

DOI: 10.21055/0370-1069-2026-1-108-115

УДК 579.841.93(470)

Д.А. Ковалев, С.В. Писаренко, Н.А. Шапаков, И.В. Кузнецова, А.М. Жиров,
Д.Г. Пономаренко, А.Н. Куличенко

Эволюция и географическое распространение *Brucella melitensis* генетической линии II на территории Российской Федерации

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, Ставрополь, Российская Федерация

Цель работы – филогеографический и эволюционный анализ штаммов *Brucella melitensis* генетической линии II, выделенных на территории Российской Федерации, в контексте изучения глобальной популяции вида. **Материалы и методы.** В исследовании использовали 282 штамма *B. melitensis* из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. Полногеномное секвенирование осуществляли с помощью секвенатора DNBSEQ G50RS (MGI, Китай) с использованием набора реагентов MGIEasy FAST FS DNA Library Prep Set V2.1 (MGI, Китай) по стандартному протоколу. Эволюционный и филогеографический анализ проводили на базе программного пакета BEAST v2.7.5. **Результаты и обсуждение.** Установлено, что штаммы *B. melitensis* в Российской Федерации принадлежат к четырем субгенотипам генетической линии II, дивергировавшей предположительно в XVI в.: IIb, IIg, IIh и IIi. Единичные случаи выявления в России изолятов субгенотипов IIb и IIg указывают на завоз инфекции из стран Ближнего Востока. Субгенотип IIh распространен в Сибири, Монголии, Китае и Казахстане. Варианты наиболее представительного и генетически гетерогенного субгенотипа IIi циркулируют на обширной территории от Северного Кавказа до Северного Китая и, как правило, выделяются в ходе эпидемиологических расследований вспышек бруцеллеза в европейской части страны. Полученные результаты указывают на перспективу использования полногеномного SNP-анализа как эффективного инструмента для своевременного выявления неэндемичных или атипичных вариантов возбудителя бруцеллеза в ходе геномного профилирования отдельных регионов.

Ключевые слова: *Brucella melitensis*, полногеномное секвенирование, байесовский анализ, филогения, эволюция.

Корреспондирующий автор: Ковалев Дмитрий Анатольевич, e-mail: kovalev_da.stv@list.ru.

Для цитирования: Ковалев Д.А., Писаренко С.В., Шапаков Н.А., Кузнецова И.В., Жиров А.М., Пономаренко Д.Г., Куличенко А.Н. Эволюция и географическое распространение *Brucella melitensis* генетической линии II на территории Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2026; 1:108–115. DOI: 10.21055/0370-1069-2026-1-108-115

Поступила 22.07.2025. Отправлена на доработку 06.10.2025. Принята к публикации 10.10.2025.

D.A. Kovalev, S.V. Pisarenko, N.A. Shapakov, I.V. Kuznetsova, A.M. Zhiron,
D.G. Ponomarenko, A.N. Kulichenko

Evolution and Geographical Distribution of *Brucella melitensis* Genetic Line II in the Territory of the Russian Federation

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to conduct phylogeographic and evolutionary analysis of *Brucella melitensis* strains of genetic lineage II, isolated in the territory of the Russian Federation in the context of studying the global population of the species. **Materials and methods.** The study used 282 strains of *B. melitensis* from the collection of pathogenic microorganisms at the Stavropol Anti-Plague Institute of the Rospotrebnadzor. Whole-genome sequencing was performed using the DNBSEQ G50RS sequencer (MGI, China) and the MGIEasy FAST FS DNA Library Prep Set V2.1 kit (MGI, China) according to the standard protocol. Evolutionary and phylogeographic analysis was carried out applying the BEAST v2.7.5 software package. **Results and discussion.** It has been established that the *B. melitensis* strains in the Russian Federation belong to four sub-genotypes of the genetic line II, which presumably diverged in the 16th century: IIb, IIg, IIh, and IIi. The singular cases of sub-genotypes IIb and IIg detection in Russia indicate the importation of infection from the Middle East. Sub-genotype IIh is prevalent in Siberia, Mongolia, China, and Kazakhstan. Variants of the most representative and genetically heterogeneous sub-genotype IIi circulate in a vast area from the North Caucasus to Northern China and are usually identified during epidemiological investigations of brucellosis outbreaks in the European part of the country. The results indicate the prospect of using genome-wide SNP analysis as an effective tool for timely detection of non-endemic or atypical variants of the causative agent of brucellosis during genomic profiling of individual regions.

Key words: *Brucella melitensis*, genome-wide sequencing, Bayesian analysis, phylogeny, evolution.

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

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

Acknowledgements: The Reference Center for Monitoring Brucellosis Agent, the Stavropol Anti-Plague Institute of the Rospotrebnadzor, expresses its deep gratitude to the heads and staff of the Rospotrebnadzor Administrations, the Centers of Hygiene and Epidemiology in the constituent entities of the Russian Federation, as well as plague control institutions of the Rospotrebnadzor for providing information and analytical materials for this study.

Supplementary information is available at <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2026-1-108-115>

Corresponding author: Dmitry A. Kovalev, e-mail: kovalev_da.stv@list.ru.

Citation: Kovalev D.A., Pisarenko S.V., Shapakov N.A., Kuznetsova I.V., Zhiron A.M., Ponomarenko D.G., Kulichenko A.N. Evolution and Geographical Distribution of *Brucella melitensis* Genetic Line II in the Territory of the Russian Federation. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2026; 1:108–115. (In Russian). DOI: [10.21055/0370-1069-2026-1-108-115](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2026-1-108-115)

Received 22.07.2025. Revised 06.10.2025. Accepted 10.10.2025.

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

Zhiron A.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7698-7361>
Ponomarenko D.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0422-6755>
Kulichenko A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Бруцеллез – зоонозное инфекционное заболевание, эндемичное во многих регионах мира. Количество ежегодно регистрируемых случаев заболевания бруцеллезом людей превышает 2,1 млн [1].

В соответствии с данными Международного комитета по систематике прокариот (ICNP), после объединения известных видов бруцелл и охробактерий в единую таксономическую группу род *Brucella* включает 25 самостоятельных видов [2]. В то же время многие известные исследователи в области бруцеллеза считают, что указанные изменения в номенклатуре рода на основании геномных данных возбудителя бруцеллеза и почвенных бактерий не вполне обоснованы, принимая во внимание принципиальные различия в физиологии и экологии этих микроорганизмов [3].

Представители вида *Brucella melitensis* имеют наибольшее эпизоотическое и эпидемическое значение среди всех известных видов патогенных для человека бруцелл. Именно с *B. melitensis* связано большинство случаев тяжелого течения бруцеллеза у людей, ассоциированных с полиорганным поражением репродуктивной, костно-суставной, сердечно-сосудистой, нервной систем организма [4]. *B. melitensis* принято считать этиологическим агентом бруцеллеза мелкого рогатого скота (МРС). Однако в 2019 г. были описаны случаи инфицирования крупного рогатого скота (КРС) бактериями этого вида в Африке, вероятно, вследствие распространения практики совместного содержания КРС и МРС [5].

Оперативная индикация и идентификация возбудителя бруцеллеза базируются на применении чувствительных и производительных молекулярно-генетических методов исследования. В целях внутривидовой дифференциации штаммов бруцелл по-прежнему широко применяются мультилокусный анализ варибельного числа копий tandemных повторов (MLVA) [6] и мультилокусное сиквенс-типирование (MLST) [7]. Однако решение актуальных задач молекулярной эпидемиологии бруцеллеза фактически невозможно без использования методов высокопроизводительного секвенирования, обладающих наивысшей разрешающей способностью [8, 9]. Кроме того, следует отметить, что активное внедрение в практику методов секвенирования нуклеиновых кислот привело к существенному снижению актуальности дифференциации штаммов *B. melitensis* на основе определения биовара. Этот факт связан в первую очередь с отсутствием корреляции биоварной принадлежности изолятов с их

филогенетическим положением в случае мультилокусного сиквенс-анализа (MLSA) [10].

В настоящее время полногеномный анализ однонуклеотидных полиморфизмов (wgSNP) – главный инструмент углубленного молекулярно-генетического анализа выделенных штаммов бруцелл при исследовании вспышек бруцеллеза, который позволяет исследовать структуру мобильных генетических элементов, генов, ассоциированных с вирулентностью, установить филогенетическое положение изолята, провести реконструкцию эпидемиологических связей между очагами инфекции [11].

Современное представление о генетической структуре глобальной популяции основано на сравнительном анализе данных полногеномного секвенирования штаммов *B. melitensis*. Согласно ему вид *B. melitensis* можно разделить на пять главных генетических линий, характеризующихся определенной географической приуроченностью. Так, представители генетической линии I распространены главным образом в странах Средиземноморского бассейна, линии II – в Евразии, III – в Африке, IV – в Европе, V – в Северной и Южной Америке [12].

Принимая во внимание высокий эпидемиологический потенциал *B. melitensis* и существующие риски, связанные с завозом/заносом на территорию России возбудителя бруцеллеза из эндемичных регионов, в частности Ближнего Востока и Юго-Восточной Азии, актуальным является совершенствование геномного мониторинга патогенных для человека бруцелл на основе новых данных о филогенетической структуре и эволюции возбудителя.

В 2018 г. нами был проведен филогенетический и эволюционно-филогеографический анализ доступных полногеномных последовательностей *B. melitensis*, в результате которого определены временные интервалы дивергенции описанных ранее генотипов и установлено, что штаммы *B. melitensis*, циркулирующие на территории России, относятся к генетической линии II [13].

Известно, что объем и состав выборки исследуемых геномов оказывает значительное влияние на результаты байесовского филогенетического анализа и топологию филогении. Так, использование большего числа геномов позволяет увеличить охват генетических вариаций внутри и между таксонами, что способствует более точному восстановлению эволюционной истории, обеспечивая лучшую статистическую поддержку узлов для определения наиболее вероятной топологии филогении. Реализация

федерального проекта «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)» позволила значительно увеличить за последние три года количество исследуемых геномных последовательностей штаммов возбудителя бруцеллеза из Российской Федерации, что создает предпосылки для глубокого анализа доступных метаданных и получения новых знаний о филогеографии *B. melitensis*.

Цель исследования – филогеографический и эволюционный анализ штаммов *B. melitensis* генетической линии II, выделенных на территории Российской Федерации, в контексте изучения глобальной популяции вида.

Материалы и методы

Геномные последовательности 690 штаммов *B. melitensis*, выделенных из разных образцов биоматериала в период с 1952 по 2023 г., получены из баз данных GenBank и VGARus.

Геномы 282 штаммов *B. melitensis* (269 выделены от людей и 13 – от животных) из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора секвенированы в ходе выполнения данной работы. В числе прочих исследуемых штаммов 219 были изолированы в разное время на территории Российской Федерации: 87 штаммов – Республика Калмыкия (1957–2024 гг.); 62 – Ставропольский край (1957–2024 гг.); 22 – Республика Дагестан (1963–2019 гг.); 3 – Чеченская Республика (1960–2014 гг.); 2 – Кабардино-Балкарская Республика (2024 г.); 2 – Карачаево-Черкесская Республика (2023, 2024 гг.); 1 – Астраханская область (2023 г.); 5 – Самарская область (2022, 2023 гг.); 2 – Саратовская область (1948, 2024 гг.); 1 – Свердловская область (2019 г.); 4 – Оренбургская область (2011 г.); 1 – Орловская область (2011 г.); 6 – Республика Тыва (1956–2010 гг.); 5 – Республика Бурятия (1970–2024 гг.); 5 – Красноярский край (1995–2024 гг.); 3 – Иркутская область (1942–1965 гг.); 1 – Новосибирская область (1993 г.); 1 – Республика Хакасия (1959 г.); 1 – Забайкальский край (1956 г.); 1 – Читинская область (2025 г.); 1 – Хабаровский край (2019 г.); 3 – г. Санкт-Петербург (2023 г.).

Сведения о штаммах *B. melitensis*, геномные последовательности которых использованы для филогенетического и эволюционного анализа, представлены в Дополнительном файле 1 (ссылка в конце статьи).

Штаммы из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора были идентифицированы с использованием стандартных биохимических методов в соответствии с требованиями МУК 4.2.3010-12. Все изоляты проявляли типичные культурально-морфологические и биохимические свойства. В соответствии с МР 4.2.0288-22 «Идентификация и

типирование штаммов бруцелл с использованием молекулярно-биологических методов», методом ПЦР подтверждена принадлежность штаммов к роду *Brucella* на основании наличия продуктов амплификации фрагментов генов *wboA*, *bcspl1* и *abc*.

Бактерии культивировали на бруцелла-агаре при 37 °С 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 °С в течение 30 мин. Геномную ДНК выделяли из 0,5 мл обеззараженной микробной взвеси с использованием набора PureLink Genomic DNA Kits (Life Technologies, США). Концентрацию ДНК количественно определяли с помощью флуориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Оценку чистоты геномной ДНК осуществляли с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы геномной ДНК хранили при минус 20 °С до дальнейшего использования.

Подготовку библиотек фрагментов ДНК проводили по стандартному протоколу для набора реагентов FAST FS DNA Library Prep Set V2.1 (MGI, Китай). Секвенирование проводили с использованием секвенатора DNBSEQ G50RS (MGI, Китай), а также реагентов и проточной ячейки FCL для запуска секвенатора DNBSEQ-G50 High-throughput Sequencing Set (FCL, PE100, 100 Гб).

Сборку геномных последовательностей осуществляли с использованием программного обеспечения SPAdes v3.15.3 [14]. Оценка качества сборки геномов выполнена с помощью программы Quast 5.2.02 [15]. Для аннотации полученных геномов использовали программу Dfast [16].

Филогенетический анализ проводили на выборке геномов, включающей 282 геномные последовательности штаммов *B. melitensis*, секвенированные в ходе выполнения данной работы, и 690 геномов из баз данных NCBI (National Center for Biotechnology Information) и VGARus ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Для анализа были отобраны завершённые и фрагментированные геномы, отвечающие следующим критериям: число контигов <100, глубина прочтения >30x, обязательное наличие сведений о дате выделения штамма (год).

Эволюционный и филогеографический анализ проводили с использованием программного пакета BEAST v2.7.5 [17]. Множественное выравнивание 972 геномов *B. melitensis* выполняли с помощью программы REALPHY (Reference Sequence Alignment-based Phylogeny Builder) [18]. Полученная таким образом матрица множественного выравнивания геномов (коровый геном) включала как обнаруженные SNP, так и инвариантные сайты гомологичных последовательностей всех геномов выборки.

Выбор оптимальной эволюционной модели проводили с использованием программы ModelTest-NG [19]. Оптимальная модель нуклеотидных замен (GTR+I+G4) определена на основе значений критерия

рия BIC (Bayesian Information Criterion) [20]. Оценка времени дивергенции ветвей филогенетического дерева выполнялась на основе сведений о дате выделения штаммов с использованием некоррелированной модели строгих молекулярных часов, что предполагает равную скорость эволюции каждой из ветвей. Консенсусное филогенетическое дерево, представленное в Дополнительном файле 2 (ссылка в конце статьи), визуализировали с использованием программы FigTree [21].

Результаты и обсуждение

В целях описания филогеографического распространения и эволюции штаммов *B. melitensis* генетической линии II, выделенных на территории Российской Федерации, изучены последовательности полных геномов 219 российских штаммов и 753 – из разных регионов мира, в том числе 690 геномов, представленных в базах данных GenBank NCBI и VGARus (все доступные черновые и полные геномы соответствующего качества на момент проведения исследования).

В соответствии с ранее полученными данными [7, 8], структура консенсусного филогенетического дерева, построенного на основании данных полногеномного SNP-анализа, включает пять основных генетических линий, обозначенных I–V (рисунок).

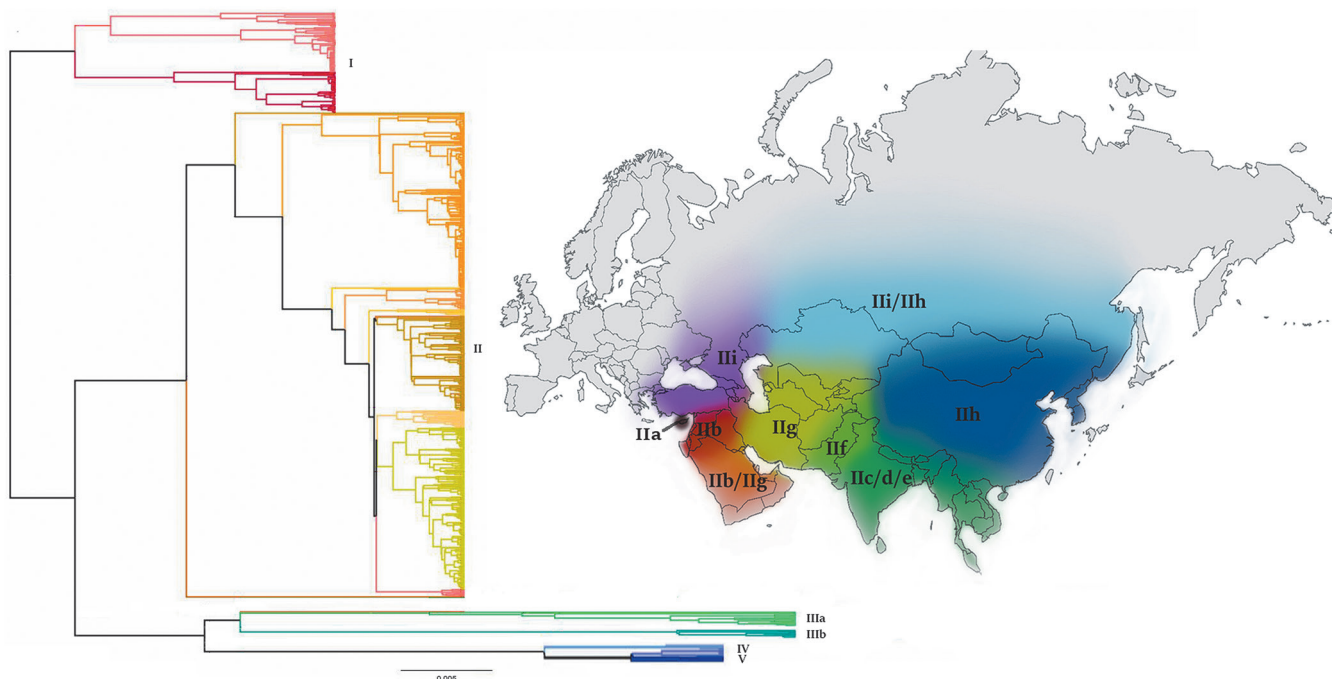
В ходе геномного анализа изолятов из Африки установлено, что 11 штаммов из ЮАР, изолированные от черной антилопы (сейбл) в 2017 г. и впервые описанные в 2024 г. в статье K.D. Mazwi

et al. [11], относятся к отдельной генетической группе в составе генотипа III, обозначенной нами IIIb (см. Дополнительный файл 2).

Размер корового генома, включающего кодирующие и некодирующие гомологичные области, составил 1 460 574 п.н. Анализ комплекса однонуклеотидных полиморфизмов, специфичных для каждой из описанных генетических ветвей *B. melitensis*, на основе сравнения соответствующих геномов с референсной геномной последовательностью штамма *B. melitensis* 16M (GCF_000007125.1) позволил выявить 10 244 однонуклеотидных полиморфизма (таблица).

Следует отметить, что на основе анализа SNP-профилей нельзя сделать вывод о функциональных отличиях штаммов в составе различных генетических линий. Подавляющая часть описанных SNP не приводит к изменению аминокислотных последовательностей белков. Кроме того, генотип-специфичные полиморфизмы относительно равномерно локализованы на обеих хромосомах, что свидетельствует об отсутствии четко выраженных «горячих» точек мутаций, ассоциированных с дивергенцией генетических групп бруцелл разного географического происхождения.

Установлено, что штаммы, выделенные в разное время на территории Российской Федерации, относятся к генетической линии II глобальной популяции, в том числе к подгенотипам IIb (1 штамм), IIg (4), IIh (18) и IIi (195). Исключение составляет *B. melitensis* C-459, выделенный из крови ребенка (М., 14 лет) в 1999 г. в г. Элисте (Республиканский



Структура филогенетического дерева на основе кластерного анализа коровых SNP штаммов *B. melitensis* и карта-схема филогеографического распространения генетической линии II

Structure of phylogenetic tree based on cluster analysis of core SNPs of *B. melitensis* strains and a map diagram of the phylogeographic distribution of the genetic lineage II

Специфичные SNP-маркеры *B. melitensis*
Specific SNP markers for *B. melitensis*

№	Генотип Genotype	Общее количество SNP для генотипа Total number of SNPs for a genotype	Подгенотип Sub-genotype	Количество SNP для подгенотипа Number of SNPs for a sub-genotype	
				Хромосома 1 Chromosome 1	Хромосома 2 Chromosome 2
1	I	67	Ia	7	6
2			Ib	37	17
3	II	316	IIa	86	43
4			IIb	9	8
5			IIc	8	–
6			IId	6	2
7			IIe	–	–
8			IIf	41	21
9			IIg	–	–
10			IIh	9	5
11			IIi	1	1
12			IIj	46	30
13	III	420	IIIa	53	34
14			IIIb	226	107
15	IV	55	n/i / n/i	39	16
16	V	0	Va (референс / reference)	–	–
17			Vb	–	–

Примечание: n/i – не идентифицирован.

Note: n/i – not identified.

центр ГСЭН), Республика Калмыкия. Установлено, что в 1998 г. М. в течение трех месяцев проживал у родственников в г. Кизляре, Республика Дагестан. Указанный изолят принадлежит к подгенотипу Ia и генетически наиболее близок штамму NCTC10509 (Италия, 1961 г.).

Клинический изолят *B. melitensis* С-636 (г. Хабаровск, 2019 г.) относится к подгенотипу IIb в составе общей генетической группы со штаммами из Сирии и Турции. Поскольку штаммы подгенотипов Ia и IIb больше не выявлялись на территории России, можно предположить, что причиной приведенных двух случаев стал завоз бруцеллезной инфекции.

В структуре генетической ветви IIg, сформировавшейся предположительно в XVI в., можно выделить две группы, одна из которых включает штаммы из Российской Федерации. Первая группа сформирована двумя штаммами из провинций Шаньдун и Внутренняя Монголия Китая (1957, 1991 гг.) и 11 – из Индии (2006–2022 гг.). В состав второй входят штаммы С-655 (г. Екатеринбург, 2019 г.), С-709 (Астраханская область, 2023 г.) и изолят WwIM IRN 28 (Иран, 2015 г.). К этой же группе относятся I-308 (Республика Тыва, 1986 г.), С-704 (г. Санкт-Петербург, 2023 г.) вместе с WwIM ТКМ 56 (Туркменистан, 2015 г.), восемь штаммами из Казахстана (372, 1985 г.; 101, 103, 131, 137, 139, 140, 149, 1986 г.), а также изолятами из Кувейта, Саудовской Аравии, Турции, Сирии, Афганистана, Азербайджана. Имеющиеся данные позволяют

предположить, что редкие случаи выявления штаммов подгенотипа IIg в Российской Федерации связаны с завозом инфекции из эндемичных регионов Ближнего Востока.

Подгенотипу IIg принадлежат и штаммы 1_45, 1_47, выделенные в Норвегии в 2016 г. Предположение о происхождении указанных штаммов из стран Азии вследствие миграции населения или туризма было выдвинуто Т.В. Johansen et al. на основании результатов анализа полных геномов и отнесения к генетической линии II [22].

Основу подгенотипа IIh, сформировавшегося предположительно в XVI в., составляют штаммы, изолированные в Китае и Индии. В составе подгенотипа встречаются также ветви, в которых китайские штаммы соседствуют с изолятами из Монголии, Казахстана и России. Так, *B. melitensis* I-136 (Республика Хакасия, 1959 г.) входит в состав ветви вместе с группой штаммов из северных и восточных провинций Китая (Хэбэй, Внутренняя Монголия, Хэнань, Цзянсу). Аналогично штамм I-280 (Республика Бурятия, 1983 г.), 5 изолятов из Республики Тыва (I-73, 1956 г.; I-163, 1958 г.; I-160, 1961 г.; I-235, 1975 г.; I-370, 2010 г.) и 5 – из Красноярского края (I-340, 1995 г.; С-752, С-753, С-754, С-755, 2024 г.) образуют общую группу со штаммами из Китая (Внутренняя Монголия, 1990 г.; Харбин, 2018 г.) и Монголии (1976 г.). *B. melitensis* I-94, выделенный из клинического материала, полученного из Читинской области, обладает наи-

большим генетическим сходством со штаммами из Китая (53, 57, 59, 71, Внутренняя Монголия, 2014–2017 гг.; Bru_18_06, Bru_18_21, Bru_18_22, Bru_18_32, Bru_18_37, Харбин, 2018 г.). В другую группу со штаммами из северо-восточных провинций Китая вошел *B. melitensis* I-53 (Забайкальский край, 1956 г.). Отдельные кластеры в составе подгенотипа сформировали штаммы I-216, I-217 и I-219, выделенные в Республике Бурятия (1970 г.), а также I-349 (Республика Тыва, 1999 г.).

Одной из вероятных причин продолжительной циркуляции штаммов одного подгенотипа *B. melitensis* на территориях северного и северо-восточного Китая, Монголии, южной части Казахстана и Сибири, наряду с многократным завозом зараженных животных и продуктов животного происхождения по известным торговым маршрутам, является высокий риск передачи бруцеллеза при контакте домашнего скота с дикими животными, особенно в степях на границе Китая и Монголии. Распространению бруцеллеза в регионе благоприятствует контаминация инфицированными животными почвы и немногочисленных водных источников [23].

Подгенотип III, сформировавшийся предположительно в XVI в., составляют изоляты из стран Азии и 89 % исследуемых штаммов (n=195), выделенных на территории Российской Федерации. Указанный подгенотип можно разделить на две основные генетические ветви, которые дивергировали предположительно в начале XVII в.

Первая ветвь подгенотипа разделена на две группы. В состав одной входят штаммы, выделенные на территории Сибири (Новосибирская область, 1993 г.; Иркутская область, 1942, 1958 и 1965 гг.), северных провинций Китая (2007–2015 гг.), Казахстана (1986 г.) и регионов Северного Кавказа: 22 штамма из Республики Калмыкия (2000–2020 гг.) и 1 – из Республики Дагестан (2014 г.). Основу другой группы составляют 36 штаммов, изолированных в Казахстане в 1986 г. К ней также относятся по одному изоляту из Узбекистана (1971 г.), Саратовской области (1948 г.), Республики Бурятия (2024 г.) и 4 штамма, выделенные в Оренбургской области (2011 г.).

Вторая ветвь подгенотипа состоит главным образом из штаммов, выделенных в южных и центральных регионах европейской части Российской Федерации, в частности: 62 – Республика Калмыкия (1957–2024 гг.), 62 – Ставропольский край (1957–2024 гг.), 22 – Республика Дагестан (1963–2019 гг.), 3 – Чеченская Республика (1960, 1970, 2014 гг.), 2 – Карачаево-Черкесская Республика (2023, 2024 гг.), 2 – Кабардино-Балкарская Республика (2024 г.), 5 – Самарская область (2022, 2023 гг.), 1 – Саратовская область (2024 г.), 1 – Орловская область (2011 г.). К этой же ветви относятся штаммы, изолированные в Санкт-Петербурге в 2023 г. (С-698, С-699) от больного, инфицированного, вероятно, при употреблении непастеризованных молочных продуктов во время пребывания в Чеченской Республике.

Представители описанной генетической ветви возбудителя бруцеллеза встречаются и в других странах, в том числе в Азербайджане (1985 г.), Грузии (2002, 2010, 2011, 2012 гг.), Казахстане (1986 г.), Турции (2014 г.), Австрии (2012, 2019 гг.), Португалии (2006, 2009 гг.).

Состав и география распространения штаммов подгенотипа III свидетельствуют о продолжительной циркуляции *B. melitensis* на юге европейской части Российской Федерации, где развито содержание и разведение МРС. Постоянное перемещение МРС и активная торговля, в том числе продуктами сельского хозяйства, на территории субъектов Северного Кавказа способствовали формированию генетически гетерогенной популяции возбудителя бруцеллеза, которая регулярно служит источником заноса инфекции в относительно благополучные по бруцеллезу регионы страны. Имеющиеся данные о штаммах генотипа III, изолированных на территории регионов Сибири, Китая, Казахстана, подтверждают происхождение соответствующих генетических групп возбудителя бруцеллеза от общего предка предположительно с Иранского нагорья.

Таким образом, результаты масштабного исследования позволили подтвердить, что основу популяции *B. melitensis* в Российской Федерации составляют два субгенотипа генетической линии II, сформировавшиеся предположительно в XVI в.: IIIh и IIIi. Штаммы наиболее представительного и генетически гетерогенного субгенотипа IIIi циркулируют на обширной территории от Северного Кавказа до Северного Китая и, как правило, выделяются в ходе эпидемиологических исследований вспышек бруцеллеза на европейской части страны. Субгенотип IIIh распространен в Сибири, Монголии, Китае и Казахстане.

Единичные случаи выявления в России изолятов субгенотипов IIIb и IIIg указывают на завоз инфекции из стран Ближнего Востока.

Новые данные о структуре, эволюции и филогеографии штаммов *B. melitensis* генетической линии II, циркулирующих на территории Российской Федерации, могут служить одним из базовых элементов проактивной системы геномного мониторинга за возбудителем бруцеллеза.

Полногеномный SNP-анализ изолята – эффективный способ установления наиболее вероятного источника происхождения и путей передачи возбудителя в ходе эпидемиологического расследования вспышки бруцеллеза. В прикладном аспекте принадлежность нескольких штаммов к общей генетической группе на соответствующем филогенетическом дереве может служить основанием для вывода об общем источнике их происхождения. SNP-генотипы *B. melitensis* остаются стабильными в течение продолжительного времени, что может быть использовано для своевременного выявления неэндемичных или атипичных вариантов патогена в ходе геномного профилирования отдельных регионов.

Необходимо отметить, что подавляющая часть исследуемых в данной работе штаммов *B. melitensis* выделена из клинического материала. Несмотря на очевидную тесную связь случаев заболевания человека с эпизоотологической ситуацией по бруцеллезу в конкретном регионе, существенный недостаток информации о геномах бруцелл, циркулирующих среди животных, служит главной причиной того, что представление о генетической структуре популяции *B. melitensis* остается недостаточно полным.

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

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

Благодарности. Референс-центр по мониторингу за возбудителем бруцеллеза ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора выражает глубокую признательность руководителям и сотрудникам управлений Роспотребнадзора, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации, а также противочумных учреждений Роспотребнадзора за предоставление информационных и аналитических материалов для проведения настоящего исследования.

Дополнительные файлы доступны по адресу <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2026-1-108-115>

Список литературы

- Laine C.G., Johnson V.E., Scott H.M., Arenas-Gamboa A.M. Global estimate of human brucellosis incidence. *Emerg. Infect. Dis.* 2023; 29(9):1789–97. DOI: 10.3201/eid2909.230052.
- Genus *Brucella*. [Электронный ресурс]. URL: <https://lpsn.dsmz.de/genus/brucella> (дата обращения: 07.07.2025).
- Moreno E., Middlebrook E.A., Altamirano-Silva P., Al Dahouk S., Araj G.F., Arce-Gorvel V., Arenas-Gamboa A., Ariza J., Barquero-Calvo E., Battelli G., Bertu W.J., Blasco J.M., Bosilkovski M., Cadmus S., Caswell C.C., Celli J., Chacón-Díaz C., Chaves-Olarte E., Comerci D.J., Conde-Alvarez R., Cook E., Cravero S., Dadar M., De Boelle X., De Massis F., Díaz R., Escobar G.I., Fernández-Lago L., Ficht T.A., Foster J.T., Garin-Bastuji B., Godfroid J., Gorvel J.P., Güler L., Erdenliç-Gürbilek S., Gusi A.M., Guzmán-Verri C., Hai J., Hernández-Mora G., Iriarte M., Jacob N.R., Keriel A., Khamis M., Köhler S., Letesson J.J., Loperena-Barber M., López-Goñi I., McGiven J., Melzer F., Mora-Carlin R., Moran-Gilad J., Muñoz P.M., Neubauer H., O'Callaghan D., Ocholi R., Oñate A., Pandey P., Pappas G., Pembroke J.T., Roop M., Ruiz-Villalón N., Ryan M.P., Salcedo S.P., Salvador-Bescós M., Sangari F.J., de Lima Santos R., Seimenis A., Splitter G., Suárez-Esquivel M., Tabbaa D., Trangoni M.D., Tsolis R.M., Vizcaino N., Wareth G., Welburn S.C., Whatmore A., Zúñiga-Ripa A., Moriyón I. If you're not confused, you're not paying attention: *Ochrobactrum* is not *Brucella*. *J. Clin. Microbiol.* 2023; 61(8):e0043823. DOI: 10.1128/jcm.00438-23.
- Ющук Н.Д., Венгеров Ю.Я., редакторы. Инфекционные болезни: национальное руководство. 3-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2021. 1104 с. ISBN 978-5-9704-6122-8.
- Kolo F.B., Adesiyun A.A., Fasina F.O., Katsande C.T., Dogonyaro B.B., Potts A., Matle I., Gelaw A.K., van Heerden H. Seroprevalence and characterization of *Brucella* species in cattle slaughtered at Gauteng abattoirs, South Africa. *Vet. Med. Sci.* 2019; 5(4):545–55. DOI: 10.1002/vms3.190.
- Al Dahouk S., Flèche P.L., Nöckler K., Jacques I., Grayon M., Scholz H.C., Tomaso H., Vergnaud G., Neubauer H. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. *J. Microbiol. Methods.* 2007; 69(1):137–45. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.12.015.
- Whatmore A.M., Perrett L.L., MacMillan A.P. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiol.* 2007; 7:34. DOI: 10.1186/1471-2180-7-34.
- Zhu L., Zhang C., Liang C., Peng L., Yan H., Liang X., Xu Y. Molecular epidemiological characteristics of osteoarthritis-associated *Brucella melitensis* in China: evidence from whole-genome

sequencing-based analysis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2024; 23(1):18. DOI: 10.1186/s12941-024-00671-w.

9. Li Y., Yu Y., Zhao J., Ding S., Zhang G., Yu X., Kou Z. Molecular epidemiological study of a human brucellosis outbreak – Weihai City, Shandong Province, China, 2022. *China CDC Wkly.* 2024; 6(12):230–4. DOI: 10.46234/cdcw2024.046.

10. Whatmore A.M., Koylass M.S., Muchowski J., Edwards-Smallbone J., Gopaul K.K., Perrett 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.

11. Mazwi K.D., Lekota K.E., Glover B.A., Kolo F.B., Hassim A., Rossouw J., Jonker A., Wojno J.M., Profitti G., Martelli P.L., Casadio R., Zilli K., Janowicz A., Marotta F., Garofolo G., van Heerden H. Whole genome sequence analysis of *Brucella* spp. from human, livestock, and wildlife in South Africa. *J. Microbiol.* 2024; 62(9):759–73. DOI: 10.1007/s12275-024-00155-8.

12. 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.

13. 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.

14. Pribelski A., Antipov D., Meleshko D., Lapidus A., Korobeynikov A. Using SPAdes de novo assembler. *Curr. Protoc. Bioinformatics.* 2020; 70(1):e102. DOI: 10.1002/cpbi.102.

15. Mikheenko A., Pribelski A., Saveliev V., Antipov D., Gurevich A. Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics.* 2018; 34(13):i142–i150. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty266.

16. Tanizawa Y., Fujisawa T., Nakamura Y. DFAST: a flexible prokaryotic genome annotation pipeline for faster genome publication. *Bioinformatics.* 2018; 34(6):1037–9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx713.

17. Bouckaert R., Vaughan T.G., Barido-Sottani J., Duchêne S., Fourment M., Gavryushkina A., Heled J., Jones G., Kühnert D., De Maio N., Matschiner M., Mendes F.K., Müller N.F., Ogilvie H.A., du Plessis L., Poppinga A., Rambaut A., Rasmussen D., Siveroni I., Suchard M.A., Wu C.H., Xie D., Zhang C., Stadler T., Drummond A.J. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput. Biol.* 2019; 15(4):e1006650. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1006650.

18. Bertels F., Silander O.K., Pachkov M., Rainey P.B., van Nimwegen E. Automated reconstruction of whole-genome phylogenies from short-sequence reads. *Mol. Biol. Evol.* 2014; 31(5):1077–88. DOI: 10.1093/molbev/msu088.

19. Darriba D., Posada D., Kozlov A.M., Stamatakis A., Morel B., Flouri T. ModelTest-NG: a new and scalable tool for the selection of DNA and protein evolutionary models. *Mol. Biol. Evol.* 2020; 37(1):291–4. DOI: 10.1093/molbev/msz189.

20. Luo A., Qiao H., Zhang Y., Shi W., Ho S.Y., Xu W., Zhang A., Zhu C. Performance of criteria for selecting evolutionary models in phylogenetics: a comprehensive study based on simulated datasets. *BMC Evol. Biol.* 2010; 10:242. DOI: 10.1186/1471-2148-10-242.

21. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. [Электронный ресурс]. URL: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree> (дата обращения: 07.07.2025).

22. Johansen T.B., Scheffer L., Jensen V.K., Bohlin J., Feruglio S.L. Whole-genome sequencing and antimicrobial resistance in *Brucella melitensis* from a Norwegian perspective. *Sci. Rep.* 2018; 8(1):8538. DOI: 10.1038/s41598-018-26906-3.

23. Gao S., Peng R., Zeng Z., Zhai J., Yang M., Liu X., Sharav T., Chen Z. Risk transboundary transmission areas and driving factors of brucellosis along the borders between China and Mongolia. *Travel Med. Infect. Dis.* 2023; 56:102648. DOI: 10.1016/j.tmaid.2023.102648.

References

- Laine C.G., Johnson V.E., Scott H.M., Arenas-Gamboa A.M. Global estimate of human brucellosis incidence. *Emerg. Infect. Dis.* 2023; 29(9):1789–97. DOI: 10.3201/eid2909.230052.
- Genus *Brucella*. (Cited 07 July 2025). [Internet]. Available from: <https://lpsn.dsmz.de/genus/brucella>.
- Moreno E., Middlebrook E.A., Altamirano-Silva P., Al Dahouk S., Araj G.F., Arce-Gorvel V., Arenas-Gamboa A., Ariza J., Barquero-Calvo E., Battelli G., Bertu W.J., Blasco J.M., Bosilkovski M., Cadmus S., Caswell C.C., Celli J., Chacón-Díaz C., Chaves-Olarte E., Comerci D.J., Conde-Alvarez R., Cook E., Cravero S., Dadar M., De Boelle X., De Massis F., Díaz R., Escobar G.I., Fernández-Lago L., Ficht T.A., Foster J.T., Garin-Bastuji B., Godfroid J., Gorvel J.P., Güler L., Erdenliç-Gürbilek S., Gusi A.M.,

- Guzmán-Verri C., Hai J., Hernández-Mora G., Iriarte M., Jacob N.R., Keriel A., Khames M., Köhler S., Letesson J.J., Loperena-Barber M., López-Goñi I., McGiven J., Melzer F., Mora-Cartin R., Moran-Gilad J., Muñoz P.M., Neubauer H., O'Callaghan D., Ocholi R., Oñate A., Pandey P., Pappas G., Pembroke J.T., Roop M., Ruiz-Villalón N., Ryan M.P., Salcedo S.P., Salvador-Bescós M., Sangari F.J., de Lima Santos R., Seimenis A., Splitter G., Suárez-Esquivel M., Tabbaa D., Trangoni M.D., Tsolis R.M., Vizcaino N., Wareth G., Welburn S.C., Whatmore A., Zúñiga-Ripa A., Moriyón I. If you're not confused, you're not paying attention: *Ochrobactrum* is not *Brucella*. *J. Clin. Microbiol.* 2023; 61(8):e0043823. DOI: 10.1128/jcm.00438-23.
4. Yushchuk N.D., Vengerov Yu.Ya., editors. [Infectious Diseases: National Guidelines]. 3rd ed., revised and updated. Moscow: "GEOTAR-Media"; 2021. ISBN 978-5-9704-6122-8.
5. Kolo F.B., Adesiyun A.A., Fasina F.O., Katsande C.T., Dogonyaro B.B., Potts A., Matle I., Gelaw A.K., van Heerden H. Seroprevalence and characterization of *Brucella* species in cattle slaughtered at Gauteng abattoirs, South Africa. *Vet. Med. Sci.* 2019; 5(4):545–55. DOI: 10.1002/vms3.190.
6. Al Dahouk S., Flèche P.L., Nöckler K., Jacques I., Grayon M., Scholz H.C., Tomaso H., Vergnaud G., Neubauer H. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. *J. Microbiol. Methods.* 2007; 69(1):137–45. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.12.015.
7. Whatmore A.M., Perrett L.L., MacMillan A.P. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiol.* 2007; 7:34. DOI: 10.1186/1471-2180-7-34.
8. Zhu L., Zhang C., Liang C., Peng L., Yan H., Liang X., Xu Y. Molecular epidemiological characteristics of osteoarthritis-associated *Brucella melitensis* in China: evidence from whole-genome sequencing-based analysis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2024; 23(1):18. DOI: 10.1186/s12941-024-00671-w.
9. Li Y., Yu Y., Zhao J., Ding S., Zhang G., Yu X., Kou Z. Molecular epidemiological study of a human brucellosis outbreak – Weihai City, Shandong Province, China, 2022. *China CDC Wkly.* 2024; 6(12):230–4. DOI: 10.46234/ccdcw2024.046.
10. Whatmore A.M., Koylass M.S., Muchowski J., Edwards-Smallbone J., Gopaul K.K., Perrett 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.
11. Mazwi K.D., Lekota K.E., Glover B.A., Kolo F.B., Hassim A., Rossouw J., Jonker A., Wojno J.M., Profiti G., Martelli P.L., Casadio R., Zilli K., Janowicz A., Marotta F., Garofolo G., van Heerden H. Whole genome sequence analysis of *Brucella* spp. from human, livestock, and wildlife in South Africa. *J. Microbiol.* 2024; 62(9):759–73. DOI: 10.1007/s12275-024-00155-8.
12. 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.
13. 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.
14. Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D., Lapidus A., Korobeynikov A. Using SPAdes de novo assembler. *Curr. Protoc. Bioinformatics.* 2020; 70(1):e102. DOI: 10.1002/cpbi.102.
15. Mikheenko A., Prjibelski A., Saveliev V., Antipov D., Gurevich A. Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics.* 2018; 34(13):i142–i150. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty266.
16. Tanizawa Y., Fujisawa T., Nakamura Y. DFAST: a flexible prokaryotic genome annotation pipeline for faster genome publication. *Bioinformatics.* 2018; 34(6):1037–9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx713.
17. Bouckaert R., Vaughan T.G., Barido-Sottani J., Duchêne S., Fourment M., Gavryushkina A., Heled J., Jones G., Kühnert D., De Maio N., Matschiner M., Mendes F.K., Müller N.F., Ogilvie H.A., du Plessis L., Poppinga A., Rambaut A., Rasmussen D., Siveroni I., Suchard M.A., Wu C.H., Xie D., Zhang C., Stadler T., Drummond A.J. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput. Biol.* 2019; 15(4):e1006650. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1006650.
18. Bertels F., Silander O.K., Pachkov M., Rainey P.B., van Nimwegen E. Automated reconstruction of whole-genome phylogenies from short-sequence reads. *Mol. Biol. Evol.* 2014; 31(5):1077–88. DOI: 10.1093/molbev/msu088.
19. Darriba D., Posada D., Kozlov A.M., Stamatakis A., Morel B., Flouri T. ModelTest-NG: a new and scalable tool for the selection of DNA and protein evolutionary models. *Mol. Biol. Evol.* 2020; 37(1):291–4. DOI: 10.1093/molbev/msz189.
20. Luo A., Qiao H., Zhang Y., Shi W., Ho S.Y., Xu W., Zhang A., Zhu C. Performance of criteria for selecting evolutionary models in phylogenetics: a comprehensive study based on simulated datasets. *BMC Evol. Biol.* 2010; 10:242. DOI: 10.1186/1471-2148-10-242.
21. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. (Cited 07 July 2025). [Internet]. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
22. Johansen T.B., Scheffer L., Jensen V.K., Bohlin J., Feruglio S.L. Whole-genome sequencing and antimicrobial resistance in *Brucella melitensis* from a Norwegian perspective. *Sci. Rep.* 2018; 8(1):8538. DOI: 10.1038/s41598-018-26906-3.
23. Gao S., Peng R., Zeng Z., Zhai J., Yang M., Liu X., Sharav T., Chen Z. Risk transboundary transmission areas and driving factors of brucellosis along the borders between China and Mongolia. *Travel Med. Infect. Dis.* 2023; 56:102648. DOI: 10.1016/j.tmaid.2023.102648.

Authors:

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

Об авторах:

Ковалев Д.А., Писаренко С.В., Шапаков Н.А., Кузнецова И.В., Жиров А.М., Пономаренко Д.Г., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.