

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-42-49

УДК 616.98:579.841.93

Е.А. Анисимова, Д.А. Миргазов, Е.А. Додонова, И.А. Елизарова, Е.В. Панкова, К.А. Осянин

### Применение HRM-анализа кривых плавления, полученных после амплификации VNTR-локусов, для идентификации и дифференциации штаммов бруцелл

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Казань, Российская Федерация

**Цель** исследования – оценка эффективности анализа кривых плавления высокого разрешения, полученных после амплификации VNTR-локусов, для идентификации и дифференциации штаммов бруцелл. **Материалы и методы.** В качестве объектов исследования использовали 16 штаммов бруцелл видов *Brucella canis* (n=1), *B. abortus* (n=9), *B. melitensis* (n=2) и *B. suis* (n=4) различного географического происхождения. MLVA-типирование проводили методом классической ПЦР с последующим разделением ампликонов в агарозном геле и методом ПЦР-РВ с пост-амплификационным анализом кривых плавления VNTR-локусов в присутствии интеркалирующего красителя SybrGreen. Биоинформационный анализ выполняли с помощью программ Vector NTI 9.1 и Mega 11 (алгоритм MUSCLE). Филогенетический анализ проводили методом UPGMA с помощью программы Mega 11. **Результаты и обсуждение.** С помощью MLVA-подхода, основанного на анализе кривых плавления ПЦР-продуктов, полученных после амплификации VNTR-локусов, показано, что каждый из 16 штаммов бруцелл характеризуется уникальным профилем температур плавления. Методом ПЦР с последующим электрофорезом установлено, что, несмотря на высокую вариабельность использованных VNTR-последовательностей ( $h=0,48\dots0,74$ ), только пост-амплификационные кривые плавления локусов Bru7, Bru9, Bru18, Bru21 обладали достаточной информативностью для определения генетического полиморфизма исследованных штаммов бруцелл. На основании филогенетического анализа последовательностей Bru7, Bru9, Bru18, Bru21 показано, что большинство исследуемых штаммов бруцелл распределялись на дендрограмме в соответствии с их таксономическим и географическим положением. Таким образом, HRM-анализ кривых плавления, полученных после амплификации локусов Bru7, Bru9, Bru18, Bru21, имеет потенциал использования для дифференциации штаммов бруцелл.

**Ключевые слова:** бруцеллез, *Brucella canis*, *B. suis*, *B. melitensis*, *B. abortus*, ПЦР, MLVA, кривые плавления.

Корреспондирующий автор: Анисимова Елизавета Алексеевна, e-mail: elizaveta-real@mail.ru.

Для цитирования: Анисимова Е.А., Миргазов Д.А., Додонова Е.А., Елизарова И.А., Панкова Е.В., Осянин К.А. Применение HRM-анализа кривых плавления, полученных после амплификации VNTR-локусов, для идентификации и дифференциации штаммов бруцелл. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 4:42–49. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-42-49

Поступила 21.07.2023. Отправлена на доработку 29.08.2023. Принята к публ. 01.11.2023.

Е.А. Anisimova, D.A. Mirgazov, E.A. Dodonova, I.A. Elizarova, E.V. Pankova, K.A. Osyenin

### Use of HRM-Analysis of the Melting Curves Obtained after Amplification of VNTR-Loci for Identification and Differentiation of *Brucella* Strains

Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation

**Abstract.** The aim of the present study was to evaluate the effectiveness of analysis of the high resolution melting curves obtained after amplification of VNTR loci for the identification and differentiation of *Brucella* strains. **Materials and methods.** 16 strains of *Brucella* species – *B. canis* (n=1), *B. abortus* (n=9), *B. melitensis* (n=2), *B. suis* (n=4) – of different geographical origin were used as objects of the research. The MLVA-typing was performed using conventional PCR followed by separation of amplicons in agarose gel and real-time PCR with post-amplification analysis of the curves of VNTR loci melting in the presence of intercalating dye SybrGreen. Bioinformatics analysis was conducted with the help of Vector NTI 9.1, Mega 11 software (MUSCLE algorithm). Phylogenetic analysis was carried out applying UPGMA method using the Mega 11 program. **Results and discussion.** MLVA approach based on the analysis of the melting point curves of the obtained after amplification of VNTR-loci PCR fragments has shown that each of the 16 strains of *Brucella* is characterized by a unique melting temperature profile. PCR followed by electrophoresis has demonstrated that despite the high variability of the used VNTR sequences ( $h=0.48\dots0.74$ ), only post-amplification melting curves of the Bru7, Bru9, Bru18, Bru21 loci had sufficient information content to determine the genetic polymorphism of the studied *Brucella* strains. Based on the results of phylogenetic analysis of the Bru7, Bru9, Bru18, Bru21 sequences, it has been found that the majority of the studied *Brucella* strains are distributed in the dendrogram in accordance with their taxonomic and geographical position. Thus, HRM analysis of melting curves obtained after amplification of the Bru7, Bru9, Bru18, Bru21 loci has the potential to be used for differentiating *Brucella* strains.

**Key words:** brucellosis, *Brucella canis*, *B. suis*, *B. melitensis*, *B. abortus*, PCR, MLVA, melting curves.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Funding:** The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Elizaveta A. Anisimova, e-mail: elizaveta-real@mail.ru.

Citation: Anisimova E.A., Mirgazov D.A., Dodonova E.A., Elizarova I.A., Pankova E.V., Osyaniin K.A. Use of HRM-Analysis of the Melting Curves Obtained after Amplification of VNTR-Loci for Identification and Differentiation of *Brucella* Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 4:42–49. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-42-49

Received 21.07.2023. Revised 29.08.2023. Accepted 01.11.2023.

Anisimova E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0416-6193>

Mirgazov D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4709-314X>

Dodonova E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6919-4064>

Elizarova I.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0802-435X>

Pankova E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4446-4619>

Osyaniin K.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2763-8605>

Бруцеллез – особо опасное инфекционно-аллергическое зоонозное заболевание, возбудителем которого являются бактерии рода *Brucella*. В настоящее время данный род включает в себя 12 видов, из которых наиболее патогенными для человека являются *B. melitensis*, *B. abortus* и некоторые биовары *B. suis* и *B. canis* [1]. Основными путями заражения человека бруцеллезом являются контакт с инфицированными животными, а также употребление в пищу сырой животноводческой продукции, полученной от больного поголовья [2]. Несмотря на примерно 97 % сходства на генетическом уровне, определенные виды бруцелл преимущественно ассоциируются с конкретными животными [3]. Так, основным хозяином у *B. abortus* является крупный рогатый скот, у *B. melitensis* – овцы и козы, у *B. canis* – собаки, а у *B. suis* – свиньи (биовары 1, 2 и 3), северные олени (биовар 4) и мышевидные грызуны (биовар 5) [4].

На протяжении последних десяти лет эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации характеризуется как достаточно напряженная и, как правило, определяется активностью эпизоотического процесса среди эпидемиологически значимых видов крупного (КРС) и мелкого (МРС) рогатого скота в скотоводческих и овцеводческих хозяйствах, а также на козых и свинофермах [5]. Помимо угрозы общественному здоровью, бруцеллез наносит значительный экономический ущерб.

В мировой практике используются различные подходы (серологические, бактериологические и т.п.) для индикации и идентификации возбудителя бруцеллеза, определения его патогенного потенциала. Для проведения противозoonических мероприятий, а также расследования вспышек бруцеллезной инфекции возрастающее значение приобретают подходы, позволяющие проводить молекулярно-генетическую характеристику бруцелл на уровне штамма. В свою очередь для характеристики микроорганизмов с высоким уровнем гомологии ДНК, к которым относятся и бактерии рода *Brucella* [6–9], широкое применение получил многолокусный анализ числа варьируемых тандемных повторов (MLVA). Этот метод позволяет дифференцировать штаммы одного вида между собой, определять их эволюционное происхождение, а также принадлежность к тому или иному биовару. Традиционно генотипирование включает в себя два последовательных этапа, а именно ПЦР-амплификацию VNTR-локусов и учет их размеров с помощью электрофореза. В данном исследовании мы рассмотрели возможность проведения MLVA в реальном времени с помощью подхода, основанного на анализе кривых плавления ПЦР-продуктов высокого разрешения, полученных

после амплификации VNTR-локусов. Аналогичная схема типирования была успешно применена нами для оценки генетического полиморфизма штаммов возбудителя сибирской язвы [10, 11].

**Целью** исследования является оценка эффективности анализа кривых плавления высокого разрешения, полученных после амплификации VNTR-локусов, для идентификации и дифференциации штаммов бруцелл.

## Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали 16 штаммов бруцелл: *B. canis* RM 6/66, *B. suis* (1330, 6989, 183-1, У-1), *B. melitensis* (1565, 1190) и *B. abortus* (82, 19, R-1096, УФ-1, 54М, 287-9, 7856, 544, 1561) из Государственной коллекции штаммов возбудителей особо опасных болезней, используемых в ветеринарии и животноводстве, ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Подготовку проб для дальнейших молекулярно-генетических исследований проводили согласно методическим указаниям МУК 3.1.7.3402-16 «Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Выделение ДНК бруцелл проводили с помощью набора «ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Россия) согласно инструкции производителя. Для амплификации VNTR-локусов использовали праймеры [12], разработанные нами ранее на основе нуклеотидных последовательностей, традиционно используемых для MLVA [13]. Претерпевшие ридзайн олигонуклеотидные затравки имеют температуру плавления (50,83±0,27) °С, однако при подборе условий проведения ПЦР *in vitro* установили, что наиболее оптимальной для отжига праймеров является температура 54 °С.

Реакционная ПЦР-смесь объемом 15 мкл содержала 2,5 мкл 10×ПЦР буфера, 1,5 мкл 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 пкМ каждого праймера, 2,5 мкл 2,5 мМ dNTP, 0,5 мкл Taq-полимеразы, 2,5 мкл ДНК матрицы, 5 мкл ddH<sub>2</sub>O. Амплификацию проводили по следующей программе: начальная денатурация ДНК при 95 °С в течение 5 мин, далее 45 циклов: денатурация при 95 °С – 10 с, отжиг олигонуклеотидов при 54 °С – 30 с, элонгация при 72 °С – 10 с.

ПЦР-продукты разделяли электрофорезом в 1,5 % агарозном геле с последующей окраской бромистым этидием. Визуализацию проводили с помощью UV-транслюминатора. Размер полученных

фрагментов определяли с использованием программы Gel Analyzer путем сравнения фрагмента с маркером молекулярной массы ДНК 100+ bp DNA Ladder (ЗАО «Евроген», Москва).

Реакционная смесь для постановки ПЦР-РВ объемом 15 мкл содержала 1,5 мкл 10×ПЦР-буфера с красителем SYBRGreen (ЗАО «Синтол», Россия), 25 мМ раствора MgCl<sub>2</sub> (ЗАО «Синтол», Россия), 0,5 единиц Taq-полимеразы (ЗАО «Синтол», Россия), 2,5 мМ дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 5 pM прямого и обратного праймера, 10 нг ДНК-матрицы, ddH<sub>2</sub>O (до 15 мкл). Амплификацию проводили по следующей программе: начальная денатурация при 95 °С в течение 5 мин; 39 циклов: денатурация при 95 °С – 10 с, отжиг олигонуклеотидов при 54 °С – 30 с (детекция по каналу FAM) и элонгация при 72 °С – 10 с. После амплификации осуществляли анализ кривых плавления с использованием следующей программы: при температуре от 65 до 95 °С (шаг 0,2 °С) – 5 с. Графический анализ кривых плавления продуктов амплификации выполняли в программе CFX Manager™ (Bio-Rad, США).

Статистическую обработку результатов проводили в программе Microsoft Office Excel 2017. Для оценки вариабельности VNTR-локусов вычисляли индекс аллельного полиморфизма (h) [14].

Биоинформационный анализ осуществляли с помощью программ Vector NTI 9.1 и баз данных ресурсов NCBI (<https://www.ncbi.gov>). Множественное выравнивание выполнили с использованием алгоритма MUSCLE в программе Mega 11.

Филогенетический анализ проводили методом попарного невзвешенного кластерирования с арифметическим усреднением (UPGMA). Для оценки достоверности филогенетических связей использовали многократную генерацию методом Bootstrap для 1000 независимых построений каждого филогенетического дерева.

### Результаты и обсуждение

Для генотипирования штаммов возбудителя бруцеллеза использовали предложенную нами ранее схему MLVA, которая включает в себя анализ 15 VNTR-локусов с длиной мотива тандемных повторов от 6 до 134 п.н. [12].

Традиционно учет результатов MLVA осуществляют путем определения размера ПЦР-продуктов методом электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле с последующим секвенированием полученных ампликонов, а также с применением капиллярных анализаторов или с использованием зондов с флуоресцентной меткой [15]. Вышеперечисленные методики являются достаточно трудоемкими, а также требуют высокотехнологичного дорогостоящего оборудования и расходных материалов. Ранее нами был разработан альтернативный подход для MLVA-типирования штаммов *Bacillus anthracis*, основанный на пост-амплификационной детекции кривых

плавления VNTR-последовательностей с использованием интеркалирующих красителей [10]. Данный метод базируется на главном принципе HRM (high resolution melting): чем больше Г/Ц пар оснований содержит ПЦР-продукт, тем выше температура его плавления. В этом случае детекция результатов происходит в реальном времени и, как следствие, не требует дальнейших манипуляций с ампликонами, что значительно убыстряет и удешевляет процесс VNTR-типирования, а также снижает риск контаминации. Отметим, что ранее HRM успешно применялся для детекции однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) бруцелл с целью их индикации на видовом уровне [16, 17]. В данном исследовании мы впервые рассмотрели возможность использования пост-амплификационных кривых плавления для типизации бруцелл методом MLVA.

С этой целью для 16 штаммов бруцелл, относящихся к различным видам (*B. canis*, *B. suis*, *B. melitensis* и *B. abortus*) и биоварам, провели MLVA-типирование с пост-амплификационным анализом кривых плавления VNTR-локусов в режиме реального времени. ПЦР-РВ амплификацию провели в трех репликах, после чего рассчитали медианное значение (табл. 1). Для большинства штаммов результаты амплификации по локусам Bru4, Bru8, Bru10, Bru11 и Bru55 оказались отрицательными, поэтому их исключили из работы. Для остальных локусов разница между повторами составила ≤0,3 °С и, как следствие, для дифференциации штаммов бруцелл на основании разниц температур плавления VNTR-локусов допустимым отличием приняли значение от 0,3 °С.

Как видно из табл. 1, каждый из 16 использованных в рамках данного исследования штаммов обладает уникальным профилем пост-амплификационных температур плавления VNTR-локусов. На этом основании можно предположить, что использованные штаммы бруцелл принадлежат к 16 различным генотипам.

Для штаммов *B. canis* RM 6/66, *B. suis* 1330, *B. suis* 183-Л, *B. melitensis* 1565, *B. melitensis* 1190, *B. abortus* R-1096, *B. abortus* 287-9, характеризующихся наиболее разнообразными температурами плавления ПЦР-продуктов, определили молекулярную массу VNTR-локусов с помощью классической ПЦР с последующим разделением ампликонов в агарозном геле. Также размеры VNTR-локусов референтных штаммов *B. canis* RM 6/66 и *B. suis* 1330 подтвердили *in silico*. Для этого с помощью программы Vector NTI 9.1 нуклеотидные последовательности I и II хромосом *B. canis* RM 6/66 и *B. suis* 1330, представленные в базе данных GenBank, ограничили соответствующими праймерами. Полученные для референтных штаммов размеры ампликонов перевели в числовой формат копий тандемных повторов. После чего путем экстраполяции рассчитали количество повторов в каждом локусе для остальных исследуемых штаммов. Результаты, проведенные по десяти локусам MLVA-типирования, представлены в табл. 2.

Таблица 1 / Table 1

Температуры плавления ПЦР-продуктов, полученных после амплификации VNTR-локусов исследуемых штаммов бруцелл  
Melting points of PCR products obtained after amplification of VNTR-loci of the studied *Brucella* strains

Штамм Strain	Биовар Biovar	Лocus, °C / Locus, °C									
		Bru6	Bru7	Bru9	Bru16	Bru18	Bru19	Bru21	Bru30	Bru43	Bru45
<i>B. canis</i> RM 6/66	–	84,4	84,1	84,3	81,1	82,2	86,4	84,4	87,9	85,2	89,5
<i>B. suis</i> 1330	1	84,3	84,1	81,3	80,6	81,7	86	84,4	87,6	84,6	89,3
<i>B. suis</i> 6989	1	84,3	83,6	81,3	80,5	81,5	86	83,8	87,5	84,6	89,4
<i>B. suis</i> 183-Л	2	84,4	84,1	84,1	80,4	82,4	86,6	84	87,6	85,1	89,4
<i>B. suis</i> Y-1	3	84,1	84,1	80,5	80,5	82,1	86	84	87,7	85,6	89,4
<i>B. melitensis</i> 1565	2	84,5	83,8	80,5	80,7	81,8	86,3	84,2	87,8	85,8	89,5
<i>B. melitensis</i> 1190	3	84,3	83,9	83,9	81	81,7	86,1	84,5	87,2	85,4	89,4
<i>B. abortus</i> 82	–	83,3	83,9	82	80,5	82,2	86	83,8	87,7	85,5	89,4
<i>B. abortus</i> 19	–	84,1	84,1	80,5	80,4	82	85,8	83,8	87,5	85,5	89,4
<i>B. abortus</i> R-1096	–	84,3	85	82	80,5	82,5	86	84,1	87,9	85,7	89,4
<i>B. abortus</i> 287-9	3	74,9	84,1	83,7	80,6	82,3	86,2	84	87,6	84,7	89,4
<i>B. abortus</i> 7856	6	84	84,1	80,5	80,5	82,2	86,2	84	87,2	85,1	89,5
<i>B. abortus</i> 54M	–	76	83,9	81	80,7	82,3	86,1	84	87,8	85,7	89,5
<i>B. abortus</i> 544	1	84,2	83,9	80,5	80,7	82,2	86	84,8	87,6	85,7	89,5
<i>B. abortus</i> 1561	7	75,8	84,6	82	80,6	82,2	86	84,1	87,7	85,6	89,4
<i>B. abortus</i> УФ-1	–	75,9	83,9	80,5	80,5	82,3	85,8	83,9	87,5	85,6	89,5

Примечание: в таблице представлено медианное значение, рассчитанное на основании значений трех повторностей.

Note: the table shows the median value calculated from the values of three replicates.

Отметим, что для амплификации участков генома, содержащих VNTR-последовательности, использовали модифицированный вариант праймеров для MLVA [12]. Поэтому молекулярная масса ПЦР-продуктов, полученных после амплификации VNTR-локусов, у референтных штаммов бруцелл отличалась от представленных в международных базах [13].

В целом установили, что использованная схема генотипирования обладает высокой дискриминирующей способностью ввиду высокой вариабельности использованных VNTR-локусов. Так, индекс разнообразия использованных VNTR-локусов находился в диапазоне от 0,48 до 0,74, наибольшей дискриминационной способностью обладал locus Bru9.

Вместе с тем полученные для шести из десяти использованных VNTR-локусов пост-амплификационные кривые плавления не обладали достаточной информативностью для определения их молекулярной массы. Так, вне зависимости от количества повторов в локусе Bru6, температура его плавления составляет (84,4±0,1) °C. Наибольшую температуру плавления ампликона, полученного после амплификации локуса Bru16, наблюдали для штаммов *B. canis* RM 6/66 и *B. melitensis* 1190, содержащих в данном локусе пять повторов. Остальные штаммы содержат в данном локусе от трех до пяти повторов и характеризуются идентичными кривыми плавления локуса Bru16, различающимися менее чем на 0,2 °C. Вариабельность локусов Bru30 и Bru45 составила 0,55 и 0,48 соответственно. Однако значения темпе-

ратур плавления, полученные после амплификации данных локусов, имели различия между штаммами менее чем на 0,3 °C, следовательно, не являются достоверными. Для большинства бруцелл кривые плавления ПЦР-продуктов, полученные после амплификации локуса Bru19, не имели значимых отличий. Исключением является штамм *B. suis* 183-Л, содержащий в своем геноме наибольшее количество повторов в локусе Bru19 и демонстрирующий более высокую температуру плавления его ампликонов в сравнении с остальными штаммами. Что касается локуса Bru43, достоверные различия между значениями, полученными после плавления данных ампликонов, установлены только для содержащих два tandemных повтора штаммов *B. melitensis* 1565 и *B. abortus* R-1096. Следовательно, полученные данные о кривых плавления локуса Bru43 позволяют идентифицировать только штаммы, содержащие два повтора в данном локусе.

Согласно методике HRM, чем выше температура плавления ПЦР-продукта, полученного после амплификации VNTR-локуса, тем больше tandemных повторов он содержит [10]. Ожидаемая корреляция прослеживалась только для четырех локусов, а именно Bru7, Bru9, Bru18, Bru21. Следовательно, кривые плавления только этих локусов могут быть использованы для определения генетического полиморфизма штаммов бруцелл.

На следующем этапе работы для всех 16 штаммов бруцелл провели сравнительный анализ VNTR-последовательностей Bru7, Bru9, Bru18, Bru21.

Таблица 2 / Table 2

Характеристика VNTR-локусов исследуемых штаммов бруцелл  
Characterization of VNTR-loci of the studied *Brucella* strains

Штамм Strain	Локус / Locus												0,57	0,55	0,74	0,55	0,67	0,64	0,61	0,55	0,48	0,61									
	Bru6			Bru7			Bru9			Bru16													Bru18			Bru19			Bru21		
	Размер локуса, п.н.	Температура плавления, °C	Количество повторов	Размер локуса, п.н.	Температура плавления, °C	Количество повторов	Размер локуса, п.н.	Температура плавления, °C	Количество повторов	Размер локуса, п.н.	Температура плавления, °C	Количество повторов	Размер локуса, п.н.	Температура плавления, °C	Количество повторов	Размер локуса, п.н.	Температура плавления, °C	Количество повторов	Размер локуса, п.н.	Температура плавления, °C	Количество повторов	Размер локуса, п.н.	Температура плавления, °C	Количество повторов	Размер локуса, п.н.	Температура плавления, °C	Количество повторов	Размер локуса, п.н.	Температура плавления, °C	Количество повторов	
<i>B. canis</i> RM 6/66*	273	84,4	2	165	84,1	6	160	84,3	7	168	81,1	5	146	82,2	5	170	86,4	40	175	84,4	9	129	87,9	3	163	85,2	1	188	89,5	5	
<i>B. suis</i> 1330*	273	84,3	2	165	84,1	6	144	81,3	5	168	80,6	5	138	81,7	4	164	86	38	175	84,4	9	129	87,6	3	163	84,6	1	188	89,3	5	
<i>B. suis</i> 183-JI	273	84,4	2	165	84,1	6	160	84,1	7	160	80,3	4	166	82,4	7	184	86,6	44	159	84	7	121	87,6	2	151	85,1	0	134	89,4	2	
<i>B. melitensis</i> 1565	139	84,5	1	157	83,8	5	128	80,5	3	152	80,7	3	138	81,8	4	178	86,3	42	167	84,2	8	185	87,8	6	175	85,8	2	152	89,5	3	
<i>B. melitensis</i> 1190	273	84,3	2	157	83,9	5	152	83,9	6	168	81	5	138	81,7	4	170	86,1	40	175	84,5	9	137	87,2	4	163	85,4	1	188	89,4	5	
<i>B. abortus</i> R-1096	139	84,3	1	197	85	10	148	82	5	152	80,5	4	162	82,5	7	170	86	42	167	84,1	8	129	87,9	3	175	85,7	2	152	89,4	3	
<i>B. abortus</i> 287-9	-	-	0	165	84,1	6	152	83,7	6	152	80,6	4	162	82,3	7	178	86,2	40	159	84	7	129	87,6	3	163	84,7	1	134	89,4	2	
Вариабельность локуса (h) Locus variability (h)																															

Примечание: \* отмечены штаммы, размеры VNTR-локусов которых подтверждены *in silico*.

Note: \* strains the size of VNTR-loci of which is confirmed *in silico*.

С этой целью на основании полученных для семи штаммов бруцелл данных о температурах плавления локусов Bru7, Bru9, Bru18, Bru21, соотносящихся с их размером, определили количество повторов в данных локусах для остальных девяти штаммов бруцелл. Полученные результаты подтвердили методом классической ПЦР с электрофоретическим разделением продуктов амплификации в агарозном геле, после чего построили дендрограмму, представленную на рисунке.

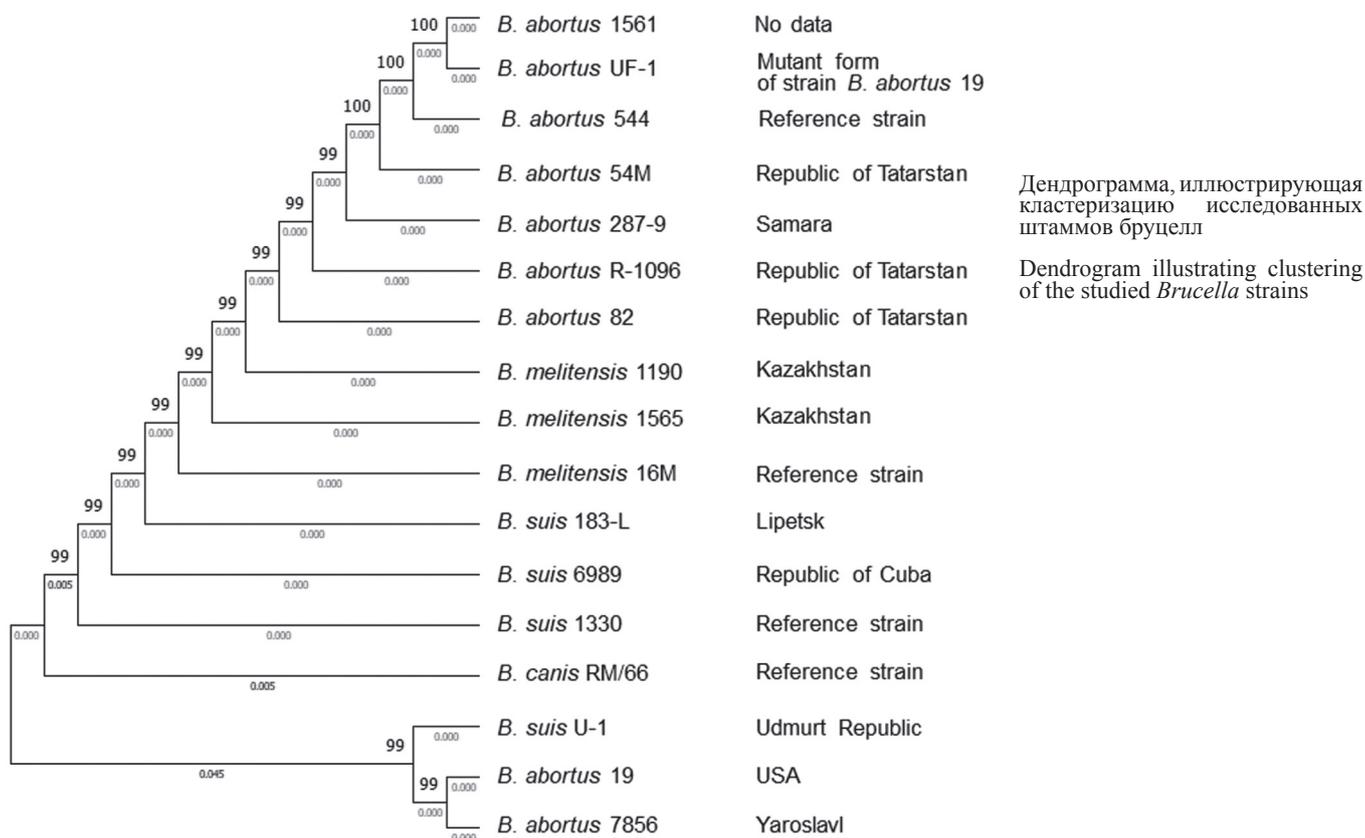
В результате кластерного анализа установили деление всех штаммов на два кластера, самый крупный из которых представлен штаммами видов *B. abortus*, *B. melitensis* и *B. suis*, группирующихся на дендрограмме согласно их видовой принадлежности и географическому происхождению. В частности, штаммы *B. abortus* 54М, 287-9, R-1096, 82, выделенные на территории Приволжского федерального округа, формируют соседние ветви в одном кластере. Отдельную подгруппу составили вакцинные штаммы *B. abortus* 1561, УФ-1 и референтный штамм *B. abortus* 544. Штамм *B. abortus* 1561 впервые выделен в 1971 г. в Балхашском районе (Казахстан) от предварительно вакцинированного животного, поэтому установить его точное географическое происхождение не представляется возможным. Находящийся с ним в одной кладе штамм *B. abortus* УФ-1 является мутантной формой производственного штамма *B. abortus* 19, поскольку получен путем воздействия УФ-излучения на данный микроорганизм [18]. Однако отметим, что, несмотря

на генетическое родство *B. abortus* УФ-1 и 1561, данные штаммы, вероятно, происходят из разных географических регионов, поскольку исходный штамм *B. abortus* 19 и его УФ-форма находятся в разных кластерах.

Штаммы II и III биовара вида *B. melitensis*, выделенные на территории Казахстана, расположились на соседних ветках, выходящих из разных узлов. Аналогичным образом группировались относящиеся к I и II биоварам штаммы *B. suis* 6989, 1330 и 183-Л. Исключением является штамм III биовара *B. suis* У-1, который образует отдельный кластер вместе с кладой, состоящей из штаммов *B. abortus* 19 и 7856. Следовательно, использование только четырех VNTR-локусов в схеме HRM-анализа оказалось недостаточным для дифференциации данных штаммов между собой.

Как видно из представленной на рисунке дендрограммы, все четыре штамма *B. suis* вышли из общего с *B. canis* RM 6/66 узла, что свидетельствует об их генетическом родстве. Данный факт находит подтверждение в исследованиях отечественных и зарубежных авторов [19, 20]. Так, в работе Ю.К. Кулакова и соавт. референтные штаммы *B. canis* RM 6/66 и *B. suis* 1330 составляли общую кладу филогенетического дерева [19].

Таким образом, установили, что проведенное по четырем локусам Bru7, Bru9, Bru18, Bru21 MLVA-типирование позволяет систематизировать большинство использованных штаммов бруцелл в соответствии с их таксономическим положением.



Из этого можно сделать вывод, что MLVA с последующим анализом кривых плавления ПЦР-продуктов, полученных после амплификации VNTR-локусов, имеет потенциал эффективного применения для проведения видовой и, в ряде случаев, штаммовой дифференциации бруцелл. Однако тот факт, что штаммы *B. abortus* 19 и 7856 объединились в один кластер со штаммом *B. suis* У-1, свидетельствует о том, что схема генотипирования, основанная только на четырех VNTR-локусах Bru7, Bru9, Bru18, Bru21, имеет свои ограничения. Поэтому для повышения дискриминирующей способности разработанного подхода к типированию бруцелл необходимо продолжать поиск оптимальных VNTR-локусов, пригодных для проведения MLVA методом HRM-анализа. Также данный подход требует дальнейшей верификации, в частности с использованием секвенирования.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

**Финансирование.** Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

#### Список литературы

1. El-Sayed A., Awad W. Brucellosis: Evolution and expected comeback. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 2018; 6(Suppl.):S31–S35. DOI: 10.1016/j.ijvsm.2018.01.008.
2. Пономаренко Д.Г., Скударева О.Н., Хачатурова А.А., Лукашевич Д.Е., Жаринова И.В., Даурова А.В., Германова А.Н., Логвиненко О.В., Ракитина Е.Л., Костюченко М.В., Манин Е.А., Малецкая О.В., Куличенко А.Н. Бруцеллез: тенденции развития ситуации в мире и прогноз на 2022 г. в Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2022; 2:36–45. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-36-45.
3. Suárez-Esquivel M., Chaves-Olarte E., Moreno E., Guzmán-Verri C. *Brucella* genomics: Macro and micro evolution. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(20):7749. DOI: 10.3390/ijms21207749.
4. Писаренко С.В., Ковалев Д.А., Хачатурова А.А., Вольныкина А.С., Русанова Д.В., Куличенко А.Н. Филогенетика штаммов *Brucella melitensis* на основе анализа SNP полных геномов. *Бактериология.* 2016; 1(1):73–9. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-73-79.
5. Насибуллин Р.Ю., Тухватуллина Л.А., Богова Я.А., Сафина Г.М., Косарев М.А. Бруцеллез: его распространение и профилактика. *Ветеринарный врач.* 2021; 1:38–43. DOI: 10.33632/1998-698x.2021-1-38-44.
6. Liu Z.-G., Di D.-D., Wang M., Liu R.-H., Zhao H.-Y., Piao D.-R., Tian G.-Z., Fan W.-X., Jiang H., Cui B.-Y., Xia X.-Z. MLVA genotyping characteristics of human *Brucella melitensis* isolated from Ulanqab of Inner Mongolia, China. *Front. Microbiol.* 2017; 8:6. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00006.
7. Шакирова Л.И., Ляпустина Л.В., Головнева С.И., Швецова Н.М. Применение молекулярно-генетических методов для характеристики клинических изолятов бруцеллезного микроба. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2014; 2:54–9.
8. Кузнецова И.В., Ковалев Д.А., Евченко Ю.М., Шакирова Л.И., Швецова Н.М., Пономаренко Д.Г., Писаренко С.В., Жиров А.М., Лукина А.А., Куличенко А.Н. Изучение генетического разнообразия штаммов бруцелл, выделенных в Северо-Кавказском федеральном округе. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2017; 3:58–62. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-58-62.
9. Хачатурова А.А., Пономаренко Д.Г., Ковалев Д.А., Германова А.Н., Лукашевич Д.Е., Русанова Д.В., Сердюк Н.С., Семенов О.В., Жиров А.М., Катюнина Л.С., Куличенко А.Н. Анализ заболеваемости людей бруцеллезом и молекулярно-биологическая характеристика изолятов *Brucella melitensis* на длительно неблагополучных по бруцеллезу территориях юга европейской части России. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2022; 99(1):63–74. DOI: 10.36233/0372-9311-185.
10. Анисимова Е.А., Фахрутдинов Н.А., Миргазов Д.А., Додонова Е.А., Елизарова И.А., Горбунова М.Е., Хаммадов Н.И., Зайнуллин Л.И., Осянин К.А. Дифференциация штаммов *Bacillus anthracis* на основе SNP- и VNTR-полиморфизма гено-

мов. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2022; 26(6):560–7. DOI: 10.18699/VJGB-22-68.

11. Фахрутдинов Н.А., Анисимова Е.А., Миргазов Д.А., Мустафина Э.Н., Осянин К.А. Дифференциация штаммов *Bacillus anthracis* методом анализа температур плавления продуктов ПЦР, полученных после амплификации VNTR локусов. *Ветеринарный врач.* 2023; 2:41–6. DOI: 10.33632/1998-698x.2023.2.41.
12. Хаммадов Н.И., Осянин К.А., Усольцев К.В., Фаизов Т.Х., Хаммадова А.В., Шуралев Э.А. Маркерные локусы генома бруцелл для дифференциальной ПЦР индикации патогенных штаммов. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2018; 3:88–93. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-88-93.
13. Le Flèche P., Jacques I., Grayon M., Al Dahouk S., Bouchon P., Denoed F., Nöckler K., Neubauer H., Guilloteau L.A., Vergnaud G. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 2006; 6:9. DOI: 10.1186/1471-2180-6-9.
14. 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; 51(5):873–84. DOI: 10.1128/aem.51.5.873-884.1986.
15. Ковалев Д.А., Кузнецова И.В., Жиров А.М., Сердюк Н.С., Жилченко Е.Б., Пономаренко Д.Г., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Куличенко А.Н. Генетическое типирование штаммов *Brucella melitensis* на основе анализа вариабельности INDEL-локусов. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2022; 12(1):81–6. DOI: 10.18565/epidem.2022.12.1.81-6.
16. Gopaul K.K., Sells J., Lee R., Beckstrom-Sternberg S.M., Foster J.T., Whatmore A.M. Development and assessment of multiplex high resolution melting assay as a tool for rapid single-tube identification of five *Brucella* species. *BMC Res. Notes.* 2014; 7:903. DOI: 10.1186/1756-0500-7-903.
17. Girault G., Perrot L., Mick V., Ponsart C. High-resolution melting PCR as rapid genotyping tool for *Brucella* species. *Microorganisms.* 2022; 10(2):336. DOI: 10.3390/microorganisms10020336.
18. Алимов А.М., Ахмадеев Р.М., Габидуллина Р.Г., Сазонова Т.Я. Штамм *Brucella abortus* УФ-1 для приготовления биологических препаратов для диагностики и специфической профилактики бруцеллеза сельскохозяйственных животных. Патент РФ № 2425148, опубл. 27.07.2011.
19. Кулаков Ю.К., Цирельсон Л.Е., Желудков М.М. Молекулярно-генетическая характеристика изолятов бруцелл, выделенных от собак и оленей в различных регионах России. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2012; 4:28–33. DOI: 10.3103/S0891416812040052.
20. Guzmán-Verri C., Suárez-Esquivel M., Ruiz-Villalobos N., Zygmunt M.S., Gonnet M., Campos E., Viquez-Ruiz E., Chacón-Díaz C., Aragón-Aranda B., Conde-Álvarez R., Moriyón I., Blasco J.M., Muñoz P.M., Baker K.S., Thomson N.R., Cloeckaert A., Moreno E. Genetic and phenotypic characterization of the etiological agent of canine orchiepididymitis smooth *Brucella* sp. BCCN84.3. *Front. Vet. Sci.* 2019; 6:175. DOI: 10.3389/fvets.2019.00175.

#### References

1. El-Sayed A., Awad W. Brucellosis: Evolution and expected comeback. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 2018; 6(Suppl.):S31–S35. DOI: 10.1016/j.ijvsm.2018.01.008.
2. Ponomarenko D.G., Skudareva O.N., Khachaturova A.A., Lukashovich D.E., Zharinova I.V., Daurova A.V., Germanova A.N., Logvinenko O.V., Rakitina E.L., Kostyuchenko M.V., Manin E.A., Maleskaya O.V., Kulichenko A.N. [Brucellosis: trends in the development of situation in the world and forecast for 2022 in the Russian Federation]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2022; (2):36–45. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-36-45.
3. Suárez-Esquivel M., Chaves-Olarte E., Moreno E., Guzmán-Verri C. *Brucella* genomics: Macro and micro evolution. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(20):7749. DOI: 10.3390/ijms21207749.
4. Pisarenko S.V., Kovalev D.A., Khachaturova A.A., Volynkina A.S., Rusanova D.V., Kulichenko A.N. [Phylogeography of *Brucella melitensis* strains based on SNP analysis of complete genomes]. *Bakteriologiya [Bacteriology].* 2016; 1(1):73–9. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-73-79.
5. Nasibullin R.Yu., Tuxvatullina L.A., Bogova Ya.A., Safina G.M., Kosarev M.A. [Brucellosis: its distribution and prevention]. *Veterinarny Vrach [Veterinarian]* 2021; (1):38–43. DOI: 10.33632/1998-698x.2021-1-38-44.
6. Liu Z.-G., Di D.-D., Wang M., Liu R.-H., Zhao H.-Y., Piao D.-R., Tian G.-Z., Fan W.-X., Jiang H., Cui B.-Y., Xia X.-Z. MLVA genotyping characteristics of human *Brucella melitensis* isolated from Ulanqab of Inner Mongolia, China. *Front. Microbiol.* 2017; 8:6. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00006.

7. Shakirova L.I., Lyapustina L.V., Golovneva S.I., Shvetsova N.M. [Application of molecular-genetic methods to characterize clinical isolates of brucellosis microbe]. *Epidemiologiya i Vaksinooprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2014; (2):54–9.
8. Kuznetsova I.V., Kovalev D.A., Evchenko Yu.M., Shakirova L.I., Shvetsova N.M., Ponomarenko D.G., Pisarenko S.V., Zhirov A.M., Lukina A.A., Kulichenko A.N. [The study of genetic diversity of brucella strains isolated in the North-Caucasian Federal District]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (3):58–62. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-58-62.
9. Khachaturova A.A., Ponomarenko D.G., Kovalev D.A., Germanova A.N., Lukashevich D.E., Rusanova D.V., Serdyuk N.S., Semenko O.V., Zhirov A.M., Katunina L.S., Kulichenko A.N. [Analysis of human brucellosis incidence and molecular-biological characteristics of *Brucella melitensis* isolates on long-term brucellosis-affected areas in the south of the European part of Russia]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2022; 99(1):63–74. DOI: 10.36233/0372-9311-185.
10. Anisimova E.A., Fakhruddinov N.A., Mirgazov D.A., Dodonova E.A., Elizarova I.A., Gorbunova M.E., Khammatov N.I., Zainullin L.I., Osyanin K.A. [Differentiation of *Bacillus anthracis* strains based on SNP- and VNTR-polymorphism of genomes]. *Vavilovskiy Zhurnal Genetiki i Selektitsii [Vavilov Journal of Genetics and Selection]*. 2022; 26(6):560–7. DOI: 10.18699/VJGB-22-68.
11. Fakhruddinov N.A., Anisimova E.A., Mirgazov D.A., Mustafina E.N., Osyanin K.A. [Differentiation of *Bacillus anthracis* strains through analyzing the melting temperatures of PCR products obtained after amplification of VNTR loci]. *Veterinarny Vrach [Veterinarian]*. 2023; (2):41–6. DOI: 10.33632/1998-698X\_2023\_2\_41.
12. Khammatov N.I., Osyanin K.A., Usol'tsev K.V., Faizov T.K., Khammatova A.V., Shuralev E.A. [Marker loci in *Brucella* genome for differential PCR indication of pathogenic strains]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; (3):88–93. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-88-93.
13. Le Flèche P., Jacques I., Grayon M., Al Dahouk S., Bouchon P., Denoeud F., Nöckler K., Neubauer H., Guilloteau L.A., Vergnaud G. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 2006; 6:9. DOI: 10.1186/1471-2180-6-9.
14. 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; 51(5):873–84. DOI: 10.1128/aem.51.5.873-884.1986.
15. Kovalev D.A., Kuznetsova I.V., Zhirov A.M., Serdyuk N.S., Zhilchenko E.B., Ponomarenko D.G., Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Kulichenko A.N. [Genetic typing of *Brucella melitensis* strains based on analysis of the variability of INDEL loci]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. Aktual'nye Voprosy [Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items]*. 2022; 12(1):81–6. DOI: 10.18565/epidem.2022.12.1.81-6.
16. Gopaul K.K., Sells J., Lee R., Beckstrom-Sternberg S.M., Foster J.T., Whatmore A.M. Development and assessment of multiplex high resolution melting assay as a tool for rapid single-tube identification of five *Brucella* species. *BMC Res. Notes.* 2014; 7:903. DOI: 10.1186/1756-0500-7-903.
17. Girault G., Perrot L., Mick V., Ponsart C. High-resolution melting PCR as rapid genotyping tool for *Brucella* species. *Microorganisms.* 2022; 10(2):336. DOI: 10.3390/microorganisms10020336.
18. Alimov A.M., Akhmadeev R.M., Gabidullina R.G., Sazonova T.Ya. [*Brucella abortus* strain UV-1 for the production of biological preparations for the diagnosis and specific prevention of brucellosis in farm animals]. RF Patent No. 2425148, publ. Jul 27, 2011.
19. Kulakov Yu.K., Tsirel'son L.E., Zheludkov M.M. [Molecular-genetic characteristics of *Brucella* isolates isolated from dogs and deer in various regions of Russia]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2012; (4):28–33. DOI: 10.3103/S0891416812040052.
20. Guzmán-Verri C., Suárez-Esquivel M., Ruiz-Villalobos N., Zygmunt M.S., Gonnet M., Campos E., Viquez-Ruiz E., Chacón-Díaz C., Aragón-Aranda B., Conde-Álvarez R., Moriyón I., Blasco J.M., Muñoz P.M., Baker K.S., Thomson N.R., Cloeckert A., Moreno E. Genetic and phenotypic characterization of the etiological agent of canine orchiepididymitis smooth *Brucella* sp. BCCN84.3. *Front. Vet. Sci.* 2019; 6:175. DOI: 10.3389/fvets.2019.00175.

**Authors:**

Anisimova E.A., Mirgazov D.A., Dodonova E.A., Elizarova I.A., Pankova E.V., Osyanin K.A. Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety. Academic Town-2, Kazan, 420075, Russian Federation. E-mail: vnivi@mail.ru.

**Об авторах:**

Анисимова Е.А., Миргазов Д.А., Додонова Е.А., Елизарова И.А., Панкова Е.В., Осянин К.А. Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности. Российская Федерация, 420075, Казань, Научный городок-2. E-mail: vnivi@mail.ru.