

И.В.Кузнецова, Д.А.Ковалев, Ю.М.Евченко, Л.И.Шакирова, Н.М.Швецова, Д.Г.Пономаренко,  
С.В.Писаренко, А.М.Жиров, А.А.Лукина, А.Н.Куличенко

## ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ШТАММОВ БРУЦЕЛЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ В СЕВЕРО-КАВКАЗСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ

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

**Цель исследования** – изучение генетического разнообразия штаммов *Brucella* разных видов, изолированных от людей и мелких млекопитающих животных на территории Северо-Кавказского федерального округа методом MLVA14, определение взаимосвязи сформированных кластеров с местом, временем и объектом выделения. **Материалы и методы.** Проведено MLVA14 генотипирование 91 штамма *Brucella* spp., выделенных от больных людей, мелких млекопитающих и сельскохозяйственных животных. Размеры ампликонов сравнивали с базой MLVA Bank 5.0 tutorial version 1.6. На основании полученных данных построена дендрограмма филогенетических связей изученных штаммов. **Результаты и выводы.** На основании MLVA-генотипирования изученные штаммы разделены на 61 MLVA14 генотип. Штаммы подвидов *B. suis*, *B. abortus*, *B. melitensis* на дендрограмме формируют отдельные кластеры. Одинаковые MLVA14 типы *B. melitensis* имеют штаммы, выделенные во время групповых заболеваний людей бруцеллезом, штаммы *B. suis* приурочены к эпизоотиям среди мелких млекопитающих, которые могут протекать на различных административных территориях. Полученные данные могут быть использованы для мониторинга за возбудителем бруцеллеза, в том числе в качестве эффективного инструмента ретроспективного эпидемиологического анализа.

**Ключевые слова:** бруцеллез, мультилокусный анализ числа варьируемых тандемных повторов, филогенетический анализ.

Корреспондирующий автор: Кузнецова Ирина Владимировна, e-mail: labindic@mail.ru.

I.V.Kuznetsova, D.A.Kovalev, Yu.M.Evchenko, L.I.Shakirova, N.M.Shvetsova, D.G.Ponomarenko,  
S.V.Pisarenko, A.M.Zhirov, A.A.Lukina, A.N.Kulichenko

## The Study of Genetic Diversity of *Brucella* Strains Isolated in the North Caucasian Federal District

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

**Objective** of the study is to investigate genetic diversity of *Brucella* strains of various species, isolated from humans and small mammals in the territory of the North Caucasus Federal District using MLVA14, as well as to identify the correlation between the formed clusters and the place setting, the time setting, and object of isolation. **Materials and methods.** Carried out has been MLVA14 genotyping of 91 *Brucella* spp. strains isolated from patients, small mammals and live-stock animals. The sizes of amplicons were compared with MLVA Bank 5.0 database, tutorial version 1.6. Based on the data obtained, constructed was a dendrogram of phylogenetic interrelations of the studied strains. **Results and conclusions.** Using the data on MLVA genotyping, the studied strains were subdivided into 61 MLVA14 genotypes. Strains of *B. suis*, *B. abortus*, *B. melitensis* form separate clusters in the dendrogram. Strains isolated during cluster cases of brucellosis in humans have similar MLVA14 *B. melitensis* types, *B. suis* strains are confined to the epizooties among small mammals that may occur in different administrative territories. The data can be used for monitoring of brucellosis agent, including as an effective tool for retrospective epidemiological analysis.

**Keywords:** brucellosis, multilocus VNTR-analysis, phylogenetic analysis.

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

Corresponding author: ..... e-mail: labindic@mail.ru.

**Citation:** Kuznetsova I.V., Kovalev D.A., Evchenko Yu.M., Shakirova L.I., Shvetsova N.M., Ponomarenko D.G., Pisarenko S.V., Zhirov A.M., Lukina A.A., Kulichenko A.N. The Study of Genetic Diversity of *Brucella* Strains Isolated in the North Caucasian Federal District. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:58–62. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-58-62

Бруцеллез – инфекционно-аллергическая болезнь, общая для человека и животных, относящаяся к особо опасным инфекциям. Эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации продолжает оставаться напряженной и определяется эпизоотическим неблагополучием среди мелкого и крупного рогатого скота. Наиболее высокий уровень заболеваемости людей бруцеллезом регистрируется в Северо-Кавказском федеральном округе [1].

В настоящее время в мировой практике для анализа геномного полиморфизма возбудителя бруцеллеза широкое применение получил многолокусный анализ варьируемых тандемных повторов (Multiple

Locus Variable-Number Tandem Repeats Analysis – MLVA) как в качестве самостоятельного, так и в сочетании с другими методами генетического типирования [6, 7, 8]. Данный метод позволяет проводить внутривидовую дифференциацию штаммов возбудителя инфекций, согласующуюся с классическими методиками, определять их принадлежность к определенному географическому региону, группировать по ряду других свойств.

Целью данной работы было изучение генетического разнообразия штаммов *Brucella* разных видов, изолированных от людей и мелких млекопитающих животных на территории Северо-Кавказского фе-

дерального округа методом MLVA14, определение взаимосвязи сформированных кластеров с местом, временем и объектом выделения.

### Материалы и методы

В работе использованы 27 штаммов (24 штамма – *B. melitensis*, 2 – *B. abortus* и 1 – *B. suis*), изолированных от больных людей и 64 штамма *B. suis*, выделенных от мелких млекопитающих (61) и сельскохозяйственных животных (3).

Бактерии выращивали на среде эритрит-агар при температуре 37 °С согласно МУ 3.1.7.1189-03. Выделение ДНК *Brucella* spp. из двухсуточной агаровой культуры осуществляли в присутствии гуанидинтиоцианата с использованием сертифицированных коммерческих наборов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» (ИнтерЛабСервис, Россия) в соответствии с инструкцией.

MLVA проводили по схеме, предложенной Le Fleche *et al.* [5], учитывая размер 15 VNTR-локусов *Brucella* spp. В ходе исследования locus Bruce 30 исключили из схемы типирования, поскольку он не амплифицировался в ПЦР с ДНК изучаемых штаммов. Размеры ампликонов определяли с помощью автоматизированной станции микрокапиллярного электрофореза «Experion System» (Bio-Rad Laboratories, США). Полученные данные сравнивали с базой MLVA Bank 5.0 tutorial version 1.6 [9].

Методом попарного невзвешенного кластирования с арифметическим усреднением (UPGMA), с помощью компьютерной программы START 2 [10], построена дендрограмма штаммов возбудителя бруцеллеза. Оценка статистической значимости различий частот наблюдений проводилась по критерию Фишера [3].

### Результаты и обсуждение

Изоляты *B. suis* (биовары 1, 5) выделены из образцов полевого материала, собранного на территории Ставропольского края, Республики Северная Осетия – Алания (РСО), Чеченской, Ингушской и Кабардино-Балкарской Республик в 1959–1984 гг. Остальные штаммы бруцеллезного микроба выделены из крови больных людей в 2011–2014 гг.: в Республике Дагестан – 21 культура *B. melitensis* (биовар 1, 3), Республике Калмыкия – 3 культуры *B. melitensis* (биовар 3) и 2 культуры *B. abortus* (биовар 3), Чеченской Республике – 1 культура *B. suis* (биовар 5). Часть штаммов *B. suis* выделена при проведении исследований, направленных на доказательство существования природной очаговости бруцеллеза, где носителями являются мелкие мышевидные грызуны [2, 4]. Штаммы от мелких млекопитающих выделены в зоне Ассино-Сунженского междуречья на границе республик Ингушетия и Северная Осетия – Алания, Кабардино-Балкарской и Чеченской в период, охватывающий конец 50-х и

начало 80-х гг. прошлого столетия. Эта зона является природным очагом туляремии и представляет собой лесостепь предгорной зоны Главного Кавказского хребта. Долина занята фруктовыми садами, виноградниками, посевами колосовых и пропашных культур. Среди этих угодий имеются небольшие участки целины с наличием кустарников. Поселения мелких млекопитающих, мышей разных видов, полевок носят мозаичный характер.

Изученные штаммы в ходе исследования были разделены на 61 MLVA14 генотип. На основании полученных данных построена дендрограмма, отображающая филогенетическое родство изучаемых изолятов (рисунок).

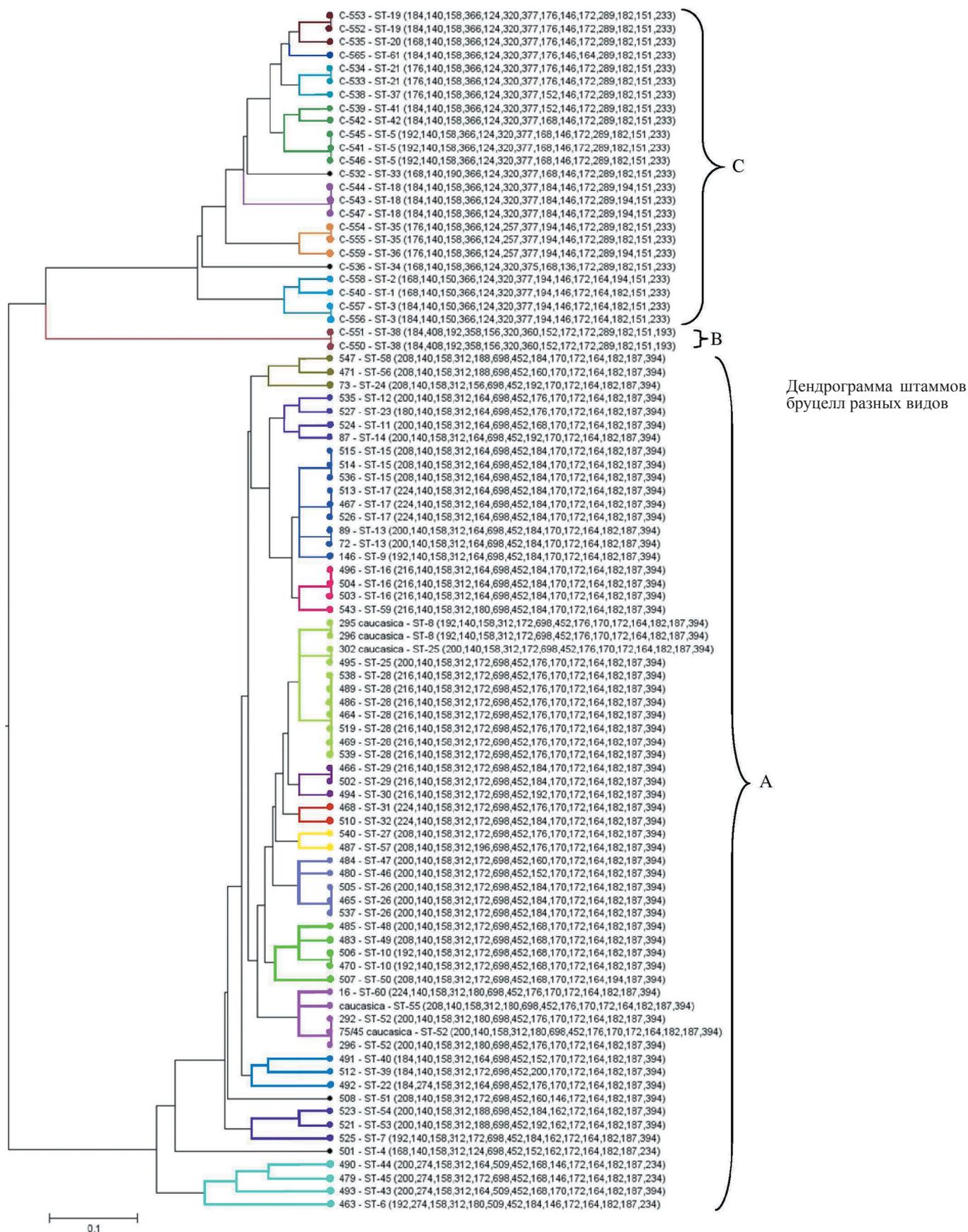
Как видно из рисунка, штаммы бруцеллы разных подвидов формируют отдельные кластеры: А – *B. suis*, В – *B. abortus*, С – *B. melitensis*.

Кластер В представлен двумя штаммами *B. abortus* С-550, С-551, изолированными от больных в Калмыкии.

В кластере С конечные ветви дендрограммы сформированы штаммами, имеющими одинаковый генотип. Поскольку данные эпидемиологического расследования отсутствуют, в качестве критериев групповой заболеваемости бруцеллезом нами использованы сведения о месте и времени изоляции культур от больных людей. Как следует из табл. 1, насчитывается семь генетически однотипных групп штаммов бруцеллезной инфекции. Из них в пяти случаях имеют место совпадения времени и мест выделения культур бруцеллеза. Например, группа 1 состоит из штаммов, выделенных в сроки, укладывающиеся в инкубационный период болезни, на территориях населенных пунктов, расположенных в 30–40 км друг от друга. Группа 3 сформирована штаммами, изолированными на значительном расстоянии (более 200 км) друг от друга. Не исключено, что они являются причиной заболеваний с общим источником заражения, однако в данном случае формальных признаков такой общности не наблюдается.

Тем не менее, использование критерия Фишера ( $\phi = 1,654$ ) позволяет заключить, что общий MLVA14 тип чаще наблюдается у штаммов, выделенных в период одного группового заболевания людей бруцеллезом.

При анализе групп и подгрупп кластера А по географическому положению места выделения возбудителя отмечено, что штаммы разных MLVA14 типов распределены по территории Ассино-Сунженского междуречья не системно. Всего выделено четыре группы с разным количеством подгрупп в каждой. В первой группе – одна подгруппа, вторая группа представлена одним штаммом – 501, в третьей группе – 9 подгрупп, в четвертой – 3. Однако при распределении по годам отмечено, что на фоне изоляции единичных штаммов разных типов имеет место одновременное выделение двух-трех штаммов с одинаковым генотипом. Такого рода случаи представлены в табл. 2, из которой следует, что од-



Дендрограмма штаммов бруцелл разных видов

нотипные штаммы вызывают эпизоотии на определенных территориях, причем в разные годы эти территории меняются, т.е. штаммы с определенными генотипами перемещаются в пределах рассматри-

ваемого Ассино-Сунженского междуречья.

Таким образом, в результате анализа полученного филогенетического дерева, построенного на основании MLVA 14 генотипирования 91 штамма бруцелл разных

Сведения о штаммах бруцелл, выделенных из клинического материала

Группа	Вид	ST-тип	Штамм	Место выделения	Дата выделения
1	<i>B. abortus</i>	38	C-550	Республика Калмыкия, Целинный р-н, п. Аршан	18.07.12
		38	C-551	Республика Калмыкия, Ики-Бурульский р-н, п. Оргакин	26.07.12
2	<i>B. melitensis</i>	3	C-556	Республика Дагестан, Хунзахский р-н, с. Орота	18.07.12
		3	C-557	Республика Дагестан, Хунзахский р-н, с.Орота	18.07.12
3	<i>B. melitensis</i>	35	C-555	Республика Дагестан, Хунзахский р-н, с. Мочох	18.07.12
		35	C-554	Республика Дагестан, Тарумовский р-н, с. Новодмитриевка	16.07.22
4	<i>B. melitensis</i>	18	C-547	Республика Дагестан, Карабудахкентский р-н, с. Карабудахкент	18.06.12
		18	C-543	Республика Дагестан, Лавашинский р-н, с. Арада-Чугли	30.05.12
		18	C-544	Республика Дагестан, Лавашинский р-н, с. Арада-Чугли	30.05.12
5	<i>B. melitensis</i>	5	C-546	Республика Дагестан, Городской округ, г. Каспийск	12.06.12
		5	C-541	Республика Дагестан, Карабудахкентский р-н, п. Манас	02.05.12
		5	C-545	Республика Дагестан, Городской округ, г. Каспийск	12.06.12
6	<i>B. melitensis</i>	21	C-533	Республика Дагестан, Тарумовский р-н, с. Кочубей	11.01.12
		21	C-534	Республика Дагестан, Тарумовский р-н, кутан М. Горького	11.01.12
7	<i>B. melitensis</i>	19	C-552	Республика Калмыкия, Малодербетовский р-н, п. Малые Дербеты	17.08.12
		19	C-553	Республика Калмыкия, Черноземельский р-н, п. Комсомольский	16.11.12

видов, сформированы MLVA14 генотипы трех уровней дискриминации. Штаммы разных подвидов бруцеллезной инфекции формируют отдельные кластеры филогенетического дерева. Одинаковые MLVA14 типы *B. melitensis* имеют штаммы, выделенные во время групповых заболеваний людей бруцеллезом.

Штаммы *B. suis* с одинаковыми MLVA14 типами приурочены к эпизоотиям среди мелких млекопитающих, которые могут протекать на различных административных территориях.

Метод MLVA14 успешно применен для мониторинга возбудителя бруцеллеза, в том числе в каче-

Таблица 2

Сведения о штаммах *B. suis*, выделенных из полевого материала

Группы	Подгруппа	ST-тип	Штамм	Место выделения	Объект выделения	Дата выделения
1	1	44	490	ЧР, Грозненский р-н	Домовая мышь	01.01.65
		43	493	ЧР, Грозненский р-н	Домовая мышь	27.03.65
3	3	22	492	РИ, Сунженский р-н	Полевая мышь	01.01.65
		40	491	ЧР, Грозненский р-н	Полевая мышь	01.01.65
	6	49	483	ЧР, Грозненский р-н	Полевая мышь	01.01.65
		48	485	РИ	Нет данных	01.01.65
	8	57	487	ЧР, Грозненский р-н	Домовая мышь	01.01.65
		30	494	РИ, Сунженский р-н	Обыкновенная полевка	20.01.65
	9	28	486	РИ	Домовая мышь	01.01.65
		28	489	ЧР, Грозненский р-н	Домовая мышь	01.01.65
	1	7	525	РИ, Малгобекский р-н	Домовая мышь	05.01.78
		53	521	РИ, Малгобекский р-н	Домовая мышь	05.01.78
		54	523	РИ, Малгобекский р-н	Домовая мышь	05.01.78
	4	52	75/45 <i>caucasica</i>	РИ	Полевка обыкновенная	05.06.82
		55	<i>caucasica</i>	РИ, Малгобекский р-н	Полевка обыкновенная	23.04.82
	9	25	302 <i>caucasica</i>	РИ, Назрановский р-н	Полевка обыкновенная	1982
		8	296 <i>caucasica</i>	РИ, Назрановский р-н	Полевая мышь	04.01.82
8		295 <i>caucasica</i>	РИ, Назрановский р-н	Лесная мышь	04.01.82	
4	52	296	РИ, Сунженский р-н	Полевая мышь	31.08.84	
	52	292	РИ, Сунженский р-н	Лесная мышь	31.08.84	
4	1	16	503	PCO	Обыкновенная полевка	1969
		16	504	PCO, Правобережный р-н	Обыкновенная полевка	11.04.69
	2	17	513	РИ, Назрановский р-н	Домовая мышь	22.12.75
		15	514	РИ, Назрановский р-н	Домовая мышь	22.12.75
		15	515	РИ, Назрановский р-н	Домовая мышь	22.12.75
	3	11	524	РИ, Сунженский р-н	Полевые мыши	19.06.78
		23	527	РИ, Сунженский р-н	Лесная мышь	19.06.78
		12	535	ЧР, Надтеречный р-н	Полевая мышь	19.06.78
	2	9	146	PCO, Ирафский р-н	Клещи	07.08.81
		13	72	PCO, Ирафский р-н	Полевая мышь	07.04.81
		13	89	PCO, Дигорский р-н	Домовая мышь	07.08.81

стве эффективного инструмента ретроспективного эпидемиологического анализа.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2015 году и прогноз на 2016 год. <http://www.snipchi.ru/updoc/obzor-epid.-situatsii-po-brutsellezu-v-rf-v-2015.pdf> (дата обращения 01.06.16 г.).
2. Лямкин Г.И., Таран И.Ф., Щедрин В.И. Современные представления о бруцеллезе как природно-очаговом заболевании. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1995; 2:115–8.
3. Савилов Е.Д., Мамонтова Л.М., Астафьев В.А., Жданова С.Н. Применение статистических методов в эпидемиологическом анализе. М.: МЕДпресс-информ; 2004. 112 с.
4. Таран И.Ф. Бруцеллезная инфекция с позиции природно-очагового заболевания. Эпидемиология и профилактика особо опасных инфекций в МНР и СССР. Улан-Батор; 1978. С. 193–4.
5. Le Flèche P., Jacques I., Grayon M., Al Dahouk S., Bouchon P., Denoëud F., Nöckler K., Neubauer H., Guilloteau L., Vergnaud G. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 2006; 6(9):1–14. DOI: 10.1186/1471-2180-6-9.
6. Jiang H., Wang H., Xu L., Hu G., Ma J., Xiao P., Fan W., Di D., Tian G., Fan M., Mi J., Yu R., Song L., Zhao H., Piao D., Cui B. MLVA Genotyping of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* Isolates from Different Animal Species and Humans and Identification of *Brucella suis* Vaccine Strain S2 from Cattle in China. *PLOS ONE.* 2013; 8(10):76332. DOI: 10.1371/journal.pone.0076332.
7. Ma J., Wang H., Zhang X., Xu L., Hu G., Jiang H., Zhao F., Zhao H., Piao D., Qin Y., Cui B., Lin G. MLVA and MLST typing of *Brucella* from Qinghai, China. *Infect. Dis. Poverty.* 2016; 5(26):1–9. DOI: 10.1186/s40249-016-0123-z.
8. Massis F., Ancora M., Atzeni M., Rolesu S., Bandino E., Danzetta M., Zilli K., Giannatale E., Scacchia M. MLVA as an Epidemiological Tool To Trace Back *Brucella melitensis* Biovar 1 Re-Emergence in Italy. *Transbound. Emerg. Dis.* 2015; 62(5):463–9. DOI: 10.1111/tbed.12397.
9. MLVA bank for Microbes Genotyping. (Cited 01 Jun 2016). Available from: <http://mlva.u-psud.fr>.
10. START version 2. (Cited 01 Jun 2016). Available from: <http://pubmlst.org/software/analysis/start2/>.

#### References

1. [Analysis of epidemiological situation on brucellosis in the Russian Federation in 2015 and prognosis for 2016] (cited 06 Jan 2016). Available from: <http://www.snipchi.ru/updoc/obzor-epid.-situatsii-po-brutsellezu-v-rf-v-2015.pdf>.
2. Lyamkin G.I., Taran I.F., Shchedrin V.I. [Modern views on brucellosis as natural-focal disease]. *Zh. Mikrobiol., Immunol. i Immunobiol.* 1995; 2:115–8.
3. Savilov E.D., Mamontova L.M., Astaf'ev V.A., Zhdanova S.N. [Application of Statistical Methods in Epidemiological Analysis]. М.: "MEDpress-inform"; 2004. 112 p.
4. Taran I.F. [Brucellosis through the lens of natural-focal disease]. In: [Epidemiology and Prophylaxis of Particularly Dangerous Infections in Mongolian People's Republic and USSR]. Ulan-Bator; 1978. P. 193–4.
5. Le Flèche P., Jacques I., Grayon M., Al Dahouk S., Bouchon P., Denoëud F., Nöckler K., Neubauer H., Guilloteau L., Vergnaud G. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 2006; 6(9):1–14. DOI: 10.1186/1471-2180-6-9.
6. Jiang H., Wang H., Xu L., Hu G., Ma J., Xiao P., Fan W., Di D., Tian G., Fan M., Mi J., Yu R., Song L., Zhao H., Piao D., Cui B. MLVA Genotyping of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* Isolates from Different Animal Species and Humans and Identification of *Brucella suis* Vaccine Strain S2 from Cattle in China. *PLOS ONE.* 2013; 8(10):76332. DOI: 10.1371/journal.pone.0076332.
7. Ma J., Wang H., Zhang X., Xu L., Hu G., Jiang H., Zhao F., Zhao H., Piao D., Qin Y., Cui B., Lin G. MLVA and MLST typing of *Brucella* from Qinghai, China. *Infect. Dis. Poverty.* 2016; 5(26):1–9. DOI: 10.1186/s40249-016-0123-z.
8. Massis F., Ancora M., Atzeni M., Rolesu S., Bandino E., Danzetta M., Zilli K., Giannatale E., Scacchia M. MLVA as an Epidemiological Tool To Trace Back *Brucella melitensis* Biovar 1 Re-Emergence in Italy. *Transbound. Emerg. Dis.* 2015; 62(5):463–9. DOI: 10.1111/tbed.12397.
9. MLVA bank for Microbes Genotyping. (Cited 01 Jun 2016). Available from: <http://mlva.u-psud.fr>.
10. START version 2. (Cited 01 Jun 2016). Available from: <http://pubmlst.org/software/analysis/start2/>.

#### Authors:

Kuznetsova I.V., Kovalev D.A., Evchenko Yu.M., Shakirova L.I., Shvetsova N.M., Ponomarenko D.G., Pisarenko S.V., Zhirov A.M., Lukina A.A., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: [snipchi@mail.stv.ru](mailto:snipchi@mail.stv.ru).

#### Об авторах:

Кузнецова И.В., Ковалев Д.А., Евченко Ю.М., Шакирова Л.И., Швецова Н.М., Пономаренко Д.Г., Писаренко С.В., Жиров А.М., Лукина А.А., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: [snipchi@mail.stv.ru](mailto:snipchi@mail.stv.ru).

Потупила 03.08.17.