

DOI: 10.48612/sbornik-2022-1-1
УДК 577.29 (574)

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *BRUCELLA* В КАЗАХСТАНЕ

Даугалиева Аида Тлековна¹, канд. вет. наук

Канатбаев Серик Ганиевич², д-р биол. наук

Ақатова Рысбике Избасқанқызы³, магистрант

Сагидуллаев Жандарбек Еркинбаевич³, магистрант

¹ТОО «Казакский научно-исследовательский институт животноводства и кормопроизводства»,
г. Алматы, Республика Казахстан

²«Западно-Казахстанская научно-исследовательская ветеринарная станция»
филиал ТОО «Казакский научно-исследовательский ветеринарный институт»,
г. Уральск, Республика Казахстан

³ЧВПОУ «Западно-Казахстанский инновационно-технологический университет»,
г. Уральск, Республика Казахстан

MLVA использовали для генотипирования панели 102 изолятов бруцелл из 8 областей Казахстана и соседних стран (Россия, Кыргызстан). Филогеография показала, что штаммы *B. abortus* и *B. melitensis* принадлежали к линиям «Abortus C» и «Восточное Средиземноморье», соответственно. Штаммы *B. abortus* из Казахстана и России оказались генетически родственными португальским, бразильским и американским изолятам, что свидетельствует о древнем распространении этих линий из Европы в Южную Америку и на восток в Турцию, Россию и Азию. Большинство казахстанских изолятов *B. melitensis* были связаны со штаммами, циркулирующими в Китае, вероятно, из-за долгосрочных торговых партнерских отношений между двумя странами. Наши результаты показывают, что молекулярное генотипирование следует применять систематически для поддержки планов борьбы с бруцеллезом в Казахстане.

Ключевые слова: бруцеллез; генотипирование; MLVA; молекулярная эпидемиология; филогеография

GENOTYPING OF *BRUCELLA* STRAINS IN KAZAKHSTAN

Daugaliyeva Aida Tlekovna¹, PhD Vet. Sci.

Kanatbayev Serik Ganievich², Dr. Biol. Sci.

Akatova Rysbike Izbaskankyzy³, master's student

Sagidullayev Zhandarbek Erkinbayevich³, master's student

¹LLP «Kazakh Research Institute for Livestock and Fodder Production», Almaty, Republic of Kazakhstan

²"West Kazakhstan Scientific Veterinary Station" branch of "Kazakh Scientific Research Veterinary Institute" LLP, Uralsk, Republic of Kazakhstan

³PHPEI «West Kazakhstan University of Innovation and Technology», Uralsk, Republic of Kazakhstan

Here, MLVA was employed to genotype a panel of 102 *Brucella* isolates collected from 8 Kazakh regions and neighboring countries (Russia, Kyrgyzstan). Phylogeography demonstrated that *B. abortus* and *B. melitensis* strains belonged to "Abortus C" and "East Mediterranean" lineages, respectively. *B. abortus* strains from Kazakhstan and Russia resulted genetically related to Portuguese, Brazilian and US isolates, suggesting ancient spread of these lineages from Europe to South America and eastwards to Turkey, Russia and Asia. Most of Kazakh *B. melitensis* isolates were related to strains circulating in China, likely due to long-term trading partnerships between the two countries. Our findings suggest that molecular genotyping should be applied systematically to support control plans for eradication of brucellosis in Kazakhstan.

Key words: brucellosis; genotyping; MLVA; molecular epidemiology; phylogeography

Бруцеллез является наиболее распространенным зоонозом во всем мире, что оказывает большое влияние на здравоохранение и экономику животноводства. Болезнь вызвана *Brucella spp.*, граммотрицательной бактерией, которая может заразить несколько видов животных, включая крупный и мелкий рогатый скот, водных буйволов и свиней. Основным симптомом инфекции являются аборт. Патоген может передаваться человеку через потребление зараженного и необработанного молока или молочных продуктов, или путем контакта с зараженными животными. У людей болезнь может вызывать волнообразную лихорадку, недомогание и миалгию, иногда связанные с тяжелыми осложнениями, такими как энцефалит, менингит, периферический неврит, спондилит, гнойный артрит и вегетативный эндокардит. Болезнь может также возникать в хронической форме.

Род *Brucella* включает 10 видов, характеризующихся более чем 90 % гомологией ДНК/ДНК [7]. Бруцеллез крупного рогатого скота обычно вызван *Brucella abortus*, в то время как бруцеллез коз и овец обычно вызван *Brucella melitensis*, хотя могут возникать инфекции кросс-видов. Оба вида *Brucella* являются высокоинфекционными для людей и распространены среди скота. Бруцеллез успешно ликвидирован в большинстве развитых стран, хотя он по-прежнему эндемичен в развивающихся странах Латинской Америки, Южной Европы, Африки, Юго-Восточной Азии и Ближнего Востока. Стратегии борьбы с бруцеллезом основаны на строгих процедурах управления, убойе серопозитивных животных и, где возможно, вакцинации.

В Казахстане бруцеллез характеризуется высокой инфекцией у людей и животных. Предотвращение бруцеллеза людей зависит от контроля заболевания животных, а также от обработки продуктов животного происхождения. Идентификация видов и биоваров полевых штаммов *Brucella* фенотипическими методами страдает отсутствием разрешающей способности понять эпидемиологию заболевания. Подходы генотипирования – более информативные, обладают большей дискриминационной способностью к характеристикам штаммов и способностью отслеживать источники инфекции. Таким образом, они могут улучшить исход программы борьбы с бруцеллезом.

Молекулярная эпидемиология *Brucella*

может быть сложной из-за низкой изменчивости в геноме [5]. За последние несколько лет характеристика переменного количества tandemных повторов (VNTR) методом множественного локуса VNTR (MLVA) была эффективно использована для типирования *Brucella spp.* у людей и животных, в том числе у крупного и мелкого рогатого скота, диких кабанов, зайцев, водных буйволов и морских млекопитающих [6, 7]. MLVA-типизация *Brucella* может быть полезна для эпидемиологических исследований и может способствовать контролю бруцеллеза человека и животных. Идентификация наличия и идентичности штаммов *Brucella* в популяциях скота также имеет важное значение для определения введения новых штаммов.

В настоящее время, хотя распространенность бруцеллеза в Казахстане остается высокой, имеются ограниченные данные о генетическом разнообразии циркулирующих штаммов. Шевцов и др. [2] использовал MLVA-16 для характеристики 128 *B. melitensis* и 124 *B. abortus* изолятов, собранных от 4 из 14 областей Казахстана. Одна и та же исследовательская группа расширила генотипирование до 94 изолятов *Brucella*, охватывающих 4 дополнительных области Казахстана, хотя в этом исследовании образцы принадлежали только к виду *B. abortus* [3]. Примечательно, что в Казахстане большинство случаев бруцеллеза человека вызвано инфекцией *B. melitensis*.

Целью этого исследования было увеличение количества данных генотипирования штаммов *Brucella*, циркулирующих в Казахстане, путем анализа изолятов *B. melitensis* и *B. abortus* из 8 областей Казахстана и из соседних стран (Россия, Кыргызстан). Выбранный молекулярный подход включал анализ 16 областей VNTR по MLVA для характеристики генетических отношений панели 102 полевых изолятов. Филогеографические анализы были применены для сравнения наших данных с профилями MLVA, идентифицированными в Казахстане по предыдущим исследованиям, и со штаммами *Brucella* во всем мире. Наконец, молекулярная эпидемиология была применена для распутывания путей локального распространения бруцеллы.

Методика исследований. Были исследованы 102 изолята *Brucella*, полученные из тканей (лимфатических узлов, печени, селезенки, почек) и крови крупного рогатого ско-

та (n = 59), овец (n = 35), коз (n = 3), верблюдов (n = 2) и морских свинок (n = 2), человека (n = 1), отобранных в рамках Национального плана борьбы с бруцеллезом и доступного в хранилище Национального референтного центра по ветеринарии. В панель образцов были включены 2 изолята вакцинных штаммов (*B. abortus* 104-М и *B. abortus* S19). Образцы были собраны у животных из 8 областей Казахстана: Акмолинской (n = 3), Алматинской (n = 40), Атырауской (n = 2), Восточно-Казахстанской (n = 9), Карагандинской (n = 1), Костанайской (n = 3), Туркестанской (n = 3), Западно-Казахстанской (n = 27). 8 архивных изолятов были зарубежные (Россия, n = 7, Кыргызстан = 1, США, n = 1), а для 7 архивных изолятов Казахстана информации о регионе происхождения не было.

Изоляты *Brucella* культивировали на эритрит агаре с добавками в течение 3–5 дней при 37 °С при 5 % CO₂. Бактериальную ДНК экстрагировали из культур набором «PureLink Genomic DNA Kits» (Invitrogen). Все штаммы были идентифицированы как виды бруцелл на основе классических процедур: морфология колоний, потребность в CO₂, производство H₂S, ингибирование роста основным фуксином и тионином, оксидазной, каталазной и уреазной активностью, лизис фагами и агглютинация моноспецифическими сыворотками (анти-А, анти-М и анти-Р сыворотки), следуя рекомендациям МЭБ. Кроме того, молекулярная типизация была выполнена для идентификации видов *Brucella*, используя собственный дифференциальный анализ ПЦР [1].

Образцы ДНК анализировали методом MLVA-16 типирования. 16 пар праймеров разделили на 2 группы: панель 1 – MLVA8 (локусы Bruce06, Bruce08, Bruce11, Bruce12, Bruce42, Bruce43, Bruce45 и Bruce55) более консервативна и характеризуется умеренно переменными минисателлитами, и панель 2 – MLVA8 (локусы Bruce04, Bruce07, Bruce09, Bruce16, Bruce18, Bruce19, Bruce21 и Bruce30), образованная высокодискриминационными микросателлитами. Эти маркеры были выбраны потому, что их стабильность была уже оценена, и они широко используются для характеристики *Brucella spp.* [4]. Амплификацию, мультиплексирование и маркировку праймеров проводили в соответствии с Garofolo et al. [5] с незначительными изменениями. Ампликон анализировали с помощью

капиллярного электрофореза с использованием генетического анализатора 3500 (ABI, Япония), оснащенного капилляром длиной 50 см, заполненным полимером POP-7 и размерными стандартами GeneScan 600 LIZ и 1200 LIZ (Life Technologies, Carlsbad, CA, США). Определение размеров фрагментов выполнялось программным обеспечением GeneMapper v.5 (Life Technologies, Carlsbad, CA, США). Нормализация исходных данных была получена с использованием поправок, полученных в результате генотипирования референтных штаммов *B. abortus* 544 и *B. melitensis* 16М. В панели MLVA-16 не наблюдались отсутствующие аллели.

Данные генотипирования 102 штаммов *Brucella* сравнивались с генотипами MLVA, доступными в базе данных на веб-сайте *Brucella* MLVA (<http://mlva.u-psud.fr/brucella/>). Генетическое разнообразие каждого локуса определяли с использованием индекса разнообразия Хантера и Гастона, определенного в BioNumerics v.7.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Бельгия). Оценки размера полосы были преобразованы в число единиц в наборе символов в программном обеспечении BioNumerics. В анализе кластеризации использовался категорический коэффициент и метод группы невзвешенных пар с использованием алгоритма средних связей (UPGMA). Минимальные охватывающие деревья (MST) были построены с использованием BioNumerics с применением категорических коэффициентов вместе с правилами приоритета дисперсии одиночного и двойного локусов. Bruce 19 был исключен из расчета деревьев MST, поскольку обнаружение редких аллелей изменило номенклатуру этого локуса, тем самым введя двусмысленность.

Результаты исследований и их обсуждение. Фенотипические и молекулярные анализы, проведенные для видов *Brucella*, идентифицировали в панели образцов 64 изолята *B. abortus* (59,6 %), 37 изолятов *B. melitensis* (39,4 %) и 1 изолят *B. suis* (1,0 %). 59 штаммов были изолированы от крупного рогатого скота, 35 – от овец, 3 – от коз, 2 – от верблюдов, 2 – от морской свинки, 1 – от человека. Наконец, для калибровки анализов были включены 2 вакцинных штамма. Профили MLVA-16 референтных штаммов были идентичны профилям в базе данных MLVA.

MLVA-16 идентифицировал все локусы изолятов, и они показаны на рисунке 1.

Анализ кластеризации показал наличие 32 генотипа, таким образом, различая 18 штаммов из 64 изолятов внутри *B. abortus* и 12 штаммов из 37 изолятов в *B. melitensis*. *B. suis* и вакцинный штамм *B. abortus* 104-М продемонстрировали уникальные генотипы, тогда как вакцинный штамм *B. abortus* S19 образовал кластер (GT28) с 3 полевыми изолятами.

Среди изолятов *B. abortus* наиболее распространенным генотипом был GT20, обнаруженный в Алматинской, Акмолинской, Западно-Казахстанской и Восточно-Казахстанской областях. GT20 демонстрирует долгую историю сохранения в Казахстане, поскольку образцы, найденные положительными для этого генотипа, покрывают промежуток времени почти 70 лет (1948-2016). Такое же наблюдение можно сделать и для других распространенных генотипов *B. abortus*, таких как GT1 и GT23, которые были обнаружены как в архивных, так и в последних образцах. Примечательно, что 8 генотипов *B. abortus* (GT6, GT10, GT21, GT23, GT26, GT27, GT30 и GT32) были новыми, в международной базе данных MLVA о них нет данных.

Среди изолятов *B. melitensis* наиболее распространенным генотипом был GT3, обнаруженный в Алматинской, Западно-Казахстанской и Восточно-Казахстанской областях. Этот генотип был идентифицирован у крупного и мелкого рогатого скота. GT3 имеет российское происхождение, поскольку он был идентифицирован в образце российского стада овец в 1953 году.

Еще одним распространенным генотипом был GT18, который был только в Алматинской области. Примечательно, что в этом исследовании впервые были обнаружены 5 генотипов *B. melitensis* (GT18, GT5, GT9, GT14 и GT15), о которых ранее не сообщалось в международной базе данных MLVA.

MLVA-16 использовался для определения мелкомасштабных эпидемиологических отношений. Анализ кластеризации с использованием UPGMA, сгруппировал изоляты *Brucella* в клады с 90 % сходством (рис.1). 64 изолята *B. abortus* были разделены на 12 кладов, тогда как 37 изолята *B. melitensis* принадлежали к 8 кладам; 2 клада в каждом из видов бруцеллы включали 1 изолят, а 16 сгруппированных близко родственных изолятов, соответствовали 27 генотипам.

Для проведения эпидемиологических исследований ветеринары сообщили информа-

цию о контактах между животными посредством торгов, пастбищ, ярмарок или рынков. Эпидемиологическая информация, подтверждающая молекулярные данные, была получена для 2 кластеров в группе *B. abortus*. Первый клад включал 6 штаммов *B. abortus* GT2, выявленных в Западно-Казахстанской области; они были изолированы от хозяйств, расположенных в 3 селах (Мерей, Жангала, Кушумский), принадлежащих к разным районам (Таскалинский, Жангалинский, Зеленовский). Эпидемиологическое расследование показало, что территории сел Кушумский и Мерей граничат друг с другом, а летний выпас – распространенная практика в этой области. Кроме того, крупный рогатый скот из разных деревень собирается возле общего водоема, и на этом участке происходят контакты между животными. Село Жангала находится далеко, в южной части Западно-Казахстанской области – области с высокой распространенностью бруцеллеза. Интересно, что в 2010–2014 годах часть населения этой области стала переезжать в Таскалинский и Зеленовский районы; поэтому можно предположить, что GT2, распространился в результате этого миграционного потока.

Второй клад включал штаммы *B. abortus*, классифицированные как GT23. 4 архивных изолята из Алматинской области принадлежали к этому генотипу (1960-1968 гг.) вместе с 3 образцами, из Восточного Казахстана. Последние происходили из 3 сел: Усть-Каменогорский, Бозанбай и Аблакецкий, расположенных в Уланском районе. Классическая эпидемиология подтвердила результаты молекулярной эпидемиологии: на самом деле села Бозанбай и Аблакецкий расположены по соседству и животные пасутся на одном и том же пастбище «Сандыктас». Село Усть-Каменогорск расположено на расстоянии 60–70 км, и животных пасутся на другом пастбищном угодье «Кызыл-су». Тем не менее, коммерческие потоки животных сообщаются среди ферм этих деревень, и это может объяснить связи молекулярной эпидемиологии. Может произойти передача бруцелл на дальние расстояния, это связано со способностью микроорганизма выживать в течение недель или месяцев в воде, моче, фекалиях, влажной почве, навозе и суспензии при благоприятных условиях (прохладно, темно и влажно).

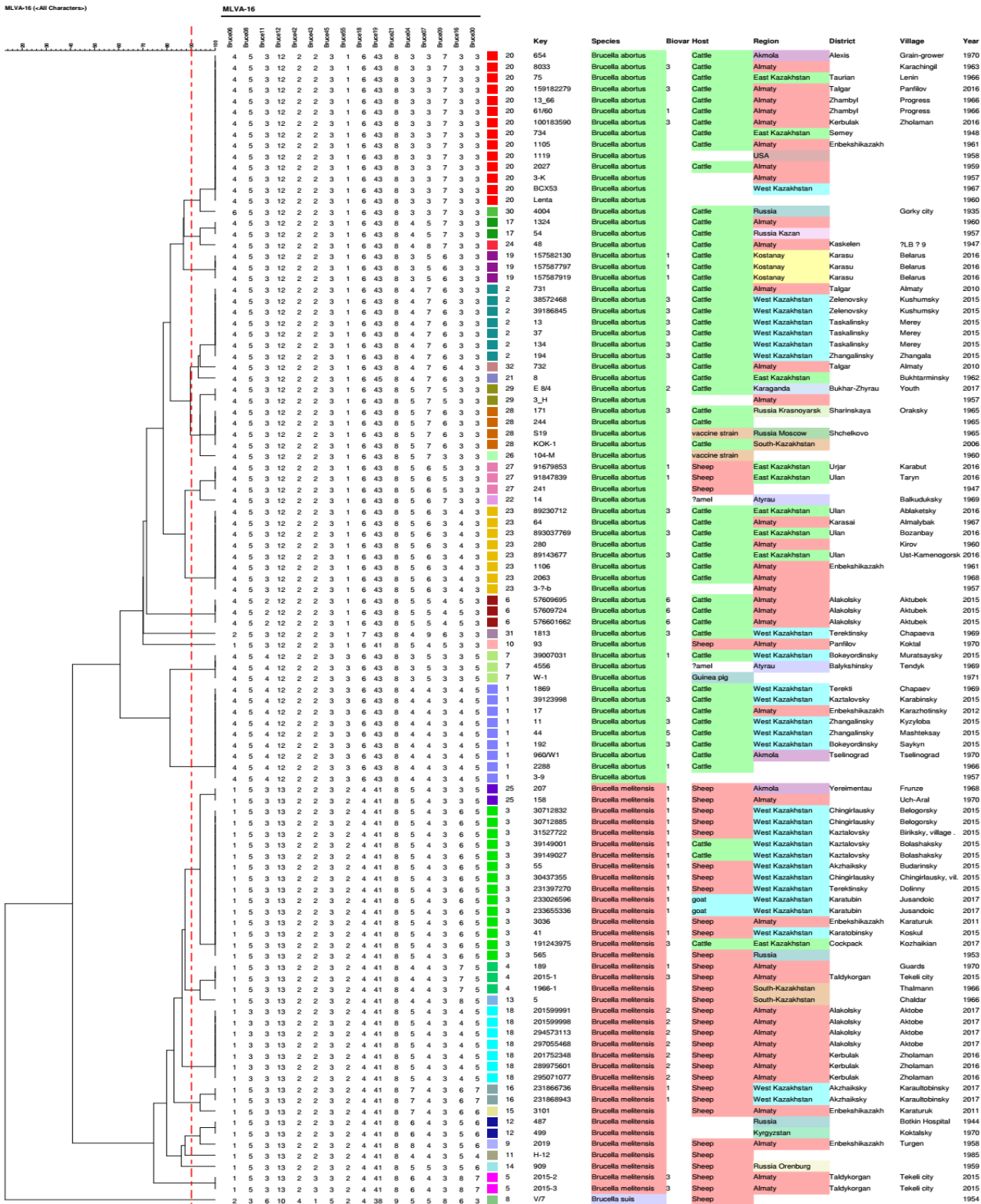


Рисунок 1 – Анализ кластеризации UPGMA из 104 изолятов *Brucella*, соответствующих 32 генотипам

В столбцах представлены следующие данные: генотип, номер животного, виды бруцеллы, биовар, виды хозяев, область, район, село и год сбора. Цветовой код выделяет одинаковые значения в каждом столбце. Пустые ячейки указывают на недоступную информацию.

Наши результаты указывают на возможность передачи бруцеллы соседним стадам из-за неконтролируемой торговли скотом. Важную роль играет отсутствие адекватных мер в отношении биологической безопасности, включая все материально-технические, структурные, управленческие и персональные требования, необходимые для предотвращения проникновения и распространения патогенов среди стад. Действительно, большинство этих ферм могут позволить прямой контакт животных между соседними стадами; это связано с отсутствием надлежащих ограждений и общих пастбищ или мест для питья.

Выводы. В Казахстане бруцеллез все еще оказывает огромное влияние на людей и животных. Неконтролируемая торговля животными считается основным источником заболеваемости стада. Поэтому генетическая дактилоскопия изолированных штаммов может оказать значительное влияние на контроль бруцеллеза и может облегчить идентификацию источников инфекции и трансмиссионных цепей.

В этом исследовании 102 изолята бруцелл из 8 областей Казахстана и соседних стран (Россия, Кыргызстан), были биотипированы с использованием обычных методов. Традиционный сбор данных вспышек имеет важное значение, но отсутствие разрешающей способности, не позволяет точно проводить филогенеографию и не может определить источник инфекций. Фактически, фенотипические методы могут продемонстрировать наличие в панели образцов всего 5 биоваров *B. abortus* и 3 биоваров *B. melitensis*. В текущем исследовании мы стремились определить генетическую структуру популяции *Brucella*, а также оценить, как казахстанские изоляты связаны с генотипами *Brucella* из Евразии и во всем мире с использованием схем типизации MLVA-16. Кроме того, были проведены исследования для связывания мелкомасштабного генетического анализа с помощью MLVA-16 с информацией из классической эпидемиологии.

64 штамма *B. abortus* были классифицированы в группу «Abortus C». 72,7 % штамма принадлежали к генотипу, который распространен в Китае, Италии и Португалии. Генотип, эндемичный в Португалии, Бразилии, Коста-Рике, Китае и Южной Корее, составлял 18,2 % штаммов, а 4,5 % были идентифициро-

ваны как генотип, типичный для Внутренней Монголии и Китая. 2 штамма *B. abortus* имели низкую частоту (1,5 %) распространения и были представлены генотипами, циркулирующими в Казахстане, Сирии и Турции. Единственный российский штамм 1935 года, был новым, не депонированным в международной базе данных.

Штаммы *B. melitensis* были объединены в группу «Восточного Средиземноморья». 75,7 % штаммов были классифицированы как генотип, который распространен в Евразии, Испании, Турции, Португалии и Китае [8]. Интересно, что 18,9 % изолятов *B. melitensis* принадлежали к генотипу, который соответствует изолятам, идентифицированным от людей в Турции. 2 изолята (5,4 %) были включены в генотип, который был обнаружен в Китае [8], Турции, Испании и Франции.

Анализ одного штамма *B. suis*, выделенного от овец, получил генетический профиль, идентифицированный как генотип, который, распространен на разных континентах; однако, отфильтровывая поиск генотипа *B. suis* 6 у крупного рогатого скота и овец, нашли только 11 записей, и это были штаммы из Китая, Внутренней Монголии и Тибета, а также наблюдалась временная близость между ними (1958-1974) и нашим штаммом *B. suis* (1954). Интересно, что все эти штаммы имеют неразличимый генотип MLVA-16 с вакцинным штаммом S2 *B. suis* биовар 1. Этот вывод свидетельствует о том, что вакцинный штамм S2 *B. suis* привел к перекрестной инфекции между свиньями, крупным рогатым скотом и овцами, так как он широко используется в Китае [6].

Анализ MST показал, что казахстанские штаммы *B. abortus* генетически связаны с португальскими, бразильскими и американскими изолятами, что свидетельствует о древнем распространении этих линий, начиная с Европы до Южной Америки, возможно, в колониальный период, и на восток в Турцию и азиатские страны, включая Казахстан и Китай. Эта гипотеза также подтверждается предыдущими результатами, которые привели к гипотезе о том, что Средиземноморская область является плавильным котлом для бруцеллеза. Однако доказательства генетических связей между штаммами из азиатской, европейской и американской областей позволяют предположить, что возбудитель может распространиться в двухстороннем направ-

лении. Фактически, генетическое сходство изолятов *B. abortus* с другими европейскими генотипами (французский, итальянский, греческий) были обнаружены в этом исследовании, что согласуется с результатами Шевцовой и др. [3], которая объяснила это открытие крупномасштабным импортом племенного скота, который начался в начале 20 века из США, Южной Америки и Европы в Казахстан, для улучшения пород крупного рогатого скота. В настоящее время правительство Казахстана инвестирует большие суммы в развитие продукции животноводства с целью превращения Казахстана в крупного экспортера в Россию и соседние страны. Для импорта племенного поголовья были предоставлены крупные субсидии, что привело к увеличению импорта крупного рогатого скота, из США, Германии, Швейцарии и Австрии.

Филогеография показала, что большинство изолятов *B. melitensis* были на 100 % идентичны штаммам, циркулирующим в Китае, в соответствии с результатами, представленными Шевцовым и др. [2]. Распространенность группы *B. melitensis* «Восточного Средиземноморья» в Казахстане и Китае предполагает общее происхождение генотипов из обеих стран, которые распространялись вместе в прошлом со Средиземноморского региона, возможно, по Шелковому пути [10]. Кроме того, в нескольких исследованиях было показано, что *B. melitensis*, вероятно, возник из Средиземноморского региона [7, 9]. Сан и др. [8], проанализировали в MLVA-16, 50 изолятов *B. melitensis*, циркулирующих в Синьцзяне, которые были разделены на 28 генотипов, из которых 10 были связаны с Казахстаном. Можно предположить, что распространение идентичных генотипов в двух странах, вероятно, связано с долгосрочными торговыми отношениями между Китаем и Казахстаном за последние несколько столетий. Следует также учитывать, что торговля скотом была основным платежным инструментом для кочевых народов Казахстана в прошлом [2].

В мелкомасштабном генетическом анализе MLVA-16 идентифицировали 18 генотипов *B. abortus* и 12 генотипов *B. melitensis*, циркулирующих в Казахстане. Анализ кластеров показал конкретные клады и их ассоциированные генотипы появились в разных районах страны, а некоторые кластеры *B. melitensis* демонстрируют региональную локализацию. Следует подчеркнуть, что некото-

рые линии (*B. abortus* GT20; *B. melitensis* GT3) все еще циркулируют, после почти 70 лет ветеринарных усилий по ликвидации бруцеллеза. Одна из причин может быть найдена в неконтролируемой торговле скотом. В текущем исследовании было описано 8 уникальных генотипов *B. abortus* и 5 *B. melitensis*, отличающихся от других генотипов *Brucella*, о которых сообщается в международной базе данных, хотя их профиль MLVA по-прежнему тесно связан с генотипами Казахстана и Китая. Одним из исключений был *B. abortus* GT10, который был идентифицирован в образце овец в Алматинской области в 1970 году. Этот генотип показал аллель с 1 повтором в локусе Bruce 06, способный разделить виды *B. abortus* и *B. melitensis* на два кластера UPGMA анализом, с 4-повторными и 1-повторными аллелями, показывающими видоспецифичность, соответственно. Обращаясь к международной базе данных MLVA, мы обнаружили идентичность со штаммом *B. abortus* от человека в Турции.

В Синьцзяне, одном из крупнейших животноводческих регионов Китая, граничащих с Казахстаном, 9 изолятов *B. abortus* были отсортированы по 9 генотипам MLVA-16, что привело исследователя к предположению, что виды *B. abortus* обладают большим генетическим разнообразием, чем *B. melitensis* [8].

Анализ кластеризации на основе MLVA-16 показал, что 1 полевой штамм (ЮК-1, 2006 г) из Южного Казахстана имел генотип, соответствующий вакцинному штамму S19 *B. abortus*; поэтому в будущем изоляты необходимо исследовать на наличие штамма S19.

Предполагается, что изоляты, принадлежащие к определенному кладу, недавно эволюционировали от общего предка, и поэтому определение кладов может быть полезно для идентификации эпидемиологических связей и для отслеживания маршрутов передачи. Действительно, вариации локусов, кодирующие тандемные повторы, могут быть получены в ходе репликации бактерий в хозяине, распространения в окружающей среде через аборт, адаптации к внешним условиям и последующих инфекций разных субъектов. Исходя из этого, мы попытались поддержать взаимосвязь, наблюдаемую среди изолятов в отдельных кладах, путем проведения эпидемиологических исследований. Отобранные клады группировали родственные изоляты *Brucella*, идентифицированные в разных хо-

зьяйствах той же деревни или из разных деревень в том же районе.

Примечательно, что некоторые вспышки характеризовались множественными генотипами MLVA-16. Например, штаммы *B. melitensis*, выделенные в селе Каратурак (Энбекшиказахский район, Алматинская область), были классифицированы как генотипы GT6 и GT15. Другим аналогичным примером была вспышка в селе Текели (Алматинская область), представленная генотипами *B. melitensis* GT4 и GT5. В деревне Жоламан сообщалось о циркуляции видов *B. abortus* GT21 и *B. melitensis* GT19. Эти данные указывают на не контролируемую торговлю скотом и отсутствие мер биозащиты при возникновении вспышки и распространение бруцеллеза в Казахстане.

В этом исследовании мы сообщаем о генетической характеристике MLVA 102 изолятов *Brucella*, из 8 областей Казахстана, за период более 80 лет. Тем не менее, филогенеография бруцелл как в местном, так и в широком масштабах оказалась сложной, вероятно, из-за широкого распространения зараженных животных через региональные, национальные и международные границы. Важно отметить, что, несмотря на относительно ограниченное количество изолятов и их широкую область распространения, мы смогли в двух случаях найти эпидемиологические связи между вспышками, имеющими один и тот же генетический профиль бруцеллы. Поэтому анализ MLVA оказался подходящим методом для характеристики бактерий и эффективного эпидемиологического анализа, направленного на поддержку конкретных планов контроля и ликвидации бруцеллеза в Казахстане.

Список литературы

1. Daugaliyeva A., Peletto S., Sultanov A., Baranova S., Acutis P.L., Adambaeva A., Tusipkanuly O., Usserbayev B. (2016): Development of a Differential PCR Assay for Detection of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*: an Analytical Approach for Monitoring of *Brucella spp.* in Foods of Animal Origin. *J. Food Qual. Hazards Control*, 3(2): 53–59.
2. Shevtsov A., Ramanculov E., Shevtsova E., Kairzhanova A., Tarlykov P., Filipenko M.,

Dymova M., Abisheva G., Jailbekova A., Kamalova D., Chsherbakov A., Tulegenov S., Akhmetova A., Sytnik I., Karibaev T., Mukanov K. (2015): Genetic diversity of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in Kazakhstan using MLVA-16. *Infect Genet Evol.*, 34: 173–80.

3. Shevtsova E., Shevtsov A., Mukanov K., Filipenko M., Kamalova D., Sytnik I., Syzdykov M., Kuznetsov A., Akhmetova A., Zharova M., Karibaev T., Tarlykov P., Ramanculov E. (2016): Epidemiology of Brucellosis and Genetic Diversity of *Brucella abortus* in Kazakhstan. *PLoS One*, 11(12): e0167496.

4. Borriello G., Peletto S., Lucibelli M.G., Acutis P.L., Ercolini D., Galiero G. (2013): Link between geographical origin and occurrence of *Brucella abortus* biovars in cow and water buffalo herds. *Appl Environ Microbiol.*, 79(3): 1039–43.

5. Garofolo G., Ancora M., Di Giannatale E. (2013a): MLVA-16 loci panel on *Brucella spp.* using multiplex PCR and multicolour capillary electrophoresis. *J Microb Methods*, 92:103–107.

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. (2013): 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*, 8(10):e76332.

7. Kay G.L., Sergeant M.J., Giuffra V., Bandiera P., Milanese M., Bramanti B., Bianucci R., Pallen M.J. (2014): Recovery of a medieval *Brucella melitensis* genome using shotgun metagenomics. *mBio*, 5: e01314–e01337.

8. Sun M.J., Di D.D., Li Y., Zhang Z.C., Yan H., Tian L.L., Jing Z.G., Li J.P., Jiang H., Fan W.X. (2016): Genotyping of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* strains currently circulating in Xinjiang, China. *Infect Genet Evol.*, 44: 522–9.

9. Tan K.K., Tan Y.C., Chang L.Y., Lee K.W., Nore S.S., Yee W.Y., Mat Isa M.N., Jafar F.L., Hoh C.C., AbuBakar S. (2015): Full genome SNP-based phylogenetic analysis reveals the origin and global spread of *Brucella melitensis*. *BMC Genomics*, 16: 93.

10. Wu G., Yang C., Li J., Liu N., Yao W., Zhang R., Lin Z. (2013): Prevalence study of brucellosis among high-risk people in Xinjiang region, China. *Microbiol. Discovery*, 1: 2.