

DOI: 10.21055/0370-1069-2026-2-148-155

УДК 579.841.93:579(571.54)

С.М. Лященко, М.И. Толмачёва, Т.О. Таликина, А.Н. Бондарюк, Е.С. Куликалова, С.В. Балахонов

Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Brucella abortus* из Джидинского района Республики Бурятия, изолированных при эпизоотической активизации бруцеллеза в 2023–2024 гг.

Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Российская Федерация

Цель исследования – выявление генетических особенностей и возможного происхождения штаммов *Brucella abortus*, вызвавших эпизоотическую вспышку бруцеллеза в Республике Бурятия в 2023–2024 гг. **Материалы и методы.** Исследуемые штаммы *B. abortus*, выделенные из патологоанатомического материала от крупного рогатого скота в Республике Бурятия в 2023–2024 гг. на территории, пограничной с Монголией, изучили бактериологически, с последующим секвенированием ДНК возбудителя и биоинформатическим анализом геномов. Проведен байесовский филогенетический анализ в BEAST v2.7.5. **Результаты и обсуждение.** Геномы штаммов охарактеризованы, проведен сравнительный анализ variability штаммов с вакцинным *B. abortus* 82 и штаммами, выделенными в Монголии в 1999 и 2014 гг. Установлено, что все исследуемые штаммы относятся к одной клональной ветви *B. abortus* сиквенс-типа 2. Группа штаммов *B. abortus* вспышки 2023–2024 гг. появилась около 58 лет назад (95% HPD: 31,2–86,7) и близкородственна штаммам, выделенным на территории Монголии в 1999 и 2014 гг. Эволюционная скорость этой группы составила $1,8 \cdot 10^{-7}$ замен на сайт в год (95% HPD: $2,5 \cdot 10^{-8}$ – $1,84 \cdot 10^{-6}$ замен на сайт в год). Уникальной мутацией, отличающей группу штаммов вспышки от штаммов *B. abortus* 82 и штаммов из Монголии, является дефект гена *rbsB*, вызванный мутацией с появлением стоп-кодона внутри рамки считывания. Этот ген участвует в энергозависимом переносе внеклеточной D-рибозы внутрь клетки и потенциально может снижать способность бактерии размножаться внутри клеток хозяина. В результате проведенного молекулярно-генетического исследования установлены причины и пути возникновения вспышки бруцеллеза среди крупного рогатого скота в Республике Бурятия в 2023–2024 гг.

Ключевые слова: *Brucella abortus*, эпизоотия, полногеномное секвенирование, байесовский филогенетический анализ.

Корреспондирующий автор: Лященко Семен Максимович, e-mail: lsh.smn15@gmail.com.

Для цитирования: Лященко С.М., Толмачёва М.И., Таликина Т.О., Бондарюк А.Н., Куликалова Е.С., Балахонов С.В. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Brucella abortus* из Джидинского района Республики Бурятия, изолированных при эпизоотической активизации бруцеллеза в 2023–2024 гг. Проблемы особо опасных инфекций. 2026; 2:148–155. DOI: 10.21055/0370-1069-2026-2-148-155

Поступила 18.09.2025. Отправлена на доработку 18.09.2025. Принята к публикации 03.11.2025.

S.M. Lyashchenko, M.I. Tolmacheva, T.O. Talikina, A.N. Bondaryuk, E.S. Kulikalova, S.V. Balakhonov

Molecular-Genetic Characteristics of *Brucella abortus* Strains from the Dzhida Region of the Republic of Buryatia under Conditions of Epizootic Activation of Brucellosis in 2023–2024

Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and the Far east, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to identify genetic features and possible origin of *Brucella abortus* strains that caused the epizootic outbreak of brucellosis in the Republic of Buryatia in 2023–2024. **Materials and methods.** The studied *B. abortus* strains, isolated from pathoanatomical material from cattle in the Republic of Buryatia in 2023–2024 in the area adjacent to Mongolia, were examined bacteriologically, followed by pathogen DNA sequencing and bioinformatic genome analysis. Bayesian phylogenetic analysis was performed in BEAST v2.7.5. **Results and discussion.** The genomes of the strains have been characterized; a comparative analysis of strain variability has been conducted in relation to the vaccine strain *B. abortus* 82 and strains isolated in Mongolia in 1999 and 2014. It was established that all studied strains belong to a single clonal branch of *B. abortus* with sequence type 2. The 2023–2024 outbreak *B. abortus* group emerged approximately 58 years ago (95% HPD: 31.2–86.7) and is closely related to strains isolated in Mongolia in 1999 and 2014. The evolution rate of this group was $1.8 \cdot 10^{-7}$ substitutions per site per year (95% HPD: $2.5 \cdot 10^{-8}$ – $1.84 \cdot 10^{-6}$ substitutions per site per year). The unique mutation distinguishing this group of strains from *B. abortus* 82 and Mongolian strains is a defect in the *rbsB* gene caused by a mutation resulting in a stop codon within the reading frame. This gene is involved in energy-dependent transport of extracellular D-ribose into the cell and may potentially reduce the bacterium's ability to reproduce inside host cells. As a result of the molecular-genetic study, the causes and patterns of occurrence of the brucellosis outbreak among cattle in the Republic of Buryatia in 2023–2024 has been established.

Key words: *Brucella abortus*, epizooty, whole genome sequencing, Bayesian phylogenetic analysis.

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

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

Bioethics: Experimental work on animals was carried out in accordance with the Rules of Good Laboratory Practice, approved by the Order of the Ministry of Health of the Russian Federation dated April 01, 2016 No. 199n, and the Federal Law dated December 27, 2018 No. 498-FL "On the responsible treatment of animals and on amendments to certain legislative acts of the Russian Federation".

Corresponding author: Semeon M. Lyashchenko, e-mail: lsh.smn15@gmail.com.

Citation: Lyashchenko S.M., Tolmacheva M.I., Talikina T.O., Bondaryuk A.N., Kulikalova E.S., Balakhonov S.V. Molecular-Genetic Characteristics of *Brucella abortus* Strains from the Dzhida Region of the Republic of Buryatia under Conditions of Epizootic Activation of Brucellosis in 2023–2024. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2026; 2:148–155. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2026-2-148-155

Received 18.09.2025. Revised 13.10.2025. Accepted 03.11.2025.

Lyashchenko S.M., ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-9778-3485>

Tolmacheva M.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5710-5311>

Talikina T.O., ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8555-0683>

Bondaryuk A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4422-0497>

Kulikalova E.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7034-5125>

Balakhonov S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>

Бруцеллез сельскохозяйственных животных (СХЖ) в настоящее время является наиболее распространенным бактериальным зоонозом, поэтому санитарный надзор за распространением возбудителя имеет особое значение.

Обстановка по бруцеллезу среди СХЖ в Российской Федерации определяется эпизоотическим неблагополучием среди крупного (КРС) и мелкого (МРС) рогатого скота [1, 2]. Неблагополучные по бруцеллезу территории сосредоточены в Северо-Кавказском, Южном, Приволжском и Сибирском федеральных округах [3].

Республика Бурятия – субъект РФ, в котором животноводство исторически является значимой отраслью сельского хозяйства, что обуславливает наличие частных предприятий по переработке мяса, молока и субпродуктов. Эпизоотологическая ситуация по бруцеллезу в республике среди СХЖ представлена регулярными спорадическими случаями бруцеллеза у КРС. Последняя вспышка инфекции на территории республики регистрировалась в 2020 г. в Тункинском районе (40 больных голов). Также Бурятия граничит с тремя субъектами РФ (Иркутская область, Республика Тыва и Забайкальский край) и Монголией, неблагополучными по бруцеллезу.

В мае 2023 г. в Джидинском районе (п. Енхор) Республики Бурятия при плановом серологическом обследовании КРС на бруцеллез (реакции агглютинации [РА], связывания комплемента [РСК], иммунодиффузии [РИД]) выявлены положительно реагирующие животные. Известно, что у КРС не наблюдалось симптомов заболевания, однако ранее в стаде отмечались спонтанные аборт и выкидыши. Выявлено 106 голов КРС, больных бруцеллезом, зарегистрировано два неблагополучных пункта – территории сельских поселений Енхорское и Боцинское с четырьмя эпизоотическими очагами, причина возникновения которых – несанкционированный ввоз больного скота в хозяйства без согласования с ветеринарной службой и Россельхознадзором.

В рамках проведенных контрольных мероприятий в 2024 г. в этом же районе (сельское поселение Белоозерское) вновь выявлены положительно реагирующие на бруцеллез СХЖ.

Цель исследования – выявление генетических особенностей и возможного происхождения штаммов *Brucella abortus*, вызвавших эпизоотическую вспышку бруцеллеза в Республике Бурятия в 2023–2024 гг.

Материалы и методы

Патологоанатомический материал (лимфоузел, печень, селезенка, половые органы) от четырех голов КРС в 2023 г. и от трех – в 2024 г. направлен в ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора для углубленного лабораторного исследования.

Бактериология. Семь штаммов возбудителя бруцеллеза изолированы из пулированных образцов внутренних органов КРС (лимфоузел, печень, селезенка, половые органы) методом биологической пробы на морских свинках. Внутренние органы морских свинок посеяны на плотную питательную среду, инкубация посевов проводилась в аэробных и частично анаэробных условиях.

Штаммы охарактеризованы по культурально-морфологическим свойствам, дифференциально-диагностическим тестам в соответствии с МУК 3.1.7.3402-16 «Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза».

Для видовой идентификации использован метод времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) на приборе Bruker MALDI Biotyper.

Полногеномное секвенирование. ПЦР-исследование на присутствие ДНК возбудителя бруцеллеза проводили с использованием тест-систем «АмплиСенс® *Brucella* spp.-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии, Россия) и «ОМ-Скрин-Бруцеллез-РВ» (ООО «Синтол», Россия).

Полногеномное секвенирование штаммов проводили с использованием прибора MinION Mk1B (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания) с набором для секвенирования SQK-LSK109 и точной ячейкой R9.4.1.

Молекулярно-генетический анализ. В качестве референсной последовательности для анализа использовали геномы штаммов *B. abortus* 2308 (AM040264), вакцинного RB51 (NZ_CP046720), вакцинного штамма *B. abortus* 82 из коллекции института.

Контроль качества полученных последовательностей (ридов) проводили с использованием программы NanoPlot v1.44.0 [4] для оценки их длины и точности секвенирования. Средний Q-score ридов после фильтрации составлял 14,2–15,6, а медианная длина – от 7366 до 23 632 нуклеотидов. Последующую сборку геномов *de novo* выполняли в программе Flye (v2.9.1-b1780) [5]. Глубина про-

чтений в среднем составила 131,2х на геном, N50 соответствовал 2 125 268 п.н. Видовую принадлежность сырых прочтений и собранного *de novo* генома идентифицировали при помощи программы Kraken v2.1.3, подсчет средней нуклеотидной идентичности относительно референсных геномов провели в программе fastANI v1.33, оценивали качество сборки генома с использованием программы BUSCO v5.2.2 [6]. Все собранные *de novo* геномы в среднем целостны на 98,6 %.

С целью изучения особенностей штаммов *in silico* геномы аннотировали программой Bakta (v1.7.0) [7] с последующей аннотацией вариантов (freebayes v1.3.6; bcftools v1.13; snpEff [8]). В результатах отражены только те мутации, которые могут предиктивно влиять на функции белка (уровень moderate и выше). Проведен MLST-анализ *in silico* (mlst v2.23.0) с визуализацией и регистрацией результатов в международной базе данных PubMLST [9], что позволило оценить принадлежность исследуемой группы штаммов конкретному сиквентс-типу (ST).

Филогенетический анализ. Следующим этапом нашего исследования стал анализ популяционной структуры *B. abortus* и определение места в ней штаммов, выделенных во время вспышки. Для филогенетического анализа выборка расширена геномами штаммов, преимущественно выделенных на территориях Республики Бурятия, Забайкальского края и Иркутской области, из коллекции патогенных бактерий института, секвенированных в ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора в период 2022–2023 гг. в рамках федерального проекта «Санитарный щит – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)» и размещенных на портале VGARus (n=31), а также нуклеотидными последовательностями штаммов, выделенных на территории РФ и Монголии, депонированных в базе данных NCBI и использованных в работе N.R. Janke et al. [10] (n=21).

Коровое SNP-выравнивание (coreSNP) получено с использованием snippy (v4.6.0). Рекомбинации из coreSNP-выравнивания удалены в программе gubbins v2.4.1 [11]. Финальная длина выравнивания coreSNP составила 9174 нуклеотида. Для оценки надежности филогенетической реконструкции был проведен анализ уровня гомоплазии в выборке в среде R с использованием пакета phangorn [12]. Высокие значения индекса согласованности (CI = 0,98) и индекса удержания (RI = 0,97) свидетельствуют о незначительном уровне гомоплазии, что, в свою очередь, подтверждает надежность построенного филогенетического дерева и достоверность отраженных на нем эволюционных взаимосвязей.

Для оценки времени дивергенции штаммов и скорости эволюции возбудителя проведен байесовский филогенетический анализ с построением дерева с максимальной достоверностью клад (MCC tree) в программе BEAST v2.7.5 [13]. Данный метод по-

зволяет датировать узлы филогенетического дерева и оценить временные рамки эволюционной истории исследуемой группы штаммов. Длина цепи Маркова в методе Монте-Карло (MCMC) для достижения эффективного размера выборки более чем 200 образцов составила 400 млн итераций. Расчет 95% интервалов наивысшей плотности апостериорной вероятности (HPD) отражал статистическую неопределенность полученных оценок.

Модель нуклеотидных замен (КЗР) выбирали при помощи теста ModelFinder, реализованного в IQ-TREE v2.4.0 [14].

Проверку временной структуры (temporal structure) и выбор модели молекулярных часов осуществляли с использованием метода BETS [15], в основе которого лежит расчет значений логарифма маргинального правдоподобия для филогенетических моделей с датированными (гетерохронными, M_{het}) и недатированными (изохронными, M_{iso}) деревьями. Для вычисления маргинального правдоподобия мы применили алгоритм Path Sampling, реализованный в пакете MODEL_SELECTION из репозитория для BEAST2. Всего проанализировано 100 шагов (steps), длина каждого шага составила 4 тыс. итераций с «отжигом» 50 % первых итераций на каждом шаге. Разница между значениями логарифмов маргинального правдоподобия для двух сравниваемых моделей представляет собой логарифм фактора Байеса ($\log BF$) со следующей интерпретацией: $3 > \log BF > 1$ – достоверная поддержка, $5 > \log BF > 3$ – высокая поддержка, $\log BF > 5$ – очень высокая поддержка [16]. Мы сравнили четыре модели часов: строгие часы и датированное дерево (SC_{het}), строгие часы и недатированное дерево (SC_{iso}), расслабленные логнормальные часы и датированное дерево ($UCLD_{het}$), расслабленные логнормальные часы и недатированное дерево ($UCLD_{iso}$).

Сравнение показало очень высокую поддержку для модели $UCLD_{het}$ в сравнении с моделью $UCLD_{iso}$ ($\log BF > 5,7$). Логарифм фактора Байеса в пользу $UCLD_{het}$ при сравнении с моделями строгих часов SC_{het} и SC_{iso} превышал 100 (табл. 1).

Таблица 1 / Table 1

Результаты теста BETS

BETS test result

Модель часов Clock's model	Логарифм маргинального правдоподобия Margin likelihood logarithm	Логарифм фактора Байеса Bayes factor logarithm
SC_{het}	–38472,4	133,6
SC_{iso}	–38481,4	142,6
$UCLD_{het}^*$	–38338,8	0
$UCLD_{iso}$	–38344,5	5,7

Примечание: * наилучшая модель с самым высоким значением маргинального правдоподобия.

Note: * best model with the highest marginal likelihood value.

Таким образом, результаты байесовской оценки временного сигнала с высокой достоверностью говорят о наличии в геномных данных временной структуры, а также о предпочтительности расслабленных часов при реконструкции датированных филогенетических деревьев.

Результаты и обсуждение

Геномная характеристика. Геномы изученных штаммов бруцелл представлены двумя кольцевыми хромосомами со средним размером 2 125 020 п.н. и 1 156 028 п.н. соответственно (табл. 2). GC-состав (57,2 %) и плотность кодирующих последовательностей на геном (87,1 %) типичны для представителей вида. У изолятов идентифицированы все факторы вирулентности, свойственные патогенным представителям рода *Brucella*. Клональное родство штаммов, вызвавших вспышку 2023–2024 гг., подтверждается идентичным количеством и составом семейств инсерционных последовательностей (IS) в их геномах.

Оценка степени нуклеотидной идентичности показала высокое сходство исследуемых штаммов с геномом штамма *B. abortus* 82 (99,97 %; ДИ 95%: 99,965–99,975), чаще используемого в России и странах СНГ для вакцинации КРС от бруцеллеза. Сходство со штаммами *B. abortus* 2308 и *B. abortus* RB51 составило в среднем 99,92 % соответственно (ДИ 95%: 99,906–99,924).

Анализ генетической вариабельности. У исследуемых штаммов при сравнении с вакцинным *B. abortus* 82 обнаружена утрата функции транспозазы семейства IS66 вследствие инсерционной мутации со сдвигом рамки считывания (позиция 679822; с.120dupC; р.Phe41fs). В результате миссенс-мутации умеренные изменения структуры нуклеотидной по-

следовательности обнаружены на большой хромосоме в локусах генов *bigA* (позиция 1945247; с.235G>T; р.Ala79Ser) и *btpB* (позиция 739471; с.331G>A; р.Gly111Ser), однако оценить значимость этих изменений еще предстоит в будущем.

Проведенный SNP-анализ показал, что отличия корового (core) генома исследуемых штаммов составляют в среднем 931 SNP (ДИ 95%: 903,3–960,4) при сравнении с референсами *B. abortus* 2308 и *B. abortus* RB51 и 181 SNP (ДИ 95%: 153,6–209,5) при сравнении с референсом *B. abortus* 82. Внутри группы вспышки отличия между штаммами 2023 и 2024 гг. составили в среднем 55 SNP (ДИ 95%: 35,4–74,7).

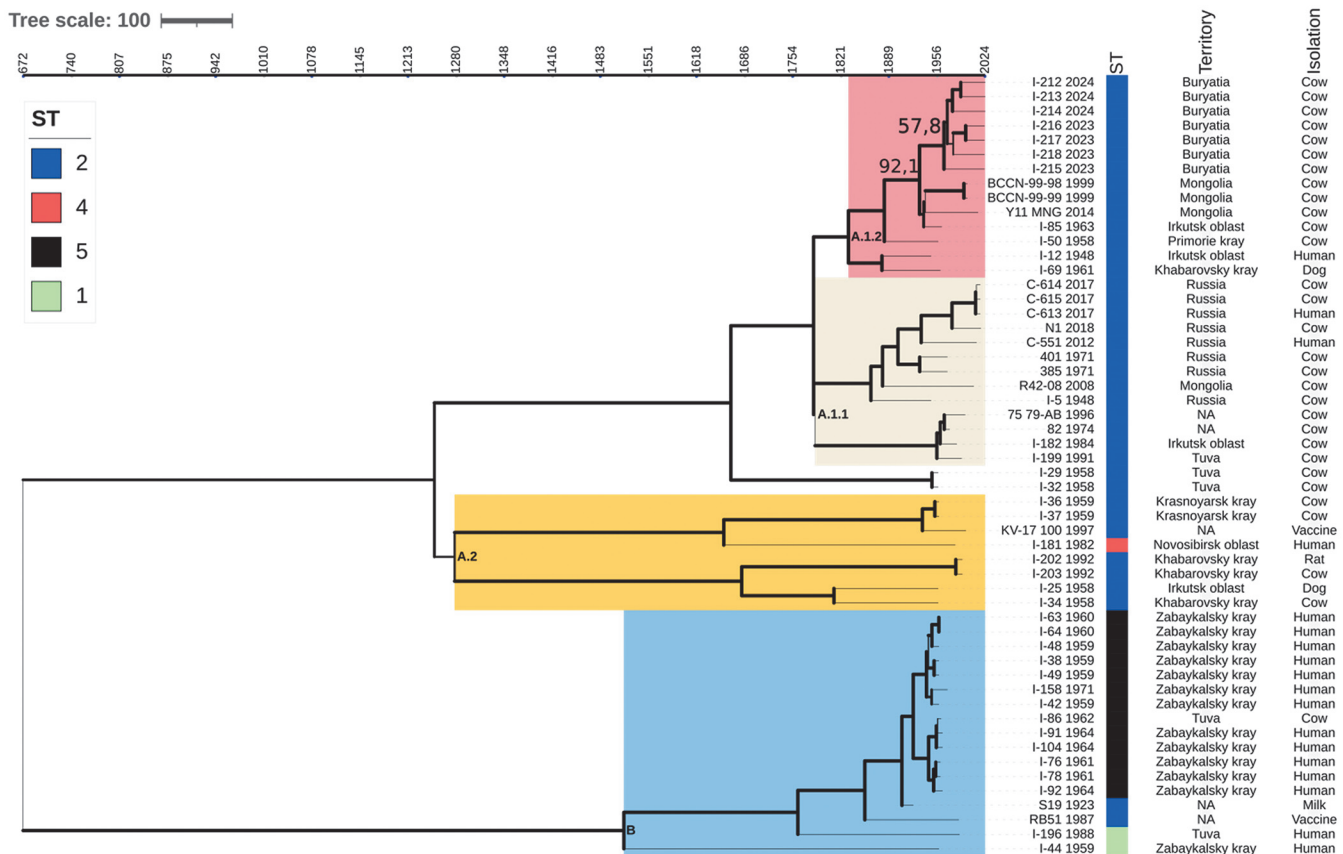
Молекулярно-генетическая классификация и филогенетический анализ. Сиквенс-тип 2 (ST2), идентифицированный *in silico* по схеме MLST-9 для бруцелл [17], по данным PubMLST, часто встречается в Азии и соответствует региональному паттерну, что подтверждается исследованиями [18–20]. Вакцинный штамм *B. abortus* 82 типирован как ST2, штаммы *B. abortus* 2308 и *B. abortus* RB51 отнесены к ST5.

С помощью байесовского филогенетического анализа установлено, что возраст ближайшего общего предка для исследуемой выборки бактерий составил в среднем 1352,4 года (95% HPD: 556,7–2411,9) (рисунок). Средняя скорость нуклеотидных замен в геноме составила $1,8 \cdot 10^{-7}$ замен на сайт в год (95% HPD: $9,3 \cdot 10^{-8}$ – $2,8 \cdot 10^{-7}$ замен на сайт в год), что в целом выше средней скорости замен, представленной в работе N.R. Janke et al. ($6,49 \cdot 10^{-8}$ замен на сайт в год) [10], однако значительно ближе по скорости к группе L3 ($1,97 \cdot 10^{-7}$ замен на сайт в год (95% HPD: 0,07 – $3,87 \cdot 10^{-7}$ замен на сайт в год), указанной в статье P.L. Kamath et al. [21]. Наблюдаемый поря-

Таблица 2 / Table 2

Сравнительная характеристика геномов штаммов *B. abortus* 2023–2024 гг.
Comparative characterization of the genomes of *B. abortus* strains isolated in 2023–2024

Название штамма Strain		И-212	И-213	И-214	И-215	И-216	И-217	И-218	RB51	2308	82
Количество CDS Number of CDS		3119	3122	3135	3144	3166	3150	3153	3125	3118	3098
Псевдогены Pseudogenes		17	18	29	46	48	45	43	10	11	15
Факторы вирулентности Virulence factors		78							77	78	77
тРНК / tRNA		55									52
рРНК / rRNA		9									3
IS (% генома) IS (% in genome)		19 (0,68)	18 (0,65)	21 (0,7)	19 (0,68)	19 (0,68)	19 (0,68)	18 (0,65)	23 (0,75)	22 (0,72)	17 (0,53)
Семейства IS IS-families	IS3	6	5	6	6	6	6	5	5	5	4
	IS5	7	7	9	7	7	7	7	12	11	9
	IS6	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
	IS66	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	IS481	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2



Dated phylogenetic tree of *B. abortus*. Branch thickness reflects the degree of a posteriori support for the clades. Color differentiation of the clades is indicated within the tree. At the top of the figure is the dating time scale (in years) from the population's most recent common ancestor. The group of strains under study is located at the top of the tree. The date of divergence of the ancestral strains is indicated by numbers at the nodes

честве вакцины для защиты КРС в СССР в период с 1954 по 1970 г. [23].

На филогенетическом дереве выделяются две основные клады с высокой апостериорной вероятностью. Клада А в основном представлена последовательностями штаммов бруцелл, в рамках исследования типированных как ST2, а клада В – последовательностями, преимущественно отнесенными к ST5. В состав клады А входит один штамм ST4 – *B. abortus* I-181, тогда как в кладе В присутствуют два штамма ST1 – *B. abortus* I-196 и *B. abortus* I-44.

Все штаммы клады В выделены из крови пациентов с бруцеллезом в Республике Тыва и Забайкальском крае. Исключением является штамм *B. abortus* I-86, выделенный в Республике Тыва из органов КРС (сарлык). В эту же кладу входят вакцинные штаммы *B. abortus* S19 и *B. abortus* RB51. Стоит отметить, что штамм *B. abortus* S19 является генетически наиболее близким к основной группе штаммов клады В и активно использовался в ка-

95% HPD: 63,1–346,4 года) и эволюционной скоростью для узла выше средней – $3,0 \cdot 10^{-7}$ замен на сайт в год (95% HPD: $3,8 \cdot 10^{-8}$ – $2,6 \cdot 10^{-6}$ замен на сайт в год). Медианное время датировки узла, объединяющего исследуемые штаммы, составило 57,8 года (1966–1967 гг.; 95% HPD: 31,2–86,7 года). При этом для группы штаммов 2023–2024 гг. выявлена более низкая скорость – до $1,78 \cdot 10^{-7}$ замен на сайт в год (95% HPD: $2,5 \cdot 10^{-8}$ – $1,84 \cdot 10^{-6}$ замен на сайт в год) в сравнении с общей группой штаммов из Бурятии и Монголии 1999 и 2014 гг. Наблюдаемая разница в скорости эволюции между субкладами A.1, по всей видимости, отражает разные условия их циркуляции. Одним из возможных объяснений более высокой скорости в общей группе (Бурятия и Монголия, 1999–2014 гг.) может служить активное распространение предковых линий в восприимчивой популяции животных, что сокращало среднее время между заражениями и могло ускорять накопление мутаций. В свою очередь, снижение скорости эволюции у штаммов вспышки в Бурятии 2023–2024 гг. согласуется с гипотезой об их более ограниченной циркуляции – в рамках уже инфицированной, частично иммунной популяции животных, где передача происходит медленнее.

Сравнительный анализ штаммов *B. abortus* выявил консервативный паттерн несинонимичной замены у исследуемых изолятов вспышки 2023–2024 гг. У всех семи изолятов данной группы обнаружена синхронная инактивирующая мутация в локусе транспорта рибозы на малой хромосоме *rbsB-3* – нонсенс-мутация с образованием стоп-кодона (с.271C>T, p.Gln91*). Ортологи этого гена кодируют субстрат-специфический белок, отвечающий за связывание и последующую транспортировку внеклеточной D-рибозы внутрь клетки [24]. Данная мутация обладает 100%-й пенетрантностью в исследуемой группе при полном отсутствии в остальных штаммах выборки, включая штаммы той же клады A.1.2. Важно отметить, что функциональная копия оперона сохраняется в консервативном локусе на большой хромосоме (*rbsB-1*), что указывает на псевдогенизацию именно избыточной, а не единственной копии.

Анализ давления отбора подтвердил дивергентные эволюционные траектории двух копий гена: функциональный *rbsB-1* находится под действием сильного отбора ($dN/dS = 0,289$), тогда как дублированная копия *rbsB-3* эволюционирует нейтрально ($dN/dS = 0,83$), что характерно для псевдогенов. Уровень синонимичных замен в *rbsB-3* ($dS = 0,5631$) на два порядка превышает таковой для *rbsB-1* ($dS = 0,0047$), что свидетельствует о длительном периоде нейтральной эволюции до фиксации стоп-кодона.

Депонирование. Нуклеотидные последовательности исследуемых штаммов размещены на портале VGARus (VGARus id: *irkn014332*, *irkn014333*, *irkn014334*, *irkn010963*, *irkn010964*, *irkn010968*). MLST-профили штаммов размещены на портале

PubMLST (id: 3427, 3428, 3429, 3430, 3431, 3432, 3433).

В рамках данной работы проведен комплексный анализ штаммов *B. abortus*, выделенных на территории Республики Бурятия в период вспышек 2023–2024 гг. Молекулярно-генетическое исследование с применением методов филогенетического анализа позволило установить сходство выделенных во время эпизоотии штаммов с изолятами, циркулировавшими в Монголии в 1999 и 2014 гг., и допустить возможность заноса возбудителя на приграничную территорию Республики Бурятия.

Штаммы, связанные со вспышками 2023–2024 гг., демонстрируют высокую степень нуклеотидной идентичности (99,97 %) с вакцинным штаммом *B. abortus* 82 и отнесены к сиквенс-типу 2 (ST2), наиболее распространенному в Азии. Байесовский филогенетический анализ с датировкой установил, что общий предок бурятских и монгольских изолятов возник примерно 92,1 года назад (95% HPD: 63,1–346,4 года), а непосредственная группа штаммов вспышки сформировалась около 57,8 года назад (1966–1967 гг.; 95% HPD: 31,2–86,7 года). Полученные временные оценки и минимальное количество SNP-различий (14) между изолятами указывают на вероятное проникновение возбудителя из Монголии и его последующую локальную эволюцию.

Кластер субклады A.1.2, объединяющий штаммы из Монголии и Бурятии, характеризуется повышенной скоростью эволюции ($3,0 \cdot 10^{-7}$ замен на сайт в год), которая снижается до средней для популяции ($1,78 \cdot 10^{-7}$ замен на сайт в год) в группе свежее выделенных штаммов, что, по всей видимости, обусловлено разной динамикой эпизоотических процессов и процессом адаптации в новой популяции.

Уникальная инактивирующая мутация в гене *rbsB-3* у штаммов вспышки представляет собой классический случай редутивной эволюции. Появление стоп-кодона в копии гена при сохранении функционального *rbsB-1* является выраженным признаком адаптации через элиминацию генетического балласта. Для *B. abortus* потеря избыточного транспортера, недоступного в нише субстрата, является эволюционно выгодной, так как позволяет устранить метаболические затраты на его экспрессию.

Для верификации адаптивной роли выявленных мутаций, включая изменения в генах факторов вирулентности (*bigA* и *btpB*), требуется дальнейшее функциональное изучение *in vitro*. Необходимо продолжить мониторинг ситуации и отслеживать распространение маркерной мутации в гене *rbsB-3* в популяции возбудителя бруцеллеза КРС на территории Дальнего Востока и Сибири.

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

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

Биоэтика. Экспериментальная работа на животных выполнена в соответствии с Правилами надлежащей лабораторной практики, утвержденными приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 № 199н, и Федеральным законом от 27.12.2018 № 498-ФЗ «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации».

Список литературы

1. Онищенко Г.Г., Куличенко А.Н., редакторы. Бруцеллез. Современное состояние проблемы. Изд. 2-е, доп. Н. Новгород: Союзполиграф: Кириллица; 2021. 356 с.
2. Захарова О.И., Бурова О.А., Яшин И.В., Блохин А.А. Эпизоотическая ситуация по бруцеллезу животных в Российской Федерации (обзор). *Аграрная наука Евро-Северо-Востока*. 2023; 24(1):20–9. DOI: 10.30766/2072-9081.2023.24.1.20-29.
3. Пономаренко Д.Г., Матвиенко А.Д., Хачатурова А.А., Жаринова И.В., Скударева О.Н., Транквилевский Д.В., Логвиненко О.В., Ракитина Е.Л., Костюченко М.В., Кондратьева Ю.В., Малецкая О.В., Куличенко А.Н. Анализ ситуации по бруцеллезу в мире и Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024; (2):36–50. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-36-50.
4. De Coster W., Rademakers R. NanoPack2: population-scale evaluation of long-read sequencing data. *Bioinformatics*. 2023; 39(5):btad311. DOI: 10.1093/bioinformatics/btad311.
5. Kolmogorov M., Yuan J., Lin Y., Pevzner P.A. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat. Biotechnol.* 2019; 37(5):540–6. DOI: 10.1038/s41587-019-0072-8.
6. Manni M., Berkeley M.R., Seppely M., Simão F.A., Zdobnov E.M. BUSCO update: Novel and streamlined workflows along with broader and deeper phylogenetic coverage for scoring of eukaryotic, prokaryotic, and viral genomes. *Mol. Biol. Evol.* 2021; 38(10):4647–54. DOI: 10.1093/molbev/msab199.
7. Schwengers O., Jelonek L., Dieckmann M.A., Beyvers S., Blom J., Goesmann A. Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microb. Genom.* 2021; 7(11):000685. DOI: 10.1099/mgen.0.000685.
8. Cingolani P., Platts A., Wang L.L., Coon M., Nguyen T., Wang L., Land S.J., Lu X., Ruden D.M. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. 2012; 6(2):80–92. DOI: 10.4161/fly.19695.
9. Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.* 2018; 3:124. DOI: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1.
10. Janke N.R., Williamson C.H.D., Drees K.P., Suárez-Esquivel M., Allen A.R., Ladner J.T., Quance C.R., Robbe-Austerman S., O'Callaghan D., Whatmore A.M., Foster J.T. Global phylogenomic diversity of *Brucella abortus*: spread of a dominant lineage. *Front. Microbiol.* 2023; 14:1287046. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1287046.
11. Croucher N.J., Page A.J., Connor T.R., Delaney A.J., Keane J.A., Bentley S.D., Parkhill J., Harris S.R. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(3):e15. DOI: 10.1093/nar/gku1196.
12. Schliep K.P. Phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*. 2011; 27(4):592–3. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq706.
13. 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., Popinga 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.
14. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 2015; 32(1):268–74. DOI: 10.1093/molbev/msu300.
15. Duchene S., Lemey P., Stadler T., Ho S.Y.W., Duchene D.A., Dhanasekaran V., Baele G. Bayesian evaluation of temporal signal in measurably evolving populations. *Mol. Biol. Evol.* 2020; 37(11):3363–79. DOI: 10.1093/molbev/msaa163.
16. Kass R.E., Raftery A.E. Bayes factors. *J. Am. Stat. Assoc.* 1995; 90(430):773–95. DOI: 10.1080/01621459.1995.10476572.
17. 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.
18. Yang C., Gao J., Xian R., Liu X., Kuai W., Yin C., Fan H., Tian J., Ma X., Ma J. Molecular epidemiology of *Brucella abortus* isolated from the environment in Ningxia Hui autonomous region, China. *Infect. Genet. Evol.* 2024; 123:105635. DOI: 10.1016/j.meegid.2024.105635.
19. Tan Q., Wang Y., Liu Y., Tao Z., Yu C., Huang Y., Yang X., Ying X., Hu Y., Li S. Molecular epidemiological characteristics of *Brucella* in Guizhou Province, China, from 2009 to 2021. *Front. Microbiol.* 2023; 14:1188469. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1188469.
20. Xue H., Li J., Ma L., Yang X., Ren L., Zhao Z., Wang J., Zhao Y., Zhao Z., Zhang X., Liu Z., Li Z. Seroprevalence and molecular characterization of *Brucella abortus* from the himalayan marmot in Qinghai, China. *Infect. Drug Resist.* 2023; 16:7721–34. DOI: 10.2147/IDR.S436950.
21. Kamath P.L., Foster J.T., Drees K.P., Luikart G., Quance C., Anderson N.J., Clarke P.R., Cole E.K., Drew M.L., Edwards W.H., Rhyan J.C., Treanor J.J., Wallen R.L., White P.J., Robbe-Austerman S., Cross P.C. Genomics reveals historic and contemporary transmission dynamics of a bacterial disease among wildlife and livestock. *Nat. Commun.* 2016; 7:11448. DOI: 10.1038/ncomms11448.
22. Duchêne S., Holt K.E., Weill F.X., Le Hello S., Hawkey J., Edwards D.J., Fourment M., Holmes E.C. Genome-scale rates of evolutionary change in bacteria. *Microb. Genom.* 2016; 2(11):e000094. DOI: 10.1099/mgen.0.000094.
23. Salmakova K.M., Fomin A.M., Plotnikova E.M., Safina G.M., Galimova G.M., Salmakova A.V., Ivanov A.V., Panin A.N., Sklyarov O.D., Shumilov K.V., Klimanov A.I. Comparative study of the immunobiological properties of live brucellosis vaccines. *Vaccine*. 2010; 28 Suppl 5:F35-40. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.03.050.
24. Reimer A., Maffei-beier V., Dubey M., Sentschilo V., Tavares D., Gil M.H., Beggah S., van der Meer J.R. Complete alanine scanning of the *Escherichia coli* RbsB ribose binding protein reveals residues important for chemoreceptor signaling and periplasmic abundance. *Sci. Rep.* 2017; 7(1):8245. DOI: 10.1038/s41598-017-08035-5.

References

1. Onishchenko G.G., Kulichenko A.N., editors. [Brucellosis. Current State of the Issue]. 2nd ed., suppl. Nizhny Novgorod: "Soyuzpoligraf"; 2021. 356 p.
2. Zakharova O.I., Burova O.A., Yashin I.V., Blokhin A.A. [Epizootic situation on animal brucellosis in the Russian Federation (review)]. *Agrarnaya Nauka Euro-Severo-Vostoka [Agrarian Science of the Euro-North-East]*. 2023; 24(1):20–9. DOI: 10.30766/2072-9081.2023.24.1.20-29.
3. Ponomarenko D.G., Matvienko A.D., Khachaturova A.A., Zharinova I.V., Skudareva O.N., Trankvillevsky D.V., Logvinenko O.V., Rakitina E.L., Kostyuchenko M.V., Kondrat'eva Yu.V., Maletskaya O.V., Kulichenko A.N. [Analysis of the situation on brucellosis around the world and in the Russian Federation]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; (2):36–50. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-36-50.
4. De Coster W., Rademakers R. NanoPack2: population-scale evaluation of long-read sequencing data. *Bioinformatics*. 2023; 39(5):btad311. DOI: 10.1093/bioinformatics/btad311.
5. Kolmogorov M., Yuan J., Lin Y., Pevzner P.A. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat. Biotechnol.* 2019; 37(5):540–6. DOI: 10.1038/s41587-019-0072-8.
6. Manni M., Berkeley M.R., Seppely M., Simão F.A., Zdobnov E.M. BUSCO update: Novel and streamlined workflows along with broader and deeper phylogenetic coverage for scoring of eukaryotic, prokaryotic, and viral genomes. *Mol. Biol. Evol.* 2021; 38(10):4647–54. DOI: 10.1093/molbev/msab199.
7. Schwengers O., Jelonek L., Dieckmann M.A., Beyvers S., Blom J., Goesmann A. Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microb. Genom.* 2021; 7(11):000685. DOI: 10.1099/mgen.0.000685.
8. Cingolani P., Platts A., Wang L.L., Coon M., Nguyen T., Wang L., Land S.J., Lu X., Ruden D.M. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. 2012; 6(2):80–92. DOI: 10.4161/fly.19695.
9. Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.* 2018; 3:124. DOI: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1.
10. Janke N.R., Williamson C.H.D., Drees K.P., Suárez-Esquivel M., Allen A.R., Ladner J.T., Quance C.R., Robbe-Austerman S., O'Callaghan D., Whatmore A.M., Foster J.T. Global phylogenomic diversity of *Brucella abortus*: spread of a dominant lineage. *Front. Microbiol.* 2023; 14:1287046. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1287046.
11. Croucher N.J., Page A.J., Connor T.R., Delaney A.J., Keane J.A., Bentley S.D., Parkhill J., Harris S.R. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(3):e15. DOI: 10.1093/nar/gku1196.

12. Schliep K.P. Phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*. 2011; 27(4):592–3. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq706.
13. 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., Popinga 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.
14. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 2015; 32(1):268–74. DOI: 10.1093/molbev/msu300.
15. Duchene S., Lemey P., Stadler T., Ho S.Y.W., Duchene D.A., Dhanasekaran V., Baele G. Bayesian evaluation of temporal signal in measurably evolving populations. *Mol. Biol. Evol.* 2020; 37(11):3363–79. DOI: 10.1093/molbev/msaa163.
16. Kass R.E., Raftery A.E. Bayes factors. *J. Am. Stat. Assoc.* 1995; 90(430):773–95. DOI: 10.1080/01621459.1995.10476572.
17. 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.
18. Yang C., Gao J., Xian R., Liu X., Kuai W., Yin C., Fan H., Tian J., Ma X., Ma J. Molecular epidemiology of *Brucella abortus* isolated from the environment in Ningxia Hui autonomous region, China. *Infect. Genet. Evol.* 2024; 123:105635. DOI: 10.1016/j.meegid.2024.105635.
19. Tan Q., Wang Y., Liu Y., Tao Z., Yu C., Huang Y., Yang X., Ying X., Hu Y., Li S. Molecular epidemiological characteristics of *Brucella* in Guizhou Province, China, from 2009 to 2021. *Front. Microbiol.* 2023; 14:1188469. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1188469.
20. Xue H., Li J., Ma L., Yang X., Ren L., Zhao Z., Wang J., Zhao Y., Zhao Z., Zhang X., Liu Z., Li Z. Seroprevalence and molecular characterization of *Brucella abortus* from the himalayan marmot in Qinghai, China. *Infect. Drug Resist.* 2023; 16:7721–34. DOI: 10.2147/IDR.S436950.
21. Kamath P.L., Foster J.T., Drees K.P., Luikart G., Quance C., Anderson N.J., Clarke P.R., Cole E.K., Drew M.L., Edwards W.H., Rhyan J.C., Treanor J.J., Wallen R.L., White P.J., Robbe-Austerman S., Cross P.C. Genomics reveals historic and contemporary transmission dynamics of a bacterial disease among wildlife and livestock. *Nat. Commun.* 2016; 7:11448. DOI: 10.1038/ncomms11448.
22. Duchêne S., Holt K.E., Weill F.X., Le Hello S., Hawkey J., Edwards D.J., Fourment M., Holmes E.C. Genome-scale rates of evolutionary change in bacteria. *Microb. Genom.* 2016; 2(11):e000094. DOI: 10.1099/mgen.0.000094.
23. Salmakov K.M., Fomin A.M., Plotnikova E.M., Safina G.M., Galimova G.M., Salmakova A.V., Ivanov A.V., Panin A.N., Sklyarov O.D., Shumilov K.V., Klimanov A.I. Comparative study of the immunobiological properties of live brucellosis vaccines. *Vaccine*. 2010; 28 Suppl 5:F35–40. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.03.050.
24. Reimer A., Maffei V., Dubey M., Senthil V., Tavares D., Gil M.H., Beggah S., van der Meer J.R. Complete alanine scanning of the *Escherichia coli* RbsB ribose binding protein reveals residues important for chemoreceptor signaling and periplasmic abundance. *Sci. Rep.* 2017; 7(1):8245. DOI: 10.1038/s41598-017-08035-5.

Authors:

Lyashchenko S.M., Tolmacheva M.I., Talikina T.O., Bondaryuk A.N., Kulikalova E.S., Balakhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and the Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Об авторах:

Лященко С.М., Толмачёва М.И., Таликина Т.О., Бондарюк А.Н., Куликалова Е.С., Балахонов С.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.