

Филогеномный анализ штаммов *Brucella abortus*, выделенных на территории Российской Федерации

Д.А.Ковалев, Н.А.Шапаков, С.В.Писаренко, О.В.Бобрышева, Д.Г.Пономаренко,
А.А.Хачатурова, А.Н.Куличенко

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

Цель работы – исследование филогенетического положения штаммов *Brucella abortus*, выделенных на территории Российской Федерации, в структуре глобальной популяции вида.

Материалы и методы. Выполнено wgSNP-типирование 297 штаммов *B. abortus* основных генетических линий бруцелл из разных регионов мира, включая 68 штаммов, выделенных в 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. На основе данных полногеномного секвенирования определено, что штаммы *B. abortus*, выделенные на территории Российской Федерации, принадлежат к двум генетическим линиям глобальной популяции вида: С, широко распространенной в странах Европы и Восточной Азии (субгенотипы С1, С2 и С4), и D, к которой относятся большинство известных вакцинных штаммов *B. abortus* (субгенотип D4). В работе описаны наборы специфичных для каждого субгенотипа *B. abortus* SNP, которые могут служить основой для совершенствования методов внутривидовой дифференциации штаммов.

Ключевые слова: *Brucella abortus*, полногеномное секвенирование, wgSNP-типирование, филогения

Для цитирования: Ковалев Д.А., Шапаков Н.А., Писаренко С.В., Бобрышева О.В., Пономаренко Д.Г., Хачатурова А.А., Куличенко А.Н. Филогеномный анализ штаммов *Brucella abortus*, выделенных на территории Российской Федерации. Бактериология. 2024; 9(4): 107–114. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-107-114

Phylogenomic analysis of *Brucella abortus* strains isolated on the territory of the Russian Federation

D.A.Kovalev, N.A.Shapakov, S.V.Pisarenko, O.V.Bobrysheva, D.G.Ponomarenko,
A.A.Khachaturova, A.N.Kulichenko

Stavropol Scientific Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation

Objective. Is to study the phylogenetic position of *Brucella abortus* strains isolated on the territory of the Russian Federation in the structure of the global population of the species.

Materials and methods. wgSNP typing of 297 *B. abortus* strains of the main brucella genetic lines from different regions of the world, including 68 strains isolated in the Russian Federation, was performed. DNA sequencing was performed on the “Ion GeneStudio S5 Plus” platform (Life Technologies, USA) using the “Ion Plus Fragment Library Kit for rapid preparation of DNA libraries” (Life Technologies, USA), using the “Ion 520™ & Ion 530™ Kit – Chef” protocol (Revision D.0).

Results. Based on genome-wide sequencing data, it was determined that *B. abortus* strains isolated on the territory of the Russian Federation belong to two genetic lines of the global population of the species: C, widespread in Europe and East Asia (subgenotypes C1, C2 and C4), and D, which includes most of the known vaccine strains of *B. abortus* (subgenotype D4). The work describes sets of SNPs specific for each subgenotype of *B. abortus*, which can serve as the basis for improving methods for intraspecific strain differentiation.

Key words: *Brucella abortus*, genome-wide sequencing, wgSNP typing, phylogeny

For citation: Kovalev D.A., Shapakov N.A., Pisarenko S.V., Bobrysheva O.V., Ponomarenko D.G., Khachaturova A.A., Kulichenko A.N. Phylogenomic analysis of *Brucella abortus* strains isolated on the territory of the Russian Federation. Bacteriology. 2024; 9(4): 107–114. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-107-114

Для корреспонденции:

Ковалев Дмитрий Анатольевич, кандидат химических наук, заведующий лабораторией биохимии ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 355035, Ставропольский край, Ставрополь, ул. Советская, 13-15

The article was received 12.01.2024, accepted for publication 25.12.2024

For correspondence:

Dmitry A. Kovalev, PhD in Chemical Sciences, head of Laboratory of Biochemistry, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russian Federation

The article was received 22.03.2024, accepted for publication 25.12.2024

В мире ежегодно регистрируется >500 тыс. случаев впервые выявленной бруцеллезной инфекции среди людей. До 70–80% заболеваемости бруцеллезом приходится на долю регионов развитого скотоводства Ближнего Востока, Средиземноморья, Африки, Юго-Восточной Азии, Южной и Центральной Америки. Особенно напряженная ситуация по бруцеллезу отмечается на территориях Восточного Средиземноморья, Северной Африки, Центральной и Восточной Азии [1, 2].

Эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в России на протяжении последних лет не имеет стойкой тенденции к улучшению. В последние два года отмечается увеличение среднегодового количества случаев бруцеллеза до 450–600. На долю Северо-Кавказского, Южного и Сибирского федеральных округов приходится >90% всей заболеваемости людей бруцеллезом в стране [3].

К наиболее значимым в эпидемиологическом отношении видам возбудителей бруцеллеза относится *Brucella abortus*, представители которого способны вызывать болезнь у различных млекопитающих, главным образом крупного рогатого скота (*Bos taurus*), яков (*Bos grunniens*), гайалов (*Bos frontalis*), бизонов (*Bison* spp.), водяных буйволов (*Bubalus bubalis*), африканских буйволов (*Syncerus caffer*), лосей (*Cervus canadensis*) и верблюдов (*Camelus*), с единичными случаями у лошадей (*Equus*). При этом бруцеллы не обладают строгой специфичностью к основному хозяину и способны поражать эволюционно далеко стоящие виды животных. Как правило, инфекция передается человеку при прямом или косвенном контакте с больными бруцеллезом животными, употреблении в пищу сырых молочных и мясных продуктов, контаминированных бруцеллами [4].

С целью исследования структуры популяции, филогенетических отношений штаммов, выявления источника и путей распространения инфекции широко используются методы мультилокусного сиквенс-типирования (MLST) и мультилокусного анализа числа переменных tandemных повторов (MLVA) [5–9].

В 2016 г. на основе данных MLST A.M.Whatmore et al. предложили классификацию *B. abortus*, согласно которой представители вида подразделяются на 4 основные клады, соответствующие генетическим линиям А, В, С1 и С2 [10]. Штаммы *B. abortus*, выделенные в Кении и Мозамбике в 1963 и 1988 гг., были отнесены к генетической линии А, в то время как другие африканские штаммы – к линии В. Штаммы из стран Ближнего Востока и Азии формировали широко распространенную в Евразии линию С1. Генетическая линия С2 включала основную часть изолятов из Северной и Южной Америки.

В 2023 г. в ходе масштабного анализа одиночных нуклеотидных полиморфизмов в масштабе полного генома (wgSNP) 1074 штаммов *B. abortus* известная классификация вида была дополнена отдельной мономорфной кладой D, соответствующей описанной ранее генетической линии С2 [11].

Метод MLVA менее эффективен для изучения эволюционных отношений и точного определения происхождения изолятов, поскольку соответствующие локусы характеризуются относительно высокой частотой мутаций и проявления гомоплазии [12]. Тем не менее глобальный анализ структуры популяции *B. abortus*, основанный на MLVA, в целом подтверж-

дает выводы, сделанные ранее A.M.Whatmore с использованием MLST [13].

В настоящей работе в качестве инструмента филогенетической реконструкции был выбран метод wgSNP, который является одним из самых эффективных и точных среди современных инструментов исследования эволюционной истории и разнообразия патогенов [11].

Ранее с помощью wgSNP-типирования нами было установлено, что штаммы *B. abortus*, циркулирующие на территории России, относятся к широко распространенной в Евразии линии С1 и имеют общее происхождение от предка из Центральной Азии [14]. Единичные штаммы из регионов Сибири принадлежат к подгенотипам С1а и С1b. Представители подгенотипа С1d – преимущественно штаммы, выделенные на Северном Кавказе и в европейской части страны. Однако накопление новых данных о структуре глобальной популяции возбудителя бруцеллеза и модернизация номенклатуры основных генетических линий вида обуславливают необходимость уточнения филогенетического положения штаммов *B. abortus*, выделенных на территории Российской Федерации.

Целью данной работы было исследование филогенетического положения штаммов *B. abortus*, выделенных на территории Российской Федерации, в структуре глобальной популяции вида.

Материалы и методы

В работе использовали 68 штаммов *B. abortus* из коллекции ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора (дополнительный файл).

Исследуемые штаммы можно условно разделить по месту выделения на три группы. Первая группа включает 56 штаммов, выделенных на Кавказе и Закавказье в период с 1959 по 2021 г.: Ставропольский край (41 штамм), Карачаево-Черкесская республика (8), Республика Чечня (2), Республика Калмыкия (2), Азербайджанская Республика (2) и Республика Северная Осетия и Алания (1). Все штаммы этой группы выделены от животных, за исключением двух (С-484 и С-653), изолированных от больных людей.

Вторая группа – 4 штамма из Центральной России, выделенные в период с 2017 по 2018 г.: Липецкая область (3) и Самарская область (1). Объектами выделения являлись крупный рогатый скот и молоко коровы.

Третья группа из 9 изолятов относится к территории Сибирского и Дальневосточного федеральных округов, период выделения штаммов – 1945–1985 гг.: Иркутская область (5), Новосибирская область (1), Республика Тыва (1), Республика Бурятия (1) и Хабаровский край (1).

Все исследуемые штаммы *B. abortus* были охарактеризованы в соответствии с традиционной схемой фенотипирования [15]. Культуры имели типичные тинкториальные, морфологические и культуральные свойства. Штаммы принадлежат к семейству *Brucellaceae*, роду *Brucella*, виду *B. abortus*. Определение видовой принадлежности и биовара бруцелл проводили с использованием традиционной схемы: изучение роста штаммов в атмосфере с избыточным содержанием углекислоты и на средах, содержащих фуксин и тионин, оценка способности образования сероводорода и дезамино-

вой активности, агглютинабельности моноспецифическими (А-, М-, R-) сыворотками, чувствительности к бруцеллезным бактериофагам Tb, Wb, Fi, Bk2.

В анализируемой выборке были выявлены представители первого (26 штаммов – 38,2%), третьего (32 штамма – 47,1%), пятого (1 штамм – 1,5%) и шестого (1 штамм – 1,5%) биоваров. У 8 штаммов с использованием классической схемы дифференциации [16] достоверно определить биовар не удалось.

Бактерии культивировали на среде Альбими в течение 48 ч при температуре 37°C, согласно МУК 3.1.7.3402-16 [16]. Обеззараживание проводили в соответствии с СанПиН 3.3686-21 [17] и МУ 1.3.2569-09 [18].

Геномную ДНК выделяли из 0,5 мл обеззараженной микробной взвеси с использованием набора PureLink Genomic DNA Kits (Life Technologies, США).

Контроль качества образцов геномной ДНК осуществляли методами спектрофотометрии, флуориметрии и электрофореза в агарозном геле. Оценку чистоты образцов проводили с помощью спектрофотометра Nanodrop 2000C (Thermo Fisher Scientific, США), оценивая отношения значений OD260/OD280 и OD260/OD230. Для определения концентрации геномной ДНК использовали флуориметр Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США) и набор реагентов Qubit dsDNA HS. Оценку длины фрагментов геномной ДНК проводили путем электрофореза 5 мкл образца в 1%-м агарозном геле. Образец геномной ДНК считали пригодным для дальнейшей работы при значениях OD260/OD280 1,8-2,0; OD260/OD230 >2,0; концентрации >10 нг/мкл и длине фрагментов ДНК >3000 п.н. Подготовленные образцы ДНК хранили при -20°C до дальнейшего использования.

Подготовку ДНК библиотек коротких фрагментов проводили по протоколу IonXpress™ Plusg DNA Fragment Library Preparation (Revision K.0) с использованием набора Ion Plus Fragment Library Kit. Секвенирование библиотек осуществляли на секвенаторе Ion GeneStudio S5 Plus (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу Ion 520™ & Ion 530™ Kit – Chef (Revision D.0).

Оценку качества полученных прочтений проводили с помощью программы FastQC версии 0.11.3 [https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/]. В программе Trimmomatic версии 0.33 удаляли прочтения со средним значением качества Q < 20, а также длиной <50 нуклеотидов. Сборку геномных последовательностей выполняли с использованием программного обеспечения GS DeNovo Assembler из программного пакета Newbler (V 3.0). Оценку качества сборки геномов проводили с помощью программы Quast 5.0 [https://github.com/ablab/quast/releases]. В качестве референсной была выбрана геномная последовательность штамма *B. abortus* 2308 (GenBank: GCA_000054005). Полученные геномные последовательности аннотировали в программе PROKKA [https://github.com/tseemann/prokka].

Для последующей филогенетической реконструкции из международной базы данных GenBank были получены все доступные на момент исследования геномные последовательности штаммов *B. abortus*.

Подтверждение видовой принадлежности исследуемых штаммов бруцелл осуществляли на основе виртуальной полимеразной цепной реакции (*in silico* ПЦР) по протоколу

Bruce-Ladder [19] с каждой геномной последовательностью. В результате для последующего анализа из представленных в GenBank данных были отобраны 229 геномных последовательностей.

Множественное выравнивание геномных последовательностей проводили в Parsnp из программного пакета Harvest Suite (параметры -c -e -u -C 1000) [https://harvest.readthedocs.io/en/latest/content/parsnp.html]. Обнаруженные SNP были извлечены в файл VCF с помощью Harvest Tools (версия 1.0). Для улучшения общего качества данных были удалены позиции SNP с расстоянием <10 п.н., а также позиции, несущие неопределенный нуклеотид («N»). Отредактированный файл использовался для компиляции файла FASTA. Визуализацию филогенетического дерева проводили в программе Interactive Tree Of Life (iTOL) v5 [20].

Результаты исследования и их обсуждение

Геномные последовательности 68 штаммов *B. abortus*, выделенных на территории России с 1945 по 2021 г., были определены методом высокопроизводительного секвенирования с использованием платформы Ion GeneStudio S5 Plus. Данные секвенирования каждого штамма были собраны *de novo* в незавершенные геномные проекты.

Среднее количество прочтений составило 1 647 371 на геном (от 1 267 889 до 2 945 072), что обеспечило среднее покрытие генома в 105,9 раза (от 101 до 205). Геномные сборки включали от 2 до 126 контигов, покрывающих от 98,5 до 99,9% последовательности референсного генома (*B. abortus* 2308), N50 выборки – 301 690. Средний размер генома насчитывал 3 251 923 ± 18 000 п.н. Содержание GC варьировало в пределах 56,91–57,30% (среднее значение GC – 57,22%).

В исследуемых геномах методами биоинформационного анализа было обнаружено от 2689 до 3355 кодирующих участков ДНК.

Множественное сопоставление секвенированных геномных последовательностей и 229 геномов из международной базы данных GenBank с референсным образцом позволило выявить 13 872 SNP. Указанный набор SNP был использован для филогенетической реконструкции с использованием метода максимального правдоподобия.

Топология филогенетического дерева, построенного на основе wgSNP-анализа, согласуется с результатами предыдущих исследований [10, 11]. В структуре дерева выделены 4 основные генетические линии (генотипа), обозначенные согласно предложенной в 2023 г. классификации: А, В, С и D (рис. 1).

В ходе изучения корового генома определено 2604 SNP, специфичных для каждого из основных генотипов и подгенотипов *B. abortus*. Из них 1777 расположены на первой хромосоме, 827 – на второй (таблица). Процентное соотношение специфичных SNP в кодирующих и некодирующих областях генома составило 89,35 и 10,65% соответственно.

Анализ филогенетического дерева позволил определить, что штаммы, выделенные на территории Российской Федерации, принадлежат к трем субгенотипам генетической линии С (С1, С2 и С4), а также к одному из субгенотипов линии D (D4).

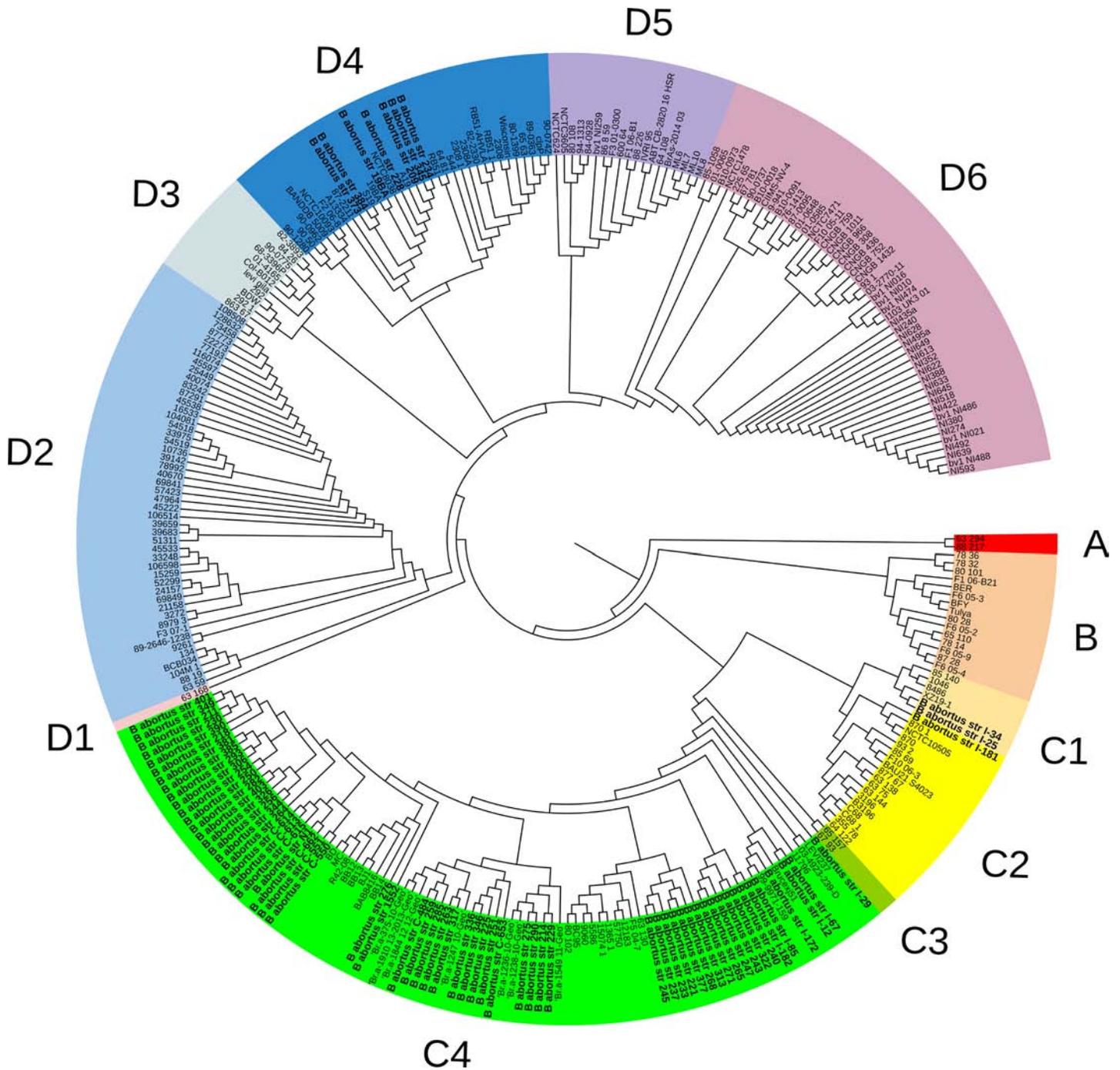


Рис. 1. Филогенетическое дерево на основе данных wgSNP штаммов *Brucella abortus* (полужирным шрифтом выделены штаммы, выделенные на территории Российской Федерации).

Fig. 1. Phylogenetic tree based on wgSNP data of *Brucella abortus* strains (the strains isolated on the territory of the Russian Federation are highlighted in bold).

По результатам исследования генотип С включает четыре субгенотипа, обозначенных как С1-С4. Нами обнаружено 103 SNP, специфичных для генетической линии С.

Субгенотип С1 включает штаммы, выделенные в России (I-25, Иркутск, 1958 и I-34, Хабаровск, 1958), Греции и Италии (107 специфичных SNP). Одной из возможных причин выделения штаммов субгенотипа С1, распространённого главным образом в странах Европы, на территории Сибири во второй половине XX века могла быть послевоенная практика вынужденного переселения жителей сельской местности вместе с домашним скотом, в т.ч. в Красноярский

край, Кемеровскую и Иркутскую области из Прибалтики, Западной Украины, а также с Кавказа.

К субгенотипу С2 отнесены штаммы, выделенные в странах Азии: Боливии, Индии, Бангладеш и Таиланде. Кроме того, субгенотип включает штаммы из Германии, Франции и Великобритании, а также 1 штамм из России (И-181, Новосибирск, 1982). Представители субгенотипа С2 отличаются от других изученных штаммов выборки набором из 97 SNP. Регистрация единственного штамма субгенотипа С2 в Сибири может быть ассоциирована с завозным случаем бруцеллеза. Однако для подтверждения наличия или отсут-

путем «замещения» циркуляции полевого патогенного штамма на аттенуированный. Учитывая, что к генетической линии D относятся вакцинные штаммы *B. abortus* и их производные, можно предположить связь появления изученных штаммов субгенотипа D4 с применением экспериментальных живых вакцинных препаратов против бруцеллеза и активным внедрением *B. abortus* 19 на территориях Советского Союза, неблагополучных по бруцеллезу. Также нельзя исключать завоз в СССР с импортируемым из-за рубежа скотом полевых штаммов *B. abortus*, имеющих общее филогенетическое происхождение со штаммами бруцелл, которые использовались в первой половине и середине XX века в качестве производных для разработки кандидатных препаратов живых противобруцеллезных вакцин (*B. abortus* 68, 519, 70, 150 и др.).

В работе описаны наборы специфичных для каждого субгенотипа *B. abortus* SNP, которые могут служить основой для совершенствования методов внутривидовой дифференциации штаммов.

Эффективность применения оптимизированного алгоритма wgSNP-типирования неоднократно подтверждалась в ходе эпидемиологических расследований вспышек бруцеллеза в 2021–2023 гг. в рамках деятельности Референс-центра по мониторингу за возбудителем бруцеллеза.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectoral program of Rospotrebnadzor.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

- Hayoun MA, Muco E, Shorman M. Brucellosis. 2023 Apr 29. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan. PMID: 28722861
- Moriyón I, Blasco JM, Letesson JJ, De Massis F, Moreno E. Brucellosis and One Health: Inherited and Future Challenges. *Microorganisms*. 2023 Aug 11;11(8):2070. DOI: 10.3390/microorganisms11082070
- Пономаренко ДГ, Хачатуров АА, Ковалёв ДА, Скударева ОН, Лукашевич ДЕ, Жаринова ИВ, и др. Анализ заболеваемости бруцеллезом и молекулярно-генетическая характеристика популяции бруцелл на территории Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023;(2):61-74. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-61-74
- Brucellosis in humans and animals. Produced by the World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Organisation for Animal Health. Principal author: M.J. Corbel. WHO/CDS/EPR/2006.7. ISBN 92 4 154713 8
- Kumari G, Doimari S, Suman Kumar M, Singh M, Singh DK. MLVA typing of *Brucella melitensis* and *B. abortus* isolates of animal and human origin from India. *Anim Biotechnol*. 2023 Apr;34(2):375-383. DOI: 10.1080/10495398.2021.1971685
- Анисимова ЕА, Миргазов ДА, Додонова ЕА, Елизарова ИА, Панкова ЕВ, Осянин КА. Применение HRM-анализа кривых плавления, полученных после амплификации VNTR-локусов, для идентификации и дифференциации штаммов бруцелл. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023;4:42-49. DOI:10.21055/0370-1069-2023-4-42-49
- Liu G, Ma X, Zhang R, Lü J, Zhou P, Liu B, et al. Epidemiological changes and molecular characteristics of *Brucella* strains in Ningxia, China. *Front Microbiol*. 2024 Jan 19;15:1320845. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1320845
- Özmen M, Özgen EK, Sayı O, Karadeniz Pütür E, Okumuş B, İba Yılmaz S, et al. Genotyping of *Brucella* isolates from animals and humans by Multiple-Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis (MLVA). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2023 May;96:101981. DOI: 10.1016/j.cimid.2023.101981
- Pereira CR, Neia RC, Silva SB, Williamson CHD, Gillece JD, O'Callaghan D, et al. Comparison of *Brucella abortus* population structure based on genotyping methods with different levels of resolution. *J Microbiol Methods*. 2023 Aug;211:106772. DOI: 10.1016/j.mimet.2023.106772
- Whatmore AM, Koylass MS, Muchowski J, Edwards-Smallbone J, Gopaul KK, Perrett LL. Extended Multilocus Sequence Analysis to Describe the Global Population Structure of the Genus *Brucella*: Phylogeography and Relationship to Biovars. *Front Microbiol*. 2016 Dec 21;7:2049. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02049
- Janke NR, Williamson CHD, Drees KP, Suárez-Esquivel M, Allen AR, Ladner JT, et al. Global phylogenomic diversity of *Brucella abortus*: spread of a dominant lineage. *Front Microbiol*. 2023 Nov 29;14:1287046. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1287046
- Keim P, Van Ert MN, Pearson T, Vogler AJ, Huynh LY, Wagner DM. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infect Genet Evol*. 2004 Sep;4(3):205-13. DOI: 10.1016/j.meegid.2004.02.005
- Vergnaud G, Hauck Y, Christiany D, Daoud B, Pourcel C, Jacques I, et al. Genotypic expansion within the population structure of classical *Brucella* species revealed by MLVA16 typing of 1404 *Brucella* isolates from different animal and geographic origins, 1974–2006. *Front Microbiol* 2018.
- Kovalev DA, Ponomarenko DG, Pisarenko SV, Shapakov NA, Khachaturova AA, Serdyuk NS, et al. Phylogeny of *Brucella abortus* strains isolated in the Russian Federation. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2021; 14(7):323-329. DOI: 10.4103/1995-7645.320523
- Таран ИФ, Лямкин ГИ. Бруцеллез: (Микробиология, иммунология, эпидемиология, профилактика). Ставрополь, 1996.
- Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза. Методические указания. МУК 3.1.7.3402-16 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 10 ноября 2016 г.).
- Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. СанПиН 3.3686-21 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 28 ноября 2013 г.).
- Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. Методические указания. МУ 1.3.2569-09 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 22 декабря 2009 г.).
- Идентификация и типирование штаммов бруцелл с использованием молекулярно-биологических методов. Методические рекомендации. МР 4.2.0288-22 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 30 мая 2022 г.).
- Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jul 2;49(W1):W293-W296. DOI: 10.1093/nar/gkab301
- Здродовский ПФ. Бруцеллез. Изд-во Академии медицинских наук СССР. М., 1948.
- Кулаков ЮК. Молекулярные аспекты персистенции бруцелл. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2016;34(1):3-8. DOI 10.18821/0208-0613-2016-34-1-3-8
- Prasolova O, Krylova E, Bogomazova A, Soltynskaya I, Sklyarov O, Gordeeva V, et al. Russian collection of *Brucella abortus* vaccine strains: annotation, implementation and genomic analysis. *Front Vet Sci*. 2023 Jun 21;10:1154520. DOI: 10.3389/fvets.2023.1154520

24. Куринский МС, Ахматов БП, Дудин СЯ, Всяких АС. Импортный скот в СССР: разведение и использование. М.: Изд-во Колос, 1976.

References

- Hayoun MA, Muco E, Shorman M. Brucellosis. 2023 Apr 29. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan. PMID: 28722861
- Moriyón I, Blasco JM, Letesson JJ, De Massis F, Moreno E. Brucellosis and One Health: Inherited and Future Challenges. *Microorganisms*. 2023 Aug 11;11(8):2070. DOI: 10.3390/microorganisms11082070
- Ponomarenko DG, Khachaturova AA, Kovalev DA, Skudareva ON, Lukashevich DE, Zharinova IV, et al. Analysis of Brucellosis Incidence and Molecular-Genetic Characteristics of *Brucella* Population in the Territory of the Russian Federation. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2023;(2):61-74. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-61-74 (In Russian).
- Brucellosis in humans and animals. Produced by the World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Organisation for Animal Health. Principal author: M.J. Corbel. WHO/CDS/EPR/2006.7. ISBN 92 4 154713 8.
- Kumari G, Doimari S, Suman Kumar M, Singh M, Singh DK. MLVA typing of *Brucella melitensis* and *B. abortus* isolates of animal and human origin from India. *Anim Biotechnol*. 2023 Apr;34(2):375-383. DOI: 10.1080/10495398.2021.1971685
- Anisimova EA, Mirgazov DA, Dodonova EA, Elizarova IA, Pankova EV, Osyanin KA. Use of HRM-Analysis of the Melting Curves Obtained after Amplification of VNTR-Loci for Identification and Differentiation of *Brucella* Strains. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2023;4:42-49. DOI:10.21055/0370-1069-2023-4-42-49 (In Russian).
- Liu G, Ma X, Zhang R, Lü J, Zhou P, Liu B, et al. Epidemiological changes and molecular characteristics of *Brucella* strains in Ningxia, China. *Front Microbiol*. 2024 Jan 19;15:1320845. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1320845
- Özmen M, Özgen EK, Sayı O, Karadeniz Pütür E, Okumuş B, İba Yılmaz S, et al. Genotyping of *Brucella* isolates from animals and humans by Multiple-Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis (MLVA). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2023 May;96:101981. DOI: 10.1016/j.cimid.2023.101981
- Pereira CR, Neia RC, Silva SB, Williamson CHD, Gillece JD, O'Callaghan D, et al. Comparison of *Brucella abortus* population structure based on genotyping methods with different levels of resolution. *J Microbiol Methods*. 2023 Aug;211:106772. DOI: 10.1016/j.mimet.2023.106772
- Whatmore AM, Koylass MS, Muchowski J, Edwards-Smallbone J, Gopaul KK, Perrett LL. Extended Multilocus Sequence Analysis to Describe the Global Population Structure of the Genus *Brucella*: Phylogeography and Relationship to Biovars. *Front Microbiol*. 2016 Dec 21;7:2049. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02049
- Janke NR, Williamson CHD, Drees KP, Suárez-Esquivel M, Allen AR, Ladner JT, et al. Global phylogenomic diversity of *Brucella abortus*: spread of a dominant lineage. *Front Microbiol*. 2023 Nov 29;14:1287046. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1287046
- Keim P, Van Ert MN, Pearson T, Vogler AJ, Huynh LY, Wagner DM. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infect Genet Evol*. 2004 Sep;4(3):205-13. DOI: 10.1016/j.meegid.2004.02.005
- Vergnaud G, Hauck Y, Christiany D, Daoud B, Pourcel C, Jacques I, et al. Genotypic expansion within the population structure of classical *Brucella* species revealed by MLVA16 typing of 1404 *Brucella* isolates from different animal and geographic origins, 1974–2006. *Front Microbiol* 2018.
- Kovalev DA, Ponomarenko DG, Pisarenko SV, Shapakov NA, Khachaturova AA, Serdyuk NS, et al. Phylogeny of *Brucella abortus* strains isolated in the Russian Federation. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2021;14(7):323-329. DOI: 10.4103/1995-7645.320523
- Taran IF, Lyamkin GI. Brucellyoz: (Mikrobiologiya, immunologiya, epidemiologiya, profilaktika). Stavropol', 1996. (In Russian).
- Epidemiologicheskij nadzor i laboratornaya diagnostika brucelleza. Metodicheskie ukazaniya. MUK 3.1.7.3402-16 (Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom RF 10 november 2016). (In Russian).
- Sanitarno-epidemiologicheskie trebovaniya po profilaktike infekcionnyh boleznej. SanPiN 3.3686-21 (utv. Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom RF 28 november 2013). (In Russian).
- Organizaciya raboty laboratorij, ispol'zuyushchih metody amplifikacii nukleinovyh kislot pri rabote s materialom, soderzhashchim mikroorganizmy I-IV grupp patogennosti. Metodicheskie ukazaniya. MU 1.3.2569-09 (utv. Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom RF 22 december 2009). (In Russian).
- Identifikaciya i tipirovaniye shtammov brucell s ispol'zovaniem molekulyarno-biologicheskikh metodov. Metodicheskie rekomendacii. MR 4.2.0288-22 (utv. Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom RF 30 may 2022). (In Russian).
- Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jul 2;49(W1):W293-W296. DOI: 10.1093/nar/gkab301
- Zdrodovskij PF. Brucellez. Izd-vo Akademii medicinskih nauk SSSR. M., 1948. (In Russian).
- Kulakov YuK. Molecular Aspects of *Brucella* Persistence. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology (Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya)*. 2016;34(1):3-8. DOI: 10.18821/0208-0613-2016-34-1-3-8 (In Russian).
- Prasolova O, Krylova E, Bogomazova A, Soltynskaya I, Sklyarov O, Gordeeva V, et al. Russian collection of *Brucella abortus* vaccine strains: annotation, implementation and genomic analysis. *Front Vet Sci*. 2023 Jun 21;10:1154520. DOI: 10.3389/fvets.2023.1154520
- Kurinsky MS, Akhmatov BP, Dudin SYa, Vsyakikh AS. Importnyi skot v SSSR: razvedenie i ispol'zovanie. M.: Publ. Kolos, 1976. (In Russian).

Информация об авторах:

Шапакон Николай Андреевич, младший научный сотрудник лаборатории биохимии, ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Писаренко Сергей Владимирович, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии, ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Бобрышева Ольга Викторовна, младший научный сотрудник лаборатории биохимии, ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Пономаренко Дмитрий Григорьевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией бруцеллеза, ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Хачатурова Анна Андреевна, аспирант, биолог лаборатории бруцеллеза, ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Куличенко Александр Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Information about authors:

Nikolay A. Shapakov, Junior Researcher of biochemistry laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

Sergey V. Pisarenko, PhD in Chemical Sciences, Leading Researcher of biochemistry laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

Olga V. Bobrysheva, Junior Researcher of biochemistry laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

Dmitry G. Ponomarenko, PhD in Biological Sciences, head of brucellosis laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

Anna A. Khachaturova, graduate student, biologist of brucellosis laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

Alexandr N. Kulichenko, MD, PhD, DSc, professor, academic RAS, director, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор