

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-125-134

УДК 616.98:579.841.93

Н.А. Осина, Е.Г. Булгакова, А.В. Осин, И.Г. Швиденко, С.А. Щербакова

Вариабельность генов *omp25* и *omp2a* у штаммов бруцелл различного таксономического положения

ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель исследования – выявление структурных отличий в генах бруцелл *omp25* и *omp2a*, позволяющих определять их таксономическое положение. **Материалы и методы.** Объектами исследования служили нуклеотидные последовательности полных геномов 48 штаммов бруцелл, представленных в базе данных GenBank NCBI. Для оценки гомологии последовательностей использовали алгоритм BLAST и программу MEGA 11. **Результаты и обсуждение.** У 13 видов бруцелл и *Brucella* spp. с неустановленной видовой принадлежностью воспроизведены *in silico* рестрикционные профили *HindIII*, *EcoRV* и *EcoRI*, *AluI* участков генома, включающих соответственно гены *omp25* и *omp2a*, фланкированные праймерами 25A-25B и 2AB-2AA. В гене *omp25* выявлено 11 несинонимичных и 24 синонимичные мутации; две делеции: Δ103–108 п.н. – у *B. nosferati*, Δ562–597 п.н. – у *B. ovis*; вставка АСТ после 585 п.н. – у *B. vulpis*. Вариабельность гена *omp2a* у изученных штаммов бруцелл была значительно выше. Выявлены 138 SNPs, из них 60 приводят к замене аминокислот, две формируют стоп-кодона, дополнительно одна делеция Δ424–561 п.н. – у *B. abortus* 1, 2, 4-го биоваров. Единичные мутации в генах *omp2a* и *omp25* имели как групповую специфичность – для нескольких видов, так и уникальную – для определенного вида или биовара патогена. Аллельные профили генов *omp25* и *omp2a* обладают большей разрешающей способностью, чем изученные их рестрикционные профили. Выявленные изменения в структуре генов *omp25* и *omp2a* коррелируют с циркуляцией отдельных видов и биоваров бруцелл в организме определенных носителей. В указанных генах показано наличие делеций, вставок и единичных полиморфных нуклеотидов, специфичных для видов, групп видов и в ряде случаев – биоваров патогена.

Ключевые слова: структурная организация, ген *omp25*, ген *omp2a*, нуклеотидная последовательность, аллели, рестрикционный анализ, виды и биовары бруцелл.

Корреспондирующий автор: Осина Наталия Александровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Осина Н.А., Булгакова Е.Г., Осин А.В., Швиденко И.Г., Щербакова С.А. Вариабельность генов *omp25* и *omp2a* у штаммов бруцелл различного таксономического положения. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 4:125–134. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-125-134

Поступила 21.11.2023. Отправлена на доработку 01.12.2023. Принята к публ. 07.12.2023.

N.A. Osina, E.G. Boolgakova, A.V. Osin, I.G. Shvidenko, S.A. Shcherbakova

Variability of *omp25* and *omp2a* Genes in *Brucella* Strains of Different Taxonomic Position

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to identify structural differences in the *Brucella omp25* and *omp2a* genes, which make it possible to determine their taxonomic position. **Materials and methods.** The objects of the study were the nucleotide sequences of the complete genomes of 48 *Brucella* strains presented in the GenBank NCBI database. To assess sequence homology, the BLAST algorithm and the MEGA 11 program were used. **Results and discussion.** In 13 species of *Brucella* and *Brucella* spp. with unknown species appurtenance, *HindIII*, *EcoRV* and *EcoRI*, *AluI* restriction profiles of genome regions have been reproduced *in silico*, including, *omp25* and *omp2a* genes, flanked by primers 25A-25B and 2AB-2AA, respectively. In the *omp25* gene, 11 non-synonymous and 24 synonymous mutations have been detected; two deletions: Δ103–108 bp – in *B. nosferati*, Δ562–597 bp – in *B. Ovis*; and ACT insertion after 585 bp – in *B. vulpis*. The variability of the *omp2a* gene in the studied *Brucella* strains was significantly higher. 138 SNPs have been identified, of which 60 lead to amino acid substitutions, 2 – form stop codons, and an additional deletion Δ424–561 bp – in *B. abortus* 1, 2, 4 biovars. Single mutations in the *omp2a* and *omp25* genes had both group specificity – for several species, and unique – for a specific species or biovar of the pathogen. Allelic profiles of the *omp25* and *omp2a* genes have greater resolution than their restriction profiles studied. The identified changes in the structure of the *omp25* and *omp2a* genes correlate with the circulation of individual *Brucella* species and biovars in the organism of certain carriers. These genes show the presence of deletions, insertions and single polymorphic nucleotides specific to species, groups of species and, in some cases, biovars of the pathogen.

Key words: structural organization, *omp25* gene, *omp2a* gene, nucleotide sequence, alleles, restriction analysis, *Brucella* species and biovars.

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

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

Corresponding author: Natalia A. Osina, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Osina N.A., Boolgakova E.G., Osin A.V., Shvidenko I.G., Shcherbakova S.A. Variability of *omp25* and *omp2a* Genes in *Brucella* Strains of Different Taxonomic Position. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 4:125–134. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-125-134

Received 21.11.2023. Revised 01.12.2023. Accepted 07.12.2023.

Osina N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0954-5683>
Boolgakova E.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2405-2684>

Osina A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5308-0022>
Shcherbakova S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1143-4069>

В настоящее время в соответствии с номенклатурой, представленной в LPSN (List of procariotic names with standing in nomenclature), в роде *Brucella* выделяют двенадцать самостоятельных видов бруцелл, вызывающих заболевания людей и животных: *B. abortus* – 7 биоваров, *B. melitensis* – 3 биовара, *B. suis* – 5 биоваров, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata*, *B. papionis*, *B. vulpis* [1]. Отмечены случаи выделения бруцелл с неустановленным систематическим положением от земноводных [2–6]. В 2023 г. открыт новый вид бруцелл – *Brucella nosferati*, выделенных от летучих мышей-вампинов *Desmodus rotundus* [6].

Внутривидовая гомология генетической структуры бруцелл достигает 95 % [7]. В то же время выявлены отдельные области – геномные острова (IncP, GI-1, GI-2, GI-3, CI-5, CI-6, GI-8, SAR1-2 и др.) и другие участки генома, представленные в разной степени у различных представителей рода *Brucella* [7–9]. Среди них можно выделить гены *omp*, кодирующие синтез белков наружной мембраны бруцелл, которые играют важную роль в патогенезе возбудителя: адгезия к клеткам хозяина, уклонение от иммунной системы макроорганизма, обеспечение транспорта питательных веществ и других компонентов за счет формирования пор во внешней мембране [10]. Методом рестрикционного анализа установлена вариабельность *omp31*, *omp25*, *omp25b*, *omp25c*, *omp25d*, *omp22*, *omp2a*, *omp2b* у ряда видов и биоваров возбудителя бруцеллеза: *B. abortus* 1, 2, 4-го биоваров, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. neotomae* [11–13]. Показана эффективность применения предложенных подходов для идентификации коллекционных штаммов бруцелл [14, 15]. Однако изменчивость генов по рестрикционному профилю была установлена для ограниченного круга бруцелл. Детальный анализ структуры генов *omp* у бруцелл с различной таксономической принадлежностью позволит оценить возможности применения их вариабельности для видовой и внутривидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза.

Цель данного исследования состояла в выявлении структурных отличий в генах бруцелл *omp25* и *omp2a*, позволяющих определять их таксономическое положение.

Материалы и методы

Объектами исследования служили полногеномные последовательности 48 штаммов бруцелл, представленные в базе данных GenBank NCBI, из них: 9 типовых, 12 референтных (для биоваров *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*) штаммов патогена, а также 28 штаммов бруцелл, у которых в аннотации указано таксономическое положение (*B. suis* 1–5-го биоваров, виды *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. ceti*,

B. pinnipedialis, *B. inopinata*, *B. vulpis*, *B. nosferati* и бруцеллы с неустановленной видовой принадлежностью (табл. 1), из которых детально анализировали фланкированные праймерами 25А-25В и 2АВ-2АА фрагменты генома бруцелл размером 758 п.н. и 1233 п.н. по А. Cloeckaert *et al.* [11], которые содержат последовательности генов *omp25* и *omp2a* соответственно.

Для оценки вариабельности нуклеотидных последовательностей использовали базу данных GenBank NCBI с алгоритмом BLAST и программе MEGA 11. В качестве референса использовали полный геном *B. abortus* 9-941 (GenBank NCBI № AE017223.1).

Результаты и обсуждение

Рестрикционный профиль областей 25А-25В (ген *omp25*) и 2АВ-2АА (ген *omp2a*) у бруцелл различной таксономической принадлежности. Ранее А. Cloeckaert *et al.* [11] показали вариабельность фрагментов генов *omp25* и *omp2a* у ряда видов бруцелл. Фрагменты геномов, ограниченные праймерами 25А и 25В, 2АВ и 2АА, содержащие последовательности данных генов соответственно, обрабатывали различными рестриктазами с последующим разделением полученных фрагментов с помощью гель-электрофореза. Среди тестированных авторами рестриктаз наибольшей дифференцирующей способностью обладали *HindIII* и *EcoRV* в отношении области 25А-25В и *EcoRI* и *AluI* при рестрикции области 2АВ-2АА: определение принадлежности к *B. abortus* 1, 2, 4-го биоваров, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. neotomae*. Предложенный подход был успешно использован нами при изучении коллекционных штаммов возбудителя бруцеллеза [15]. Однако в обеих работах оценивалась вариабельность указанных участков генома только у шести видов бруцелл: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* – и не были определены размеры рестрикционных фрагментов.

В настоящей работе проведен рестрикционный анализ *in silico* этих областей генома у штаммов 13 видов бруцелл и *Brucella* spp. с неустановленной видовой принадлежностью (табл. 1). Выявлялось количество и взаиморасположение указанных сайтов рестрикции, а также прогнозировались размеры рестрикционных фрагментов у бруцелл различной таксономической принадлежности. Результаты наших исследований мы сравнили с данными зарубежных коллег.

Установлено, что в области 25А-25В имеется по одному сайту рестрикции *HindIII* и *EcoRV* (рис. 1). Большинство бруцелл имеют одинаковый рестрикционный профиль – P1_{HindIII} (467 и 291 п.н.) и P1_{EcoRV} (649 и 109 п.н.) соответственно. Характерные профили отмечены у *B. ovis* – P2_{HindIII} (467 и 255 п.н.)

Таблица 1 / Table 1

Перечень нуклеотидных последовательностей бруцелл, использованных в работе
List of *Brucella* nucleotide sequences used in the work

№	Штамм Strain	Type/reference	GenBank NCBI №
1	<i>B. abortus</i> bv. 1 9-941	–	AE017223.1
2	<i>B. abortus</i> bv. 2 86/8/59 ATCC 23449	Reference	CP007765.1
3	<i>B. abortus</i> bv. 3 Tulya ATCC 23450	Reference	ACBI01000007.1 ACBI01000005.1
4	<i>B. abortus</i> bv. 4 292 ATCC23451	Reference	JMSB01000016.1 JMSB01000015.1
5	<i>B. abortus</i> bv. 5 3196 ATCC 23452	Reference	CP007707.1
6	<i>B. abortus</i> bv. 6 870 ATCC23453	Reference	CP007709.1
7	<i>B. abortus</i> bv. 9 C68 ATCC23455	Reference	CP007705.1
8	<i>B. melitensis</i> bv. 1 16M ATCC23456	Type	CP007763.1
9	<i>B. melitensis</i> bv. 2 63/9 ATCC23445	Reference	CP007789.1
10	<i>B. melitensis</i> bv. 3 706 ATCC23458	Reference	CP007760.1
11	<i>B. suis</i> bv. 1 1330 ATCC23444	Type	CP002997.1
12	<i>B. suis</i> bv. 1 S2	–	CP006961.1
13	<i>B. suis</i> bv. 2 Thomsen ATCC23445	Reference	CP000911.1
14	<i>B. suis</i> bv. 2 Bs143CITA	–	CP007695.1
15	<i>B. suis</i> bv.3 686 ATCC23446	Reference	CP007719.1
16	<i>B. suis</i> bv. 3 CVI_71	–	CP054957.1
17	<i>B. suis</i> bv. 4 40 ATCC 23447	Reference	ACJK01000011.1 AZBG02000003.1
18	<i>B. suis</i> bv. 4 BSP	–	CP008757.1
19	<i>B. suis</i> bv. 5 513UK BCCN R21	Reference	CP007717.1
20	<i>B. suis</i> bv. 5 CVI_73	–	CP054953.1
21	<i>B. canis</i> ATCC 23365	Type	CP000872.1
22	<i>B. canis</i> FDAARGOS_420	–	CP023974.1
23	<i>B. canis</i> SVA13	–	CP007629.1
24	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Type	CP000708.1
25	<i>B. ovis</i> 81/8	–	AQKO01000006.1 AQKO01000005.1
26	<i>B. ovis</i> 63/96	–	AQKN01000002.1
27	<i>B. neotomae</i> 5K33	Type	ACEH01000046.1 U26441.1
28	<i>B. neotomae</i> NCTC10070	–	UAQT01000004.1
29	<i>B. neotomae</i> NCTC10071	–	UAQU01000004.1
30	<i>B. ceti</i> M644/93/1	–	ACBO01000060.1
31	<i>B. ceti</i> M13/05/1	–	ACBP01000069.1
32	<i>B. ceti</i> BD1442	–	LC484043.1
33	<i>B. ceti</i> Cudo	–	ACJD01000002.1
34	<i>B. pinnipedialis</i> 6/566	–	CP007743.1
35	<i>B. pinnipedialis</i> B2/94	Type	CP002078.1
36	<i>B. microti</i> CCM 4915	Type	CP001578.1
37	<i>B. inopinata</i> BO1	Type	AZBI02000145.1 ADEZ01000026.1
38	<i>B. inopinata</i> FO700662 6	–	JARQXC010000006.1
39	<i>B. vulpis</i> F60	Type	LN997863.1
40	<i>B. vulpis</i> F965	–	LN998033.1
41	<i>B. nosferati</i> bbatCR03	–	CP106870.1
42	<i>Brucella</i> sp. 10RB9215	–	LT599047.1
43	<i>Brucella</i> sp. 09RB8910	–	CP019390.1
44	<i>Brucella</i> sp. 09RB8471	–	CP019347.1
45	<i>Brucella</i> sp. 2594	–	CP103960.1
46	<i>Brucella</i> sp. 2716	–	CP103962.1
47	<i>Brucella</i> sp. BO3	–	CP047232.1
48	<i>Brucella</i> sp. 2280	–	CP045697.1

Примечание: bv. – биовар; Type – типовой штамм; Reference – референтный штамм.

Note: bv. – biovar; Type – type strain; Reference – reference strain.

и P2_{EcoRV} (613 и 109 п.н.), *B. vulpis* – P3_{HindIII} (467 и 294 п.н.) и P3_{EcoRV} (652 и 109 п.н.), *B. nosferati* – P4_{HindIII} (461 и 291 п.н.) и P4_{EcoRV} (643 и 109 п.н.). У *B. melitensis* всех биоваров отсутствует сайт рестрикции

EcoRV, поскольку в этой области наблюдается замена A613T (рис. 1).

Полученные нами результаты по количеству фрагментов, образующихся при гидролизе указан-

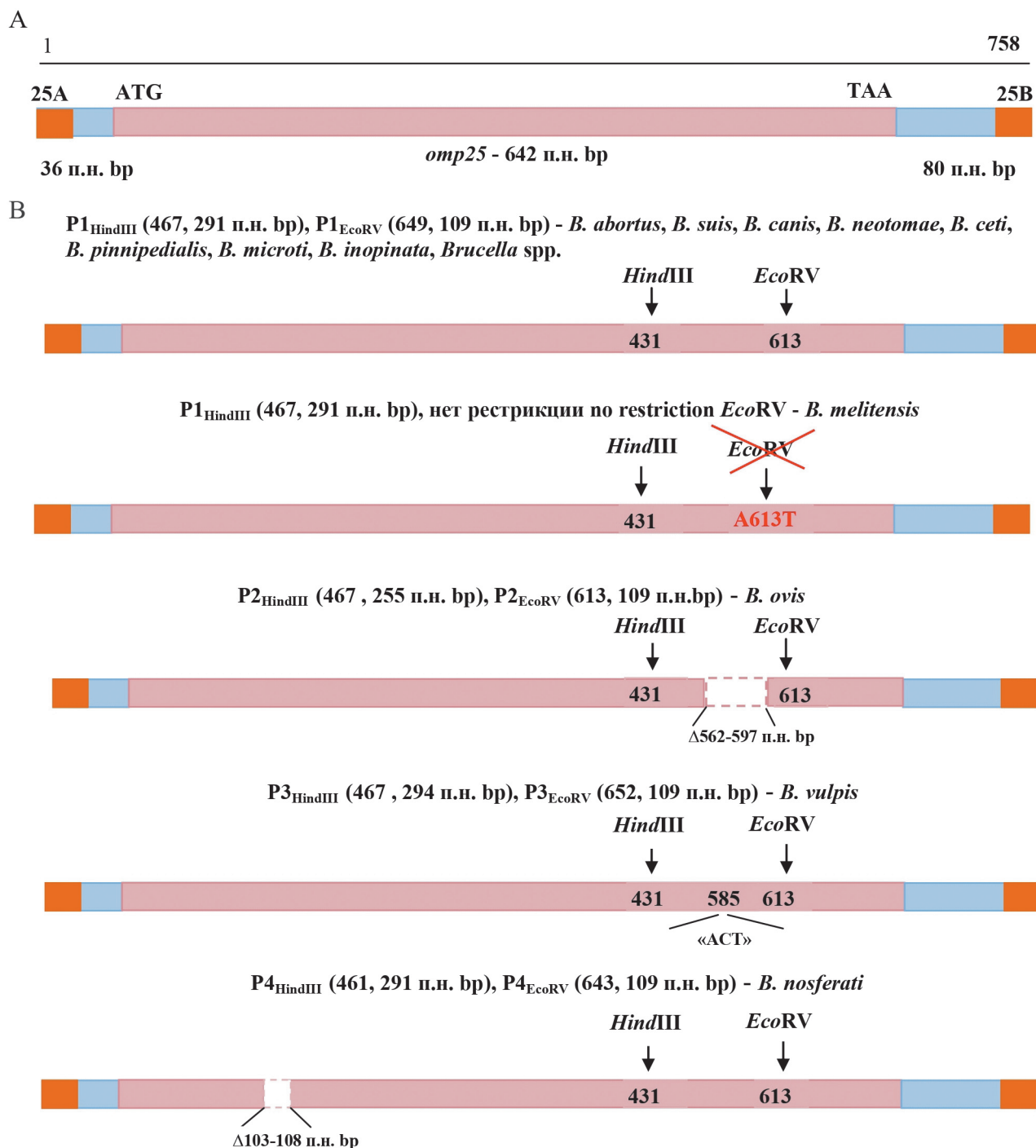


Рис. 1. Анализ структуры области 25A-25B бруцелл:

A – фрагмент генома патогена размером 758 п.н., содержащего ген *omp25*, фланкированный праймерами 25A-25B по A. Cloeckaert *et al.* [11] (область 25A-25B): оранжевым выделено положение праймеров; голубым – участки межгенного пространства, ограниченные праймерами (36 п.н. слева и 80 п.н. справа от гена); розовым – ген *omp25*; ATG – старт-кодон; TAA – стоп-кодон;

B – рестрикционные профили области 25A-25B: цифрами обозначены нуклеотиды, по которым происходит рестрикция ферментами *HindIII* и *EcoRV* или происходят мутации: SNP, делеции, вставки (нумерация от старт-кодона)

Fig. 1. Analysis of the structure of the 25A-25B region in *Brucella*:

A – fragment of the pathogen genome 758 bp in size, containing the *omp25* gene, flanked by primers 25A-25B. Cloeckaert *et al.* [11] (25A-25B region): the position of the primers is highlighted in orange; blue – areas of intergenic space limited by primers (36 bp to the left and 80 bp to the right of the gene); pink – *omp25* gene; ATG – start-codon; TAA – stop-codon;

B – restriction profiles of the 25A-25B region: numbers indicate nucleotides at which restriction with the enzymes *HindIII* and *EcoRV*, or mutations occur: SNP, deletions, insertions (numbering from the start-codon)

ными рестриктазами, совпали с данными, приведенными зарубежными авторами для *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*. Дополнительно для этих видов нами определены точные размеры фрагментов *Hind*III и *Eco*RV области 25А-25В. Кроме того, установлены рестрикционные профили для *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata* и *Brucella* spp. с неустановленной видовой принадлежностью ($P1_{HindIII}$, $P1_{EcoRV}$), а для *B. vulpis* ($P3_{HindIII}$, $P3_{EcoRV}$) и *B. nosferati* ($P4_{HindIII}$, $P4_{EcoRV}$) рестрикционные профили оказались уникальными (рис. 1). В итоге области 25А-25В изученных бруцелл формировали четыре рестрикционных профиля *Hind*III и пять – *Eco*RV.

При анализе области 2АВ-2АА выявлено два сайта рестрикции *Eco*RI, четыре или пять сайтов – *Alu*I (рис. 2). Большинство бруцелл имеют одинаковый *Eco*RI рестрикционный профиль $P1_{EcoRI-2a}$ (660, 371 и 202 п.н.). У *B. abortus* 1, 2 и 4-го биоваров из-за наличия делеции Δ424–561 п.н. отсутствует один из сайтов рестрикции, что приводит к образованию характерного для них профиля – $P2_{EcoRI-2a}$ (724 и 371 п.н.). У *B. nosferati* мутация А283G также приводит к отсутствию одного из сайтов рестрикции *Eco*RI. В результате формируется профиль рестрикции $P3_{EcoRI-2a}$ (660 и 573 п.н.).

У изученных бруцелл превалирует профиль $P1_{AluI-2a}$ (657, 275, 163, 126 и 12 п.н.) *Alu*I области 2АВ-2АА. У штаммов *B. abortus* 1, 2, 4-го биоваров в результате делеции Δ424–561 п.н. профиль изменился на $P2_{AluI-2a}$ (519, 275, 163, 126 и 12 п.н.); у *B. ovis* мутация G63A приводит к образованию дополнительного сайта рестрикции и появлению профиля $P3_{AluI-2a}$ (657, 260, 163, 126, 15 и 12 п.н.). Для *B. neotomae* и *B. vulpis* мутация G981A исключает один из сайтов рестрикции и формирует профиль $P4_{AluI-2a}$ (820, 275, 163, 126 и 12 п.н.); у *B. nosferati* замена G324А убирает один из сайтов рестрикции, добавляя новый профиль $P5_{AluI-2a}$ (932, 163, 126 и 12 п.н.). У штамма *Brucella* sp. 2280, выделенного от амфибий, благодаря мутации G831Т образуется дополнительный сайт рестрикции, создавая профиль $P6_{AluI-2a}$ (505, 275, 163, 152, 126, 12 п.н.) (рис. 2). Ведущую роль в формировании различных рестрикционных профилей области 2АВ-2АА играют единичные мутации, которые приводят к образованию новых или утрате имеющихся сайтов рестрикции ферментами *Eco*RI и *Alu*I.

Как видно из приведенных результатов, рестрикционный анализ областей 25А-25В и 2АВ-2АА обладает приблизительно одинаковой видовой и внутривидовой дифференцирующей способностью для бруцелл. Совместное определение рестрикционных профилей указанных областей позволяет дифференцировать *B. abortus* 1, 2, 4-го биоваров, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. vulpis*, *B. nosferati* и *Brucella* sp. 2280 с неустановленной видовой принадлежностью. В то же время для разделения близких по размеру фрагментов в агарозном геле

может потребоваться фиксация фанггерпринтов в нескольких временных интервалах с тщательным подбором процентности и качества геля, но даже это может оказаться недостаточным для разделения таких фрагментов. Определение нуклеотидной последовательности спорных по размеру фрагментов потребует дополнительного времени и будет затруднять определение таксона изучаемого штамма. Поэтому нами изучена видовая и внутривидовая вариабельность генов *omp25* и *omp2a* на основе определения их нуклеотидных последовательностей с выявлением мутаций, пригодных для определения таксономического положения штаммов бруцелл.

Анализ вариабельности гена *omp25* у штаммов бруцелл различной таксономической принадлежности. В ходе проведенного анализа в гене *omp25* бруцелл выявлено 11 несинонимичных единичных мутаций, приводящих к замене аминокислот: T98С (Cys33Ala), G191А и С192Т (Ser64Asn), C227G (Ala76Gly), C256А (Gln86Lys), G286А (Asp96Lys), C386Т (Pro129Leu), C416Т (Ala139Cys), G582С (Thr194Ser), C584А (Thr195Asn), A613Т (Ile205Phe); 24 синонимичные мутации: G39А, C40Т, T120С, C144Т, T162С, T168С, C189Т, T198G, C234Т, C261Т, C273Т, T276С, C351Т, C369Т, G405А, C417Т, C450Т, C453Т, C519Т, C522G, T567С, T579С, T585G, T588С; две делеции: Δ103–108 п.н. (Δ35Аla36Pro), Δ562–597 п.н. (Δ188Asn, 189Tyr, 190Asp, 191Leu, 192Ala, 193Gly, 194Thr, 195Thr, 196Cys, 197Arg, 198Asn, 199Lys); вставка АСТ после 585 п.н.

У штаммов *B. abortus* вне зависимости от их биоварной принадлежности в позиции 168 гена *omp25* находится нуклеотид Т, тогда как у других видов бруцелл в этой позиции – нуклеотид С. Для *B. melitensis* характерны две синонимичные замены: C40Т, C369Т и одна несинонимичная – A613Т (Ile205Phe). Дополнительные замены выявлены у референтного штамма *B. melitensis* 63/9 2-го биовара – T276С и у *B. melitensis* 706 3-го биовара – C416Т (Ala139Cys). Специфичность данных мутаций для *B. melitensis* 2-го и 3-го биоваров можно будет уточнить исследованиями более широкой выборки штаммов этих биоваров. *B. suis* 1, 3, 4-го биоваров, *B. pinnipedialis*, *B. microti* несут в гене *omp25* только замену T168С, тогда как *B. suis* 2-го и 5-го биоваров – дополнительно C522G, *B. canis* – C256А (Gln86Lys), C522G, *B. ceti* – C351Т, *B. neotomae* – G39А, T168С, C386Т (Pro129Leu).

Более значительные изменения гена *omp25* отмечены у *B. ovis*, *B. inopinata*, *B. vulpis* и *Brucella* spp. с неопределенной видовой принадлежностью. Только для *B. ovis* в данном гене характерны замены G286А (Asp96Lys), G405А и делеция Δ562–597 размером 36 п.н. (потеря аминокислот: 188Asn, 189Tyr, 190Asp, 191Leu, 192Ala, 193Gly, 194Thr, 195Thr, 196Cys, 197Arg, 198Asn, 199Lys). У *B. vulpis* выявлены специфичные замены C581G и G582С (Thr194Ser), T585G и АСТ-вставка после 585 п.н. Для *B. nosferati* отмечено наличие делеции 6 нуклео-

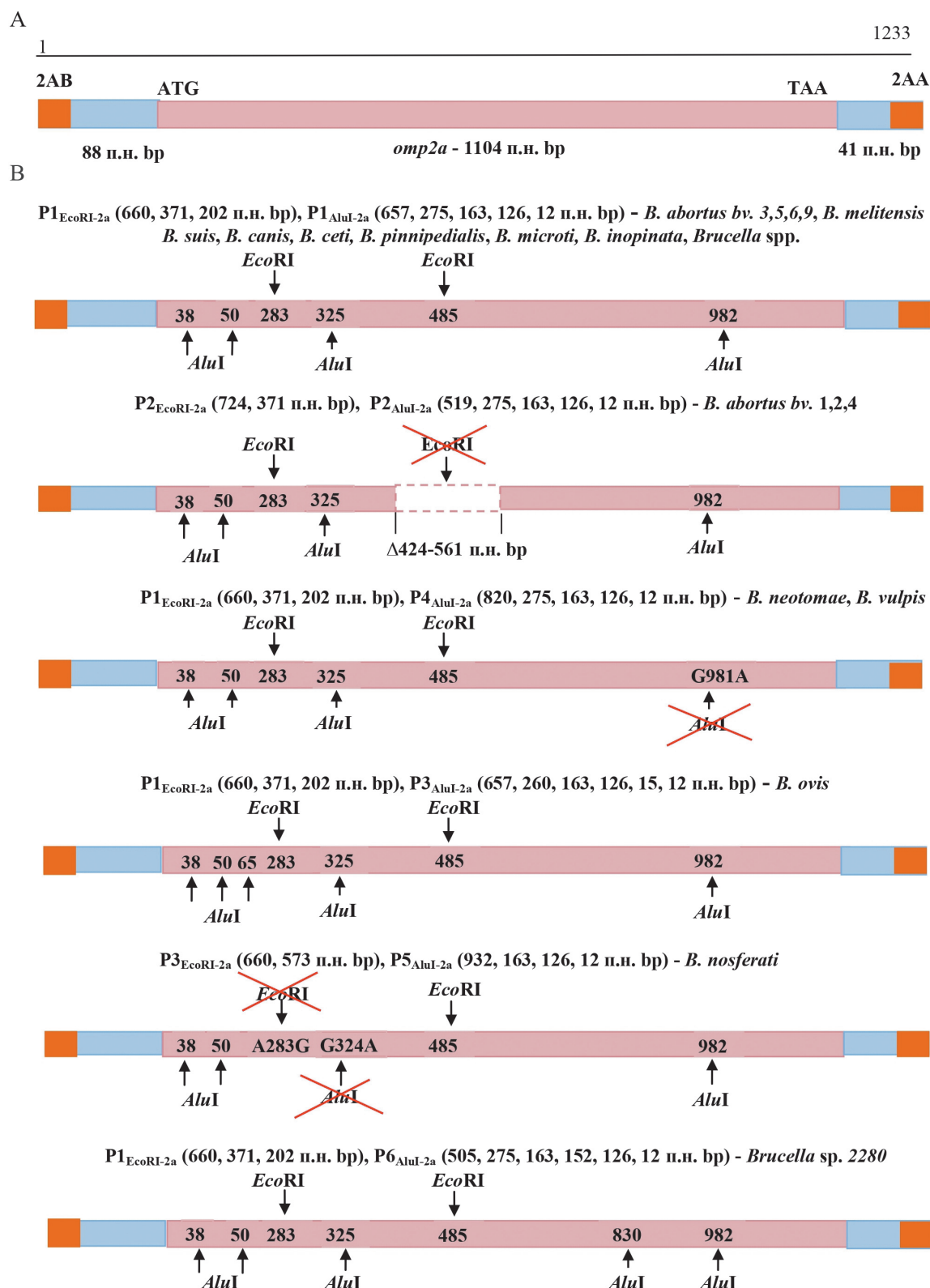


Рис. 2. Анализ структуры области 2AB-2AA:

A – фрагмент генома бруцелл размером 1233 п.н., содержащего ген *omp2a*, фланкированный праймерами 2AB-2AA по A. Cloeckaert *et al.* [11] (область 2AB-2AA): оранжевым выделено положение праймеров; голубым – участки межгенного пространства, ограниченные праймерами (88 п.н. слева и 41 п.н. справа от гена); розовым – ген *omp2a*; ATG – старт-кодон; TAA – стоп-кодон; *B* – рестрикционные профили области 2AB-2AA: цифрами обозначены нуклеотиды, по которым происходит рестрикция ферментами *EcoRI* и *AluI* или происходят мутации (SNP) (нумерация от старт-кодона); bv. – биовар

Fig. 2. Analysis of the structure of the 2AB-2AA region:

A – fragment of the *Brucella* genome, 1233 bp in size, containing the *omp2a* gene and flanked by primers 2AB-2AA. Cloeckaert *et al.* [11] (2AB-2AA region): the position of the primers is highlighted in orange; the sections in blue are intergenic space limited by primers (88 bp to the left and 41 bp to the right of the gene); pink – *omp2a* gene; ATG – start-codon; TAA – stop-codon; *B* – restriction profiles of the 2AB-2AA region: numbers indicate nucleotides at which restriction by the enzymes *EcoRI* and *AluI*, or mutations occur (SNP) (numbering from the start-codon); bv. – biovar

тидов Δ103–108 п.н. (35Ala36Pro) и замена T98C (Cys33Ala). Проведенный анализ показал, что для *B. inopinata*, *B. vulpis* и *Brucella* spp. с неуточненной видовой принадлежностью характерны замены, которые не встречаются у других видов патогена: T162C, T198G, C227G (Ala76Gly), T567C, C584A (Thr196Asn), T588C.

Возникновение делеции Δ562–597 размером 36 п.н. у *B. ovis* связано с гомологичной рекомбинацией между двумя прямыми повторами GCAACAAG, которые фланкируют участок размером 28 п.н. Образование делеции Δ103–108 п.н. (35Ala36Pro), выявленной у *B. nosferati*, имеет другое происхождение, поскольку в данной области повторы не обнаружены. Замены, делеции и вставки, которые выявлены у *B. melitensis* 3-го биовара, *B. canis*, *B. ovis*, *B. vulpis*, *B. nosferati*, могут привести к увеличению гидрофильности белка Omp25 за счет снижения количества гидрофобных аминокислот, что, возможно, повлияет на изменение иммунного ответа макроорганизма, на инфицирование этими видами бруцелл, поскольку данный белок подавляет синтез TNF макрофагами и дендритными клетками.

Исследование нуклеотидной последовательности гена *omp25* позволило выделить 18 аллелей, характерных для отдельных видов или групп видов: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* биоваров 1, 3, 4, *B. suis* биоваров 2, 5 / *B. pinnipedialis* / *B. microti*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. inopinata*, *B. vulpis*, *B. nosferati* и *Brucella* spp. с неустановленной видовой принадлежностью (табл. 2). Определение аллельного спектра гена *omp25* значительно расширяет возможности видовой дифференциации бруцелл (18 аллелей) по сравнению с рестрикционным анализом (4, 5 рестрикционных профиля).

Анализ вариабельности гена *omp2a* у штаммов бруцелл различной видовой и биоварной принадлежности. Вариабельность гена *omp2a* у изученных штаммов бруцелл была значительно выше. Выявлены 76 синонимичных замен и 62 несинонимичные мутации, приводящие в 60 случаях к замене аминокислот и в двух – к образованию стоп-кодона, а также одна делеция Δ424–561 п.н. Выявленные полиморфизмы имели как групповую специфичность для нескольких видов, так и уникальную – для определенного вида или биовара патогена (табл. 3).

Все штаммы *Brucella* spp., кроме *B. abortus*, *B. melitensis* и *B. nosferati*, имеют следующие замены: T213C±, C222T±, T223A (Ser75Thr), T228C/A229T/C231G (Thr77Ser), C234T, C237T, T240R (Asn80Lys), C901A (Pro301Thr). Только штаммы *B. suis* 1–4-го биоваров и *B. canis* имеют две несинонимичные замены – T722C (Cys241Ala) и T736C (Ser246Pro), которые приводят к замене двух гидрофильных аминокислот – цистеина и серина – на две гидрофобные – аланин и пролин соответственно, что может изменить гидрофильность белка Omp2a и, как следствие, процесс образования пор во внешней мембране патогена.

Таблица 2 / Table 2

Аллели генов *omp25* и *omp2a*, выявленные в работе
 Alleles of *omp25* and *omp2a* genes, identified within the frames of the work

Вид, биовар бруцелл <i>Brucella</i> species, biovar	Аллель / Allele	
	ген <i>omp25</i> <i>omp25</i> gene	ген <i>omp2a</i> <i>omp2a</i> gene
<i>B. abortus</i> bv. 1, 2, 4	1	1
<i>B. abortus</i> bv. 3, 5, 6, 9	1	2
<i>B. melitensis</i> bv. 1–3	2	2
<i>B. suis</i> bv. 1	3	3
<i>B. suis</i> bv. 2	4	4
<i>B. suis</i> bv. 3	3	5
<i>B. suis</i> bv. 4	3	6
<i>B. suis</i> bv. 5	4	7
<i>B. canis</i>	5	6
<i>B. ovis</i>	6	8
<i>B. neotomae</i>	7	9
<i>B. ceti</i>	8	10
<i>B. pinnipedialis</i>	4	10
<i>B. microti</i>	4	10
<i>B. inopinata</i>	9	11
<i>B. vulpis</i>	10	12
<i>B. nosferati</i>	11	13
<i>Brucella</i> sp. 10RB9215	12	14
<i>Brucella</i> sp. 09RB8910	13	15
<i>Brucella</i> sp. 09RB8471	14	16
<i>Brucella</i> sp. 2594	15	17
<i>Brucella</i> sp. 2716	16	18
<i>Brucella</i> sp. BO3 (WHO)	17	19
<i>Brucella</i> sp. 2280	18	20

Примечание: bv. – биовар.

Note: bv. – biovar.

Среди групповых мутаций можно выделить биспецифичные замены для *B. neotomae* и *B. vulpis*: C963G, C966T, C972T, C979G/G981A (Gln327Glu), C984G, C990T, A993C, A1000G (Ile334Cys). Обозначенные несинонимичные замены могут увеличить гидрофильность белка и изменить его заряд. Изменения, характерные только для *B. neotomae* – C542A (Ala181Asp) и *B. vulpis* – G568T (Ala190Ser), C815T (Ala272Cys), при которых нейтральная гидрофобная аминокислота Ala замещается на аминокислоты с лучшей растворимостью и, в последнем случае, на нейтральную гидрофильную, приведут к повышению гидрофильных свойств белка.

Наибольшие изменения нуклеотидных последовательностей гена *omp2a* наблюдаются у *B. abortus* 1, 2 и 4-го биоваров, *B. suis* 2-го биовара, *B. ovis* и *B. nosferati*. Для *B. abortus* 1, 2 и 4-го биоваров характерна делеция размером 130 п.н. (Δ424–561 п.н.) в результате гомологичной рекомбинации по восьмичленному нуклеотидным повторам GCACCGGC. Как следствие, штаммы этих биоваров продуцируют усеченную аминокислотную последовательность (321 аминокислота из 367).

Таблица 3 / Table 3

Групповые и единичные мутации, выявленные в гене *omp2a* у изученных штаммов бруцелл
Group and single mutations detected in the *omp2a* gene in the studied strains of *Brucella*

Полиморфные нуклеотиды, в скобках указана замена аминокислот в случае несинонимичных мутаций Polymorphic nucleotides, amino acid substitutions in case of non-synonymous mutations are indicated in parentheses	Виды бруцелл <i>Brucella</i> species
Мутации, специфичные для нескольких видов бруцелл Mutations specific to several <i>Brucella</i> species	
T213C±, C222T±, T223A (Ser75Thr), T228C, A229T/C231G (Thr77Ser), C234T, C237T, T240R (Asn80Lys), C901A (Pro301Thr)	<i>Brucella</i> spp., кроме <i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. nosferati</i> <i>Brucella</i> spp. except <i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. nosferati</i>
T722C (Cys241Ala), T736C (Ser246Pro)	<i>B. suis</i> bv. 1–4, <i>B. canis</i>
G175A (Cys59Ile), C178A/A179G/T180C (His60Ser), T183C±	<i>Brucella</i> spp., кроме <i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. suis</i> bv. 1, 3, 4, <i>B. canis</i> , <i>B. nosferati</i> <i>Brucella</i> spp. except <i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. suis</i> bv. 1, 3, 4, <i>B. canis</i> , <i>B. nosferati</i>
C963G, C966T, C972T, C979G/G981A (Gln327Glu), C984G, C990T, A993C, A1000G (Ile334Cys)	<i>B. neotomae</i> , <i>B. vulpis</i>
T318C, C330T, C399T±, A630G A801T, C813T±, T852C, T885C, T978C*	<i>B. inopinata</i> , <i>B. vulpis</i> , <i>Brucella</i> spp. с неуточненной видовой принадлежностью <i>B. inopinata</i> , <i>B. vulpis</i> , <i>Brucella</i> spp. with unspecified species appurtenance
G388A/A389G (Asp130Ser), C391G/G392T (Arg131Cys) G388A (Asp130Asn), C391G/G392T (Arg131Cys)	<i>B. vulpis</i> , <i>Brucella</i> spp. с неуточненной видовой принадлежностью <i>B. vulpis</i> , <i>Brucella</i> spp. with unspecified species appurtenance
A993C	<i>B. suis</i> bv. 5, <i>B. inopinata</i> , <i>Brucella</i> spp. с неуточненной видовой принадлежностью <i>B. suis</i> bv. 5, <i>B. inopinata</i> , <i>Brucella</i> spp. with unspecified species appurtenance
Мутации, специфичные для одного вида и биовара бруцелл Mutations specific to one species and biovar of <i>Brucella</i>	
Δ424–561 нуклеотид / nucleotide	<i>B. abortus</i> bv. 1, 2, 4
C911T (Ala304Cys)	<i>B. suis</i> bv. 1
G752A (образование стоп-кодона TAG / formation of stop codon TAG)	<i>B. suis</i> bv. 2
T877C (Trp293 Arg)	<i>B. suis</i> bv. 3
G63A, C129T, C255T, C264T, G409A (Gly137Ser), G517A (Cys173Ile), T531C, C534G, G535A (Cys179Ile), G538T/T540G (Ala180Ser), G1040A (образование стоп-кодона TAG / formation of stop codon TAG)	<i>B. ovis</i>
A87G, C542A (Ala181Asp), T598C (Ser200Pro), C954G	<i>B. neotomae</i>
C78T, C534T, G568T (Ala190Ser), C654T, T660C, C815T (Ala272Cys), G933C, A1021T (Thr341 Ser)	<i>B. vulpis</i>
A271C/T272G/G273T (Met91Arg), T274G/C276T (Phe92Cys), A277T/A278C (Asn93Ser), G282C/A283G/A284G (Asn95Gly), A306C, G310A/G311A/C312G (Gly104Lys), A317T (Tyr106 Phe), T321C, C322G/G324A (Gln108 Glu), C339T, A340G/C342T (Thr114 Ala), A343G/G344C/C345G (Ser115Ala), A757G/A759C (Thr253 Ala), G791	<i>B. nosferati</i>

Примечание: bv. – биовар.

Note: bv. – biovar.

B. suis 2-го биовара из-за наличия мутации G752A, которая приводит к преждевременной термине транскрипции и образованию стоп-кодона, также продуцируют усеченную аминокислотную последовательность (250 аминокислот из 367). У *B. ovis* пять несинонимичных мутаций приводят к замене четырех аминокислот: G409A (Gly137Ser), G517A (Cys173Ile), G535A (Cys179Ile), G538T/T540G (Ala180Ser), – а одна G1040A – к образованию стоп-кодона TAG, из-за чего синтезируется укороченная аминокислотная последовательность белка Omp2a

(346 аминокислот из 367). У штаммов нового вида бруцелл *B. nosferati* отмечено значительное количество несинонимичных мутаций в начале нуклеотидной последовательности гена *omp2a*: A271C/T272G/G273T (Met91Arg), T274G/C276T (Phe92Cys), A277T/A278C (Asn93Ser), G282C/A283G/A284G (Asn95Gly), A306C, G310A/G311A/C312G (Gly104Lys), A317T (Tyr106 Phe), T321C, C322G/G324A (Gln108Glu), A340G/C342T (Thr114Ala), A343G/G344C/C345G (Ser115Ala) – и единичные в конце – A757G/A759C (Thr253Ala).

Количество аллелей гена *omp2a* значительно выше, чем гена *omp25*, – практически все выбранные для анализа штаммы имели уникальную структуру данного гена (табл. 2). Используя анализ нуклеотидной последовательности данного гена, возможно дифференцировать *B. abortus* биоваров 1, 2, 4, *B. abortus* биоваров 3, 5, 6, 9 / *B. melitensis*, *B. suis* биовара 1, *B. suis* биовара 2, *B. suis* биовара 3, *B. suis* биовара 5, *B. suis* биовара 4 / *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. ceti* / *B. pinnipedialis* / *B. microti*, *B. inopinata*, *B. vulpis*, *B. nosferati* и отдельные *Brucella* spp. с неустановленной видовой принадлежностью.

В процессе адаптации *Brucella* spp. к определенным видам хозяина ген *omp2a* бруцелл приобрел ряд изменений, связанных с делетированием и полиморфизмом единичных нуклеотидов, которые могут влиять на гидрофильность и заряд белка Omp2a и даже приводить к утрате его функции. Это, скорее всего, меняет конфигурацию образующихся пор, а значит, и доступность определенных питательных веществ. Представляет интерес изучение изменения третичной структуры и, как следствие, изменение порообразующей способности белков Omp2a с усеченной аминокислотной последовательностью, синтезируемых штаммами *B. abortus* 1, 2 и 4-го биоваров, *B. suis* 2-го биовара и *B. ovis*.

Виды и биовары бруцелл отличаются по вирулентности для определенных видов животных и человека [9, 16]. Они отличаются по ряду фенотипических признаков: способности к продукции сероводорода и уреазы, отношению к избыточному содержанию углекислоты в воздухе, степени резистентности к бактериостатическому действию красителей (основного фуксина и тионина), агглютинабельности моноспецифическими сыворотками Abortus и Melitensis, чувствительности к диагностическим бруцеллезным бактериофагам [16]. Отмечены вариации генетической структуры возбудителя бруцеллеза различного таксономического положения [7, 8].

В представленной работе установлены *in silico* количество и размеры рестриктов HindIII, EcoRV и EcoRI, AluI участков генома бруцелл, фланкированных праймерами 25A-25B и 2AB-2AA по A. Cloeckaert *et al.* [11], которые содержат последовательности генов *omp25* и *omp2a* соответственно. Подтверждена возможность использования рестрикционного анализа, описанного зарубежными авторами, для дифференциации *B. abortus* биоваров 1, 2, 4, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. neotomae*. Помимо этого, дополнительно выявлены специфичные рестрикционные профили для *B. vulpis*, *B. nosferati* и *Brucella* sp. 2280 с неустановленной видовой принадлежностью, которые не изучались в работе зарубежных авторов, поскольку на тот момент еще не были открыты. В настоящий момент при совместном рестрикционном анализе областей 25A-25B и 2AB-2AA дифференцируются бруцеллы видов *B. abortus* биоваров 1, 2, 4, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. vulpis*, *B. nosferati*

и *Brucella* sp. 2280 с неустановленной видовой принадлежностью. Отмечена ограниченность практического применения данного метода для определения таксономической принадлежности штаммов бруцелл.

Вариабельность нуклеотидных последовательностей генов *omp25* и *omp2a* оказалась значительно шире: 18 и 20 аллелей соответственно. При этом для большинства видов бруцелл и в ряде случаев для биоваров характерна уникальная последовательность данных генов. На основании совокупного анализа нуклеотидной последовательности этих генов возможно дифференцировать *B. abortus* биоваров 1, 2, 4, *B. abortus* биоваров 3, 5, 6, 9, *B. melitensis*, *B. suis* биовара 1, *B. suis* биовара 2, *B. suis* биовара 3, *B. suis* биовара 4, *B. suis* биовара 5, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. pinnipedialis* / *B. microti*, *B. inopinata*, *B. vulpis*, *B. nosferati* и отдельные *Brucella* spp., выделенные от амфибий.

В структурной вариабельности генов преобладающим было наличие единичных полиморфных нуклеотидов, часть из которых приводит к замене аминокислот и, как следствие, к изменению гидрофильности белка и его заряда. Делеции Δ562–597 (*omp25*) характерны для *B. ovis*, а Δ424–561 (*omp2a*) – для *B. abortus* 1, 2 и 4-го биоваров. Обе делеции образуются в результате гомологичной рекомбинации, поскольку участки генома ограничены восьмичленными прямыми повторами. Помимо этого, в гене *omp25* у *B. nosferati* и *B. vulpis* отмечены непротяженная делеция Δ103–108 п.н. и вставка триплета АСТ соответственно. Связь структурных изменений генов *omp25* и *omp2a* с определенными видами бруцелл, с одной стороны, и с циркуляцией этих бруцелл среди строго определенных животных – с другой, позволяет предположить, что такие изменения возникли в результате приспособления отдельных видов бруцелл к конкретным носителям. Интересным направлением продолжения данной работы может оказаться изучение функциональной активности как вариантов белков Omp2a с усеченными аминокислотными последовательностями *B. abortus* 1, 2 и 4-го биоваров, *B. suis* 2-го биовара и *B. ovis*, так и вариантов с измененной гидрофильностью, установление роли этих белков в переносе определенных ионов и питательных веществ.

Таким образом, нами изучена генетическая структура генов *omp25* и *omp2a* бруцелл, показано наличие мутаций: делеций, вставок и единичных полиморфных нуклеотидов, которые специфичны для видов, групп видов и в ряде случаев биоваров патогена. Установлены хорошие дифференцирующие способности определения аллельных вариантов генов *omp25* и *omp2a* для определения таксономического положения бруцелл. Представляется перспективным продолжение работы по изучению данных участков генома у коллекционных штаммов бруцелл, в том числе выделенных на территории Российской Федерации, и создание на основе полученных дан-

ных способа определения таксономического положения бруцелл.

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. LPSN (List of Procariotic names with Standing in Nomenclature). [Электронный ресурс]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=Brucella> (дата обращения 20.09.2023).
2. Eisenberg T., Hamann H.-P., Kaim U., Schlez K., Seeger H., Schauerte N., Melzer F., Tomaso H., Scholz H.C., Koylass M.S., Whatmore A.M., Zschöck M. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(10):3753–5. DOI: 10.1128/AEM.07509-11.
3. Fischer D., Lorenz N., Heuser W., Kämpfer P., Scholz H.C., Lierz M. Abscesses associated with a *Brucella inopinata*-like bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*). *J. Zoo Wildl. Med.* 2012; 43(3):625–8. DOI: 10.1638/2011-0005R2.1.
4. Whatmore A.M., Dale E.-J., Stubberfield E., Muchowski J., Koylass M., Dawson C., Gopaul K.K., Perrett L.L., Jones M., Lawrie A. Isolation of *Brucella* from a White's tree frog (*Litoria caerulea*). *JMM Case Rep.* 2015; 2(1). DOI: 10.1099/jmmcr.0.000017.
5. Soler-Lloréns P.F., Quance C.R., Lawhon S.D., Stuber T.P., Edwards J.F., Ficht T.A., Robbe-Austerman S., O'Callaghan D., Keriel A. A *Brucella* spp. isolate from a Pac-Man frog (*Ceratophrys ornata*) reveals characteristics departing from classical brucellae. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2016; 6:116. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00116.
6. Hernández-Mora G., Chacón-Díaz C., Moreira-Soto A., Barrantes-Granados O., Suárez-Esquivel M., Viquez-Ruiz E., Barquero-Calvo E., Ruiz-Villalobos N., Hidalgo-Montelegre D., González-Barrientos R., Demeter E.A., Estrella-Morales J., Zúñiga-Pereira A.-M., Quesada-Gómez C., Chaves-Olarte E., Lomonte B., Guzmán-Verri C., Drexler J.F., Moreno E. Virulent *Brucella nosferati* infecting *Desmodus rotundus* has emerging potential due to the broad foraging range of its bat host for humans and wild and domestic animals. *mSphere*. 2023; 8(4):e0006123. DOI: 10.1128/msphere.00061-23.
7. Halling S.M., Peterson-Burch B.D., Bricker B.J., Zuerner R.L., Qing Z., Li L.L., Kapur V., Alt D.P., Olsen S.C. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(8):2715–26. DOI: 10.1128/JB.187.8.2715-2726.2005.
8. Rajashekara G., Glasner J.D., Glover D.A., Splitter G.A. Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J. Bacteriol.* 2004; 186(15): 5040–51. DOI: 10.1128/JB.186.15.5040-5051.2004.
9. Mancilla M. The *Brucella* genomic islands. In: López-Goñi I., O'Callaghan D., editors. *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*. Wymondham, UK: Caister Academic Press; 2012. P. 36–57. DOI: 10.21775/9781913652531.
10. Roop R.M. 2nd, Barton I.S., Hoppersberger D., Martin D.W. Uncovering the hidden credentials of *Brucella* virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2021; 85(1):e00021-19. DOI: 10.1128/MMBR.00021-19.
11. Cloeckaert A., Verger J.M., Grayon M., Grépinet O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology (Reading)*. 1995; 141(Pt. 9):2111–21. DOI: 10.1099/13500872-141-9-2111.
12. Vizcaino N., Cloeckaert A., Verger J., Grayon M., Fernández-Lago L. DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microbes Infect.* 2000; 2(9):1089–100. DOI: 10.1016/s1286-4579(00)01263-6.
13. García-Yoldi D., Marín C.M., López-Goñi I. Restriction site polymorphisms in the genes encoding new members of group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005; 245(1):79–84. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.02.026.
14. De Massis F., Zilli K., Di Donato G., Nuvoloni R., Pelini S., Sacchini L., D'Alterio N., Di Giannatale E. Distribution of *Brucella* field strains isolated from livestock, wildlife populations, and humans in Italy from 2007 to 2015. *PLoS One*. 2019; 14(3):e0213689. DOI: 10.1371/journal.pone.0213689.
15. Осина Н.А., Касьян Ж.А., Касьян И.А., Ляшова О.Ю., Осин А.В. Определение видовой принадлежности штаммов бруцелл из фонда Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» с помощью амплификационных и рестрикционных технологий. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 4:69–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-69-74.
16. Вершилова Н.А., Голубева А.А. Бруцеллез в СССР и пути его профилактики. М.: Медицина; 1970. 190 с.

References

1. LPSN (List of Procariotic names with Standing in Nomenclature). (Cited 20 Sept 2023). [Internet]. Available from: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=Brucella>.
2. Eisenberg T., Hamann H.-P., Kaim U., Schlez K., Seeger H., Schauerte N., Melzer F., Tomaso H., Scholz H.C., Koylass M.S., Whatmore A.M., Zschöck M. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(10):3753–5. DOI: 10.1128/AEM.07509-11.
3. Fischer D., Lorenz N., Heuser W., Kämpfer P., Scholz H.C., Lierz M. Abscesses associated with a *Brucella inopinata*-like bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*). *J. Zoo Wildl. Med.* 2012; 43(3):625–8. DOI: 10.1638/2011-0005R2.1.
4. Whatmore A.M., Dale E.-J., Stubberfield E., Muchowski J., Koylass M., Dawson C., Gopaul K.K., Perrett L.L., Jones M., Lawrie A. Isolation of *Brucella* from a White's tree frog (*Litoria caerulea*). *JMM Case Rep.* 2015; 2(1). DOI: 10.1099/jmmcr.0.000017.
5. Soler-Lloréns P.F., Quance C.R., Lawhon S.D., Stuber T.P., Edwards J.F., Ficht T.A., Robbe-Austerman S., O'Callaghan D., Keriel A. A *Brucella* spp. isolate from a Pac-Man frog (*Ceratophrys ornata*) reveals characteristics departing from classical brucellae. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2016; 6:116. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00116.
6. Hernández-Mora G., Chacón-Díaz C., Moreira-Soto A., Barrantes-Granados O., Suárez-Esquivel M., Viquez-Ruiz E., Barquero-Calvo E., Ruiz-Villalobos N., Hidalgo-Montelegre D., González-Barrientos R., Demeter E.A., Estrella-Morales J., Zúñiga-Pereira A.-M., Quesada-Gómez C., Chaves-Olarte E., Lomonte B., Guzmán-Verri C., Drexler J.F., Moreno E. Virulent *Brucella nosferati* infecting *Desmodus rotundus* has emerging potential due to the broad foraging range of its bat host for humans and wild and domestic animals. *mSphere*. 2023; 8(4):e0006123. DOI: 10.1128/msphere.00061-23.
7. Halling S.M., Peterson-Burch B.D., Bricker B.J., Zuerner R.L., Qing Z., Li L.L., Kapur V., Alt D.P., Olsen S.C. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(8):2715–26. DOI: 10.1128/JB.187.8.2715-2726.2005.
8. Rajashekara G., Glasner J.D., Glover D.A., Splitter G.A. Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J. Bacteriol.* 2004; 186(15): 5040–51. DOI: 10.1128/JB.186.15.5040-5051.2004.
9. Mancilla M. The *Brucella* genomic islands. In: López-Goñi I., O'Callaghan D., editors. *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*. Wymondham, UK: Caister Academic Press; 2012. P. 36–57. DOI: 10.21775/9781913652531.
10. Roop R.M. 2nd, Barton I.S., Hoppersberger D., Martin D.W. Uncovering the hidden credentials of *Brucella* virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2021; 85(1):e00021-19. DOI: 10.1128/MMBR.00021-19.
11. Cloeckaert A., Verger J.M., Grayon M., Grépinet O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology (Reading)*. 1995; 141(Pt. 9):2111–21. DOI: 10.1099/13500872-141-9-2111.
12. Vizcaino N., Cloeckaert A., Verger J., Grayon M., Fernández-Lago L. DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microbes Infect.* 2000; 2(9):1089–100. DOI: 10.1016/s1286-4579(00)01263-6.
13. García-Yoldi D., Marín C.M., López-Goñi I. Restriction site polymorphisms in the genes encoding new members of group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005; 245(1):79–84. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.02.026.
14. De Massis F., Zilli K., Di Donato G., Nuvoloni R., Pelini S., Sacchini L., D'Alterio N., Di Giannatale E. Distribution of *Brucella* field strains isolated from livestock, wildlife populations, and humans in Italy from 2007 to 2015. *PLoS One*. 2019; 14(3):e0213689. DOI: 10.1371/journal.pone.0213689.
15. Osina N.A., Kas'yan Zh.A., Kas'yan I.A., Lyashova O.Yu., Osin A.V. [Determination of specific appurtenance of *Brucella* strains stored in the State Collection of Pathogenic Bacteria "Microbe", using amplification and restriction techniques]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (4):69–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-69-74.
16. Vershilova N.A., Golubeva A.A. [Brucellosis in the USSR and Ways of its Prevention]. Moscow: "Medicine"; 1970. 190 p.

Authors:

Osina N.A., Boolgakova E.G., Osin A.V., Shvidenko I.G., Shcherbakova S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Осина Н.А., Булгакова Е.Г., Осин А.В., Швиденко И.Г., Щербакова С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.