

REPORTS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ISSN 2224-5227

Volume 1, Number 311 (2017), 141 – 150

UDC 577.21.113.151.7.616.99

Y. A. Skiba¹, G. A. Ismagulova, A. P. Chirkin¹, R.E. Zhidkeeva¹, E. R. Maltseva¹,
A.O. Bissenbay¹, D.V. Berezovsky², A. N. Kuznetsov², M. S. Syzdykov², N.A. Aitkhozhina¹

i_gulnara@mail.ru

**MOLECULAR-GENETIC TYPING OF *BRUCELLA* SPP. STRAINS
CIRCULATING IN KAZAKHSTAN FOR THE IMPROVEMENT
OF EPIDEMIOLOGICAL MONITORING OF BRUCELLOSIS
CAUSATIVE AGENTS**

Abstract. There is a requirement in our country for a constant monitoring of epidemiological situation on brucellosis and timely assessment of the effectiveness of anti-epidemic activities, thus *Brucella* spp. isolates collection and genetic profiles databases has been initiated. All the blood culture isolates were obtained via Castaneda method from the blood of people with the symptoms, not excluding brucellosis (possible brucellosis). The absence of contamination by external microflora and isolates' species identity has been confirmed by the analysis of 16S rRNA's nucleotide sequence fragments and PCR (Bruce-ladder) multiplex. The MLVA analysis of 146 *Brucella* spp. isolates with the determination of their digital genetic profiles has been carried out. The loci with the largest index of diversity have been identified and the quantity of allelic variants has been set for each of the studied locus. Loci with the highest and the lowest number of alleles have been determined as well. The results of phylogenetic analysis revealed that all isolates belong to the *Brucella melitensis* type and refer to the East mediterranean (Eastern Mediterranean type) genetic family which significantly predominates over the others in the territory of Kazakhstan.

Keywords: isolates of *Brucella* spp., genomic DNA, molecular-genetic typing, MLVA, phylogenetic tree, alleles, genetic diversity.

УДК 577.21.113.151.7.616.99

Ю.А. Скиба¹, Г.А. Исмагулова¹, А.П. Чиркин¹, Р.Е. Жидкеева¹, Э.Р. Мальцева¹,
А.О. Бисенбай¹, Д.В.Березовский², А.Н.Кузнецов², М.С.Сыздыков, Н.А. Айтхожина¹

¹Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина КН МОН РК, Алматы, ул.
Досмухамедова, 86, e-mail: abiks_y@mail.ru;

²Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева Комитета по защите
прав потребителей МНЭ, Алматы, ул. Капальская, 14

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ
BRUCELLA SPP., ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КАЗАХСТАНЕ
ДЛЯ УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО
МОНИТОРИНГА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БРУЦЕЛЛЕЗА**

Аннотация. Начато создание коллекции и базы данных генетических профилей казахстанских изолятов *Brucella* spp., что является необходимым условием для постоянного контроля эпидемиологической обстановки по бруцеллезу на территории нашей страны и своевременной оценки эффективности проводимых противоэпидемических мероприятий. Все изоляты гемокультуры получали по методу Кастанеда из крови людей с симптомами, не исключаями бруцеллёз (вероятный бруцеллёз). Анализ фрагментов нуклеотидной последовательности 16S rRNA и постановка мультиплексного ПЦР (Bruce-ladder) подтвердили отсутствие контаминации посторонней микрофлорой и видовую идентичность выделенных изолятов. Проведен

MLVA анализ 146-ти изолятов *Brucella* spp. и определены их цифровые генетические профили. Выявлены локусы, имеющие наибольший индекс разнообразия. Для каждого из исследованных локусов установлено количество аллельных вариантов. Определены локусы с наибольшим и наименьшим числом аллелей. Результаты филогенетического анализа показали, что все выделенные изоляты принадлежат виду *Brucella melitensis* и относятся генетическому семейству East mediterranean (Восточно-Средиземноморский тип), значительно преобладающему над другими на территории Казахстана.

Ключевые слова: изоляты *Brucella* spp., геномная ДНК, молекулярно-генетическое типирование, MLVA, филогенетическое древо, аллели, генетическое разнообразие.

Введение. Бруцеллез является одной из наиболее сложных и, в то же время, опасных для людей антропозоонозных инфекционных болезней. Поражает практически все виды сельскохозяйственных, многие виды диких животных и человека.

Среди постсоветских республик по заболеваемости бруцеллезом Казахстан занимает печальное второе место после Кыргызстана. В последние годы в нашей стране регистрируется ежегодно 2500–3500 случаев заболевания людей. Не все заболевшие обращаются за медицинской помощью, у многих бруцеллез протекает под другим диагнозом, поэтому реальное число больных бруцеллезом значительно выше. У 20–60 процентов болезнь переходит в хроническую форму, а 13% становятся инвалидами на всю жизнь – ежегодно это более 300 человек! Наиболее неблагоприятные регионы по бруцеллезу в нашей стране - это Алматинская, Южно-Казахстанская, Жамбылская, Кызылординская и Восточно-Казахстанская области (85% от всех случаев).

Широкое распространение бруцеллёза среди населения Республики Казахстан обуславливает ряд эпидемиологических особенностей данной инфекции: высокая заболеваемость детского населения (в отличие от большинства других стран, где бруцеллёз является преимущественно профессиональным заболеванием), более частая встречаемость нетипичных путей инфицирования (воздушно-пылевой), большое количество тяжёлых и осложнённых форм.

Одним из наиболее надежных способов предупреждения энзоотий и ликвидации очагов бруцеллеза является эффективная диагностика инфекции, основанная на современных молекулярно-генетических методах выявления и дифференциации возбудителей бруцеллеза [1, 2].

Современные методы исследования позволяют не только определить наличие возбудителя бруцеллеза, но и идентифицировать его происхождение: индийская, казахстанская или аргентинская бруцелла является источником заражения.

В настоящее время для детекции и идентификации бруцелл и лабораторного подтверждения диагноза используются молекулярно-генетические методы на основе ПЦР технологии. Этот подход позволяет в короткие сроки определить наличие ДНК бруцелл в пробах как клинического, так и полевого материала, проводить не только родовую и видовую идентификацию, но и штаммовую дифференциацию на основе данных о нуклеотидных последовательностях полных геномов патогенных видов бруцелл [3, 4].

Определение видов и биоваров бруцелл на конкретных территориях и в очагах инфекции имеет важное эпидемиологическое значение с точки зрения классификации очагов, оценки степени напряженности эпизоотического процессов, установления фактов миграции бруцелл с одного вида животных на другой [5].

Цель исследований - проведение генетического типирования и дифференциация циркулирующих в Казахстане штаммов возбудителей бруцеллеза, выделенных из крови больных животных и человека.

Результаты и их обсуждение

Объектом нашего исследования служили изоляты *Brucella* spp., выделенные из образцов патологического материала больных животных и человека из Южно-Казахстанской, Алматинской, Актюбинской, Акмолинской, Восточно-Казахстанской, Западно-Казахстанской, Атырауской, Павлодарской, Карагандинской и Кызылординской областей Республики Казахстан.

Чистые культуры выделяли из крови больных животных и человека, собранных в полевых условиях в вакуумные пробирки (вакутейнеры) с антикоагулянтом ЭДТА и транспортировали в лабораторию на холоде. Патологический материал высевали на селекционные среды - печеночный

агар с добавлением 3% глицерина и 1% глюкозы или печеночный агар по Хеддльсону. При исследовании материала, содержащего постороннюю микрофлору, в расплавленную охлажденную среду добавляли водный раствор генцианвиолета в соотношении 1:200 000.

Идентификацию выделенных культур проводили определением потребности в углекислом газе, образованием сероводорода, роста в средах с красителями [6, 7]. Культуры бруцелл хранили в 10%-ном растворе глицерина при -90°C.

Геномную ДНК *Brucella sp.* выделяли из колоний с помощью коммерческих наборов Qiagen 250 и Qiagen 50 (QIAGEN, США) по протоколу фирмы-производителя.

MLVA типирование осуществляли по 16 переменным локусам: Bruce04, Bruce06, Bruce07, Bruce08, Bruce09, Bruce11, Bruce12, Bruce16, Bruce18, Bruce19, Bruce21, Bruce30, Bruce42, Bruce43, Bruce45 и Bruce55. Прямые и обратные праймеры для всех 16 локусов синтезировали на приборе ASM 800 фирмы Биоссет (Россия) фосфоимидным методом в соответствии с методическим руководством Р. Le Fleche [8, 9]. Последовательности использованных в работе праймеров представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Олигонуклеотидные праймеры, использованные в исследовании

Название	Последовательность 3'→5'
Bruce04-F	CTGACGAAGGGAAGGCAATAAG
Bruce04-R	CGATCTGGAGATTATCGGGAAG
Bruce06-F	ATGGGATGTGGTAGGGTAATCG
Bruce06-R	GCGTGACAATCGACTTTTTGTC
Bruce07-F	GCTGACGGGAAGAACATCTAT
Bruce07-R	ACCCTTTTTTCAGTCAAGGCAAA
Bruce08-F	ATTATTTCGAGGCTCGTGATTTC
Bruce08-R	ACAGAAGGTTTTCCAGCTCGTC
Bruce09-F	GCGGATTCGTTCTTCAGTTATC
Bruce09-R	GGGAGTATGTTTTGGTTGTACATAG
Bruce11-F	CTGTTGATCTGACCTTGCAACC
Bruce11-R	CCAGACAACAACCTACGTCCTG
Bruce12-F	CGGTAAATCAATTGTCCCATGA
Bruce12-R	GCCCAAGTTCAACAGGAGTTTC
Bruce16-F	ACGGGAGTTTTTGTGCTCAAT
Bruce16-R	GGCCATGTTCCGTTGATTAT
Bruce18-F	TATGTTAGGGCAATAGGGCAGT
Bruce18-R	GATGGTTGAGAGCATTGTGAAG
Bruce19-F	GACGACCCGGACCATGTCT
Bruce19-R	ACTTCACCGTAACGTCGTGGAT
Bruce21-F	CTCATGCGCAACCAAAAACA
Bruce21-R	GATCTCGTGGTCGATAATCTCATT
Bruce30-F	TGACCGCAAAAACCATATCCTTC
Bruce30-R	TATGTGCAGAGCTTCATGTTTCG
Bruce42-F	CATCGCCTCAACTATACCGTCA
Bruce42-R	ACCGCAAAAATTTACGCATCG
Bruce43-F	TCTCAAGCCCGATATGGAGAAT
Bruce43-R	TATTTTCCGCTGCCCATAAAC
Bruce45-F	ATCCTTGCCTCTCCCTACCAG
Bruce45-R	CGGGTAAATATCAATGGCTTGG
Bruce55-F	TCAGGCTGTTTCGTCATGTCTT
Bruce55-R	AATCTGGCGTTCGAGTTGTCT

ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 2 мМ 10X HotTaq-буфер, 2,5 мМ MgCl₂, 5% DMSO, 0,2 мМ каждого из dNTP, прямой и обратный праймеры, 1 ед. HotTaq-полимеразы (Силекс, Россия) и от 1 до 10 нг ДНК изолята на амплификаторе Mastercycler ep gradient S (Eppendorf, Германия) по следующей схеме: начальная денатурация 94°C 5 мин - 1 цикл; 94°C 30 с, 60°C 30 с, 72°C 60 с - 30 циклов и последняя элонгация 72°C в течение 5 минут [10]. В качестве положительных контролей использовали по 10 нг ДНК референтных штаммов бруцелл (16М и *B. suis*).

Анализ продуктов ПЦР осуществляли электрофорезом в 3% агарозном геле в трис-боратном буфере (89мМ борной кислоты, 2мМ ЭДТА, рН 8.0) в течение 240 мин при 100В. Результаты электрофоретического разделения ампликонов обрабатывали при помощи гель-документирующей системы GelDoc в проходящем ультрафиолетовом свете при длине волны от 260 до 360 нм и программного обеспечения Quantity One (Bio-Rad, США) [11]. Соответствие размеров полученных ПЦР фрагментов числу содержащихся в них повторов устанавливали по стандартной отработанной схеме [12]. Генотип каждого штамма отображали как набор из 16-х цифр, где каждая цифра 16-значного номера соответствует числу копий соответствующего tandemного повтора.

Оценку дискриминирующей способности MLVA анализа и аллельного разнообразия проводили на основании индекса Хантера – Гастона (HGDI) по (формуле 1).

$$D = 1 - \frac{\sum_{j=1}^s nj (nj - 1)}{N (N - 1)} \quad (1)$$

где N - это общее число штаммов в типизируемой выборке, s - это число штаммов другого типа, а nj - это число штаммов, принадлежащих к j – типу [12].

Статистическую обработку результатов проводили программным пакетом Excel (Microsoft Corporation) и Bionumerics (Applied Math, Belgium). Филогенетический анализ с последующей визуализацией полученных данных, а также идентификацию штаммов и генетических семейств, к которым они принадлежат, проводили при помощи онлайн базы данных *BrucellaMLVA* database, содержащей MLVA профили бактерий, идентифицированных в различных странах мира. Кластерный анализ с построением дерева филогенетического родства проводили с использованием критерия UPGMA.

Результаты исследований

За период наблюдения с 1999г. по 2014г. в Республике Казахстан было зарегистрировано 36174 случаев впервые диагностированного бруцеллёза человека (рисунок 1). Ежегодные уровни регистрации случаев впервые диагностированного бруцеллёза колебались от 1443, 1443 (2013, 2014 гг.) до 3596 случаев (2004 г.) с медианой официально зарегистрированных случаев 2187.5 (95% ДИ: 1836, 2577).

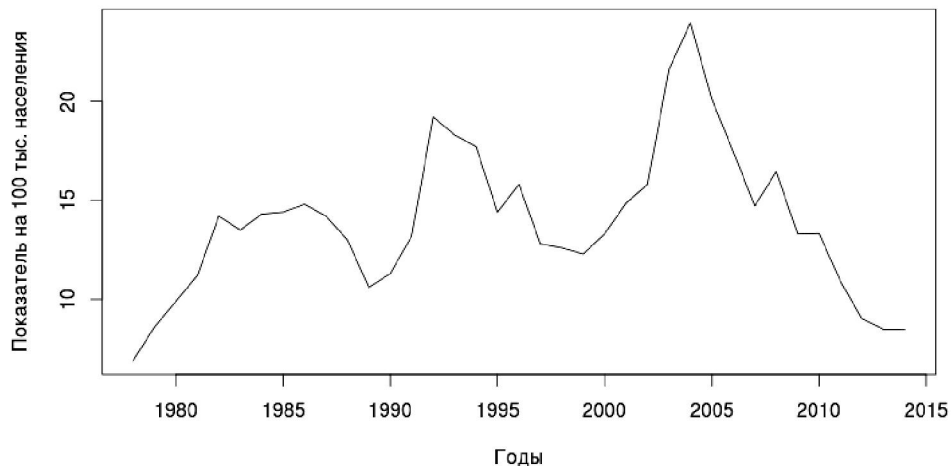


Рисунок 1 - Динамика многолетней заболеваемости, впервые диагностированным бруцеллёзом людей (1978 — 2014 гг.)

В свободной среде R версии 3.2.0 был проведён анализ многолетней заболеваемости впервые диагностированным бруцеллёзом людей за период с 1978 по 2014гг. Несмотря на значительные колебания ежегодных регистрируемых уровней заболеваемости, впервые диагностированным бруцеллёзом в многолетней динамике (1978-2014 гг.), за последние 10 лет отмечается её снижение: абсолютное снижение заболеваемости составило - 11.0945, среднее абсолютное снижение заболеваемости составило - 1.23273, темп снижения заболеваемости составил - 59.1133%, среднегодовой

темп уменьшения заболеваемости составил - 8.39161%, что соответствует выраженной тенденции снижения ($p < 0,01$).

Высокие показатели заболеваемости бруцеллёзом людей и поражённости сельскохозяйственных животных были географически сгруппированы на юго-западе в течение всего периода исследования, хотя и наблюдалось снижение в человеческих кластерах в более поздних годах. Однако не ясно, отражает ли это улучшающуюся эпидемическую ситуацию или это - результат различий сбора данных в разные годы. Следовательно можно предположить, что уровень заболеваемости в человеческой популяции тесно связан с таковыми у животных.

Нами была создана коллекция клинических изолятов бруцелл, циркулирующих в различных регионах Казахстана, выделенных от людей и сельскохозяйственных животных, всего 94 образцов.

Выделение изолятов бруцелл осуществлялось из цельной крови серопозитивных к бруцеллёзному антигену пациентов (РА 1 : 200 и выше) и положительно реагирующих в Роз-Бенгал тесте сельскохозяйственных животных, по методу Кастанеда.

Отобранные культуры были подвергнуты межвидовой дифференциации по отношению к избыточному содержанию углекислоты в воздухе, способности к образованию сероводорода, редуцирующей активности в отношении красителей (тионин, основной фуксин), агглютинация моноспецифическими бруцеллёзными сыворотками (anti-abortionus, anti-melitensis) и чувствительности к бруцеллёзному бактериофагу Тб. В результате были выявлены образцы, имеющие характерные для бруцелл культуральные и морфологические признаки. Все отобранные изоляты относились к виду *Brucella melitensis*, преимущественно 1 и 3 биоваров, что также подтверждено анализом фрагментов нуклеотидной последовательности 16S rRNA.

Для детальной оценки генетического разнообразия казахстанской популяции *Brucella sp.* нами был выбран метод MLVA-типирования по 16 переменным локусам. Этот метод обладает отличной воспроизводимостью и удобством проведения, а полученные результаты легко интерпретируются и могут быть выражены в виде набора чисел, что позволяет проводить анализ полученных молекулярно-генетических профилей в мировых базах данных, таких как *BrucellaMLVAdatabase*.

На рисунке 2 представлен пример результатов электрофоретического разделения в 3%-ном агарозном геле продуктов амплификации по локусу Bruce04 и Bruce55.

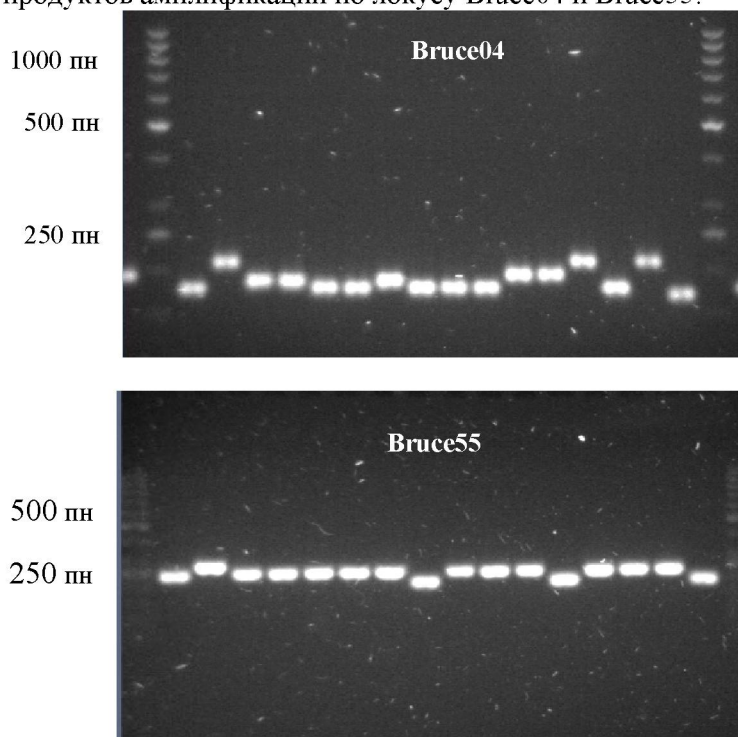


Рисунок 2 - Пример результатов электрофоретического разделения продуктов амплификации по локусу Bruce04 и Bruce55

Анализ дискриминирующей способности VNTR по 16 локусам проведен на основе цифровых генетических профилей всех 96-ти исследованных изолятов *Brucella sp.* Оценку соответствия размеров полученных ПЦР фрагментов числу содержащихся в них повторов проводили согласно опубликованным протоколам [16]. Генотип каждого штамма отображали как набор из 16-х цифр, где каждая цифра 16-значного номера соответствует числу копий соответствующего тандемного повтора (рисунок 3).

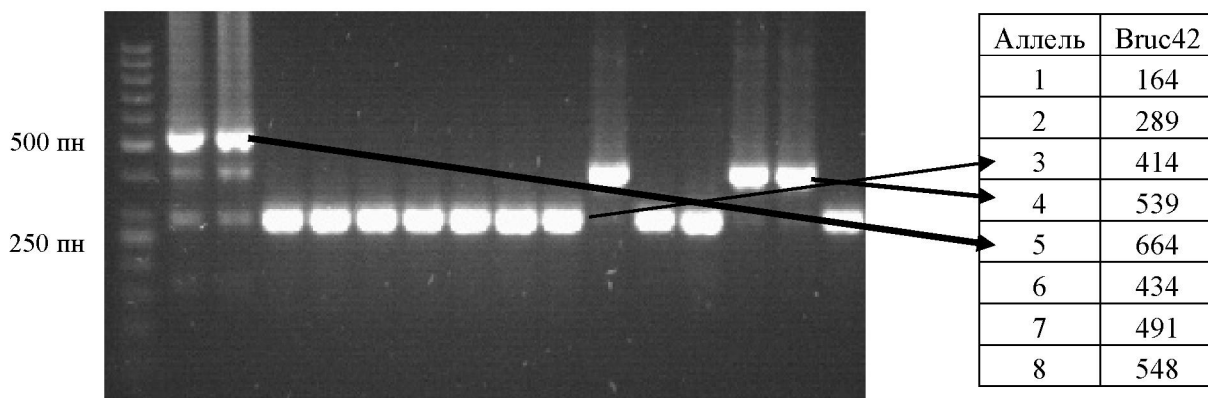


Рисунок 3 - Перевод экспериментальных данных в цифровой код

Выявленные аллельные варианты и значения дискриминирующего индекса Хантера-Гастона (HGI) для каждого проанализированного локуса представлены в таблице 2.

Значения HGI всех VNTR-локусов заметно отличались друг от друга. Наибольший индекс разнообразия в данном исследовании был отмечен для Bruc16 (0,752), Bruc04 (0,571) и Bruc30 (0,459). Количество выявленных аллелей для каждого из проанализированных локусов также варьировало от 2-х (локусы Bruc12, Bruc42, Bruc45, Bruc55, Bruc18) до 7-ми у Bruc16. Три аллельных варианта установлены для локусов Bruc06, Bruc08, Bruc11, Bruc43, Bruc19, Bruc21 и Bruc09. При амплификации ДНК изолятов бруцелл идентифицированы установлены 6 аллельных варианта для локуса Bruc04, 4 для Bruc07 и для локуса Bruc30 выявлено 5 аллельных вариантов.

Таблица 2 - Аллельное разнообразие 16-ти варибельных локусов для 96 казахстанских штаммов *Brucella sp.*

Локус	Альтернативное название	Число выявленных типов	Дискриминирующий индекс	Доверительный интервал (95% CI)
Bruc06	BRU1322	3	0.041	[0.0 - 0.098]
Bruc08	BRU1134	3	0.245	[0.135 - 0.356]
Bruc11	BRU211	3	0.041	[0.0 - 0.098]
Bruc12	BRU73	2	0.021	[0.0 - 0.061]
Bruc42	BRU424	2	0.041	[0.0 - 0.097]
Bruc43	BRU379	3	0.138	[0.045 - 0.231]
Bruc45	BRU233	2	0.021	[0.0 - 0.061]
Bruc55	BRU2066	2	0.021	[0.0 - 0.061]
Bruc18	BRU339	2	0.021	[0.0 - 0.061]
Bruc19	BRU324	3	0.041	[0.0 - 0.098]
Bruc21	BRU329	3	0.041	[0.0 - 0.098]
Bruc04	BRU1543	6	0.571	[0.47 - 0.672]
Bruc07	BRU1250	4	0.261	[0.15 - 0.373]
Bruc09	BRU588	3	0.041	[0.0 - 0.098]
Bruc16	BRU548	7	0.752	[0.707 - 0.796]
Bruc30	BRU1505	5	0.459	[0.355 - 0.564]

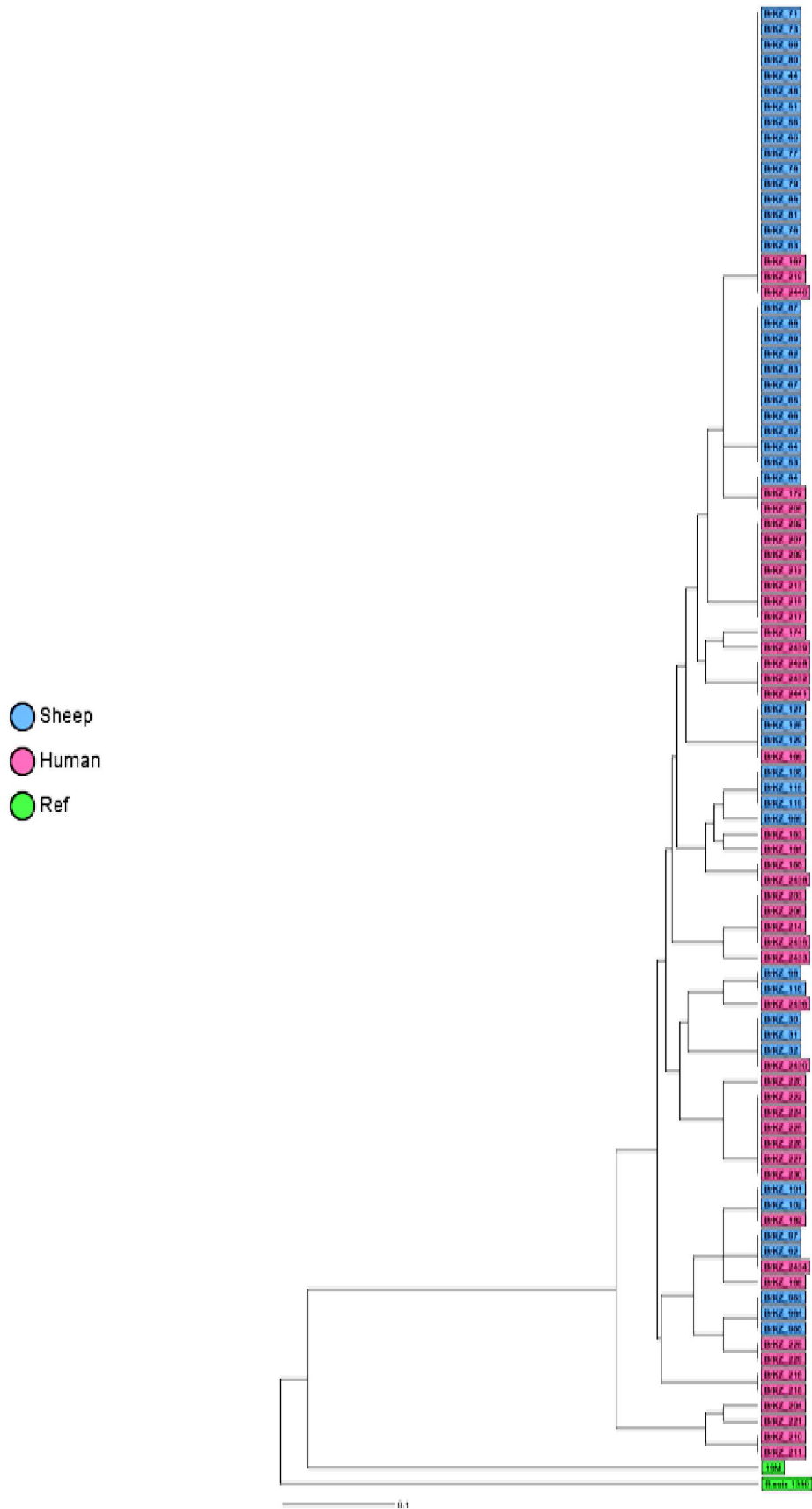


Рисунок 3 – Филогенетическое древо, построенное на основе результатов MLVA типирования 96 штаммов *Brucella sp.* по 16 локусам

Полученные в ходе исследования генетических профилей по 16 вариабельным локусам были обработаны при помощи международной базы данных *Brucella*MLVAdatabase и проведен филогенетический анализ выявленных генотипов с использованием метода UPGMA (рисунок 3).

По результатам филогенетического анализа было установлено, что все 94 изолята, выделенные как от животных, так и от людей, принадлежат виду *Brucella melitensis* и относятся генетическому семейству East mediterranean (Восточно-Средиземноморский тип) и, следовательно, на территории Казахстана это генетическое семейство значительно преобладает над другими.

В результате кластерного анализа 96 генетических профилей, в т.ч. 2 референтных изолята, были сгруппированы в 17 кластеров, включающих более одного изолята, и установлен 31 тип профилей. Выявлено, что отдельные генотипы, характерные одновременно и для ветеринарных и для «человеческих» бруцелл, образуют относительно крупные кластеры на ветвях филогенетического древа. При этом анализ географического распределения этих изолятов не показал большой плотности и сосредоточения в каком либо месте. Уровень кластеризации для изучаемой выборки составил 0.677. Было установлено, что наибольший кластер, состоящий из 19 идентичных генотипов (153132232441854345), также образован изолятами, выделенными как от животных, так и от человека. Это может свидетельствовать о широкой диссеминации отдельных «успешных» генотипов, которые по каким-то причинам имеют преимущества над остальными. Вероятно, что эти случаи могут иметь эпидемиологические связи, что найдет подтверждение при увеличении выборки в исследовании. Не смотря на это, полученные нами результаты наглядно демонстрируют возможность применения метода MLVA16 для успешного решения ряда эпидемиологических задач.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Желудков М.М., Кулаков Ю.К., Алексеева Н.В. ПЦР в диагностике бруцеллеза. Уч. пособие. ПЦР и ее применение в бактериологии. М. - 2006. - С.46-53.
- [2] Bricker B.J, Ewalt D.R., MacMillan A.P., Foster O., Brew S. Related Articles, Nucleotide Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals // J. Clin. Microbiol. - 2000. - V.38, № 3. -P.1258-1262.
- [3] Ramiisse V., Houssu P., Hernandez E. et al. Variable number of tandem repeats in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* for typing purposes. // J. Clin. Microbiol. - 2004. - V. 42. - P. 5722–5730.
- [4] Urwin R., Maiden, M. C. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. // Trends Microbiol. - 2003. - V. 11. - P. 479–487.
- [5] Профилактика и борьба с болезнями, общими для человека и животных: Сборник санитарных и ветеринарных правил. - М.: Инф.-изд.центр Госкомсанэпиднадзора России, 1996. - 256 с.
- [6] Мазик М.М., Кожемякин А.К. Лабораторная диагностика бруцеллеза у людей: инструкция 4.2. 10-19-65.- Республика Беларусь, 2005.
- [7] Шубина Е.А. Бруцеллез крупного рогатого скота: диагностика и специфическая профилактика // БИО. - 2011.- № 10.- С. 65.
- [8] Техническое руководство и инструкция по эксплуатации синтезатора олигонуклеотидов ASN800. / ТОО «Бюссет». – Новосибирск, 2002. 40с.
- [9] Le Fleche P., Jacques I., Grayon M. et al. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. // BMC Microbiol. – 2006. – V. 6. – P.9-22.
- [10] Del Vecchio. Molecular genotyping of *Brucella* I Del Vecchio // V.G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2002. - V.99. - P.443-448.
- [11] Maniatis
- [12] Hunter P. R. and Gaston M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. // J. Clin. Microbiol. - 1988. - V. 26. – P. 2465 – 2466.

Ю.А. Скиба¹, Г.А. Исмагулова¹, А.П. Чиркин¹, Р.Е. Жидкеева¹, Э.Р.Мальцева¹,
А.О. Бисенбай¹, Д.В.Березовский², А.Н.Кузнецов², М.С.Сыздыков², Н.А. Айтхожина¹

**БРУЦЕЛЛЕЗ ҚОЗДЫРУШЫЛАРЫНЫҢ ЭПИДЕМИОЛОГИЯЛЫҚ БАҚЫЛАУЫН ЖЕТІЛДІРУГЕ
АРНАЛҒАН ҚАЗАҚСТАН АУМАҒЫНДА АЙНАЛЫМДА ЖҮРГЕН *BRUCELLA* SPP
ШТАММДАРЫНЫҢ МОЛЕКУЛАЛЫҚ-ГЕНЕТИКАЛЫҚ ТИПТЕЛУІ**

Аннотация. Біздің елімізде бруцеллез бойынша эпидемиологиялық жағдай бойынша тұрақты мониторинг және эпидемияға қарсы шаралардың тиімділігін бағалауына қажет қазақстандық *Brucella* spp. изоляттарының коллекциясы мен генетикалық профилдерінің дерекқорларын құруы басталды. Барлық қан жасушаларының изоляттары ықтимал бруцеллез белгілері бар адамдардың қанынан Кастанеда әдісімен алынды. *16S rRNA*-дің нуклеотидті тізбек фрагменттерінің талдауы мен мультиплексті ПТР (Bruce-ladder) алынған изоляттардың бөгде микрофлорамен ластануының жоқтығын және түр-тұқым сәйкестігін дәлелдеді. *Brucella* spp. 146 изоляттарының MLVA талдауы өткізіліп олардың сандық генетикалық профилдері анықталды. Ең ірі алуантүрлілік индексі бар локустар анықталды. Зерттелген локустардың әрқайсысына аллельдік нұсқаларының саны яғни ең жоғары және ең төмен аллельдік саны бар локустар анықталды. Филогенетикалық талдау нәтижесінде, барлық алынған изоляттар *Brucella melitensis* түріне және Қазақстан территориясында басқа түрлерден басым келетін East mediterranean (Шығыс-Орталықдік тип) туысына жататыны анықталды.

Тірек сөздер. *Brucella* spp. изоляттары, геномдық ДНҚ, молекулалық-генетикалық типтеу, MLVA, филогенетикалық ағашы, аллельдер, генетикалық алуантүрлік.