

ФЕНО-И ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КУЛЬТУР БРУЦЕЛЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РК

Бакиева Ф.А., кандидат ветеринарных наук
flurachka-78@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0627-2608>

Бармова Ш.А., доктор биологических наук, профессор
sholbar@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2990-0961>

Мырзалиев А.Ж., кандидат ветеринарных наук
Ahan75@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5649-7330>

Илимбаева А.К., магистр ветеринарных наук
almira577@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9847-564X>

Өзбекбай Н.Б., магистр ветеринарных наук
nazerke.bauyrzhankyzy.94@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6678-5942>,

Кобдикова Г.М., магистр биологических наук
gulmirakobdikova.kz@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0009-5535-9268>

«Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт», город Алматы, Казахстан

Аннотация. В статье приведены результаты молекулярно-биологических исследований бруцелл, изолированных из крови и семенника баранов, содержащихся в хозяйствах южного региона РК. Работа проведена сотрудниками лаборатории бруцеллеза ТОО «КазНИВИ на основе исследований материала отобранного в различных по степени благополучия хозяйствах РК.

Лаборатория бруцеллеза продолжительное время занимается выделением эпизоотических культур полученных из патологического материала от мелкого рогатого скота. Все выделенные культуры изучаются, на них составляются паспорта с описанием их свойств.

Изучение фенотипических и генотипических свойств выделенных культур бруцелл позволило идентифицировать их родовую и видовую принадлежности, свидетельствующих о циркуляции возбудителя *B. ovis* среди МРС отдельных хозяйствующих субъектов РК. Эти положения требуют принятия определенных мер по ликвидации болезни, приносящей овцеводческой отрасли немалые экономические потери, складывающиеся из снижения поголовья животных и их потомства, затрат на проведение противоэпизоотических мер. Выделенные, в результате работы, изоляты вида *B. ovis* оказались генетически родственными в 99,8%-ных случаях со штаммом NR074146.1 *Brucella ovis* ATCC 25840 16S ribosomal R NA, регистрируемого в международном Генбанке. Выделенным штамма были присвоены коллекционные номера ШАФА-1 и ШАФА-2 и разработаны соответствующие паспорта.

Ключевые слова: *B. ovis*, заболеваемость, инфекционный эпидидимит баранов, биобезопасность, бактериологические и молекулярно-генетические исследования, культура бруцелл, секвенирование

Введение. Для прогнозирования эпизоотической ситуации по той или иной болезни животных особую значимость представляет информация о фенотипических и молекулярно-генетических характеристиках, циркулирующего на определенной территории возбудителя. Это дает нам возможность определить генетическое родство выделенных на территории РК бактерий рода *Brucella* с таковыми, отмеченных в других странах и предполагать вероятность заноса инфекции из них, прогнозировать и предупреждать вспышки болезни среди поголовья МРС и людей. К тому же высокая специфичность ПЦР может помочь при проведении дифференциальной диагностики ИЭБ и других инфекционных заболеваний, возбудители которых имеют общие антигенные детерминанты с бруцеллами [1,2,3,4,5]. Исходя из актуальности проблемы, научный интерес наших исследований был заключен в

изучении фено-генетических свойств, выделенных из различных эпизоотических очагов республики бактерий *B. ovis*.

В нашей стране база данных о генетических характеристиках распространённых на территории Казахстана видов бруцелл R-форм крайне скудна.

В течение ряда лет в лаборатории бруцеллеза КазНИВИ ведутся периодические пополнения официальной коллекции микроорганизмов, выявленными из биоматериала МРС эпизоотическими культурами, в т.ч. *B. ovis* с разработанными к ним индивидуальными паспортами, характеризующих молекулярно-биологические свойства. Полученные по результатам исследований данные позволят расширить сведения отечественной базы о генетических свойствах патогенов, циркулирующих на территориях регионов РК, представляя ценную информацию для определения происхождения возбудителя при возникновении инфекции (в т.ч. при заносе извне).

Материалы и методы исследования. Эпизоотологический мониторинг по ИЭБ осуществлялся сотрудниками лаборатории бруцеллеза ТОО «КазНИВИ на основе использования серологических, бактериологических и молекулярно-генетических методов исследований отобранных в различных по степени благополучия хозяйствах РК.

Бактериологически было исследовано 1205 образцов биоматериала от 57 овец.

Сбор проб патологического материала (цельная кровь, околоплодная жидкость, абортёрванные плоды и т.д.) осуществлялся в хозяйствах РК, где были выявлены положительно реагирующие на овисный антиген в РДСК животные, которые исследовались бактериологически на ИЭБ с целью индикации бруцелл.

Изолированные из биоматериала культуры микроорганизмы подвергались изучению их фенотипических свойств: культурально-морфологических, тинкториальных, биохимических и других в соответствии с общепринятыми требованиями, регламентированными в документах «Ветеринарное законодательство РК, 2005» и «Межгосударственный стандарт по ГОСТ 34105-2023 (Армения, Казахстан, Беларусь, Кыргызстан, Россия), М., 2023» [6,7].

Изучение генотипических характеристик выделенных изолятов с характерными для *B. ovis* (R-форма) биологическими признаками, основывалось на последующем подтверждении их родовой и видовой принадлежности с помощью молекулярно-генетических методов и сравнении полученных нуклеотидных последовательностей с референсными данными [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15]. При этом были использованы методы выделения ДНК из вышеуказанных культур; проведения ПЦР с праймерами, специфичными для родовой и видовой уровней бруцелл; электрофоретическое разделение ампликонов; секвенирование специфических фрагментов ДНК; сравнение полученных нуклеотидных последовательностей с референсными данными международного банка.

При определении родовой принадлежности бруцелл использовалась классическая ПЦР. Бактериальная ДНК выделена с использованием набора InnuPREP DNA Mini Kit 2.0 (Analytik Jena). ПЦР программа выполнена с применением амплификатора Eppendorf Master cycler. При идентификации выделенных культур бруцелл до видов использовали набор праймеров AMOS-ПЦР (*Abortus*, *Melitensis*, *Ovis*, *Suis*) с последующим электрофорезом продуктов реакции. Филогенетический анализ 16S рРНК генов выделенных изолятов бруцелл осуществлялся на основании секвенирования и определения биномиальной номенклатуры.

Результаты и их обсуждение. В результате бактериологического исследования образцов биоматериала, доставленных из различных хозяйствующих субъектов были выделены 2 культуры вида *B. ovis* (от 1 барана Жамбылской и 1 - Туркестанской областей). Также было изолировано 4 культуры бруцелл, из которых 3 - по результатам типовой идентификации отнесены к *B. melitensis* и 1 - к *B. abortus*. Согласно задачам проекта, выполненного в рамках НТП ИРН BR218004/0223 «Совершенствование мер обеспечения биологической безопасности в Казахстане: противодействие опасным и особо опасным инфекциям» на 2023-2025 годы, наши последующие научные изыскания по изучению

генетического профиля выделенных штаммов, касались *B.ovis*.

Основной целью исследований, при изучении молекулярно-генотипических признаков 2-х бактериальных культур, отнесённых по фенотипическим свойствам к *B. ovis* (R-форма), являлось подтверждение их принадлежности к роду *Brucella* spp. и к виду *ovis*. Идентификация изолятов бактерий была выполнена методом определения прямой нуклеотидной последовательности фрагмента 16S rRNA гена с последующим сравнением нуклеотидной идентичности с последовательностями бруцелл, депонированными в международной базе данных Gene Bank, а также построением филогенетического древа.

Первым этапом молекулярно-генетических исследований явилось выделение ДНК из вышеуказанных культур при помощи классической ПЦР с использованием набора InnuPREP DNA Mini Kit 2.0 (Analytik Jena). ПЦР программа была выполнена с применением амплификатора Eppendorf Master cycler. Для выделения ДНК пробы, содержащие по 1 мл убитой суспензии *B. ovis* центрифугировали при 13000 об/мин в течение 3 минут, затем надосадочную жидкость декантировали, а осадок разводили в 500 мкл ТЕ буфера. Далее проводили идентификацию видов, выделенных изолятов бруцелл с использованием набора праймеров AMOS (*abortus*, *melitensis*, *ovis*, *suis*). Данные использованных праймеров приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Праймеры, используемые при проведении AMOS- ПЦР *Brucella*

ПЦР	Наименование праймера	Sequence (5-3)	DNA Targets	Ампликон (п.н)
AMOS	<i>Brucella abortus</i> BA	GAC GAA CGG AAT TTT TCC AAT CCC	IS711	498
	<i>Brucella melitensis</i> BM	AAA TCG CGT CCT TGC TGG TCT GA		731
	<i>Brucella ovis</i> BO	CGG GTT CTG GCA CCA TCG TCG		976
	BS	GCG CGG TTT TCT GAA GGT GGT TCA GG		285
	IS711	TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT		

Как видно из таблицы 1, электрофорез амплификации с целью определения видов *Brucella* spp. осуществлялся с помощью набора праймеров AMOS (А - *abortus*, М - *melitensis*, О - *ovis*, S – *suis*). Набор праймеров AMOS является строго специфичным для *B.abortus*, *B.melitensis*, *B.ovis* и *B.suis* и имеет размер ампликонов - 498, 731; 976 и 285 пар нуклеотидов (п.н), соответственно. Условия постановки ПЦР приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Условия проведения ПЦР при изучении выделенных культур бруцелл

Параметры ПЦР постановки		Температурный режим для ПЦР		
2хПЦР буфер	- 12,5 µl;	Нач.ден.	95 ⁰ С- 5 мин	} 30 циклов
5хSuper fi	- 5 µl;	Денатурация	95 ⁰ С- 1 мин	
Праймер прямой	- 1,25 µl;	Отжиг	55,5 ⁰ С- 2мин	
(20пмоль/µl)	- 1,25 µl;	Репл.	72 ⁰ С- 2мин	
Праймер обратный	- 3 µl;	Пост-репл.	72 ⁰ С- 5мин	
ДНК проба	- 2 µl;			
Вода	-25 µl			
Total				

Как показывают данные таблицы 2, постановка ПЦР осуществлялась с соблюдением всех этапов амплификации гена мишени IS711 с помощью электрофоретического анализа в 1,2% агарозном геле. Результат электрофореза с ДНК-пробами исследуемых изолятов с

набором праймеров AMOS показан на рисунке 1.

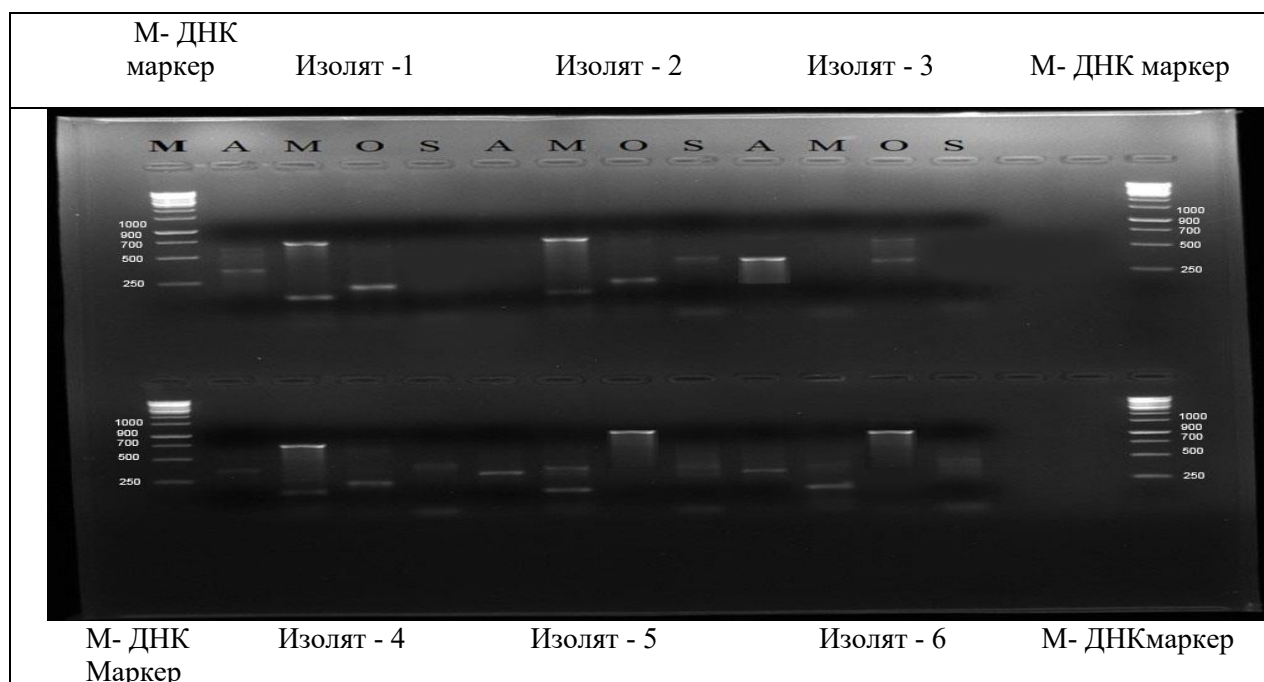


Рисунок 1 – Результаты электрофоретического анализа продуктов AMOS ПЦР для определения видовой принадлежности изолятов *Brucella spp*

Результаты, приведенного на рисунке 1 электрофоретического анализа с применением AMOS-ПЦР, демонстрируют разделение продуктов ПЦР изолятов 5 и 6 в виде светящихся полос, характерных видам *B. ovis*. В таблице 3 представлены данные электрофоретического разделения продуктов амплификации бруцелл (светящиеся участки) по молекулярной массе.

Таблица 3 – Электрофоретическое разделение продуктов амплификации бруцелл по молекулярной массе

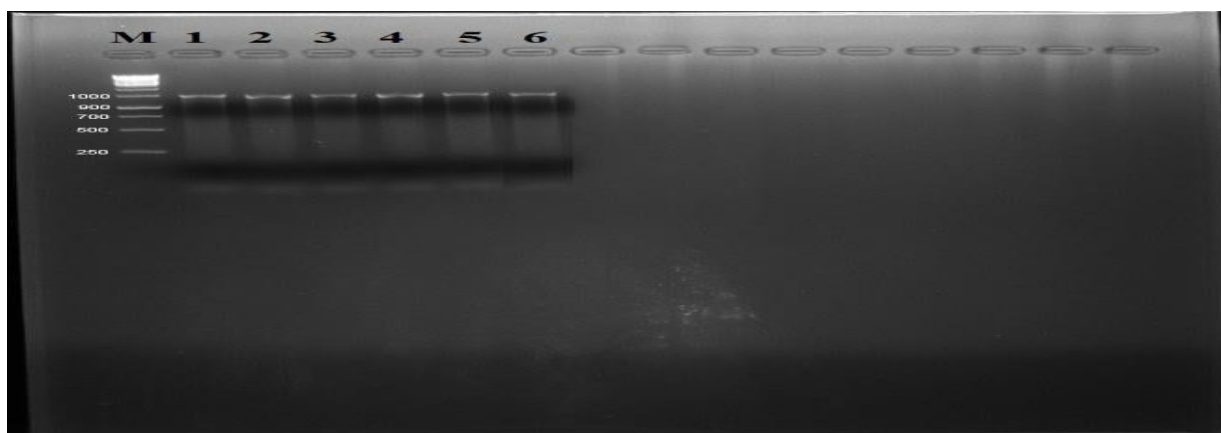
№	Наименование изолятов	AMOS ПЦР праймеры				М - ДНК маркер, п.н.
		А	М	О	С	
5	<i>Brucella ovis</i>	-	-	976	-	
6	<i>Brucella ovis</i>	-	-	976	-	

Из данных таблицы 3 видно, что величина специфичного ампликона, визуализируемого при электрофорезе и характерного для *B. ovis* составляет 976 п.н.

Таким образом, на основе применения методики AMOS ПЦР с последующим электрофорезом продуктов реакции представляется возможность быстрой и эффективной дифференциации изолятов рода *Brucella spp.* по видовой принадлежности. Визуализация специфических ампликонов для каждого вида бруцелл в результате электрофореза подтверждает, что данный подход является надёжным инструментом для идентификации возбудителя бруцеллёза до видового уровня. Полученные результаты имеют важное значение для проведения достоверной диагностики, эпидемиологического надзора и контроля бруцеллёза животных.

Амплификация фрагмента 16S rRNA гена. Реакция ПЦР была выполнена универсальными праймерами 8F 5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 и 806R- 5' GGACTACCAGGGTATCTAAT в общем объеме 7,5 мкл. Мастер-микс содержал 36,7 мкл ДНК, 7,5 воды дионизированной, 10 пмоль каждого праймера. Программа ПЦР

амплификации включала денатурацию 95°C в течение 1 минут; 95°C – 15 секунд, 60°C- 15 секунд; 72°C – 30 секунд; 35 циклов: заключительную элонгацию Holod при 4°C. Разделение ампликонов проводилось методом горизонтального электрофореза в 1,2 % агарозном геле (рисунок 2).



Примечание - ДНК маркер с молекулярной массой Gene Ruler 250-1000 н.п. Изоляты: 5 - *B. ovis*, 6 - *B. ovnis*

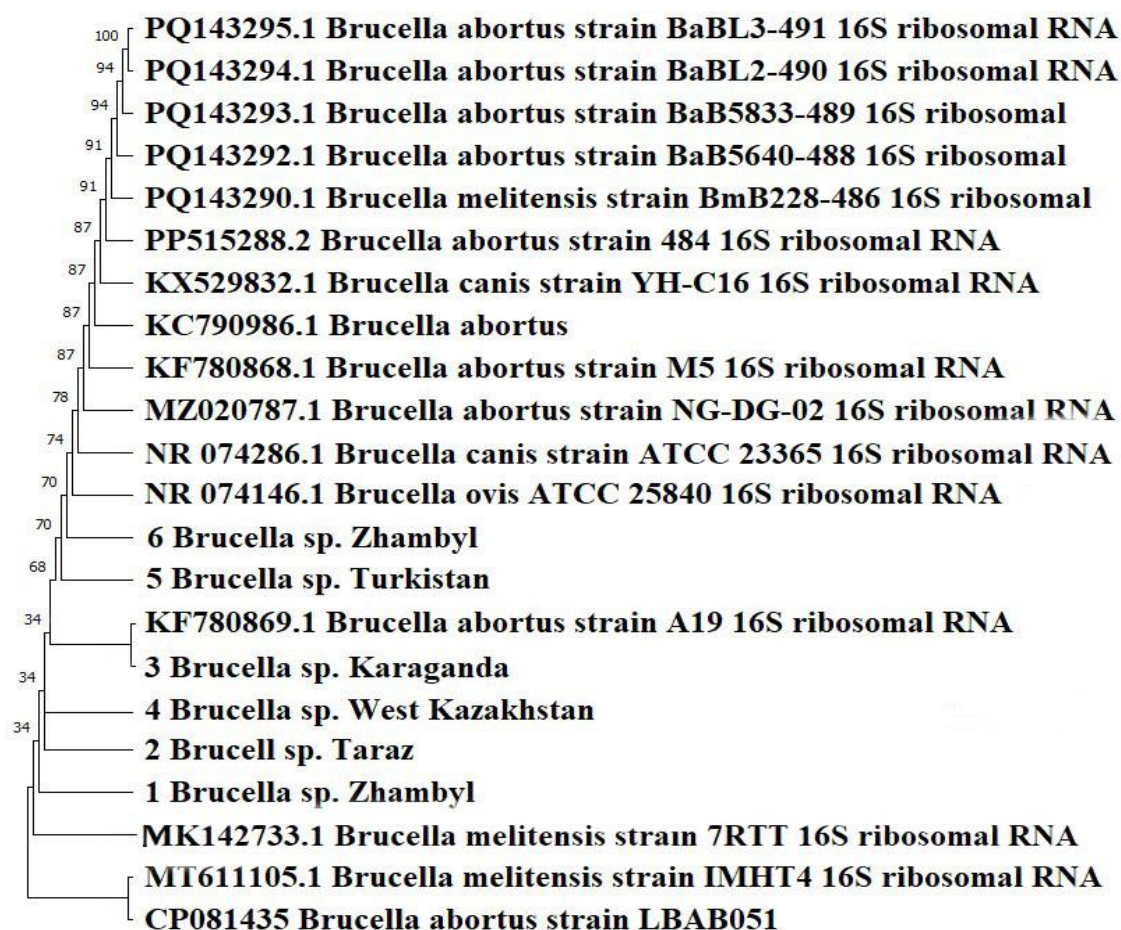
Рисунок 2 – Электрофоретический анализ продуктов 16S rRNA гена эпизоотических культур бруцелл

Результаты электрофоретического анализа продуктов 16S rRNA гена приведенные на рисунке 2, которые показывают, что у всех исследуемых образцов были амплифицированы специфические фрагменты молекулярной массой около 1000 пар нуклеотидов, что соответствует типичной длине бактериальных 16S rRNA генов. Анализ 16S rRNA генов является эффективным молекулярно-генетическим подходом для предварительной идентификации бактерий, в т.ч. и бруцелл.

Результаты электрофоретического разделения ампликонов были использованы для дальнейшей видовой идентификации изучаемых культур бруцелл на основе секвенирования. Предварительно проведя очистку от геля и вырезав чётко выделенные участки, пробы были запущены в секвенатор для проведения филогенетического анализа. Все анализируемые бактериальные культуры, выделенные нами от MPC РК, находятся на одной филогенетической ветви с разновидностями рода *Brucella*. Изоляты 5,6 были идентифицированы как *B. ovis*, группируясь в кластер с типичными представителями данного вида (рисунок 3). Таким образом, филогенетическое древо, построенное на основании 16S рРНК генов, четко показывает разделение бактериальных изолятов на отдельные ветви, соответствующие роду *Brucella* и виду *ovis*.

Изоляты 5 и 6 вида *B. ovis*, выделенные из цельной крови барана Жамбылской и семенника барана Туркестанской областей, соответственно, оказались родственными генетически в 99,8%-ных случаях со штаммом NR074146.1 *Brucella ovis* ATCC 25840 16 S ribosomal R NA, регистрируемого в международном Генбанке.

При проверке чистоты представленных штаммов на основе анализа электрофореграммы нуклеотидной последовательности IS711 гена всех анализируемых штаммов отмечено отсутствие в них посторонних видов бактерий и перекрёстной контаминации между названными видами бруцелл.



**Рисунок 3 – Филогенетическое древо последовательности гена 16S рРНК изолятов:
5 - *B. ovis*, 6 - *B. ovis* и родственных штаммов бактерии рода *Brucella* spp. из Генбанка**

Таким образом, результаты проведенных молекулярно-биологических исследований с целью определения генетических характеристик 2-х эпизоотических культур бруцелл, выделенных из биоматериала, отобранного от MPC в хозяйствующих субъектах РК, подтвердили их принадлежность к роду *Brucella* spp. и виду *ovis*, что согласуется в полном объеме с результатами фенотипических исследований. Полученные данные о фенотипических и генотипических характеристиках выделенных эпизоотических культур бруцелл свидетельствуют о циркуляции на территории областей РК, в той или иной степени *B. ovis* (R-форма), который является патогенным, для животных и человека и представляют угрозу биобезопасности страны.

На выделенные из цельной крови барана из Жамбылской области и из семенника барана из Туркестанской области штаммы вида *B. ovis* (с коллекционными номерами ШАФА-1 и ШАФА-2), разработаны индивидуальные паспорта с описанием номенклатурных данных, а также фенотипических и генотипических характеристик.

Заключение. В результате бактериологических исследований проб биоматериала, отобранных от MPC Жамбылской и Туркестанской областей изолированы 2 культуры *B. ovis*, соответствующие по биологическим свойствам *B. ovis*, что подтверждено также результатами биологической пробы на морских свинках.

Изученные по фенотипическим характеристикам указанные 2 изолята бруцелл, далее были подвергнуты идентификации с помощью методов определения прямой нуклеотидной последовательности фрагмента 16S rRNA гена с последующим сравнением нуклеотидной идентичности с последовательностями бруцелл, депонированными в международной базе данных Gene Bank, а также построением филогенетического древа. У исследуемых образцов

были амплифицированы специфические фрагменты молекулярной массой около 1000 пар нуклеотидов, что идентично типичной длине 16S rRNA генов бактерий, на основании которого было построено филогенетическое древо.

Изоляты вида *B. ovis* оказались генетически родственными в 99,8%-ных случаях со штаммом NR074146.1 *Brucella ovis* ATCC 25840 16S ribosomal R NA, регистрируемого в международном Генбанке. На выделенные два штамма *B. ovis* (коллекционные номера ШАФА-1 и ШАФА-2), разработаны микробиологические паспорта.

Финансирования. Работа выполнена в рамках НТП ИРН BR218004/0223 «Совершенствование мер обеспечения биологической безопасности в Казахстане: противодействие опасным и особо опасным инфекциям» на 2023-2025 годы.

Литературы:

- [1] **Charypkhan, D.**, Sultanov A.A., Ivanov N.P., Baramova Sh.A., Torgerson P.R. Economic and health burden of brucellosis in Kazakhstan // *Journal Zoonoses Public Health*. 2019. – С. 1-8.
- [2] **Grushina, T.** Universal indirect enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring of human and animals brucellosis in Kazakhstan // *Vaccine*. 2010. Т. 28. Вып. Suppl. 5. – С. F46-F48.
- [3] **Даугалиева, А.Т.**, Барамова Ш.А., Усербаев Б.С., Адамбаева А.А., Даугалиева С.Т., Айтлесова Р.Б. Генетическое разнообразие штаммов *Brucella melitensis* и *Brucella abortus*, выделенных от людей и животных различных областей Казахстана // *Микробиология и вирусология*. 2019. № 1 (24). – С. 24-32.
- [4] **Даугалиева, А.Т.**, Усербаев Б.С., Адамбаева А.А., Айтлесова Р.Б., Намазбекова К.Е. ПЦР для дифференциации *Brucella abortus* и *Brucella melitensis* // *Исследования, результаты*. 2019. – № 2 (82). – С. 16-23.
- [5] **Даугалиева, А.Т.**, Усербаев Б.С., Адамбаева А.А., Айтлесова Р.Б. Выявление возбудителя бруцеллеза животных и дифференциация до видов *abortus* и *melitensis* методом ПЦР // *Жайык ветеринары*. 2019. – № 5 (131). – С. 1-2.
- [6] Методические указания по лабораторной диагностике бруцеллеза // *Ветеринарное законодательство*. Астана, 2005. Т. 3. – С. 19-32.
- [7] Лабораторная диагностика бруцеллеза // *Межгосударственный стандарт по ГОСТ 34105, принятый Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации пяти стран СНГ (Армения, Казахстан, Беларусь, Кыргызстан, Россия) (протокол от 28 февраля 2023 г. № 159-П)*. Москва, 2023. – 50 с.
- [8] **Daugaliyeva, A.**, Sultanova A., Usserbayeva B., Baramovaa Sh., Modestob P., Adambayevaa A., Acutisb P.L., Pelettob S. Genotyping of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* strains in Kazakhstan using MLVA-15 // *Infection, Genetics and Evolution*. 2018. – Т. 58. – С. 135-144.
- [9] **Diaz, R.**, Bosseray N. Identification d'un composé antigénique spécifique de la phase rugueuse (R) des *Brucella* // *Ann. Rech. Vet.* 1973. Т. 4. – С. 283-292.
- [10] **Estein, S.M.**, Baldi P.C., Bowden R.A. Comparison of serological tests based on outer membrane or internal antigens for detecting antibodies to *Brucella ovis* in infected flocks // *J. Vet. Diagn. Invest.* 2002. – Т. 14. – С. 407-411.
- [11] **Saitou, N.**, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Molecular Biology and Evolution*. 1987. – Т. 4. – С. 406-425.
- [12] **Tamura, K.**, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // *Molecular Biology and Evolution*. 1993. – Т. 10. – С. 512-526.
- [13] **Tamura, K.**, Kumar S. Evolutionary distance estimation under heterogeneous substitution pattern among lineages // *Molecular Biology and Evolution*. 2002. – Т. 19. – С. 1727-1736.
- [14] **Tamura, K.**, Stecher G., Kumar S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 // *Molecular Biology and Evolution*. 2021.
- [15] **Felsenstein, J.** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // *Evolution*. 1985. Т. 39. – С. 783-791.

References:

- [1] **Charypkhan, D.**, Sultanov A.A., Ivanov N.P., Baramova Sh.A., Torgerson P.R. Economic and

health burden of brucellosis in Kazakhstan // Journal Zoonoses Public Health. 2019. – S. 1-8.

[2] **Grushina, T.** Universal indirect enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring of human and animals brucellosis in Kazakhstan // Vaccine. 2010. T. 28. Vyp. Suppl. 5. – S. F46-F48.

[3] **Daugalieva, A.T.**, Baramova Sh.A., Userbaev B.S., Adambaeva A.A., Daugalieva S.T., Ajtlesova R.B. Geneticheskoe raznoobrazie shtammov Brucella melitensis i Brucella abortus, vy-deleennyh ot ljudej i zhivotnyh razlichnyh oblastej Kazahstana // Mikrobiologija i viruso-logija. 2019. – № 1 (24). – S. 24-32. [in Russian].

[4] **Daugalieva, A.T.**, Userbaev B.S., Adambaeva A.A., Ajtlesova R.B., Namazbekova K.E. PCR dlja differenciacii Brucella abortus i Brucella melitensis // Issledovanija, rezul'taty. 2019. – № 2 (82). – S. 16-23. [in Russian].

[5] **Daugalieva, A.T.**, Userbaev B.S., Adambaeva A.A., Ajtlesova R.B. Vyjavlenie vozbu-ditelja brucelleza zhivotnyh i differenciacija do vidov abortus i melitensis metodom PCR // Zhajyk veterinary. 2019. – № 5 (131). – S. 1-2. [in Russian].

[6] Metodicheskie ukazanija po laboratornoj diagnostike brucelleza // Veterinarnoe zakonodatel'stvo. Astana, 2005. – T. 3. – S. 19-32. [in Russian].

[7] Laboratornaja diagnostika brucelleza // Mezhgosudarstvennyj standart po GOST 34105, prinjatyj Mezhgosudarstvennym sovetom po standartizacii, metrologii i sertifikacii pjati stran SNG (Armenija, Kazahstan, Belarus', Kyrgyzstan, Rossija) (protokol ot 28 fevralja 2023 g. № 159-P). Moskva, 2023. – 50 s. [in Russian].

[8] **Daugaliyeva, A.**, Sultanova A., Userbayeva B., Baramovaa Sh., Modestob P., Adam-bayevaa A., Acutisb P.L., Pelettob S. Genotyping of Brucella melitensis and Brucella abortus strains in Kazakhstan using MLVA-15 // Infection, Genetics and Evolution. 2018. – T. 58. – S. 135-144.

[9] **Diaz, R.**, Bosseray N. Identification d'un composé antigénique spécifique de la phase ru-gueuse (R) des Brucella // Ann. Rech. Vet. 1973. – T. 4. – S. 283-292.

[10] **Estein, S.M.**, Baldi P.C., Bowden R.A. Comparison of serological tests based on outer membrane or internal antigens for detecting antibodies to Brucella ovis in infected flocks // J. Vet. Diagn. Invest. 2002. – T. 14. – S. 407-411.

[11] **Saitou, N.**, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phy-logenetic trees // Molecular Biology and Evolution. 1987. T. 4. – S. 406-425.

[12] **Tamura, K.**, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Molecular Biology and Evolution. 1993. – T. 10. – S. 512-526.

[13] **Tamura, K.**, Kumar S. Evolutionary distance estimation under heterogeneous substitu-tion pattern among lineages // Molecular Biology and Evolution. 2002. – T. 19. – S. 1727-1736.

[14] **Tamura, K.**, Stecher G., Kumar S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 // Molecular Biology and Evolution. 2021.

[15] **Felsenstein, J.** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. 1985. – T. 39. – S. 783-791.

ҚР ТЕРРИТОРИЯСЫНДА ОҚАШАУЛЫҒАН БРУЦЕЛЛА ӨСІНДІЛЕРІНІҢ ФЕНОТИПТІК ЖӘНЕ ГЕНОТИПТІК ҚАСИЕТТЕРІ

Бакиева Ф.А., ветеринария ғылымдарының кандидаты
Барамова Ш.А., биологиялық ғылымдарының докторы, профессор
Мырзалиев А.Ж., ветеринария ғылымдарының кандидаты
Илимбаева А.К., ветеринария ғылымдарының магистры
Өзбекбай Н.Б., ветеринария ғылымдарының магистры
Кобдикова Г. М., биологиялық ғылымдарының магистры

«Қазақ ғылыми-зерттеу ветеринария институты» ЖШС, Алматы, Қазақстан

Аңдатпа. Мақалада Қазақстан Республикасының оңтүстік өңіріндегі шаруашылықтарда ұсталатын қошқарлардың қанынан және аталық безінен бөлініп алынған бруцеллезге жасалған молекулярлық-биологиялық зерттеулердің нәтижелері берілген. Жұмысты «ҚазВФЗИ» ЖШС-і бруцеллез зертханасының қызметкерлері Қазақстан Республикасының әл-ауқаты әртүрлі шаруашылықтарынан жиналған материалды зерттеу негізінде жүргізді.

Бруцеллез зертханасы ұзақ уақыт бойы ұсақ малдан патологиялық материалдан алынған эпизоотиялық өсіндіні оқшаулаумен айналысады. Барлық таңдалған бөлініп алынған өсінділер зерттеліп, олардың қасиеттерін сипаттайтын төлқұжат құрастырылады.

Бөлінген бруцелла өсінділерінің фенотиптік және генотиптік қасиеттерін зерттеу Қазақстан Республикасының жеке шаруашылық жүргізуші субъектілерінің ұсақ малдары арасында *B. ovis* қоздырғышының айналымын көрсете отырып, олардың тектік және түрлік тиесілігін анықтауға мүмкіндік берді. Бұл ережелер жануарлар мен олардың төлдерінің санының азаюынан, эпизоотияға қарсы іс-шараларды жүргізуге кететін шығындардан қой шаруашылығы саласына айтарлықтай экономикалық шығын әкелетін ауруды жою бойынша белгілі бір шараларды қабылдауды талап етеді. Жұмыс нәтижесінде алынған *B. ovis* түрінің изоляттары 99,8% жағдайда халықаралық Genbank-те тіркелген NR074146.1 *Brucella ovis* ATCC 25840 16S рибосомалық R NA штаммымен генетикалық байланыста болып шықты. Оқшауланған штаммдарға ШАФА-1 және ШАФА-2 коллекциялық нөмірлері беріліп, сәйкес паспорттар әзірленді.

Тірек сөздер: *B. ovis*, аурушандық, қойлардың инфекциялық эпидидимиттері, биоқауіп-сіздік, бактериологиялық және молекулалық-генетикалық зерттеулер, бруцелла өсіндісі, секвенирлеу.

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC PROPERTIES OF BRUCELLA CULTURES ISOLATED IN THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

F.A. Bakiyeva, Candidate of Veterinary Sciences
Sh.A. Baramova, Doctor of Biological Sciences, Professor
A.J. Myrzaliyev, Candidate of Veterinary Sciences
A.K. Ilimbayeva, Master of Veterinary Sciences
N.B. Ozbekbay, Master of Veterinary Sciences
G.M. Kobdikova, Master of Biology Sciences

LLP “Kazakh Scientific-Research Veterinary Institute”, Almaty sity, Republic of Kazakhstan

Annotation. The article presents the results of molecular biological studies of *Brucella* isolated from the blood and testicles of rams kept in farms in the southern region of the Republic of Kazakhstan. The work was carried out by employees of the brucellosis laboratory of KazSRVI LLP based on studies of material collected from farms with different epizootic statuses.

For many years, the laboratory brucellosis has been engaged in isolating and studying epizootic cultures obtained from pathological material of small ruminants.

All isolated cultures undergo phenotypic and genotypic characterization, and passports are compiled for them describing their properties.

The study of phenotypic and genotypic properties of isolated *Brucella* cultures allowed identifying their genus and species affiliation, confirming the circulation of the *B. ovis* among small ruminants in certain farms of Kazakhstan. This disease causes considerable economic losses to the sheep-breeding industry due to a decrease in livestock numbers, reproductive decline, and the costs of anti-epizootic measures. The obtained *B. ovis* isolates were found to be genetically related (99.8%) to the strain NR074146.1 *Brucella ovis* ATCC 25840 16S ribosomal RNA, registered in the international GenBank database. The isolated strains were assigned collection numbers ШАФА-1 and ШАФА-2, and corresponding passports were developed.

Keywords: *B. ovis*, morbidity, infectious epididymitis of rams, biosafety, bacteriological and molecular genetic studies, *Brucella* culture, sequencing.