

DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-154-161

УДК 616.98:579.841.93(470)

И.В. Кузнецова, Д.А. Ковалев, С.В. Писаренко, О.В. Бобрышева, Н.А. Шапак, А.М. Жиров,  
Н.С. Сафонова, Д.Г. Пономаренко, А.А. Хачатурова, Е.Б. Жилченко, Н.С. Сердюк, А.Н. Куличенко

**Генетическая характеристика штаммов *Brucella melitensis*,  
выделенных на территории Российской Федерации, на основе данных анализа  
единичных нуклеотидных полиморфизмов при полногеномном секвенировании**

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация

**Цель работы** – проведение сравнительного филогенетического анализа на основе gSNP полных геномов штаммов *Brucella melitensis*, циркулирующих на территории Российской Федерации. **Материалы и методы.** Выполнено wgSNP-типирование 412 штаммов *B. melitensis* основных генетических линий бруцелл из разных регионов мира, включая 64 штамма, выделенных в регионах европейской и азиатской части Российской Федерации. Секвенирование ДНК проводили на платформе Ion GeneStudio S5 Plus (Life Technologies, США) при использовании набора для быстрой подготовки библиотек ДНК Ion Plus Fragment Library Kit (Life Technologies, США), по протоколу Ion 520™ & Ion 530™ Kit – Chef (Revision D.0). **Результаты и обсуждение.** Установлено, что штаммы, циркулирующие в России, принадлежат главным образом к генотипу II, который имеет широкое географическое распространение на территории Евразии. При этом в регионах Сибири преобладает подгенотип IIh, а на европейской территории страны – IIi. Впервые определены наборы специфичных SNP, позволяющие осуществлять внутривидовую дифференциацию штаммов *B. melitensis*. Полученные результаты позволили определить вероятные пути проникновения возбудителя бруцеллеза на территорию Российской Федерации из Китая и стран Ближнего Востока. Показана перспектива применения оптимизированной схемы wgSNP-типирования для решения актуальных задач в области молекулярной эпидемиологии бруцеллеза, в том числе определения генотипа и подгенотипа патогена, ассоциированного с вероятным географическим регионом происхождения инфекции, выявления генетической связи между штаммами с высокой точностью.

**Ключевые слова:** *Brucella melitensis*, полногеномное секвенирование, SNP-анализ, филогения.

Корреспондирующий автор: Ковалев Дмитрий Анатольевич, e-mail: kovalev\_da.stv@list.ru.

Для цитирования: Кузнецова И.В., Ковалев Д.А., Писаренко С.В., Бобрышева О.В., Шапак Н.А., Жиров А.М., Сафонова Н.С., Пономаренко Д.Г., Хачатурова А.А., Жилченко Е.Б., Сердюк Н.С., Куличенко А.Н. Генетическая характеристика штаммов *Brucella melitensis*, выделенных на территории Российской Федерации, на основе данных анализа единичных нуклеотидных полиморфизмов при полногеномном секвенировании. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024; 1:154–161. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-154-161

Поступила 26.07.2023. Отправлена на доработку 05.10.2023. Принята к публ. 21.11.2023.

I.V. Kuznetsova, D.A. Kovalev, S.V. Pisarenko, O.V. Bobrysheva, N.A. Shapakov, A.M. Zhironov,  
N.S. Safonova, D.G. Ponomarenko, A.A. Khachaturova, E.B. Zhilchenko, N.S. Serdyuk,  
A.N. Kulichenko

**Genetic Profile of *Brucella melitensis* Strains Isolated on the Territory  
of the Russian Federation, Based on Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms  
Following Whole Genome Sequencing**

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

**Abstract.** The aim of the work was to conduct a comparative phylogenetic analysis based on wgSNP of complete genomes of *Brucella melitensis* strains circulating in the territory of the Russian Federation. **Materials and methods.** wgSNP typing of 412 *B. melitensis* strains of the main genetic lineages of brucella from different regions of the world, including 64 strains isolated in the regions of the European and Asian parts of the Russian Federation, was performed. DNA sequencing was conducted on the “Ion GeneStudio S5 Plus” platform (“Life Technologies”, USA) using the “Ion Plus Fragment Library Kit library preparation” (“Life Technologies”, USA), according to the “Ion 520™ & Ion 530™ Kit – Chef” protocol (Revision D.0). **Results and discussion.** It has been established that the strains circulating in Russia belong mainly to genotype II, which has a wide geographical distribution across the territory of Eurasia. At the same time, subgenotype IIh prevails in the regions of Siberia, and IIi – in the European territory of the country. For the first time, sets of specific SNPs have been identified that allow for intraspecific differentiation of *B. melitensis* strains. The obtained results made it possible to determine the probable routes of introduction of the causative agent of brucellosis into the territory of the Russian Federation from China and the countries of the Middle East. The prospect of using an optimized wgSNP typing scheme to solve urgent problems in the field of molecular epidemiology of brucellosis is demonstrated. It includes determining the genotype and subgenotype of the pathogen associated with the probable geographical region of origin of infection, and identifying the genetic relations between strains with high accuracy.

**Key words:** *Brucella melitensis*, whole genome sequencing, SNP analysis, phylogeny.

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

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

Corresponding author: Dmitry A. Kovalev, e-mail: kovalev\_da.stv@list.ru.

Citation: Kuznetsova I.V., Kovalev D.A., Pisarenko S.V., Bobrysheva O.V., Shapakov N.A., Zhiron A.M., Safonova N.S., Ponomarenko D.G., Khachaturova A.A., Zhilchenko E.B., Serdyuk N.S., Kulichenko A.N. Genetic Profile of *Brucella melitensis* Strains Isolated on the Territory of the Russian Federation, Based on Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms Following Whole Genome Sequencing. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2024; 1:154–161. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-154-161

Received 26.07.2023. Revised 05.10.2023. Accepted 21.11.2023.

Kuznetsova I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9513-0761>  
Kovalev D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>  
Pisarenko S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6458-6790>  
Bobrysheva O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6338-4476>  
Shapakov N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9152-4026>  
Zhiron A.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7698-7361>

Safonova N.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8974-1053>  
Ponomarenko D.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0422-6755>  
Khachaturova A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7459-7204>  
Zhilchenko E.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7180-1292>  
Kulichenko A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Бруцеллез имеет глобальное распространение, эндемичен во многих регионах мира и остается наиболее значимой особо опасной зоонозной инфекцией преимущественно на территориях Северо-Кавказского, Южного, Приволжского и Сибирского федеральных округов Российской Федерации [1].

Род *Brucella* состоит из 12 самостоятельных видов, различающихся по генетическим, биохимическим, антигенным и вирулентным характеристикам. Большое эпизоотическое и эпидемическое значение представляет вид *B. melitensis* – возбудитель бруцеллеза мелкого рогатого скота (козы и овцы), приводящий к поражению репродуктивной, костно-суставной, сердечно-сосудистой и нервной системы [2].

Система противоэпидемических мероприятий по контролю и борьбе с бруцеллезом, наряду с оперативной индикацией и идентификацией возбудителя, включает и его генетическое типирование. Для генетической характеристики штаммов патогена нашли применение несколько молекулярных методов с высокой разрешающей способностью: анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) [3], мультилокусный анализ вариабельного числа копий tandemных повторов (MLVA) [4–6], мультилокусное сиквенс-типирование (MLST) [7, 8] или мультилокусный сиквенс-анализ (MLSA) [9], выявление вставки или делеции нескольких нуклеотидов (InDel) [10] и др. В последние годы для генетической характеристики штаммов, определения взаимосвязей между изолятами, оценки филогении и филогеографии бруцелл, выделенных из клинического материала, от животных и объектов окружающей среды, все чаще используются методы высокопроизводительного секвенирования [11–14].

Полногеномное секвенирование позволяет в ходе одного эксперимента получить исчерпывающую информацию о геноме микроорганизма, включая первичную структуру целевых генов (факторов вирулентности, антибиотикорезистентности и т.д.), сиквенс-тип, особенности плазмидного состава, в относительно короткие сроки, как правило, от трех до пяти дней. Кроме того, в последние годы разработаны новые методы генотипирования, в том числе мультилокусное сиквенс-типирование корового генома (cgMLST) и полногеномный анализ однонуклеотидных полиморфизмов (wgSNP), обладающие существенно большей дискриминирующей способностью по сравнению с методами гель-электрофореза в импульсном поле (PFGE) и MLVA [15, 16].

Следует отметить, что, несмотря на очевидные преимущества современных технологий полногеномного секвенирования, существует ряд объективных трудностей их практического применения, в частности: относительно высокая стоимость исследования, сложность стандартизации алгоритмов обработки и интерпретации постоянно увеличивающихся массивов данных WGS в условиях прекращения доступа к коммерческим зарубежным биоинформационным платформам и онлайн-ресурсам, потребность в наличии высококвалифицированного персонала в области биоинформатики.

На основании метода wgSNP охарактеризована структура глобальной популяции бруцелл. В 2015 г. K. Tan *et al.* определили, что вид *B. melitensis* представлен пятью основными генетическими линиями, которые соответствуют потенциальному географическому происхождению изолятов: I – средиземноморская, II – азиатская, III – африканская, IV – европейская, V – американская [17].

Ранее нами был проведен эволюционно-филогеографический анализ, в результате которого определены временные интервалы дивергенции генотипов и подгенотипов для каждой генетической линии [18]. Согласно результатам исследования 22 штамма *B. melitensis* из России были отнесены к генотипу II.

Учитывая широкое географическое распространение вида *B. melitensis* на территории России, актуальным является проведение исследований штаммов, выделенных на территориях эндемичных регионов, с целью накопления знаний о филогенетической структуре возбудителя и геномных особенностях штаммов.

**Цель** исследования – проведение масштабной филогенетической реконструкции на основе полногеномного SNP-анализа штаммов *B. melitensis*, выделенных на территории Российской Федерации с 1948 по 2021 г.

## Материалы и методы

Геномные последовательности 348 штаммов *B. melitensis*, выделенных в период с 1956 по 2021 г., получены из международной базы данных GenBank.

Геномы 64 штаммов секвенированы в ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, из которых 59 выделены от больных людей и 5 – от животных. Исследуемые штаммы были изолированы в разное время на территории

европейской и азиатской части Российской Федерации: 42 штамма – Северный Кавказ (1999–2021 гг.), 13 – Сибирь (1958–2010 гг.), 5 – Урал (2011, 2019 гг.), 1 – Дальний Восток (2019 г.), 1 – Поволжье (1948 г.), 1 – г. Москва (2017 г.), 1 – г. Санкт-Петербург (2021 г.). Независимо от места, времени и источника выделения, штаммы характеризовались специфичным для *B. melitensis* ростом на жидких и твердых питательных средах. Все изоляты были типичны по своим фенотипическим и антигенным свойствам.

Бактерии культивировали на бруцелла-агаре при 37 °C в течение 48 ч. К микробной взвеси с концентрацией  $2 \cdot 10^9$  м.к./мл добавляли мертиолят натрия до конечной концентрации 0,01 % и инкубировали при температуре 56 °C в течение 30 мин. Геномную ДНК выделяли из 0,5 мл обработанной мертиолятом натрия микробной взвеси с использованием набора PureLink Genomic DNA Kits (Life Technologies, США).

Подготовку ДНК библиотек для секвенирования проводили по стандартному протоколу Ion Xpress™ Plus gDNA Fragment Library Preparation (Revision K.0) с использованием набора Ion Plus Fragment Library Kit (Life Technologies, США). Секвенирование проводили с использованием секвенатора Ion GeneStudio S5 Plus (Life Technologies, США), по протоколу Ion 520™ & Ion 530™ Kit – Chef (Revision D.0).

Оценку качества данных секвенирования проводили с помощью программы FastQC (версия 0.11.3) [19]. Чтения со средним значением качества  $Q < 20$ , а также риды длиной менее 75 нуклеотидов отфильтрованы в программе Trimmomatic (версия 0.33) [20]. Для сборки геномов применяли программное обеспечение Newbler v3.0 (Roche, США), контиги длиной менее 500 нуклеотидов были удалены. Оценку качества сборки геномов выполняли с использованием программы Quast 3.0 [21].

Для обнаружения SNP и построения филогенетического дерева использовали программу ParSNP [22]. Запуск программы для множественного выравнивания 412 полногеномных последовательностей *B. melitensis* против референсного генома *B. melitensis* 16M (GenBank: NC003317, NC003318) осуществляли с параметрами -c -e -u -C 1000. Полученная в результате множественного выравнивания бинарная матрица, содержащая все нуклеотидные замены в коровом геноме исследуемых штаммов, использовалась для обнаружения SNP специфичных для отдельных кластеров. Визуализацию и аннотацию филогенетического дерева осуществляли с помощью онлайн-инструмента iTOL v6.7.5 [23].

### Результаты и обсуждение

Для определения на основании полногеномного SNP-анализа филогенетического положения штаммов *B. melitensis*, изолированных в России, в структуре глобальной популяции вида изучены полученные последовательности полных геномов 64 штам-

мов бруцелл, выделенных на территории Российской Федерации, а также геномы 347 штаммов патогена, представленных в международной базе данных GenBank NCBI (все доступные черновые и полные геномы на момент проведения анализа).

Кластерная структура филогенетического дерева, построенного на основании данных полногеномного SNP-анализа, согласуется с результатами предыдущих исследований [17, 18]. Для описания филогении мы использовали предложенную ранее схему обозначения ветвей (рис. 1). Филогенетический анализ определяет пять основных генетических линий (генотипов): I – средиземноморская (136 штаммов), II – азиатская (249 штаммов), III – африканская (15 штаммов), IV – европейская (3 штамма), V – американская (9 штаммов).

При анализе корового генома выявлено 1854 SNP-маркера, специфичных для каждого из подгенотипов *B. melitensis*. Из них 1142 локализованы на первой хромосоме, 712 – на второй. Процентное соотношение SNP-маркеров в кодирующих и некодирующих областях генома составило 87,56 и 12,44 % соответственно.

Подгенотип IIa несет только SNP, специфичные для генотипа II, и у него нет уникальных мутаций; подгенотипы Va и Vb несут только SNP, специфичные для генотипа V, а мутаций для подгенотипов не выявлено (табл. 1).

Геномы штаммов, принадлежащих к подгенотипу IIi, отличаются только одним специфич-

Таблица 1 / Table 1

Специфичные SNP-маркеры для генетических линий *B. melitensis*  
Specific SNP markers for *B. melitensis* genetic lineages

| №  | Генотип<br>Genotype | Общее количество SNP для генотипа<br>Total number of SNPs for a genotype | Исследованные подгенотипы<br>Studied subgenotype | Общее количество SNP для подгенотипа<br>Total number of SNPs for a subgenotype |
|----|---------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | I                   | 1095                                                                     | –                                                | –                                                                              |
| 2  | II                  | 599                                                                      | IIa                                              | –                                                                              |
| 3  |                     |                                                                          | IIb                                              | 24                                                                             |
| 4  |                     |                                                                          | IIc                                              | 107                                                                            |
| 5  |                     |                                                                          | IIId                                             | 33                                                                             |
| 6  |                     |                                                                          | IIe                                              | 39                                                                             |
| 7  |                     |                                                                          | IIIf                                             | 106                                                                            |
| 8  |                     |                                                                          | IIh                                              | 24                                                                             |
| 9  |                     |                                                                          | IIg                                              | 13                                                                             |
| 10 |                     |                                                                          | IIi                                              | 1                                                                              |
| 11 | III                 | 300                                                                      | –                                                | –                                                                              |
| 12 | IV                  | 112                                                                      | –                                                | –                                                                              |
| 13 | V                   | 0                                                                        | Va                                               | –                                                                              |
| 14 |                     |                                                                          | Vb                                               | –                                                                              |



Анализ филогенетического дерева, построенного на основе данных *wg*SNP, позволил установить, что российские изоляты, секвенированные в рамках данного исследования, принадлежат к четырем подгенотипам генетической линии II: IIb, IIh, IIg и IIi (рис. 2).

Штамм *B. melitensis* C-636 (г. Хабаровск, 2019 г.), выделенный из клинического материала, относится к генетическому кластеру Пб в составе одной группы с изолятами из Сирии, Турции и Кувейта. В данном случае можно предположить завоз бруцеллезной инфекции, поскольку штаммы данного генотипа на территории Российской Федерации больше не выявлялись. Следует отметить, что подгенотип Пб включает также штамм *B. melitensis* C-289 (г. Баку, 1984 г.), который занимает обособленное положение на филогенетическом дереве, и наиболее близким к нему является кластер, образованный штаммами, выделенными преимущественно на территории Турции.

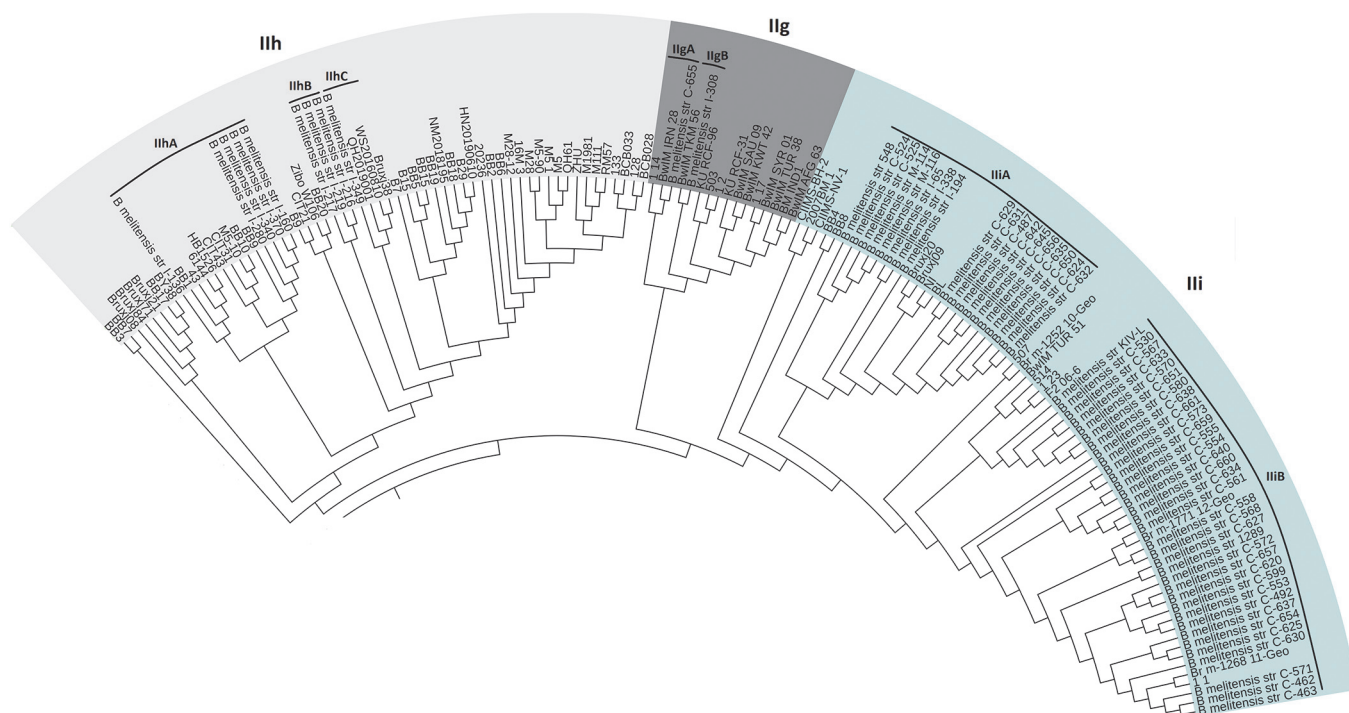


Рис. 2. Фрагмент дендрограммы кластерного анализа коровых SNP. Подгенотипы II генетической линии

Fig. 2. Fragment of the dendrogram displaying cluster analysis of core SNPs. Subgenotypes of the II genetic lineage

К подгенотипу Ph относятся 9 штаммов возбудителя бруцеллеза, выделенных на территории Сибирского федерального округа, и 51 штамм из Китая (в том числе вакцинный штамм M5-10). В структуре подгенотипа Ph российские изоляты распределяются на три ветви. Одну из ветвей, PhA, образуют штаммы I-136 (Республика Хакасия, 1959 г.), I-280 (Республика Бурятия, 1983 г.), I-340 (г. Красноярск, 1995 г.), I-160, I-370 (Республика Тыва, 1961 и 2010 гг.), а также 9 штаммов, выделенных в Китае в 1973, 1990, 2012, 2015 и 2021 гг. (штаммы BB9, BB10, M5-10, CIT31, CIT43, HB1526, 6144, 43, BB1). Три изолята, I-216, I-217, I-219, из Республики Бурятия (1970 г.) образуют вторую ветвь – PhB. Третья ветвь, PhC, включает штамм I-349 из Республики Тыва (1999 г.) и 3 штамма из Китая (Bruxj38, WS20160810 и QH2019001), выделенные в 2014, 2016 и 2019 гг.

Таким образом, штаммы из Китая и России, образующие подгенотип Ph, не имеют четкой кластерной дифференциации, за исключением трех изолятов из Республики Бурятия (1970 г.), что дает возможность предположить неоднократный завоз на территорию России зараженных животных и продуктов животного происхождения из эндемичных по бруцеллезу северных регионов Китая через Казахстан и Монголию и обратно в течение длительного времени.

В топологии генетической линии Pg выделяют-  
ся две ветви, в составе которых имеются российские  
штаммы. Одна из них, PgA, включает изолят С-655  
(г. Екатеринбург, 2019 г.), штамм BwIM IRN 28  
(Иран, 2015 г.), а также штамм 1\_14 (Норвегия,  
2012 г.).

Вторую ветвь, ПгВ, составляют российский штамм *B. melitensis* I-308 (Республика Тыва, 1986 г.) и штамм BwIM TKM 56 из Туркменистана (2015 г.). Большинство остальных штаммов, относящихся к подгенотипу Пг, были выделены на территории стран Ближнего Востока (Афганистан, Кувейт, Саудовская Аравия, Сирия, Турция). Как и в случаях с российскими изолятами подгенотипа Пб, штаммы подгенотипа Пг на территории Российской Федерации больше не выявлялись. В связи с этим представляется весьма вероятным завозное происхождение штаммов генотипа Пг, выделенных на территории России. Более глубокий анализ однонуклеотидных замен позволил обнаружить специфичные SNP-маркеры для штаммов филогенетических линий ПгА и ПгВ (табл. 2).

Подгенотип III включает 70 штаммов из Китая, Турции, Индии, Грузии и России. Российские изоляты относятся к двум отдельным ветвям.

Первая ветвь, PiA, включает штаммы патогена, выделенные в Саратовской (1948 г.), Оренбургской (4 штамма, 2011 г.), Новосибирской (1993 г.) и Иркутской (1958 и 1965 гг.) областях, 10 штаммов, выделенных на территории Республики Калмыкия в 2000, 2019–2020 гг., а также 4 штамма китайского происхождения (Bruxj20, Bruxj09, NI, BL), изолированные в 2007 и 2012–2014 гг. При этом изоляты из Республики Калмыкия образуют отдельный кластер в структуре филогенетической ветви (C-629, C-631, C-487, C-642, C-645, C-656, C-635, C-650, C-654, C-632).

Вторая ветвь, IIb, включает 5 штаммов из стран Европы, 3 штамма из Грузии, 1 из Турции и 34 российские культуры: 7 выделены на территории

Таблица 2 / Table 2

**Специфичные SNP-маркеры для генетических линий HgA и HgB**  
**Specific SNP markers for HgA and HgB genetic lineages**

| Ветвь<br>Branch | Количество SNP<br>Number of SNP | Первая хромосома<br>The first chromosome                                                                                                                                                                                                                         | Вторая хромосома<br>The second chromosome                                                                                                                                                                                                       |
|-----------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HgA             | 9                               | G77222T (Q-K)<br>G408479A (G-S)<br>C1074861G (D-H)<br>G1199277A (S-F)<br>A1660182G (S-P)<br>G2060435A (D=D)<br>G2094887A (Q-STOP)                                                                                                                                | G166770A (Q=Q)<br>G1144549A (I=I)                                                                                                                                                                                                               |
| HgB             | 27                              | C8336T (T-M)<br>C299099T (G-S)<br>G409123A (R-R)<br>G730891T (V-F)<br>G1098252A (A=A)<br>G1167509T (G=G)<br>G1233086A (P-S)<br>G1396529C (D-E)<br>C1412916T (S=S)<br>C1439099A (G=G)<br>C1628351T (L=L)<br>G1700252A (A-V)<br>A1748053G (V-A)<br>G1980366A (G-S) | A214074C (L-R)<br>A217636G (S=S)<br>C300143G (L=L)<br>C356833T (P=P)<br>A375902G (M-V)<br>G536182A (A=A)<br>G636860A (S=S)<br>T904712C (T-A)<br>A949246G (G=G)<br>C978155T (STOP-STOP)<br>G1001577C (G-R)<br>C1108445T (R-C)<br>T1161077C (T-A) |

Республики Дагестан (2011–2014 гг.); 1 – в Чеченской Республике (2014 г.); 13 – в Ставропольском крае (2011–2021 гг.); 11 – в Республике Калмыкия (2013–2019 гг.); по одному – в Санкт-Петербурге (2021 г., завозной случай из Республики Дагестан) и Москве (2017 г., завозной случай из Республики Дагестан).

Высокая однородность геномов штаммов второй ветви, наряду с отсутствием четкой кластеризации по географическому признаку, свидетельствует о длительной, постоянной циркуляции штаммов на территориях субъектов юга европейской части Российской Федерации (Республика Дагестан, Ставропольский край, Республика Калмыкия), что напрямую связано с распространением бруцеллеза среди мелкого рогатого скота. Причиной этого чаще всего является бесконтрольное приобретение и перемещение больных животных из эндемичных регионов, отсутствие профилактических, противоэпизоотических мероприятий и контроля со стороны ветеринарной службы.

Результаты анализа географического распределения мест выделения штаммов подгенотипа *III* свидетельствуют о двух независимых маршрутах исторического распространения *B. melitensis* на территорию Российской Федерации. Один из них – проникновение возбудителя на территорию юга Сибири из Китая через территорию Монголии и Казахстана. Второй маршрут, возможно, связан с одним из ответвлений Великого шелкового пути и предполагает занос возбудителя на территорию юга европейской части России с территории стран Средней Азии.

Таким образом, на основании полногеномного SNP-анализа установлено, что штаммы *B. melitensis*,

циркулирующие на территории России, относятся к генотипу *II*, имеющему широкое географическое распространение по всей территории Евразии. При этом в регионах Сибири преобладают штаммы подгенотипа *III*, а на юге европейской территории страны – *II*. Полученные результаты продемонстрировали высокую степень гомологии геномных SNP-профилей штаммов *B. melitensis*, циркулирующих на одной территории, и позволили определить вероятные пути проникновения возбудителя бруцеллеза на территорию Российской Федерации из Китая и стран Ближнего Востока.

В результате проведенной работы выявлены новые уникальные SNP-маркеры *B. melitensis*, которые могут использоваться для внутривидового генетического типирования с целью определения происхождения отдельных изолятов при решении задач молекулярно-эпидемиологического мониторинга.

Полученные данные демонстрируют высокую эффективность метода wgSNP в качестве инструмента для изучения глобальных популяций микроорганизмов, эпидемиологического расследования вспышек заболеваний и спорадических случаев, а также выявления атипичных или генномодифицированных вариантов патогенных бактерий.

В то же время определение эпидемического потенциала изолятов возбудителя бруцеллеза на основе данных полногеномного секвенирования затруднено, главным образом, вследствие фрагментарности знаний о генетических детерминантах вирулентности и функционировании генома бруцелл в ходе инфекции. В связи с этим целесообразно проведение дальнейших исследований, направленных на выявление осо-

бенностей транскрипционных и протеомных профилей штаммов, принадлежащих разным генетическим линиям возбудителя бруцеллеза и обладающих различными комплексами фенотипических свойств.

**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. 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.
2. Ющук Н.Д., Венгеров Ю.Я., редакторы. Инфекционные болезни: национальное руководство. 3-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2021. 1104 с. DOI: 10.33029/9704-6122-8-INB-2021-1-1104.
3. Al Dahouk S., Tomaso H., Prenger-Berninghoff E., Spletstoeser W.D., Scholz H.C., Neubauer H. Identification of *Brucella* species and biotypes using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Crit. Rev. Microbiol.* 2005; 31(4):191–6. DOI: 10.1080/10408410500304041.
4. Kumari G., Doimari S., Suman Kumar M., Singh M., Singh D.K. MLVA typing of *Brucella melitensis* and *B. abortus* isolates of animal and human origin from India. *Anim. Biotechnol.* 2023; 34(2):375–83. DOI: 10.1080/10495398.2021.1971685.
5. Sayour A.E., Elbauomy E., Abdel-Hamid N.H., Mahrous A., Carychao D., Cooley M.B., Elhadidy M. MLVA fingerprinting of *Brucella melitensis* circulating among livestock and cases of sporadic human illness in Egypt. *Transbound. Emerg. Dis.* 2020; 67(6):2435–45. DOI: 10.1111/tbed.13581.
6. Zhao Z.J., Li J.Q., Ma L., Xue H.M., Yang X.X., Zhao Y.B., Qin Y.M., Yang X.W., Piao D.R., Zhao H.Y., Tian G.Z., Li Q., Wang J.L., Tian G., Jiang H., Xu L.Q. Molecular characteristics of *Brucella melitensis* isolates from humans in Qinghai Province, China. *Infect. Dis. Poverty.* 2021; 10(1):42. DOI: 10.1186/s40249-021-00829-0.
7. Piao D.R., Liu X., Di D.D., Xiao P., Zhao Z.Z., Xu L.Q., Tian G.Z., Zhao H.Y., Fan W.X., Cui B.Y., Jiang H. Genetic polymorphisms identify in species/biovars of *Brucella* isolated in China between 1953 and 2013 by MLST. *BMC Microbiol.* 2018; 18(1):7. DOI: 10.1186/s12866-018-1149-0.
8. Shome R., Krithiga N., Shankaranarayana P.B., Jegadesan S., Udayakumar S.V., Shome B.R., Saikia G.K., Sharma N.K., Chauhan H., Chandel B.S., Jeyaprakash R., Rahman H. Genotyping of Indian antigenic, vaccine, and field *Brucella* spp. using multilocus sequence typing. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2016; 10(3):237–44. DOI: 10.3855/jidc.6617.
9. Whatmore A.M., Koylass M.S., Muchowski J., Edwards-Smallbone J., Gopaul K.K., Perret L.L. Extended multilocus sequence analysis to describe the global population structure of the genus *Brucella*: phylogeography and relationship to biovars. *Front. Microbiol.* 2016; 7:2049. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02049.
10. 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.
11. Moran-Gilad J. Whole genome sequencing (WGS) for food-borne pathogen surveillance and control-taking the pulse. *Euro Surveill.* 2017; 22(23):30547. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.23.30547.
12. Besser J., Carleton H.A., Gerner-Smidt P., Lindsey R.L., Trees E. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 2018; 24(4):335–41. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.10.013.
13. Collineau L., Boerlin P., Carson C.A., Chapman B., Fazil A., Hetman B., McEwen S.A., Parmley E.J., Reid-Smith R.J., Taboada E.N., Smith B.A. Integrating whole-genome sequencing data into quantitative risk assessment of foodborne antimicrobial resistance: a review of opportunities and challenges. *Front. Microbiol.* 2019; 10:1107. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01107.
14. Carriço J.A., Sabat A.J., Friedrich A.W., Ramirez M. Bioinformatics in bacterial molecular epidemiology and public health: databases, tools and the next-generation sequencing revolution. *Euro Surveill.* 2013; 18(4):20382. DOI: 10.2807/ese.18.04.20382-en.
15. Janowicz A., De Massis F., Ancora M., Cammà C., Patavino C., Battisti A., Prior K., Harmsen D., Scholz H., Zilli K., Sacchini L., Di Giannatale E., Garofolo G. Core genome multilocus sequence typing and single nucleotide polymorphism analysis in the epidemiology of *Brucella melitensis* infections. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56(9):e00517-18. DOI: 10.1128/JCM.00517-18.
16. Abdel-Gilil M.Y., Thomas P., Brandt C., Melzer F., Subbaiyan A., Chaudhuri P., Harmsen D., Jolley K.A., Janowicz A., Garofolo G., Neubauer H., Pletz M.W. Core genome multilocus sequence typing scheme for improved characterization and epidemiological surveillance of pathogenic *Brucella*. *J. Clin. Microbiol.* 2022; 60(8):e0031122. DOI: 10.1128/jcm.00311-22.
17. Tan K.K., Tan Y.C., Chang L.Y., Lee K.W., Nore S.S., Yee W.Y., Mat Isa M.N., Jafar F.L., Hoh C.C., AbuBakar S. Full genome SNP-based phylogenetic analysis reveals the origin and global spread of *Brucella melitensis*. *BMC Genomics.* 2015; 16(1):93. DOI: 10.1186/s12864-015-1294-x.
18. Pisarenko S.V., Kovalev D.A., Volynkina A.S., Ponomarenko D.G., Rusanova D.V., Zharinova N.V., Khachaturova A.A., Tokareva L.E., Khvoynova I.G., Kulichenko A.N. Global evolution and phylogeography of *Brucella melitensis* strains. *BMC Genomics.* 2018; 19(1):353. DOI: 10.1186/s12864-018-4762-2.
19. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. 2010. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (дата обращения 20.07.2023).
20. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014; 30(15):2114–20. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
21. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics.* 2013; 29(8):1072–5. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt086.
22. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6):1547–9. DOI: 10.1093/molbev/msy096.
23. Letunic I., Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics.* 2007; 23(1):127–8. DOI: 10.1093/bioinformatics/btl529.

## References

1. 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., Maletskaya 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.
2. Yushchuk N.D., Vengerov Yu.Ya., editors. [Infectious Diseases: National Guidelines]. 3<sup>rd</sup> ed., revised and updated. Moscow: GEOTAR-Media; 2021. 1104 p. DOI: 10.33029/9704-6122-8-INB-2021-1-1104.
3. Al Dahouk S., Tomaso H., Prenger-Berninghoff E., Spletstoeser W.D., Scholz H.C., Neubauer H. Identification of *Brucella* species and biotypes using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Crit. Rev. Microbiol.* 2005; 31(4):191–6. DOI: 10.1080/10408410500304041.
4. Kumari G., Doimari S., Suman Kumar M., Singh M., Singh D.K. MLVA typing of *Brucella melitensis* and *B. abortus* isolates of animal and human origin from India. *Anim. Biotechnol.* 2023; 34(2):375–83. DOI: 10.1080/10495398.2021.1971685.
5. Sayour A.E., Elbauomy E., Abdel-Hamid N.H., Mahrous A., Carychao D., Cooley M.B., Elhadidy M. MLVA fingerprinting of *Brucella melitensis* circulating among livestock and cases of sporadic human illness in Egypt. *Transbound. Emerg. Dis.* 2020; 67(6):2435–45. DOI: 10.1111/tbed.13581.
6. Zhao Z.J., Li J.Q., Ma L., Xue H.M., Yang X.X., Zhao Y.B., Qin Y.M., Yang X.W., Piao D.R., Zhao H.Y., Tian G.Z., Li Q., Wang J.L., Tian G., Jiang H., Xu L.Q. Molecular characteristics of *Brucella melitensis* isolates from humans in Qinghai Province, China. *Infect. Dis. Poverty.* 2021; 10(1):42. DOI: 10.1186/s40249-021-00829-0.
7. Piao D.R., Liu X., Di D.D., Xiao P., Zhao Z.Z., Xu L.Q., Tian G.Z., Zhao H.Y., Fan W.X., Cui B.Y., Jiang H. Genetic polymorphisms identify in species/biovars of *Brucella* isolated in China between 1953 and 2013 by MLST. *BMC Microbiol.* 2018; 18(1):7. DOI: 10.1186/s12866-018-1149-0.
8. Shome R., Krithiga N., Shankaranarayana P.B., Jegadesan S., Udayakumar S.V., Shome B.R., Saikia G.K., Sharma N.K., Chauhan H., Chandel B.S., Jeyaprakash R., Rahman H. Genotyping of Indian antigenic, vaccine, and field *Brucella* spp. using multilocus sequence typing. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2016; 10(3):237–44. DOI: 10.3855/jidc.6617.
9. Whatmore A.M., Koylass M.S., Muchowski J., Edwards-Smallbone J., Gopaul K.K., Perret L.L. Extended multilocus se-

quence analysis to describe the global population structure of the genus *Brucella*: phylogeography and relationship to biovars. *Front. Microbiol.* 2016; 7:2049. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02049.

10. 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; (1):81–6. DOI: 10.18565/epidem.2022.12.1.81-6.

11. Moran-Gilad J. Whole genome sequencing (WGS) for food-borne pathogen surveillance and control-taking the pulse. *Euro Surveill.* 2017; 22(23):30547. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.23.30547.

12. Besser J., Carleton H.A., Gerner-Smidt P., Lindsey R.L., Trees E. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 2018; 24(4):335–41. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.10.013.

13. Collineau L., Boerlin P., Carson C.A., Chapman B., Fazil A., Hetman B., McEwen S.A., Parmley E.J., Reid-Smith R.J., Taboada E.N., Smith B.A. Integrating whole-genome sequencing data into quantitative risk assessment of foodborne antimicrobial resistance: a review of opportunities and challenges. *Front. Microbiol.* 2019; 10:1107. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01107.

14. Carriço J.A., Sabat A.J., Friedrich A.W., Ramirez M. Bioinformatics in bacterial molecular epidemiology and public health: databases, tools and the next-generation sequencing revolution. *Euro Surveill.* 2013; 18(4):20382. DOI: 10.2807/ese.18.04.20382-en.

15. Janowicz A., De Massis F., Ancora M., Cammà C., Patavino C., Battisti A., Prior K., Harmsen D., Scholz H., Zilli K., Sacchini L., Di Giannatale E., Garofolo G. Core genome multilocus sequence typing and single nucleotide polymorphism analysis in the epidemiology of *Brucella melitensis* infections. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56(9):e00517-18. DOI: 10.1128/JCM.00517-18.

16. Abdel-Glil M.Y., Thomas P., Brandt C., Melzer F., Subbaiyan A., Chaudhuri P., Harmsen D., Jolley K.A., Janowicz A., Garofolo G., Neubauer H., Pletz M.W. Core genome multilocus sequence typing scheme for improved characterization and epidemiological surveillance of pathogenic *Brucella*. *J. Clin. Microbiol.* 2022; 60(8):e0031122. DOI: 10.1128/jcm.00311-22.

17. Tan K.K., Tan Y.C., Chang L.Y., Lee K.W., Nore S.S., Yee W.Y., Mat Isa M.N., Jafar F.L., Hoh C.C., AbuBakar S. Full ge-

nome SNP-based phylogenetic analysis reveals the origin and global spread of *Brucella melitensis*. *BMC Genomics.* 2015; 16(1):93. DOI: 10.1186/s12864-015-1294-x.

18. Pisarenko S.V., Kovalev D.A., Volynkina A.S., Ponomarenko D.G., Rusanova D.V., Zharinova N.V., Khachaturova A.A., Tokareva L.E., Khvoynova I.G., Kulichenko A.N. Global evolution and phylogeography of *Brucella melitensis* strains. *BMC Genomics.* 2018; 19(1):353. DOI: 10.1186/s12864-018-4762-2.

19. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. 2010. (Cited 20 Jul 2023). [Internet]. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

20. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014; 30(15):2114–20. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.

21. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics.* 2013; 29(8):1072–5. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt086.

22. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6):1547–9. DOI: 10.1093/molbev/msy096.

23. Letunic I., Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL): an on-line tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics.* 2007; 23(1):127–8. DOI: 10.1093/bioinformatics/btl529.

#### Authors:

Kuznetsova I.V., Kovalev D.A., Pisarenko S.V., Bobrysheva O.V., Shapakov N.A., Zhirov A.M., Safonova N.S., Ponomarenko D.G., Khachaturova A.A., Zhilchenko E.B., Serdyuk N.S., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

#### Об авторах:

Кузнецова И.В., Ковалев Д.А., Писаренко С.В., Бобрышева О.В., Шапак Н.А., Жиров А.М., Сафонова Н.С., Пономаренко Д.Г., Хачатурова А.А., Жилченко Е.Б., Сердюк Н.С., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.