	10/11/14/9/4,9/8/54	2/G3	02
Ivan (GCA_000986905.1)	Венгрия; 1961	10/10/13/9/4,9/8/54	3/G3	02
BM_campo 2.1 (GCA_905359435.1)	Бразилия; 2016	10/10/13/9/4,9/8/54	3/G3	02
UFAL2 (GCA_905359425.1)	Бразилия; 2017	8/4/9/14/4,9/4/27	1/H	06
PRL-20 (GCA_000169875.1)	Пакистан, Лахор; 2005	5/4/6/6/3,9/7/58	1/I	25
India86-567-2 (GCA_000959465.1)	Индия; нет данных	6/4/8/6/8,9/11/58	2/I	01
Turkey1 (GCA_002345985.1)	Турция; нет данных	7/4/11/6/6,9/7/56	1/J	15
Turkey2 (GCA_002346025.1)	Турция; нет данных	7/4/10/6/6,9/7/56	2/J	15
Turkey3 (GCA_002346065.1)	Турция; нет данных	7/4/7/6/6,9/6/56	3/J	15
Turkey4 (GCA_002346085.1)	Турция; 1960	7/4/11/6/6,9/6/56	4/J	15
Turkey6 (GCA_002346125.1)	Турция; нет данных	7/4/11/6/6,9/6/56	4/J	15
Turkey7 (GCA_002346145.1)	Турция; нет данных	7/4/11/6/6,9/7/56	1/J	15
Turkey8 (GCA_002346165.1)	Турция; нет данных	7/4/11/6/6,9/7/56	1/J	15
Turkey9 (GCA_002346185.1)	Турция; нет данных	7/4/12/6/6,9/7/56	5/J	15
Turkey10 (GCA_002346005.1)	Турция; нет данных	7/4/11/6/6,9/7/56	1/J	15
Muksuwar-11 (vnip002733)****	Индия; 1979	5/4/8/17/6,9/12/53	1/K	11
SCPM-O-B-7093 (GCA_003627585.1)	Индия; 1979	5/4/8/17/6,9/11/53	2/K	07
Mukteswar (GCA_033870375.1)	Индия; 1996	5/4/8/17/6,9/11/53	2/K	11
Zagreb (vnip002734)****	Югославия; нет данных	5/4/8/15/6,9/6/53	3/K	07
Bogor-37 (vnip002732)****	Индонезия; 1979	5/4/8/15/6,9/11/53	4/K	07
Zagreb (GCA_033870355.1)	Югославия; 1996	5/4/8/15/6,9/11/53	4/K	07
Bogor (GCA_033870395.1)	Индонезия; 1995	5/4/8/15/6,9/11/53	4/K	07

Окончание табл. 1.

Название штамма <i>B. mallei</i> (номер в GenBank или VGARus)	Место; год выделения	MLVA-профиль*	Номер MLVA- профиля/ кластера**	DFR- тип***
Kweiyang#4 (GCA_001608335.1)	Китай; 1942	9/7/4/24,71/6,9/15/56	1/L	22
2002721274 (GCA_002522985.1)	США; 1956	9/7/4/19/6,9/16/56	2/L	01
ATCC 23344 (GCA_033956065.1)	Мьянма; 1942	8/7/4/31/6,9/15/56	3/L	01
JHU (GCA_002346205.1)	США, Мэриленд; 2000	8/7/4/27/6,9/15/56	4/L	01
FMH 23344 (GCA_000755785.1)	Мьянма; 1944	8/7/4/27/6,9/15/56	4/L	01
FMH (GCA_002346045.1)	США, Мэриленд; 2000	8/7/4/27/6,9/15/56	4/L	01

Примечание. *MLVA-профиль штаммов записан в виде числового паттерна количества повторов в схеме «L933k/L3145k/L3652k/L20k/L1217k/S2862k/BPSS1974^{#1}».

**Каждому MLVA-профилю присвоен порядковый номер внутри соответствующего кластера, сформированного при построении дендрограммы.

***Номера DFR-типам присвоены в соответствии с ранее опубликованными данными [19].

****Штаммы из коллекции Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора.

L3145k (ne = 4,257; PIC = 0,765) и L933k (ne = 7,087; PIC = 0,859) — 8 и 10 аллелей соответственно, в локусах L3652k (ne = 7,368; PIC = 0,864) и L1217k (ne = 3,842; PIC = 0,74) — по 11 аллелей, в локусе S2862k (ne = 7,628; PIC = 0,869) — 13 аллелей, максимальное число в локусе L20k (ne = 8,103; PIC = 0,877) — 16 аллелей. HGDI при добавлении локуса BPSS1974^{#1} к схеме MLVA-6 не изменился и составил 0,981.

Для анализа генетического полиморфизма штаммов, VNTR-профили которых были достоверно определены, дополнительно использовали метод амплификации дифференцирующих регионов генома. В результате 51 штамм возбудителя сапа был распределён по 19 DFR-типам, из которых 6 выявлены впервые (DFR20 — 001110011, DFR21 — 000111110, DFR22 — 111110110, DFR23 — 110110111, DFR24 — 010111010, DFR25 — 111101100).

При сравнении дендрограмм, построенных на основании результатов типирования с использованием схемы MLVA-6 (рисунк, а), и при включении в эту схему локуса BPSS1974^{#1} (рисунк, б) наблюдали отличия во взаиморасположении прикорневых кластеров и отдельных штаммов. Так, при сочетании использования схемы MLVA-6 и локуса BPSS1974^{#1} сформирован новый кластер, обозначенный нами как G и состоящий из подкластеров G1, G2 и G3. Подкластер G1 сформировал штамм *B. mallei* Bahrain1. Подкластер G2 включал штаммы BM-4 и *B. mallei* 11, а подкластер G3 — штаммы *B. mallei* NCTC 10229, 2002734299 и Ivan, выделенные сотрудниками Печского института в Венгрии в 1961 г., и *B. mallei* BM_campo 2.1. Для штаммов подкластера G3 установлен общий DFR-тип (DFR02), а их MLVA-профили отличались на 1 повтор по локусам L3145k и L3652k, при этом VNTR-генотипы штаммов BM_campo 2.1 и Ivan полностью идентичны.

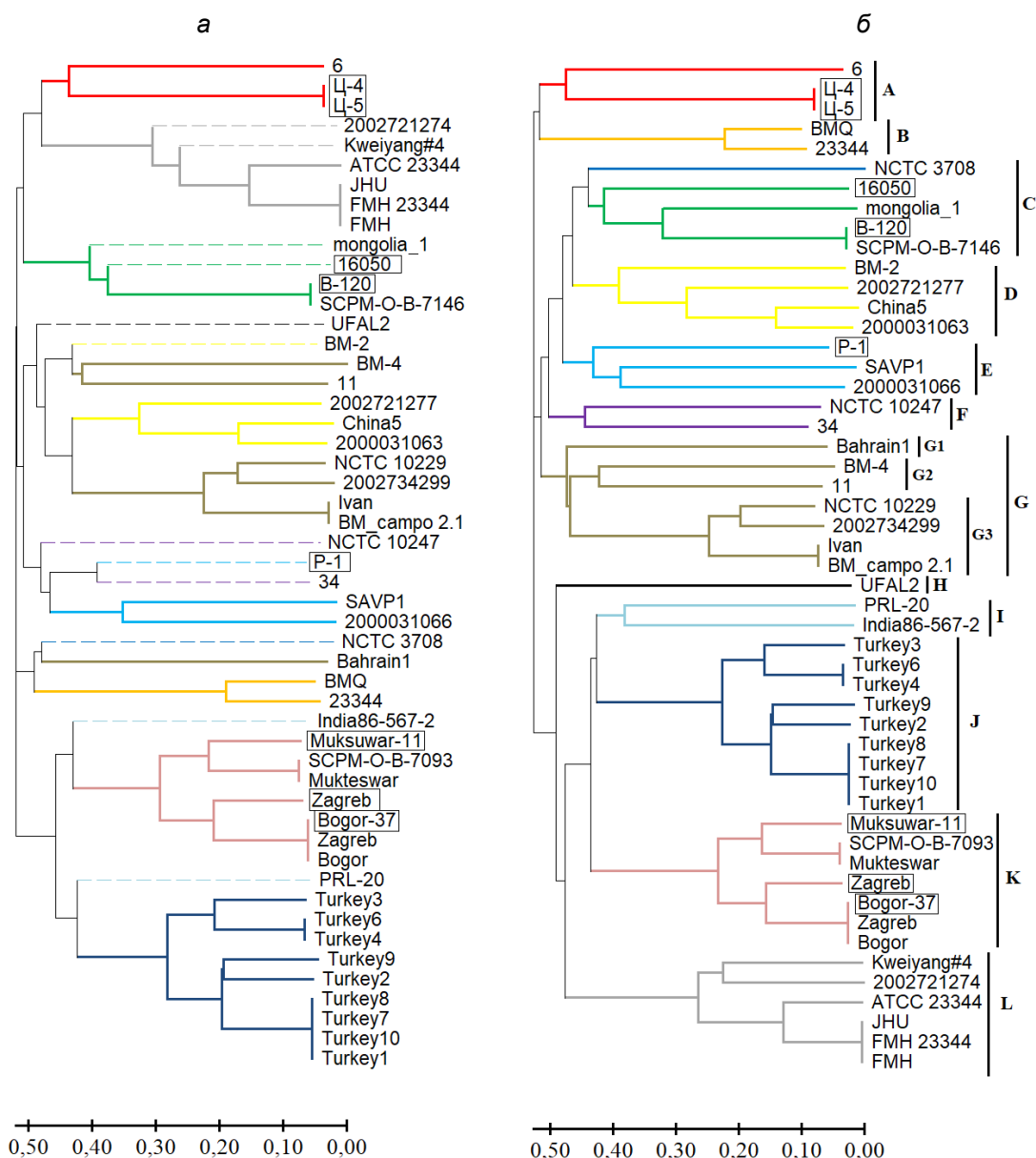
На соседних ветвях дендрограммы расположены штаммы из кластеров F и E. Для штаммов из кластера F — *B. mallei* 34 неизвестного проис-

хождения и NCTC 10247 — определено одинаковое число повторов по VNTR-локусам L3145k, L20k и BPSS1974^{#1}, а их DFR-профили были уникальны и отличались по локусам BmVAT1 и BmVAT6. В кластер E вошли штаммы из Индии (2000031066 и SAVP1) с идентичным MLVA-профилем по локусам L933k, L3145k и L20k, при этом их DFR-типы также являлись уникальными и отличались отсутствием локуса BmVAT6 у *B. mallei* SAVP1. Отдельную ветвь в составе кластера E сформировал штамм *B. mallei* P-1 из Югославии.

Включение локуса BPSS1974^{#1} в схему типирования позволило расположить штамм *B. mallei* BM-2 в виде отдельной ветви в составе кластера D, состоящего из штаммов *B. mallei* 2002721277, China5 и 2000031063. У всех штаммов этого кластера установлено одинаковое число повторов по локусам L3145k, L1217k и BPSS1974^{#1}, а также идентичный DFR-профиль (DFR16).

Генотип по локусу BPSS1974^{#1}, соответствующий 58 повторам, был выявлен только у индийского штамма *B. mallei* India86-567-2 и PRL-20, что позволило выделить эти штаммы в отдельный кластер I. Штамм India86-567-2 принадлежал к типу DFR01, а PRL-20 — к впервые выявленному нами типу DFR25, который отличался от DFR01 отсутствием локусов BmVAT5 и BmVAT8.

Особенно интересно положение выделенного и идентифицированного нами штамма *B. mallei* 16050, сформировавшего общий кластер с *B. mallei* mongolia_1 и генетически идентичными по MLVA-профилю *B. mallei* B-120 и его дубликатом SCPM-O-B-7146. У всех 4 штаммов выявлены идентичные DFR-профиль (DFR06) и VNTR-профили по локусам L20k и L1217k. При этом у *B. mallei* mongolia_1 и B-120 также определено одинаковое число повторов по локусам S2862k и BPSS1974^{#1}, а по локусам L933k и L3145k они отличались на 1 повтор, что позволило выделить эти штаммы в отдельную ветвь внутри кластера C. Для *B. mallei*



Сравнительный анализ результатов типирования 51 штамма *B. mallei* с помощью схемы MLVA-6 (а) и сочетанного использования схемы MLVA-6 и локуса BPSS1974^{#1} (б).

Одним цветом отмечены идентичные прикорневые кластеры. а: пунктирной линией отмечены штаммы, расположение которых изменилось при включении локуса BPSS1974^{#1}. Рамкой выделены штаммы из коллекции Волгоградского научно-исследовательского противочумного института.

16050 более тесная связь установлена со штаммом *B. mallei* B-120, поскольку их MLVA-профили содержали по 6 повторов в локусе L3145k.

Отдельную кластерную группу сформировал штамм UFAL2 (Бразилия, 2017 г.) с уникальным количеством повторов по локусам L20k ($n = 14$), S2862k ($n = 4$) и BPSS1974^{#1} ($n = 27$). При этом *B. mallei* UFAL2 наряду со штаммами из России и Монголии принадлежал к типу DFR06.

MLVA-профили дубликатов штаммов из различных коллекций были идентичны или отличались только по 1 из локусов, что позволяло им сохранять принадлежность к одному кластеру. Так, по локусу

L933k выявлены различия на 3 повтора у *B. mallei* Ц-4 и SCPM-O-B-4682 и на 1 повтор у *B. mallei* Ц-5 и SCPM-O-B-4683. Штамм Muksuwar-11 отличался от штаммов SCPM-O-B-7093 и Mukteswar (GCA_033870375.1) на 1 повтор по локусу S2862. Штамм Zagreb из коллекции нашего института отличался от Zagreb (GCA_033870355.1) на 5 повторов по локусу S2862 (табл. 2).

В результате дополнение локусом BPSS1974^{#1} схемы MLVA-6 позволило выявить более тесную генетическую связь ряда штаммов и сформировать новые кластеры, коррелирующие с их DFR-профилями.

Таблица 2. MLVA-профили дубликатов штаммов *B. mallei* из различных коллекций

Название штамма <i>B. mallei</i> (номер в GenBank)	Количество повторов в локусах						
	L933k	L3145k	L3652k	L20k	L1217k	S2862k	BPSS1974 ^{#1}
P-1*	6	5	11	7	–	6	55
SCPM-O-B-4688 (GCA_003627635.1)**	6	5	11	7	–	6	55
Muksuwar-11*	5	4	8	17	6,9	12	53
SCPM-O-B-7093 (GCA_003627585.1)**	5	4	8	17	6,9	11	53
Mukteswar (GCA_033870375.1)***	5	4	8	17	6,9	11	53
B-120*	10	6	8	17	5	6	55
SCPM-O-B-7146 (GCA_003627695.1)**	10	6	8	17	5	6	55
Ц-4*	11	7	6	17	–	8	54
SCPM-O-B-4682 (GCA_003627705.1)**	14	7	6	17	–	8	54
Ц-5*	11	7	6	17	–	8	54
SCPM-O-B-4683 (GCA_003627655.1)**	10	7	6	17	–	8	54
Bogor-37*	5	4	8	15	6,9	11	53
Bogor (GCA_033870395.1)***	5	4	8	15	6,9	11	53
Zagreb*	5	4	8	15	6,9	6	53
Zagreb (GCA_033870355.1)***	5	4	8	15	6,9	11	53

Примечание. *Штаммы *B. mallei* из коллекции Волгоградского научно-исследовательского противочумного института.

**Штаммы *B. mallei*, депонированные в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур.

***Штаммы *B. mallei* из Института Фридриха Леффлера Федерального научно-исследовательского института здоровья животных Германии.

Обсуждение

Эффективность внутривидового типирования возбудителей инфекционных заболеваний в значительной степени определяется доступностью нуклеотидных последовательностей их геномов. Проведение полногеномного секвенирования и последующая сборка генома возбудителя сапа осложнены большим количеством повторяющихся последовательностей и высоким содержанием GC. В результате из депонированных в GenBank NCBI на май 2025 г. 113 геномов *B. mallei* только 33 являлись полными, а большинство остальных геномов представлены десятками или сотнями контигов. При этом часть штаммов возбудителя сапа не были уникальными.

У ряда штаммов из сформированной нами выборки *in silico* установить VNTR-генотип по отдельным локусам было невозможно. Низкое покрытие ридями областей генома, соответствующих локусам L20k и L3652k, не позволило локализовать целевую VNTR-область в пределах одного контига у 5 штаммов. Недостаточное покрытие при секвенировании может быть обусловлено GC-составом этих регионов, составившее более 70% у референтного штамма *B. mallei* ATCC 23344.

Другая проблема при поиске целевых VNTR-локусов в неполных геномах — отсутствие соответствующих этим локусам участков генома (нуль-аллели). В этом случае не существует надёжного способа определения причины возникновения нуль-аллелей: это может быть следствием как естест-

венных эволюционных изменений, так и ошибок при сборке геномов. Нами были обнаружены нуль-аллели по локусу L1217k у 14 штаммов из выборки, 10 из которых были представлены неполными геномами, что привело к их исключению из дальнейшего исследования. При проведении ПЦР с ДНК коллекционных штаммов продукт амплификации по локусу L1217k отсутствовал у 3 штаммов. Вместе с тем нуль-аллели в полных геномах увеличивают риск ложной гомоплазии, поэтому во многих популяционных исследованиях такие локусы исключают из анализа. Однако вероятность регистрации нуль-аллеля на каждый локус возрастает при увеличении самой выборки, что может привести к исключению большого числа локусов, а это в свою очередь отрицательно повлияет на качество исследований.

В результате из первоначальной выборки были исключены 13 штаммов, а оставшийся 51 штамм *B. mallei* с помощью 6-локусной схемы VNTR-типирования был распределён по 39 MLVA-типам (HGDI = 0,981). Перспективность включения в эту схему локуса BPSS1974^{#1} определялась структурой мотива в его составе, вырожденность которого снижает вероятность ошибок ДНК-полимеразы в ходе репликации и секвенирования. При этом последовательность самого мотива находится под действием стабилизирующего отбора, что способствует его сохранению в геноме.

В проведённом нами исследовании установлено, что все VNTR-локусы имели PIC > 0,5, что ука-

зывало на их высокую дискриминационную силу, при этом эффективное число аллелей варьировало от 3,842 до 8,103 на локус и в среднем составило 6,381. По этим показателям локус BPSS1974^{#1} занимал промежуточное положение между VNTR-локусами L3145k и L933k, представленными совершенными и вырожденными мини-сателлитными повторами соответственно.

Успешная амплификация локуса BPSS1974^{#1} при проведении ПЦР с ДНК штамма *B. mallei* 16050, выделенного от больной лошади в 2023 г., свидетельствовала о стабильности областей, фланкирующих VNTR-регион. В свою очередь полно-размерная нуклеотидная последовательность локуса BPSS1974^{#1}, выявленная при анализе данных полногеномного секвенирования штамма *B. mallei* 16050, показала его перспективность при проведении *in silico* MLVA-типирования.

Полученные нами результаты кластерного анализа штаммов *B. mallei* на основе определения количества повторов в 7 VNTR-локусах были сопоставлены с данными мультилокусного сиквенс-типирования коровой области генома (core genome multilocus sequence typing, cgMLST), проведённого S. Appelt и соавт. [13]. Сравнение показало, что состав и взаимное расположение кластеров имели много общих черт. Так, по данным cgMLST, штаммы из Китая были сгруппированы в два основных кластера, соответствующие на построенной нами дендрограмме MLVA-кластерам D и L. В состав этих кластеров входили штаммы, у которых в GenBank географическим регионом происхождения указаны США: кластер L включал штаммы *B. mallei* 2002721274, JHU и FMH, а кластер D — *B. mallei* 2002721277. Установленная нами кластеризация согласовывалась с результатами cgMLST и свидетельствовала о вероятном китайском происхождении этих штаммов. Внутри кластера D подтверждена тесная связь между штаммами 2000031063 (Венгрия) и China5 (Китай), MLVA-профили которых отличались только по локусу S2862k. Наряду с данными cgMLST генетическая близость штаммов внутри MLVA-кластеров D и L подтвердилась и по результатам проведённого нами DFR-типирования. Так, за исключением *B. mallei* Kweiyang^{#4}, у которого отсутствовал продукт амплификации по локусу BmVAT6, для всех штаммов каждого кластера определён общий DFR-профиль.

Исследованные в ходе работы штаммы из Турции вошли в состав 3 разных кластеров. Дополненная локусом BPSS1974^{#1} схема MLVA-6 позволила распределить штаммы из этих кластеров в соответствии с их положением на минимальном основном дереве, построенном на основании данных cgMLST [13]. Так, по результатам типирования только с использованием схемы MLVA-6 в один кластер со штаммами из Турции был включён штамм

B. mallei PRL-20. Определение количества повторов по локусу BPSS1974^{#1} позволило выделить на дендрограмме *B. mallei* PRL-20 в отдельную ветвь со штаммом *B. mallei* India86-567-2 из Индии, а штаммы из Турции сформировали отдельный самый многочисленный кластер J. Два других штамма из Турции (*B. mallei* 11 и NCTC 10247) вошли соответственно в состав подкластера G2 и кластера F.

Включение локуса BPSS1974^{#1} в схему MLVA-6 позволило наряду со штаммом *B. mallei* India86-567-2 уточнить положение другого индийского штамма — *B. mallei* 3708, который сформировал отдельную ветвь в составе кластера C. Установленная с помощью разработанной схемы MLVA-7 кластеризация индийских штаммов согласовывалась с данными, полученными в исследовании H. Singha и соавт. [24]. В представленной работе на основании MLVA-типирования по 23 локусам выявлена принадлежность штаммов *B. mallei* India86-567-2, Mukteswar, SAVP1, BMQ и NCTC 3708 к разным кластерам, что соответствовало полученным в ходе нашего исследования результатам.

Установленные нами MLVA- и DFR-профили бразильских штаммов подтвердили ранее выдвинутое предположение о разных актах интродукции возбудителя сапа в Бразилию [25]. Так, выявленная нами тесная генетическая связь внутри подкластера G3 между штаммами европейского происхождения и BM_sapro 2.1 свидетельствовала о возможном завозе сапа в Бразилию из Европы, вероятно, при колонизации или торговле.

Включение в схему MLVA-6 локуса BPSS1974^{#1} позволило локализовать штамм *B. mallei* 11 в соседнем подкластере G2, что соответствовало данным M.V.D. Falcão и соавт. [25]. Авторы проводили типирование штаммов по 15 филогенетически информативным однонуклеотидным полиморфизмам методом ПЦР с последующим анализом плавления высокого разрешения, в результате которого была идентифицирована ветвь L3B3sB3, включающая штаммы из сформированных в нашей работе MLVA-кластеров G2 и G3. При анализе однонуклеотидных полиморфизмов [25] также показана принадлежность штамма *B. mallei* UFAL2 к ветви L3B2, включающей штаммы, выделенные на территории Бразилии. Из-за отсутствия в Genbank нуклеотидных последовательностей других бразильских штаммов нам не удалось определить MLVA- и DFR-профили штаммов линии L3B2. Вместе с тем уникальный VNTR-профиль штамма *B. mallei* UFAL2 позволил выделить его в отдельный MLVA-кластер H, что соответствует разделению бразильских штаммов по разным филогенетическим линиям.

По результатам MLVA- и DFR-анализа установлено тесное генетическое родство между штаммами *B. mallei* B-120 и 16050, выделенными с разницей в 18 лет от больных животных на территории Вос-

точной Сибири, и штаммом *B. mallei* mongolia_1, изолированным от больной лошади в Монголии в 2022 г. Принадлежность к одному DFR-типу (DFR06) и общий уникальный VNTR-профиль по локусам L20k и L1217k, наряду с географической близостью территорий этих стран, где были зарегистрированы вспышки сапа, позволяют предположить общий источник происхождения этих штаммов. Вместе с тем *B. mallei* Ц-4 и Ц-5, выделенные в Монголии в 1967 г., сформировали отдельный MLVA-кластер. DFR-тип (DFR06) был также идентифицирован у бразильского штамма *B. mallei* UFAL2. Общие DFR-профили для штаммов из разных MLVA-кластеров были выявлены и в ряде других случаев, что может свидетельствовать о снижении специфичности выбранных DFR-локусов по мере увеличения числа нуклеотидных последовательностей геномов *B. mallei* в генетических базах данных.

Выявленные изменения в VNTR-профилях дубликатов штаммов *B. mallei* из разных коллекций могут быть связаны с условиями хранения, в частности с методами поддержания бактериальных культур. В работе J.M. U'Ren и соавт. [26] при исследовании стабильности 32 VNTR-локусов, предложенных для типирования штаммов возбудителя мелиоидоза, с помощью метода серийных пассажей на чашках установлены изменения в 12 локусах. При этом мутации были выявлены в локусах L933k, L3145k и S2862k, которые вошли в разработанную нами схему типирования штаммов возбудителя сапа. Установленная в нашей работе вариативность локусов L933k и S2862k в геномах дубликатов штаммов *B. mallei* свидетельствовала о сходном характере изменчивости этих VNTR-локусов у патогенных буркхолдерий. Для локуса BPSS1974^{#1} определена стабильность его молекулярной структуры у штаммов в условиях разных коллекций, что важно при проведении эпидемиологических расследований и эволюционного анализа.

Заключение

VNTR-локус BPSS1974^{#1} можно расценивать как маркер, включение которого в схему MLVA-6 позволит повысить точность генотипирования и установления регионов происхождения вновь выделенных штаммов возбудителя сапа. Наряду с совершенствованием схем дифференциации штаммов возбудителя сапа для более эффективного внутривидового типирования необходимо увеличение количества доступных для анализа нуклеотидных последовательностей геномов *B. mallei* в сочетании с дополнением метаданных о точном географическом происхождении.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Топорков А.В., Виктор Д.В., Липницкий А.В. и др. *Мелиоидоз и сап*. Волгоград;2016. Toporkov A.V., Viktorov D.V.,

- Lipnitsky A.V., et al. *Melioidosis and Glanders*. Volgograd;2016. EDN: <https://elibrary.ru/wlrord>
2. Khan I., Wieler L.H., Melzer F., et al. Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures. *Transbound. Emerg. Dis.* 2013;60(3):204–21. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01342.x>
3. Raj A., Pathak A., Karuppusamy S., et al. Knowledge, awareness and perception about equine glanders among veterinarians and medical professionals in India. *Front. Vet. Sci.* 2024;11:1334485. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1334485>
4. Никифоров В.В., Мельникова Л.И., Зарьков К.А. и др. Сап: случай из практики. *Инфекционные болезни*. 2005;3(1): 89–92. Nikiforov V.V., Melnikova L.I., Zar'kov K.A., et al. Glanders: a clinical case. *Infectious Diseases*. 2005;3(1):89–92. EDN: <https://elibrary.ru/iadiwd>
5. Srinivasan A., Kraus C.N., Deshazer D., et al. Glanders in a military research microbiologist. *N. Engl. J. Med.* 2001;345(4):256–8. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJM200107263450404>
6. Онищенко Г.Г., Топорков А.В., Липницкий А.В., Виктор Д.В. Проблемы противодействия биологическому терроризму на современном этапе. *Инфекционные болезни. Новости. Мнения. Обучение*. 2016;1(14):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;(1):24–31. EDN: <https://elibrary.ru/vretnz>
7. Gilad J., Harary I., Dushnitsky T., et al. *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* as bioterrorism agents: national aspects of emergency preparedness. *Isr. Med. Assoc. J.* 2007;9(7):499–503.
8. Guilhot A., Bricaire F., Bossi P. Glanders, melioidosis and biowarfare. *Presse Med.* 2005;34(2 Pt. 2):185–8. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0755-4982\(05\)83900-4](https://doi.org/10.1016/s0755-4982(05)83900-4) (in French)
9. Мельникова Л.А., Букова Н.К., Макаев Х.Н. и др. Сап: особо опасное инфекционное заболевание, его характеристика, эпизоотология и диагностика. *Ветеринарный врач*. 2016;(4):22–5. Melnikova L.A., Bukova N.K., Makaev H.N., et al. Glanders — particularly dangerous disease: characterization, epizootology and detection. *Veterinarian*. 2016;(4):22–5. EDN: <https://elibrary.ru/whtgvj>
10. Go P.C., Sansthan A. Glanders — a re-emerging zoonotic disease. *J. Biol. Sci.* 2014;14(1):38–51. DOI: <https://doi.org/10.3923/jbs.2014.38.51>
11. Kettle A.N., Wernery U. Glanders and the risk for its introduction through the international movement of horses. *Equine Vet. J.* 2016;48(5):654–8. DOI: <https://doi.org/10.1111/evj.12599>
12. Elschner M.C., Klaus C.U., Liebler-Tenorio E., et al. *Burkholderia mallei* infection in a horse imported from Brazil. *Equine Vet. Educ.* 2009;21(3):147–50. DOI: <https://doi.org/10.2746/095777309X401071>
13. Appelt S., Rohleder A.M., Jacob D., et al. Genetic diversity and spatial distribution of *Burkholderia mallei* by core genome-based multilocus sequence typing analysis. *PLoS One*. 2022;17(7):e0270499. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270499>
14. Girault G., Wattiau P., Saqib M., et al. High-resolution melting PCR analysis for rapid genotyping of *Burkholderia mallei*. *Infect. Genet. Evol.* 2018;63:1–4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.05.004>
15. Hornstra H., Pearson T., Georgia S., et al. Molecular epidemiology of glanders, Pakistan. *Emerg. Infect. Dis.* 2009;15(12):2036–9. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1512.090738>
16. Losada L., Ronning C.M., DeShazer D., et al. Continuing evolution of *Burkholderia mallei* through genome reduction and large-scale rearrangements. *Genome Biol. Evol.* 2010;2:102–16. DOI: <https://doi.org/10.1093/gbe/evq003>

17. Бондарева О.С., Ткаченко Г.А., Леденева М.Л. и др. Разработка схемы генотипирования возбудителя сапа на основе мультилокусного анализа числа переменных тандемных повторов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019;96(5):8–16. Bondareva O.S., Tkachenko G.A., Ledenyova M.L., et al. Development of genotyping method of the glanders causative agent based on multiple locus variable-number tandem repeat analysis. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2019;96(5):8–16. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-5-8-16> EDN: <https://elibrary.ru/osgwxb>
18. Леденева М.Л., Ткаченко Г.А., Захарова И.Б. Новые генетические маркеры для типирования штаммов *Burkholderia pseudomallei*. *Инфекция и иммунитет*. 2022;12(6):1091–102. Ledenyova M.L., Tkachenko G.A., Zaharova I.B. New genetic markers for *Burkholderia pseudomallei* strains typing. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2022;12(6):1091–102. EDN: <https://elibrary.ru/gdlreo>
19. Бондарева О.С., Савченко С.С., Ткаченко Г.А. и др. Генотипирование штаммов *Burkholderia mallei* на основе метода амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2016;34(1):33–7. Bondareva O.S., Savchenko S.S., Tkachenko G.A., et al. Genotyping of the *Burkholderia mallei* strains based on different region analysis. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2016;34(1):33–7. DOI: <https://doi.org/10.18821/0208-0613-2016-34-1-33-37> EDN: <https://elibrary.ru/vxmnaaz>
20. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., et al. Spades: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012;19(5):455–77. DOI: <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
21. Schluter P.M., Harris S.A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Mol. Ecol. Notes*. 2006;6(2): 569–72.
22. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 2021;38(7):3022–7. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
23. 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;26(11):2465–6. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988>
24. Singha H., Elschner M.C., Malik P., et al. Molecular typing of *Burkholderia mallei* isolates from equids with glanders, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2021;27(6):1745–8. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2706.203232>
25. Falcão M.V.D., Laroucau K., Vorimore F., et al. Molecular characterization of *Burkholderia mallei* strains isolated from horses in Brazil (2014–2017). *Infect. Genet. Evol.* 2022;99:105250. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105250>
26. U'Ren J.M., Schupp J.M., Pearson T., et al. Tandem repeat regions within the *Burkholderia pseudomallei* genome and their application for high resolution genotyping. *BMC Microbiol.* 2007;7:23. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-23>

Информация об авторах

Леденева Маргарита Леонтьевна — н. с. лаб. генодиагностики особо опасных инфекций Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, volresin@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5923-4774>

Бондарева Ольга Сергеевна — канд. мед. наук, с. н. с. лаб. генодиагностики особо опасных инфекций Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, fiat-lux@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5690-6686>

Ткаченко Галина Александровна — канд. мед. наук, доцент, в. н. с. отд. биологического и технологического контроля Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, tkachenko_g@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0199-3342>

Устинов Димитрий Владимирович — н. с. лаб. биоинформационного анализа Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, naugron@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4516-731X>

Захарова Ирина Борисовна — д-р биол. наук, доцент, в. н. с. лаб. патогенных буркгольдерий Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, Волгоград, Россия, zib279@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7808-7658>

Участие авторов: Леденева М.Л. — концепция и дизайн исследования, проведение типирования штаммов *in silico*, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи, формирование окончательного варианта статьи для публикации; Бондарева О.С. — проведение типирования штаммов *in vitro*, анализ и интерпретация данных; Ткаченко Г.А. — анализ данных, редактирование рукописи; Устинов Д.В. — проведение полногеномного секвенирования, обработка полученных результатов; Захарова И.Б. — работа с бактериями штаммами, редактирование рукописи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 07.07.2025;
принята к публикации 14.09.2025;
опубликована 31.10.2025

Information about the author

Margarita L. Ledenyova — researcher, Laboratory of gene diagnostics of particularly dangerous infections, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, volresin@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5923-4774>

Olga S. Bondareva — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of gene diagnostics of particularly dangerous infections, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, fiat-lux@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5690-6686>

Galina A. Tkachenko — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, leading researcher, Department of biological and technological control, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, tkachenko_g@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0199-3342>

Dimitriy V. Ustinov — researcher, Laboratory of bioinformatics analysis, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, naugron@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-4516-731X>

Irina B. Zakharova — Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor, leading researcher, Laboratory of pathogenic burkholderia, Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd, Russia, zib279@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7808-7658>

Authors' contribution: Ledenyova M.L. — concept and design of the study, *in silico* strain typing, data analysis and interpretation, writing the article, forming the final version of the article for publication; Bondareva O.S. — *in vitro* strain typing, data analysis and interpretation; Tkachenko G.A. — data analysis, editing the manuscript; Ustinov D.V. — whole-genome sequencing, processing the obtained results; Zakharova I.B. — work with bacterial strains, editing the manuscript. All authors confirm that their authorship meets the criteria of the International Committee of Medical Journal Editors, made a significant contribution to the search and analytical work and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

The article was submitted 07.07.2025;
accepted for publication 14.09.2025;
published 31.10.2025