

УДК 579.841.93:579.253:577.21.08

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ БАКТЕРИИ РОДА BRUCELLA, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН**© С. О. Садикалиева*, В. М. Строчков, М. Б. Орынбаев, К. А. Шораева, Б. А. Еспембетов, А. Р. Сансызбай, К. Т. Султанкулова***Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности
Республика Казахстан, п.г.т. Гвардейский.***Email: ribsp@biosafety.kz*

*В данной работе представлены результаты работ по молекулярно-генетическому типированию бактерии рода *Brucella*, циркулирующих в Республике Казахстан, с использованием метода *MLVA*, основанного на анализе локусных вариабельных тандемных повторов возбудителя. В результате проведенных исследований было установлено, что казахстанские штаммы бактерии рода *Brucella* образуют два отдельных кластера. К первому кластеру отнеслись штаммы *Brucella abortus* (*B. abortus*) 0036/X, 0037/X, *Alakol 1* и *Alakol 2*, выделенные в Южно-Казахстанской области и в Талдыкорганском регионе Алматинской области в 2012–2013 гг. Данные штаммы показали принадлежность к 1 биовару *B. abortus*. Второй кластер образовали штаммы 3 биовара *B. abortus* 0001/H, 0002/H, выделенные в Жамбылской области, 0006/B, 0007/B, 0008/B, выделенные в Алматинской области, 0038/X, 0009/X, выделенные в Южно-Казахстанской области, 0047/T, выделенный в Северо-Казахстанской области, 0050/F, выделенный в Восточно-Казахстанской области, и 0046/E, выделенный в Атырауской области.*

Ключевые слова: бактерии рода *Brucella*, бруцеллез, *MLVA*, ПЦР, локусы, мультиплексные реакции.

Введение

Бруцеллез относится к наиболее распространенным и опасным заболеваниям, наносящих большой экономический ущерб животноводству. Полная ликвидация бруцеллеза является актуальной задачей, стоящей перед отраслью медицины и ветеринарии. Сложность этой проблемы обусловливается рядом особенностей биологии возбудителя этого заболевания [1, 2].

Распространенность бруцеллезной инфекции не одинакова по регионам, его регистрируют в основном в животноводческих районах. Наиболее широко бруцеллез распространен в странах Средиземноморья, Малой Азии, Юга и Юго-Восточной Азии, Африки, Центральной и Южной Америки, в том числе и в Казахстане [3, 4].

В системе мероприятий по контролю и борьбе с бруцеллезом важное значение имеет своевременное выявление источника инфекции, выделение, идентификация и дифференциация возбудителя заболевания.

Бруцеллы не обладают строгой специфичностью к основному хозяину и способны поражать эволюционно далеко стоящие виды животных. Эта их способность имеет большое эпидемическое значение при переходе самого патогенного для человека вида бруцелл с мелкого на крупный рогатый скот и другие виды животных. При этом необходимо идентифицировать эпидемически опасные штаммы, характеризующиеся повышенной вирулентностью и персистенцией в организме хозяина.

В Республике Казахстан, несмотря на проводимые противоэпидемические и противоэпизоотические, санитарно-гигиенические и профилактические

мероприятия заболеваемость бруцеллезом не теряет свою актуальность.

Изоляты различных видов бруцелл, выделяемые в регионах Казахстана, характеризуют в основном фенотипическими методами, не позволяющими выявлять их внутривидовые особенности и связывать с территориями эпидемиологического неблагополучия по бруцеллезу. Решение этой проблемы видится в использовании современных методов молекулярно-генетического типирования изолятов бруцелл. Молекулярно-генетическая характеристика изолятов бруцелл, выделяемых от различных природных хозяев, позволяет получать новые данные о генетическом родстве и разнообразии разных родов бруцелл, систематизировать возбудителей бруцеллеза в каталоги, сравнивать с существующими международными базами данных, что в итоге приводит к совершенствованию системы эпидемиологического надзора за бруцеллезной инфекцией в нашей стране.

Благодаря внедрению в практику молекулярно-генетических методов стало возможным проводить не только родовую и видовую идентификацию с помощью ПЦР, но и дифференциацию штаммов с использованием метода *MLVA*, основанного на анализе локусных вариабельных тандемных повторов возбудителя [5–8].

MLVA позволяет проводить определение видовой, подвидовой, биоварной и очаговой принадлежности штаммов *B. abortus*. При этом метод мультилокусного анализа обеспечивает различие между штаммами и кластеризацию штаммов по очаговой приуроченности.

Исходя из вышеперечисленных фактов, целью данной работы являлось проведение молекулярно-

генетического типирования штаммов бактерии рода *Brucella*, циркулирующих в Республике Казахстан.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. Объектом для исследований являлись 14 штаммов бактерии *B. abortus* выделенные из цельной крови, серопозитивных на

бруцеллез Крупного рогатого скота (КРС), из различных областей Республики Казахстан (табл. 1).

Выделение бактериальной ДНК. Выделение бактериальной ДНК проведен с использованием коммерческого набора "PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent" фирмы Applied Biosystems, согласно протоколу производителя.

Таблица 1

Штаммы бактерии рода <i>Brucella</i>				
№	Наименование штамма	Регионы	Объект выделения	Год выделения
1	<i>Brucella abortus</i> 0001/H	Жамбылская область	Патологический материал КРС	2012
2	<i>Brucella abortus</i> 0002/H			2012
3	<i>Brucella abortus</i> 0006/B			2012
4	<i>Brucella abortus</i> 0007/B	Алматинская область	КРС, кровь	2012
5	<i>Brucella abortus</i> 0008/B			2012
6	<i>Brucella abortus</i> 0009/X			2012
7	<i>Brucella abortus</i> 0036/X	Южно-Казахстанская область	КРС, кровь	2012
8	<i>Brucella abortus</i> 0037/X			2012
9	<i>Brucella abortus</i> 0038/X			2012
10	<i>Brucella abortus</i> Alakol 1	Алматинская область, Талдыкорганский регион	КРС, кровь	2013
11	<i>Brucella abortus</i> Alakol 2			2013
12	<i>Brucella abortus</i> 0046/E	Атырауская область	КРС, кровь	2013
13	<i>Brucella abortus</i> 0047/T	Северо-Казахстанская область	КРС, кровь	2013
14	<i>Brucella abortus</i> 0050/F	Восточно-казахстанская область, Зайсанский район	КРС, кровь	2013

Таблица 2

Олигонуклеотидные праймеры для наработки переменных локусов		
Наименование	Последовательность праймера	Размер продукта (п.н)
Bruce 30F	PET-TGACCGCAAAACCATATCCTTC	119–199
Bruce 30R	TATGTGCAGAGCTTCATGTTTCG	
Bruce 08F	PET-ATTATTCGCAGGCTCGTGATTC	312–384
Bruce 08R	ACAGAAGGTTTTCCAGCTCGTC	
Bruce 11F	6FAM-CTGTTGATCTGACCTTGCAACC	257–1076
Bruce 11R	CCAGACAACAACCTACGTCCTG	
Bruce 45F	6FAM-ATCCTTGCCCTCTCCCTACCAG	133–187
Bruce 45R	CGGGTAAATATCAATGGCTTGG	
Bruce 19F	NED-GACGACCCGGACCATGTCT	76–202
Bruce 19R	ACTTCACCGTAACGTCGTGGAT	
Bruce 06F	NED-GATTGCGGAACGTCTGAACT	140–542
Bruce 06R	TAACCGCCTTCCACATAATCG	
Bruce 42F	VIC-CATCGCCTCAACTATACCGTCA	164–914
Bruce 42R	ACCGCAAAATTTACGCATCG	
Bruce 12F	NED-CGGTAAATCAATTGTCCCATGA	302–452
Bruce 12R	GCCCAAGTTCAACAGGAGTTTC	
Bruce 18F	PET-TATGTTAGGGCAATAGGGCAGT	130–186
Bruce 18R	GATGGTTGAGAGCATTGTGAAG	
Bruce 55F	PET-TCAGGCTGTTTCGTCATGTCTT	193–553
Bruce 55R	AATCTGGCGTTCGAGTTGTCT	
Bruce 21F	6FAM-CTCATGCGCAACCAAAACA	140–175
Bruce 21R	GTGGATACGCTCATTCTCGTTG	
Bruce 04F	VIC-CTGACGAAGGGAAGGCAATAAG	144–360
Bruce 04R	TGGTTTTTCGCAATATCAACA	
Bruce 07F	NED-GCTGACGGGAAGAACATCTAT	134–246
Bruce 07R	ACCCTTTTTTCAGTCAAGGCAAA	
Bruce 09F	VIC-GCGGATTCGTTCTTCAGTTATC	124–292
Bruce 09R	GGGAGTATGTTTTGGTTGTACATAG	
Bruce 43F	6FAM-TCTCAAGCCCGATATGGAGAAT	170–194
Bruce 43R	TATTTTCCGCCTGCCATAAAC	
Bruce 16F	6FAM-ACGGGAGTTTTTGTGTCTCAAT	144–270
Bruce 16R	GGCCATATCCTTCCGCAATA	

MLVA. Для проведения MLVA из базы данных о тандемных повторах были выбраны праймеры, фланкирующие 16 вариабельных локусов I и II хромосомы бруцелл.

Для упрощения и ускорения анализа MLVA были использованы 3 мультиплексных ПЦР.

Таблица 3

Комбинации праймеров для мультиплексных реакции

Мультиплексные реакции	Локусы
CE1	bruce 30, bruce 08, bruce 11, bruce 45, bruce 19, bruce 06, bruce 42
CE2	bruce 12, bruce 18, bruce 55, bruce 21, bruce 04
CE3	bruce 07, bruce 09, bruce 43, bruce 16

ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 1x ПЦР буфер, по 0.8 mM каждого праймера, 0.04 ед. Taq-ДНК полимеразы, ДНК образца и деионизированной вода (свободная от ДНК-азы и РНК-азы). Температурный режим амплификации: денатурация – 94 °C 2 мин, репликация 30 циклов: 94 °C – 30 сек, 60 °C – 30 сек, 68 °C – 1 мин, пострепликация 68 °C – 7 мин.

Для точного определения размеров ПЦР-продуктов, проводили фрагментный анализ на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 310 xl,

Applied Biosystems. В качестве стандарта молекулярных масс использовали GeneScan – 600 LIZ Size Standard, фирмы Applied Biosystems.

Размеры продуктов были получены с использованием программного обеспечения Peak Scanner. Результаты анализа были обработаны с использованием online-базы MLVA bank (<http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/>).

Результаты и обсуждения

При анализе данных, полученных на сервере MLVA bank, были построены филогенетические древы, исследованных казахстанских штаммов *B. abortus* (*puc. 1, 2*).

На *puc. 1* представлено филогенетическое древо казахстанских штаммов *B. abortus*, образующие 1 кластер.

Как видно из *puc. 1*, штаммы *B. abortus 0036/X, 0037/X, Alakol 1* и *Alakol 2*, выделенные от КРС, относятся к 1 биовару и близкородственны со штаммами *B. abortus*, выделенными от КРС в Италии, Китае, Португалии, Сицилии, Монголии и в Бразилии. Штаммы *B. abortus 0036/X* и *0037/X*, выделенные в южно-Казахстанской области, отличаются от перечисленных штаммов в локусах BRU18, BRU07, BRU16, BRU04. В штаммах *B. abortus Alakol 1* и *Alakol 2* отличия наблюдаются в локусах BRU06, BRU11, BRU30, BRU18, BRU16 и BRU04.

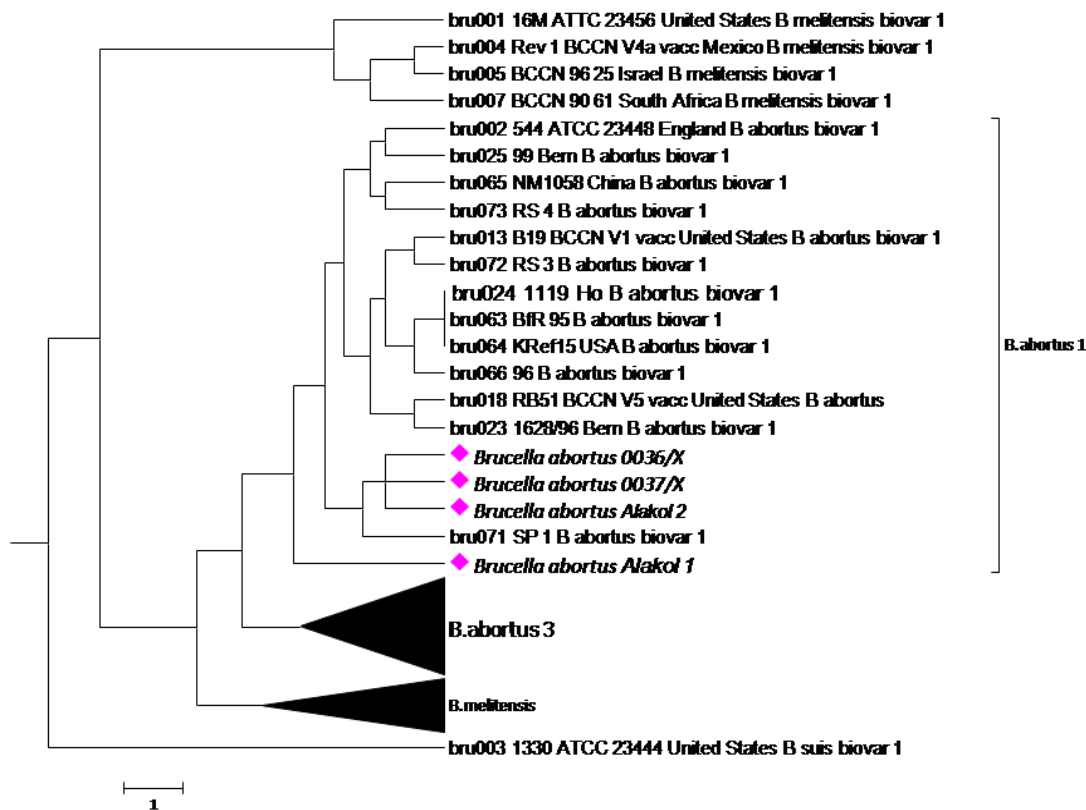


Рис. 1. Филогенетическое древо казахстанских штаммов *B. abortus* при кластеризации в соответствии с их типами (MLVA-16). **◆** – штаммы, выделенные в Южно-Казахстанской области *B. abortus 0036/X, 0037/X* и штаммы выделенные Талдыкорганском регионе Алматинской области *B. abortus Alakol 1* и *Alakol 2*.

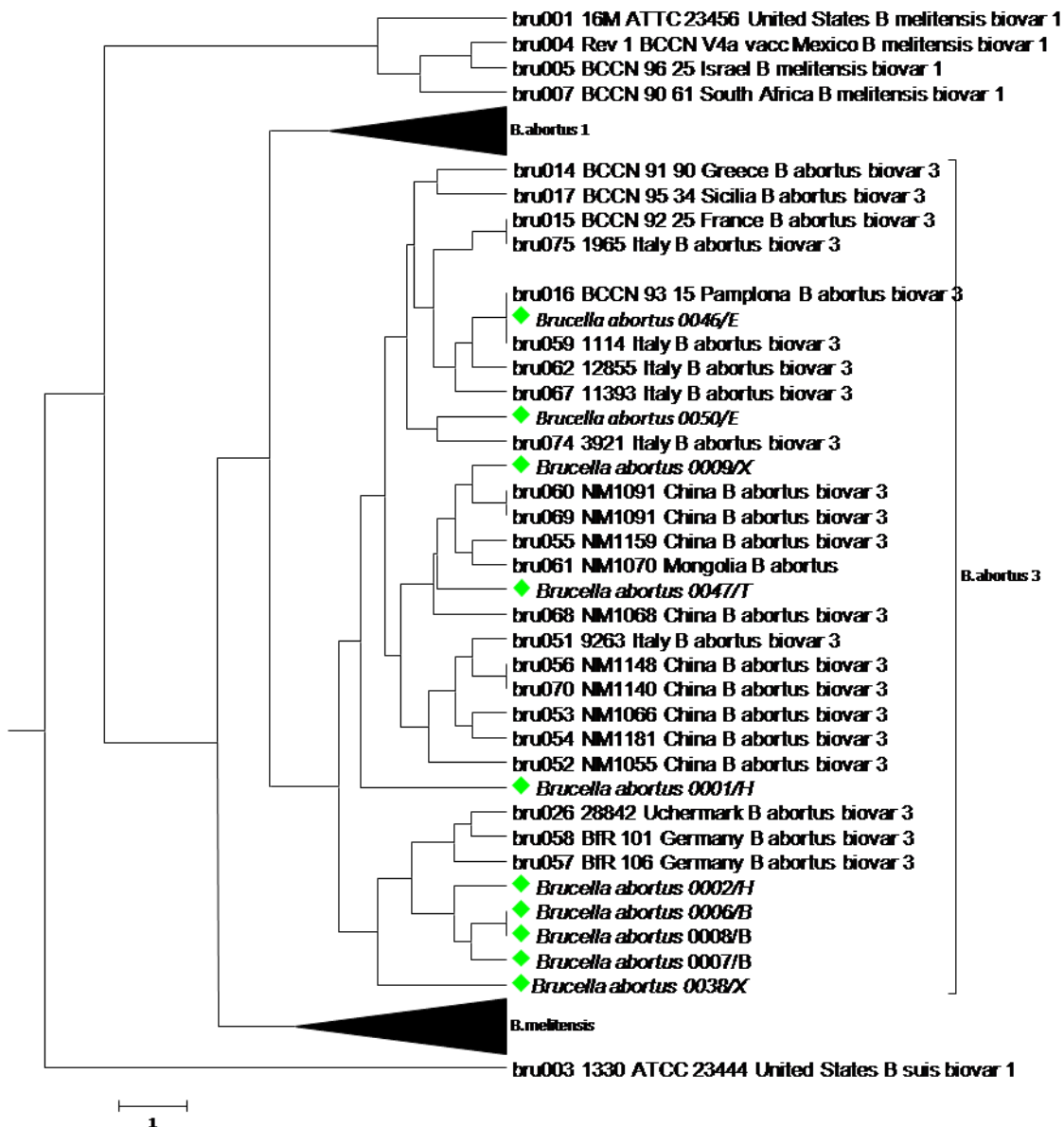


Рис. 2. Филогенетическое дерево казахстанских штаммов *B. abortus* при кластеризации в соответствии с их типами (MLVA-16). ◆ – штаммы *B. abortus* 0001/H, 0002/H, выделенные в Жамбылской области; штаммы *B. abortus* 0006/B, 0007/B, 0008/B, выделенные в Алматинской области; штаммы *B. abortus* 0038/X, 0009/X, выделенные в Южно-Казахстанской области; штамм *B. abortus* 0047/T, выделенный в Северо-Казахстанской области; штамм *B. abortus* 0050/F, выделенный в Восточно-Казахстанской области; штамм *B. abortus* 0046/E, выделенный в Атырауской области.

На рис. 2 представлено филогенетическое дерево казахстанских штаммов *B. abortus*, образующие 2 кластер.

Десять казахстанских штаммов *B. abortus* 0001/H, 0002/H, 0006/B, 0007/B, 0008/B, 0038/X, 0009/X, 0047/T, 0050/F, 0046/E, относятся к 3 биофару и показывают наибольшее сходство со штаммами *B. abortus*, выделенными от КРС в Китае, Италии и Португалии. Штаммы 0001/H и 0002/H, выделенные в Жамбылской области, отличаются от остальных казахстанских штаммов по локусам BRU11 и BRU08 соответственно. Основные различия казахстанских штаммов от штаммов из MLVA

базы наблюдаются в локусах BRU18, BRU19, BRU07, BRU09 и BRU16.

Таким образом, в результате проведения MLVA анализа было выявлено, что исследуемые штаммы бактерии рода *Brucella*, выделенные в различных регионах республики Казахстан образуют 2 отдельных кластера: *B. abortus* 1 биофар и *B. abortus* 3 биофар. Также полученные данные показали, что Казахские штаммы показали родство со штаммами, выделенными от КРС в Италии, Китае, Португалии, Сицилии, Монголии и в Бразилии. Монголия является наиболее близкорасположенной республикой к нашей стране, где практикуется

пастбищный метод ведения животноводства, и неблагоприятная эпизоотическая ситуация по бруцеллезу мелкого и крупного скота сохраняется на протяжении нескольких десятилетий. Учитывая, что в Монголии выделяются изоляты *B. abortus* 1, 3 и 6 биоваров, можно предполагать общность их происхождения с казахстанскими изолятами, тем более, что в этих регионах происходит перемещение сельскохозяйственных животных [11].

Из литературных данных известно, что с момента создания точек дозорного эпиднадзора в Китае, была собрана и проанализирована коллекция изолятов бактерии рода *Brucella*. Было выявлено, что основной причиной бруцеллеза в различных эпидемических районах Китая и Монголии является *B. melitensis* как доминирующий вид, а также *B. Abortus*, *B. suis* как самые распространенные виды данной инфекции [12].

Возможность штаммовой дифференциации изолятов одного вида, быстрота и низкая стоимость проведения анализов в сочетании с простотой интерпретации результатов подтверждают преимущества MLVA при проведении эпидемиологического надзора за бруцеллезом на территории Республики Казахстан и сопредельных государствах.

ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вершилова П. А. Бруцеллез // Медицина. 1972.
2. Желудков М. М., Цирельсон Л. Е., Кулаков Ю. К. и др. // Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. 2009. №6. С. 23–28.
3. Аманфуз В., Уорд Д., Пите Л. Обзор эпидемиологии бруцеллеза в отдельных странах // Семинар по проблемам бруцеллеза людей и животных Казахстана, Узбекистана и Грузии. Алма-Ата. 2004. С. 89–92.
4. Кузнецов А. Н., Сыздыков М. С., Дуйсенова А. К., Абуова Г. Н., Бердалиева Ф. А., Дауылбаева С. Ф., Садовская В. П. Информационное обеспечение эпидемиологического надзора за бруцеллезом с использованием ГИС-технологии. – http://journal.kspk.kz/contents/v10n4_2011.pdf
5. Le Flèche P., Jacques I., Grayon M., Al Dahouk S., Bouchon P., Denoed F. et al. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay // BMC Microbiol. 2006. V. 6. P. 1–14.
6. Scholz H. C., Hubalek Z., Sedláček I., Vergnaud G., Tomaso H., Al Dahouk S. et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 375–382.
7. Lindstedt B. A. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria // Electrophoresis. 2005. V. 26. P. 2567–2582.
8. Chang C. H., Chang Y. C., Underwood A. et al. VNTRDB: a bacterial variable number tandem repeat locus database // Nucleic Acids Res. 2007. V. 35. P. 416–421.
9. Marianelli C., Petrucca A., Pasquali P., Ciuchini F., Papadopoulou S. et al. Use of MLVA-16 typing to trace the source of a laboratory-acquired *Brucella* infection // J. Hosp. Infect. 2008. V. 68. P. 274–276.
10. Al Dahouk S., Le Flèche P., Nöckler K., Jacques I., Grayon M. et al. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis // J. Microbiol Methods. 2007. V. 69. P. 137–145.
11. Zhang W. Y., Guo W. D., Sun S. H., Jiang J. F., Sun H. L., Li S. L., Liu W., Cao W. C. Human brucellosis, Inner Mongolia, China // Emerg. Infect. Dis. 2010. V.16. P. 2001–2003.
12. Shang D. Q., Xiao D. L., Yin J. M. Epidemiology and control of brucellosis in China // Vet. Microbiol. 2002. V. 90. P. 165–182.

Поступила в редакцию 18.05.2017 г.

**MOLECULAR-GENETIC TYPING OF BACTERIA OF GENUS *BRUCELLA*
CIRCULATED IN THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN**

© **S. O. Sadikalieva***, **V. M. Stochkov**, **M. B. Orynbaev**, **K. A. Shorayeva**,
B. A. Espembetov, **A. R. Sansyzbay**, **K. T. Sultankulova**

*Research Institute for Biological Safety
Gvardeisky town, Jambyl region, Republic of Kazakhstan.*

**Email: sadikalieva86@mail.ru*

In this paper, the authors present the results of work on the molecular genetic typing of bacteria of the genus *Brucella* circulating in the Republic of Kazakhstan, using the MLVA method based on the analysis of variable number tandem repeats loci of the pathogen. When analyzing the data obtained on the MLVA bank server, phylogenetic trees were constructed with studied Kazakh strains of *B. abortus*. As a result of the study, it was found that Kazakh strains of the *Brucella* genus form two separate clusters. The strains *B. abortus* 0036/X, 0037/X, *Alakol 1* and *Alakol 2*, isolated in the South Kazakhstan oblast and in the Taldykorgan region of Almaty oblast in 2012–2013, belong to the first cluster. These strains showed belonging to biovar 1 *B. abortus*, and are closely related to *B. abortus* strains isolated from cattle in Italy, China, Portugal, Sicily, Mongolia, and Brazil. Differences of Kazakhstan strains from the above mentioned strains are mainly observed in the loci BRU04, BRU06, BRU07, BRU11, BRU16, BRU18 and BRU30. The second cluster formed strains of biovar 3 *B. abortus* 0001/H, 0002/H, 0006/B, 0007/B, 0008/B, 0038/X, 0009/X, 0047/T, 0050/F and 0046/E. These strains show the greatest similarity with *B. abortus* strains isolated from cattle in China, Italy and Portugal. The main differences of Kazakhstan strains from strains from the MLVA database are observed in the loci BRU18, BRU19, BRU07, BRU09 and BRU16.

Keywords: *Brucella* bacteria, brucellosis, MLVA, PCR, loci, multiplex reaction.

Published in Russian. Do not hesitate to contact us at bulletin_bsu@mail.ru if you need translation of the article.

REFERENCES

1. Vershilova P. A. Brutsellez. Meditsina. 1972.
2. Zheludkov M. M., Tsirel'son L. E., Kulakov Yu. K. i dr. Epidemiol. i vaksino profilaktika. 2009. No. 6. Pp. 23–28.
3. Amanfuz V., Uord D., Pite L. Seminar po problemam brutselleza lyudei i zhiivotnykh Kazakhstana, Uzbekistana i Gruzii. Alma-Ata. 2004. Pp. 89–92.
4. Kuznetsov A. N., Syzdykov M. S., Duisenova A. K., Abuova G. N., Berdalieva F. A., Dauylbaeva S. F., Sadovskaya V. P. Informatsionnoe obespechenie epidemiologicheskogo nadzora za brutsellezom s ispol'zovaniem GIS-tehnologii. – http://journal.ksph.kz/contents/v10n4_2011.pdf
5. Le Flèche P., Jacques I., Grayon M., Al Dahouk S., Bouchon P., Denoëud F. et al. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. BMC Microbiol. 2006. Vol. 6. Pp. 1–14.
6. Scholz H. C., Hubalek Z., Sedláček I., Vergnaud G., Tomaso H., Al Dahouk S. et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. Vol. 58. Pp. 375–382.
7. Lindstedt B. A. Electrophoresis. 2005. Vol. 26. P 2567–2582.
8. Chang C. H., Chang Y. C., Underwood A. et al. VNTRDB: a bacterial variable number tandem repeat locus database. Nucleic Acids Res. 2007. Vol. 35. Pp. 416–421.
9. Marianelli C., Petrucca A., Pasquali P., Ciuchini F., Papadopoulou S. et al. Use of MLVA-16 typing to trace the source of a laboratory-acquired *Brucella* infection. J. Hosp. Infect. 2008. Vol. 68. Pp. 274–276.
10. Al Dahouk S., Le Flèche P., Nöckler K., Jacques I., Grayon M. et al. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. J. Microbiol Methods. 2007. Vol. 69. Pp. 137–145.
11. Zhang W. Y., Guo W. D., Sun S. H., Jiang J. F., Sun H. L., Li S. L., Liu W., Cao W. C. Emerg. Infect. Dis. 2010. V.16. Pp. 2001–2003.
12. Shang D. Q., Xiao D. L., Yin J. M. Vet. Microbiol. 2002. Vol. 90. Pp. 165–182.

Received 18.05.2017.