

## ORIGINAL RESEARCH PAPERS

IRSTI: 68.41.53

A.T. DAUGALIEVA<sup>1</sup>, S.G. KANATBAYEV<sup>2</sup>, S.T. DAUGALIEVA<sup>3\*</sup>, N.S. KYDYR<sup>1</sup>,  
S. PELETTO<sup>4</sup><sup>1</sup>Kazakh research institute of livestock and fodder production, Almaty, Kazakhstan<sup>2</sup>West Kazakhstan Scientific Research Veterinary Station, Almaty, Kazakhstan<sup>3</sup>Scientific and Production Center of Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan<sup>4</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Turin, Italy

\*e-mail:saule.daugalieva@mail.ru

GENOTYPING OF THE CAUSATIVE AGENT OF BRUCELLOSIS CIRCULATING IN  
THE TERRITORY OF THE WEST KAZAKHSTAN REGION

doi:10.53729/MV-AS.2024.02.09

## Abstract

Brucellosis affects all animals and people. In Kazakhstan, brucellosis is an endemic disease of animals and humans. Traditional biotyping methods cannot differentiate closely related *brucella* species and their biovars or track the outbreak's source. In our study, we carried out genotyping of *brucella* circulating in the territory of the West Kazakhstan region using the method of molecular typing - a multilocus analysis of the variable number of tandem repeats. As a result of the conducted studies, four genotypes of *B. abortus* were identified from 13 heads of cattle, and two genotypes of *B. melitensis* were identified from 11 heads of small ruminants and two heads of cattle. Cross-infection of *brucella* has been observed in secondary host animals; namely, infection in cattle was caused by *B. melitensis*. The most common genotype in small ruminants was *B. melitensis* genotype 3, which belongs to the Eastern Mediterranean lineage and circulates throughout Asia. Strains of *B. abortus* differ from global strains. Studying *Brucella* genotypes is necessary to track outbreaks in the final stages of a brucellosis eradication program or to track sources of infection in humans and animals in non-endemic areas of Kazakhstan.

**Keywords:** brucellosis, cattle, small ruminants, multilocus analysis.

Brucellosis affecting a wide range of livestock, wild mammals, and humans [1-3]. In Kazakhstan, brucellosis is an endemic disease of animals and humans and is a priority problem in veterinary medicine due to the problematic epidemiological situation. Based on biochemical characteristics [4] and host preferences, 12 genetically closely related species have been identified [5-12]. Most human infections are caused by two types of *brucella*: *B. melitensis* and *B. abortus* [3,13,14]. Natural reservoirs are the hosts of *B. abortus*, including the family *Bovidae* [15]. However, cross-infections of *Brucella* in secondary host animals have also been reported [3,16-19]. In areas where cattle are kept in close contact with small ruminants, as is often the case in many mixed livestock populations, infection in cattle can also be caused by *B. melitensis*, and in small ruminants by *B. abortus* [20-27]. As in many countries of the world, *B. melitensis* is the most widespread and most virulent *Brucella* species in Kazakhstan [28-30] since it is most often isolated from humans and provokes disabling, intractable diseases, sometimes with fatal outcomes [13,29,31-38]. Even though vaccination is the primary method of preventing infectious diseases [39], vaccination against brucellosis of ruminants in the territory of the Republic of Kazakhstan is not officially recommended.

To date, knowledge about molecular epidemiology, phylogeographic origin, distribution, and genetic diversity of *Brucella spp.* strains is limited in Kazakhstan. Various typing methods are used to identify *Brucella* species and their biovars. Epidemiological studies include both

traditional biotyping techniques and modern molecular analysis methods. Traditional biotyping methods recommended by the World Organization for Animal Health are based on host specificity, crop growth features [40], phagotyping, and biochemical and routine serological characteristics [41]. These methods are laborious and require the processing of living bacteria. Still, their resolution needs to be higher [18,19,42], i.e., they cannot differentiate *Brucella* species and their biovars to trace the outbreak's source [19,43-48]. The gold standard in diagnosing brucellosis is isolating a pure culture, but this requires a biosafety level 3 laboratory (BSL - 3) [12,49,50].

Developments in molecular typing have contributed to the current understanding of the global population structure of *Brucella spp.* and disease epidemiology [51].

Our study genotyped *Brucella* circulating in West Kazakhstan using multilocus analysis of the variable number of tandem repeats (MLVA).

### Materials and methods of research

To determine the phenotypic characteristics of the pathogen, traditional methods were used by the World Health Organization [41].

When performing PCR, we were guided by the instructions of the Federal State Budgetary Institution "VGNKI". Subsequently, PCR with the primers we developed was used to differentiate the pathogen to species [52].

From 26 samples of aborted fetuses with breast cancer (15 from cattle and 11 from small cattle), 13 strains of *B. melitensis* and 13 *B. abortus* were isolated. DNA was extracted with PureLink Genomic DNA Kits (Invitrogen). Fragment analysis was performed using standard methods with slight modification [53]. 16 gene loci were studied [54].

The master mix 2 x (Thermo Scientific) also contained 10 pmol of primer and 10 ng of matrix. LIZ 1200 and LIZ 600 were used. Fragment analysis was carried out on an ABI 3500 sequencer using GeneMapper 4.1 software. Strains *B. abortus* 544 and *B. melitensis* 16 M were controls to test the subjects with Internet data. Bioinformatics processing was carried out using BioNumerics7.5 software (Applied Maths, Belgium). Pathogens were grouped using the UPGMA approach. Phylogenetic trees were constructed based on the categorical coefficient data. The results obtained were compared with the publicly available MLVA database.

### Results and discussion

As a result of the conducted studies, four genotypes of *B. abortus* (1,2,7,30) were identified from 13 heads of cattle, two genotypes of *B. melitensis* (3,16) were identified from 11 heads of small ruminants and two heads of cattle (Table and Figure).

Table - Strains circulating in the West Kazakhstan region

№	Key	Species	Biovar	Host	Region	Disrtict	Village	Year	Genotype
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b><i>B. abortus</i></b>									
1	39123998	Abortus	3	Cattle	West Kazakhstan	Kaztalovsky	Kabinsky	2015	1
2	192	Abortus	3	Cattle	West Kazakhstan	Bokeyordinsky	Saykun	2015	1
3	44	Abortus	5	Cattle	West Kazakhstan	Zhangalinsky	Mashteksay	2015	1
4	11	Abortus	3	Cattle	West Kazakhstan	Zhangalinsky	Kyzyloba	2015	1
5	1869	Abortus		Cattle	West Kazakhstan	Terektinsky	Chapaev	1969	1
6	134	Abortus	3	Cattle	West Kazakhstan	Taskalinsky	Merey	2015	2
7	38572468	Abortus	3	Cattle	West Kazakhstan	Baytereksky	Kushum	2015	2
8	194	Abortus	3	Cattle	West Kazakhstan	Zhangalinsky	Zhangala	2015	2
9	39186845	Abortus	3	Cattle	West Kazakhstan	Baytereksky	Kushum	2015	2

Table continued

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10	37	abortus	3	Cattle	West Kazakhstan	Taskalinsky	Merey	2015	2
11	13	abortus	3	Cattle	West Kazakhstan	Taskalinsky	Merey	2015	2
12	39007031	abortus	1	Cattle	West Kazakhstan	Bokeyordinsky	Muraksay	2015	7
13	1813	abortus	3	Cattle	West Kazakhstan	Terektinsky	Chapaev	1969	30
<b><i>B. melitensis</i></b>									
14	55	melitensis	1	Sheep	West Kazakhstan	Akzhaiksky	Budalinsk	2015	3
15	231397270	melitensis	1	Sheep	West Kazakhstan	Terektinsky	Doliny	2015	3
16	39149027	melitensis	1	Sheep	West Kazakhstan	Kaztalovsky	Bolashak	2015	3
17	233655336	melitensis	1	Goat	West Kazakhstan	Karatobinsky	Zhusandyk	2017	3
18	31527722	melitensis	1	Sheep	West Kazakhstan	Kaztalovsky	Birlik, Azhebay	2015	3
19	30712885	melitensis	1	Sheep	West Kazakhstan	Chingirlausky	Belagorsk	2015	3
20	30437355	melitensis	1	Sheep	West Kazakhstan	Chingirlausky	Chingirlau, Ulgili	2015	3
21	30712832	melitensis	1	Sheep	West Kazakhstan	Chingirlausky	Belagorsk	2015	3
22	41	melitensis	1	Sheep	West Kazakhstan	Karatobinsky	Koskul	2015	3
23	233026596	melitensis	1	Goat	West Kazakhstan	Karatobinsky	Zhusandyk	2017	3
24	39149001	melitensis	1	Cattle	West Kazakhstan	Kaztalovsky	Bolashak	2015	3
25	231868943	melitensis	1	Sheep	West Kazakhstan	Akzhaiksky	Karaultobe	2017	16
26	231866736	melitensis	1	Sheep	West Kazakhstan	Akzhaiksky	Karaultobe	2017	16

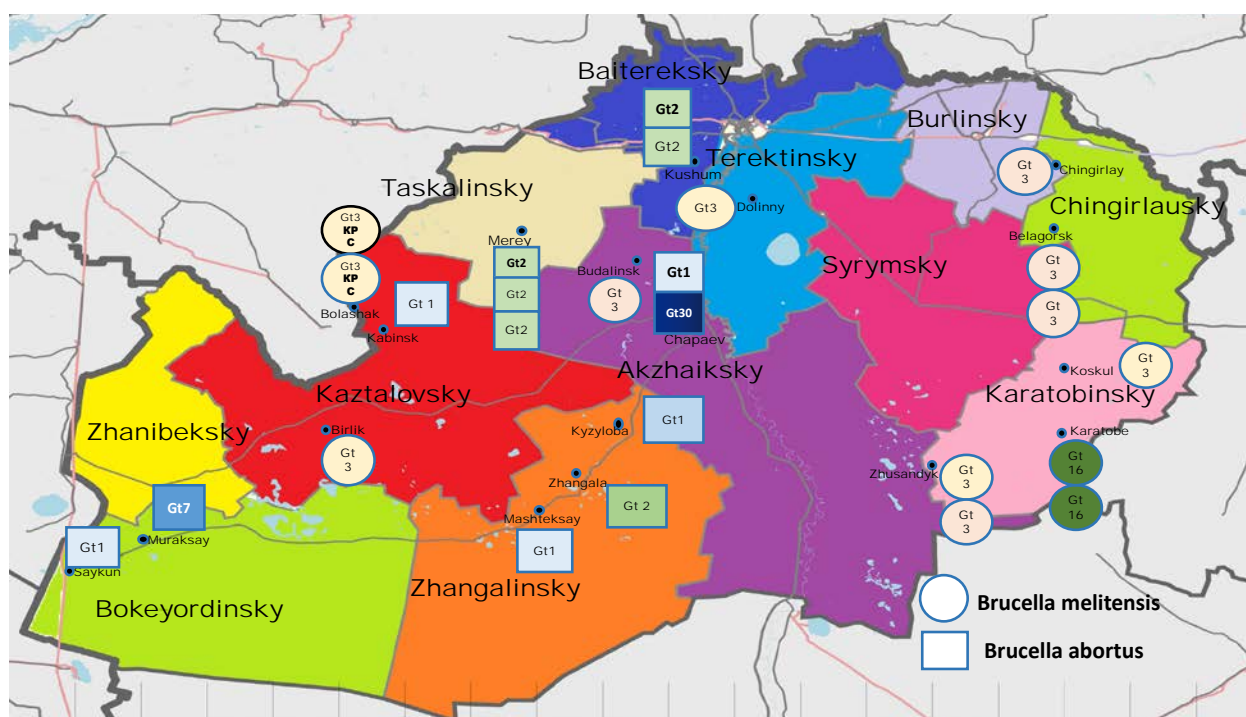


Figure – Geographical distribution of *Brucella* spp. Isolates in West Kazakhstan region

As seen from Table and Figure, in the Zhangali, Bokeyordinsky, and Terektinsky districts, two genotypes circulate in cattle (1 and 2; 1 and 7; 1 and 30, respectively). It should be noted that genotype one has been circulate since 1969. There are also two genotypes circulating among small ruminants in the Akzhaik district - 3 and 16. In this study, cross-contamination was detected; namely, the pathogen of the species *melitensis* was detected in two heads of cattle. The most common genotype in small ruminants was *B. melitensis* genotype 3, which circulated in the Akzhaiksky, Terektinsky, Kaztalov, Karatobinsky, and Chingirlau districts. This genotype belongs to the Eastern Mediterranean lineage and spreads throughout Asia.

*B. abortus* genotypes 1 and 2 are common among cattle. Interestingly, genotype two was also found in the Zhangali district, which does not border the Bayterek and Taskalinsky districts. The spread probably occurred due to the mass migration of residents from the Zhangalinsky district to the ones mentioned above.

The outbreak and spread of *Brucella* in the West Kazakhstan region occur as a result of the uncontrolled exchange of livestock between the Russian Federation in the past and the ongoing cross-border movement of infected animals. The spread of cases of brucellosis of animals from one neighboring area to another is facilitated by the uncontrolled movement of animals from one herd to another and the use of common pastures.

### Conclusions

Genetic studies determine the origin of the causative agent of the disease, but the problem is that the *Brucella* bacteria are genetically conservative. A multilocus analysis of a variable number of tandem repeats is used to discriminate *Brucella* isolates by genotypes in epidemiological studies.

To prevent brucellosis, importing animals from countries that are guaranteed brucellosis-free is essential. Information and educational work should be carried out regularly. Practical cooperation between the Ministries of Health, Ministries of Agriculture, Ministries of Ecology, and Natural Resources is needed to improve the surveillance and control of brucellosis outbreaks to achieve optimal health for humans, animals, and the environment. Creating favorable conditions for developing a professional veterinary service and improving cooperation between farmers and the government is necessary.

The *B. melitensis* strain circulating in Kazakhstan originated from the Mediterranean region. *B. abortus* strains differ from those reported in the global database. Genotyping is necessary to determine the source of the pathogen and the routes of its spread.

### Funding

This research was funded by the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (Grant No. AP19676357 «Unveiling virulence factors of *Brucella* isolates from livestock in Kazakhstan by whole genome sequencing»).

### References:

- 1 Martins R.daC., Irache J.M., Gamazo C. Acellular vaccines for ovine brucellosis: a safer alternative against a worldwide disease. *Expert Rev. Vaccines*. 2012, 11: 87–95. (doi: 10.1586/erv.11.172)
- 2 Ducrotoy M., Bertu W.J., Matope G., Cadmus S., Conde-Álvarez R., Gusi A.M., et al. *Brucellosis* in sub-Saharan Africa: current challenges for management, diagnosis and control. *Acta Trop*. 2017, 165: 179–193. (doi: 10.1016/j.actatropica.2015.10.023)
- 3 Khan A.U., Melzer F., Sayour A.E., Shell W.S., Linde J., Abdel-Glil M., et al. Whole-Genome Sequencing for Tracing the Genetic Diversity of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* Isolated from Livestock in Egypt. *Pathogens*. 2021, 10:759. (doi: 10.3390/pathogens10060759)
- 4 Chain P.S.G., Comerci D.J., Tolmasky M.E., Malfatti S.A., Vergez L.M., Agüero F., et al. Whole-Genome Analyses of Speciation Events in Pathogenic *Brucellae*. *Infection and immunity*. 2005, 73: 8353–8361 (doi:10.1128/IAI.73.12.8353–8361.2005)
- 5 Foster G., Osterman B.S., Godfroid J., Jacques, I., Cloeckaert, A., et al. *Brucella ceti sp. nov.* and *Brucella pinnipedialis sp. nov.* for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2007, 57: 2688–2693. (doi: 10.1099/ijs.0.65269-0)
- 6 Scholz H.C., Nockler K., Gollner C., Bahn P., Vergnaud G., Tomaso H. et al. *Brucella inopinata sp. nov.*, isolated from a breast implant infection. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2010, 60: 801–808. (doi: 10.1099/ijs.0.011148-0)
- 7 Whatmore A.M, Davison N., Cloeckaert A., Al Dahouk S., Zygmunt M.S., Brew S.D. et al. *Brucella papionis sp. nov.*, isolated from baboons (*Papio spp.*). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014, 64: 4120–4128. (doi: 10.1099/ijs.0.065482-0)

8 Ronai Z., Kreizinger Z., Dan A., Drees K., Foster J.T., Bányai K., et al. First isolation and characterization of *Brucella microti* from wild boar. BMC Vet Res. 2015, 11:14. (doi: 10.1186/s12917-015-0456-z)

9 Scholz H.C., Revilla-Fernandez S., Al Dahouk S., Hammerl J.A., Zygmunt M.S., Cloeckaert A., et al. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). Int J Syst Evol Microbiol. 2016, 66: 2090–2098. (doi: 10.1099/ijsem.0.000998)

10 List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN). Species. Available online: <http://www.bacterio.net/-allnamesac.html> (accessed on 1 August 2018).

11 Leclercq S.O., Cloeckaert A., Zygmunt M.S. Taxonomic organization of the family *Brucellaceae* based on a phylogenomic approach. Front. Microbiol. 2020, 10:3083 (doi: 10.3389/fmicb.2019.03083)

12 Pelerito A., Nunes A., Grilo T., Isidro J., Silva C., Ferreira A.C., et al. Genetic Characterization of *Brucella* spp.: Whole Genome Sequencing-Based Approach for the Determination of Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Profiles. Front. Microbiol. 2021, 12 :740068. (doi: 10.3389/fmicb.2021.740068)

13 Corbel M.J. Brucellosis in Humans and Animals. Geneva: World Health Organization. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241547130>

14 Akoko J. M., Pelle R., Lukambagire A.S., Machuka E.M., Nthiwa D., Mathew C., et al. Molecular epidemiology of *Brucella* species in mixed livestock-human ecosystems in Kenya. Sci. Rep. 2021, 11:8881. (doi: 10.1038/s41598-021-88327-z)

15 Spickler A.R. Brucellosis: *Brucella abortus*. Available online: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php> (accessed on 1 January 2019).

16 Richomme C., Gauthier D., Fromont, E. Contact rates and exposure to inter-species disease transmission in mountain ungulates. *Epidemiol. Infect.* 2006, 134: 21–30. (doi: 10.1017/S0950268805004693)

17 Saeed U., Ali S., Khan T.M., El-Adawy H., Melzer F., Khan A.U., et al. Seroepidemiology and the molecular detection of animal brucellosis in Punjab, Pakistan. *Microorganisms*. 2019, 7: 449. (doi: 10.3390/microorganisms7100449)

18 Sayour A.E., Elbauomy E., Abdel-Hamid N.H., Mahrous A., Carychao D., Cooley M.B., et al. MLVA fingerprinting of *Brucella melitensis* circulating among livestock and cases of sporadic human illness in Egypt. *Transbound. Emerg. Dis.* 2020, 67: 2435–2445. (doi: 10.1111/tbed.13581)

19 Wareth G., El-Diasty M., Melzer F., Schmoock G., Moustafa S.A., El-Beskawy M., et al. MLVA-16 genotyping of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* isolates from different animal species in Egypt: Geographical relatedness and the mediterranean lineage. *Pathogens*. 2020, 9:498. (doi: 10.3390/pathogens9060498)

20 Samaha H., Al-Rowaily M., Khoudair R.M., Ashour H.M. Multicenter study of brucellosis in Egypt. *Emerg. Infect. Dis.* 2008, 14: 1916–1918. (doi: 10.3201/eid1412.071452)

21 Preena P., Darshana U.W., Naveen K.V., Shefeena S., Ganesan P.I., Balakrishnan S., et al. Cross-Species Transmission of *Brucella abortus* in an Aborted Sow. *J. Entomol. Zool.* 2000, 8: 1793-1795 <https://www.entomoljournal.com/archives/?year=2020&vol=8&issue=3&ArticleId=7001>

22 Alvarez J., Suez J.L., Garcia N., Serrat C., Perez-Sancho M., Gonzalez S., et al. Management of an outbreak of brucellosis due to *B. melitensis* in dairy cattle in Spain. *Res. Vet. Sci.* 2011, 90: 208–211. (doi:10.1016/j.rvsc.2010.05.028)

23 Blasco J.M., Molina-Flores B. Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2011, 27: 95–104. (doi: 10.1016/j.cvfa.2010.10.003)

24 Management of an outbreak of brucellosis due to *B. melitensis* in dairy cattle in Spain. *Res. Vet. Sci.* 2011, 90: 208–211. (doi: 10.1016/j.rvsc.2010.05.028)

25 Ledwaba B., Mafofo J., van Heerden H. Genome sequences of *Brucella abortus* and *Brucella suis* strains isolated from bovine in Zimbabwe. *Genome Announc.* 2014, 2: 01063-14. (doi: 10.1128/genomeA.01063-14)

26 Wareth G., Melzer F., Tomaso U., Roesler H., Neubauer H. Detection of *Brucella abortus* DNA in aborted goats and sheep in Egypt by real-time PCR. *BCM Res.Notes.* 2015, 8:212. (doi: 10.1186/s13104-015-1173-1)

27 Hegazy, Y.M., Abdel-Hamid, N.H., Eldehieh, M., Oreiby, A.F., Algabbary, M.H., Hamdy, M.E. et al. Trans-species transmission of *Brucellae* among ruminants hampering brucellosis control efforts in Egypt. *J.Appl. Microbiol.* 2021, 132: 90-100 (doi: 10.1111/jam.15173)

- 28 Zowghi E., Ebadi A., Yarahmadi M. Isolation and identification of *Brucella* organisms in Iran. *J. Clin. Infect. Dis.* 2008, 4:185-188. (<https://brieflands.com/articles/archcid-73413>)
- 29 Georgi E., Walter M.C., Pfalzgraf M.T., Northoff B.H., Holdt L.M., Scholz H.C., et al. Whole genome sequencing of *Brucella melitensis* isolated from 57 patients in Germany reveals high diversity in strains from Middle East. *PloS ONE.* 2017, 12:175425. (doi: 10.1371/journal.pone.0175425)
- 30 Dadar M., Yazdani Y., Wareth G. Molecular diagnosis of acute and chronic brucellosis of human. *Microbial Technology for the Welfare of Society.* Springer. 2019, 223-245. (doi:10.1007/978-981-13-8844-6\_16)
- 31 Solera J., Lozano E., Martínez-Alfaro E., Espinosa, A. Castillejos M.L., Abad L. *Brucellar* spondylitis: review of 35 cases and literature survey. *Clin. Infect. Dis.* 1999, 29: 1440-1449. (doi: 10.1086/313524)
- 32 Young E.J. “*Brucella* species,” in *Principles and Practice of Infectious Diseases.* 6th Edn. eds. G. L. Mandell, J. E. Bennet and R. Dolin (Philadelphia: Churchill Livingstone). 2005: 2669–2772. (doi:10.1001/jama.2010.1643)
- 33 Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N., Christou L., Tsianos E.V. The new global map of human brucellosis, *Lancet Infect. Dis.* 2006, 6: 91-99.(doi: 10.1016/S1473-3099(06)70382-6)
- 34 Ariza J., Bosilkovski M., Cascio A., Colmenero J.D., Corbel M.J., Falagas M.E., et al. Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: the Ioannina recommendations. *PLoS Med.* 2007, 4: 317. (doi:10.1371/journal.pmed.0040317)
- 35 Dean A.S., Crump L., Greter H., Schelling, E., Zinsstag J. Global Burden of Human Brucellosis: A Systematic Review of Disease Frequency. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012, 6: 1865. (doi: 10.1371/journal.pntd.0001865)
- 36 Yumuk Z., O'Callaghan D. Brucellosis in Turkey- an overview, *Int. J. Infect. Dis.* 2012, 16: 228-235. (<https://www.aaem.pl/Brucellosis-in-humans-etiology-diagnostics-clinical-forms,71918,0,2.htm>)
- 37 Galinska E.M., Zagorski J. Brucellosis in humans—etiology, diagnostics, clinical forms. *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM.* 2013, 20: 233–238. (doi: 10.5812/jjm.7197)
- 38 Mirnejad R., Mohammadi M., Majdi A., Taghizoghi N., Piranfar V. Molecular typing of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* from human blood samples using PCR-RFLP Method. *Jundishapur J. Microbiol.* 2013, 6: 1-6 (doi: 10.5812/jjm.7197)
- 39 Urazayeva S.T., Begalin T., Tolgombaeva V.S., Urazayeva A.B., Amanshieva A.A., Nurmaganbetova G.Zh., et al. The problem of vaccination rejections and ways of solution. *Microbiology and virology.* 2023, 4: 110-117. (doi: 10.53729/MV-AS.2023.04.06)
- 40 Sun M., Jing Z., Di D., Yan H., Zhang Z., Xu Q., et al. Multiple locus variable – number tandem – repeat and single – nucleotide polymorphism – based *Brucella* typing reveals multiple lineages in *Brucella melitensis* currently endemic in China. *Front. Vet. Sci.* 2017, 4:215. (doi: 10.3389/fvets.2017.00215)
- 41 OIE. Brucellosis (infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 7th ed.; World Health Organization for Animal Health: Paris, France. 2018, 1: 355–398. (doi: 10.2903/j.efsa.2017.4889)
- 42 Khan A.U., Shell W.S., Melzer F., Sayour A.E., Ramadan E.S., Elschner M.C., et al. Identification, genotyping and antimicrobial susceptibility testing of *Brucella spp.* isolated from livestock in Egypt. *Microorganisms.* 2019, 7: 603. (doi: 10.3390/microorganisms7120603)
- 43 Bricker B.J., Halling S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32: 2660–2666. (doi: 10.1128/jcm.32.11.2660-2666.1994)
- 44 Garcia-Yoldi D., Marin C.M., de Miguel M.J., Munoz P.M. Vizmanos, J.L. Lopez-Goni I. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clin. Chem.* 2006, 52: 779–781. (doi: 10.1373/clinchem.2005.062596)
- 45 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, 6:9. (doi: 10.1186/1471-2180-6-9)
- 46 Al Dahouk S., Le Fleche P., Nockler K., Jacques I., Grayon M., Scholz H.C., et al. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. *J. Microbiol. Methods.* 2007, 69: 137–145. (doi: 10.1016/j.mimet.2006.12.015)

47 Foster J.T., Beckstrom-Sternberg S.M., Pearson T., Beckstrom-Sternberg J.S., Chain P.S., Roberto F.F., et al. Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella*. *J. Bacteriol.* 2009, 191: 2864–2870. (doi: 10.1128/JB.01581-08)

48 Wattam A.R., Foster J.T., Mane S.P., Beckstrom-Sternberg S.M., Beckstrom-Sternberg J.M., Dickerman A.W., et al. Comparative phylogenomics and evolution of the *Brucellae* reveal a path to virulence. *J. Bacteriol.* 2014, 196: 920–930. (doi: 10.1128/JB.01091-13)

49 Johansen T.B., Schefer L., Jensen V.K., Bohlin J., Feruglio S.L. Whole-genome sequencing and antimicrobial resistance in *Brucella melitensis* from a Norwegian perspective. *Sci. Rep.* 2018, 8:8538. (doi: 10.1038/s41598-018-26906-3)

50 Yang X., Piao D., Mao L., Pang B., Zhao H., Tian G., et al. Whole-genome sequencing of rough *Brucella melitensis* in China provides insights into its genetic features. *Emerg Microbes Infect.* 2020, 9: 2147–2156. (doi: 10.1080/22221751.2020.1824549)

51 Whatmore A.M., Foster J.T. Emerging diversity and ongoing expansion of the genus *Brucella*. *Infect. Genet. Evol.* 2021, 92:104865. (doi: 10.1016/j.meegid.2021.104865)

52 Ashford R.T., Whatmore A.M. "*Brucella*." In *Molecular Typing in Bacterial Infections*. Filippis I. de. Cham: Springer International Publishing. 2022, 2:217–245. (<https://www.semanticscholar.org/paper/Brucella-Ashford-Whatmore/16ee23b326b2c3790f6fc7e331c1e331403392b0>)

53 Daugaliyeva A., Peletto S., Sultanov A., Baramova S., Acutis P.L., Adambaeva A., Tusipkanuly O., Usserbayev B. 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.* 2016, 3: 53–59. (doi: 10.1016/j.meegid.2017.12.022)

54 Garofolo, G., Ancora, M., Di Giannatale, E., MLVA-16 loci panel on *Brucella* spp. using multiplex PCR and multicolour capillary electrophoresis. *J. Microbiol. Methods.* 2013, 92:103–107. (doi: 10.1016/j.mimet.2012.11.007)

А.Т. ДАУГАЛИЕВА<sup>1</sup>, С.Г. ҚАНАТБАЕВ<sup>2</sup>, С.Т. ДАУГАЛИЕВА<sup>3\*</sup>, Н.С. ҚЫДЫР<sup>1</sup>,  
S. PELETTO<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Қазақ мал шаруашылығы және жемшөп өндірісі ғылыми зерттеу институты, Алматы, Қазақстан

<sup>2</sup>Батыс Қазақстан ғылыми-зерттеу ветеринариялық станциясы, Алматы, Қазақстан

<sup>3</sup>Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

<sup>4</sup>Эксперименттік зоофилактикалық Пьемонте институты, Турин, Италия

\*e-mail:saule.daugaliyeva@mail.ru

## БАТЫС ҚАЗАҚСТАН ОБЛЫСЫНЫҢ АУМАҒЫНДАҒЫ БРУЦЕЛЛЕЗ ҚОЗДЫРҒЫШЫН ГЕНОТИПТЕУ

### Түйін

Бруцеллез – үй және жабайы жануарларға, сондай-ақ адамдарға әсер ететін *Brucella* тұқымдасының бактериялары тудыратын зооноздық жұқпалы ауру. Қазақстанда бруцеллез жануарлар мен адамдардың эндемиялық ауруы болып табылады. Дәстүрлі биотиптеу әдістері жақын туыс бруцеллалар түрлерін және олардың биоварларын ажырата алмайды және індеттің көзін анықтай алмайды. Біздің зерттеуімізде біз молекулалық типтеу әдісі – тандем қайталануларының ауыспалы санын мультилокусты талдау арқылы Батыс Қазақстан облысында айналымда жүрген бруцеллалардың генотипін анықтадық. Зерттеу нәтижесінде 13 бас ірі қарадан *B. abortus* 4 генотипі, 11 бас ұсақ малдан және 2 бас ірі қара малдан *B. melitensis* 2 генотипі анықталды. Бруцелланың екіншілік жануарлар иелеріне айқаспалы инфекциясы байқалды, *B. melitensis* ірі қара малда инфекцияны тудырады. Ұсақ мүйізді жануарларда ең көп таралған генотип *B. melitensis* 3 генотипі болды, ол Шығыс Жерорта теңізі тұқымдастығына жатады және Азия құрлығында таралған. *B. abortus* штамдарының генотиптері бірегей, өйткені олар алғаш рет Қазақстан территориясында анықталған. Бруцеллездің генетикалық әртүрлілігін зерттеу бруцеллезді жою бағдарламасының соңғы кезеңдеріндегі ошақтарды қадағалау немесе Қазақстанның эндемиялық емес аймақтарындағы адамдар мен жануарлардың инфекция көздерін қадағалау үшін қажет.

**Кілтті сөздер:** бруцеллез, ірі қара мал, ұсақ мал, мультилокусты талдау.

MPNТИ: 68.41.53

А.Т. ДАУГАЛИЕВА<sup>1</sup>, С.Г. КАНАТБАЕВ<sup>2</sup>, С.Т. ДАУГАЛИЕВА<sup>3\*</sup>, Н.С. ҚЫДЫР<sup>1</sup>,  
S. PELETTO<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Казахский научно-исследовательский институт животноводства и кормопроизводства,  
Алматы, Казахстан

<sup>2</sup>Западно-Казахстанская научно-исследовательская ветеринарная станция, Алматы,  
Казахстан

<sup>3</sup>Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

<sup>4</sup>Экспериментальный зоофилактический институт Пьемонте, Турин, Италия

\*e-mail:saule.daugalieva@mail.ru

## ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА, ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО НА ТЕРРИТОРИИ ЗАПАДНО-КАЗАХСТАНСКОЙ ОБЛАСТИ

doi:10.53729/MV-AS.2024.02.09

### Аннотация

Бруцеллез поражает всех животных и людей. В Казахстане бруцеллез является эндемичным заболеванием животных и людей. Традиционные методы биотипирования неспособны дифференцировать близкородственные виды бруцелл и их биовары, и отследить источник вспышки. В нашем исследовании мы провели генотипирование бруцелл, циркулирующих на территории Западно-Казахстанской области, при помощи метода молекулярного типирования - мультилокусного анализа варибельного числа tandemных повторов. В результате проведенных исследований, от 13 голов крупного рогатого скота было выявлено 4 генотипа *B. abortus*, а от 11 голов мелкого рогатого скота и 2 голов крупного рогатого скота было выявлено 2 генотипа *B. melitensis*. Наблюдалась перекрестная инфекция бруцелл на вторичных животных-хозяев, а именно, инфекция у крупного рогатого скота была вызвана *B. melitensis*. Самым распространенным генотипом у мелкого рогатого скота являлся *B. melitensis* генотип 3, который относится к Восточно-Средиземноморской линии и циркулирует по всему азиатскому континенту. Штаммы *B. abortus* отличаются от мировых штаммов. Исследование генотипов бруцелл необходимо для отслеживания вспышек на заключительных этапах программы по ликвидации бруцеллеза, или отслеживания источников инфицирование человека и животных в неэндемичных районах Казахстана.

**Ключевые слова:** бруцеллез, крупный рогатый скот, мелкий рогатый скот, мультилокусный анализ.

Бруцеллез поражает широкий круг домашнего скота, диких млекопитающих и человека [1-3]. В Казахстане бруцеллез является эндемичным заболеванием животных и людей, и представляет собой приоритетную проблему ветеринарии из-за сложной эпидемиологической ситуации. Основываясь на биохимических характеристиках [4] и предпочтениях хозяина, было идентифицировано 12 генетически близкородственных видов [5-12]. Большинство инфекций человека вызываются двумя видами бруцелл: *B. melitensis* и *B. abortus* [3,13,14]. Естественные резервуары-хозяева *B. abortus* включают семейство *Bovidae* [15]. Однако также сообщается о перекрестных инфекциях бруцелл на вторичных животных-хозяевах [3,16-19]. В районах, где крупный рогатый скот содержится в тесном контакте с мелким рогатым скотом, как это часто бывает во многих популяциях смешанного животноводства, инфекция у крупного рогатого скота также может быть вызвана *B. melitensis*, а у мелкого рогатого скота – *B. abortus* [20-27]. Как и во многих странах мира, в Казахстане *B. melitensis* является самым распространенным и наиболее вирулентным видом *Brucella* [28-30], поскольку он чаще всего выделяется от человека и провоцирует выводящие из строя, трудноизлечимые заболевания, иногда с фатальным исходом [13,29,31-38]. Несмотря на то, что вакцинация является основным методом



профилактики инфекционных заболеваний [39], вакцинация против бруцеллеза жвачных животных на территории РК официально не рекомендуется.

На сегодняшний день в Казахстане знания о молекулярной эпидемиологии, филогеографическом происхождении и распространении, а также о генетическом разнообразии штаммов *Brucella spp.* несколько ограничены. Для идентификации видов бруцелл и их биоваров используются различные методы типирования. В эпидемиологические исследования включают как традиционные методы биотипирования, так и современные методы молекулярного анализа. Традиционные методы биотипирования, рекомендованные Всемирной организацией по здоровью животных (МЭБ), основываются на специфичности хозяина, особенности роста культур [40], фаготипировании, биохимических и рутинных серологических характеристиках [41]. Эти методы трудоемки и требуют обработки живых бактерий, однако их разрешающая способность слишком мала [18,19,42], т.е. они не способны дифференцировать виды бруцелл и их биовары, отследить источник вспышки [19,43-48]. Золотым стандартом в диагностике бруцеллёза является выделение чистой культуры, однако для этого необходима лаборатория 3 уровня биобезопасности (BSL - 3) [12,49,50].

Разработки в области молекулярного типирования способствовали современному пониманию мировой структуры популяций организмов *Brucella spp.* и эпидемиологии заболеваний [51].

В нашем исследовании мы провели генотипирование бруцелл, циркулирующих на территории Западно-Казахстанской области, при помощи мультилокусного анализа варибельного числа tandemных повторов (MLVA).

#### **Материалы и методы исследования**

Для определения фенотипической характеристики возбудителя использовали традиционные методы Всемирной организацией здравоохранения [41].

При постановке ПЦР руководствовались инструкцией ФГБУ «ВГНКИ». В последующем использовали ПЦР с разработанными нами праймерами, для дифференцирования патогена до вида [52].

Из 26 проб абортинрованного плода с ЗКО (15 от КРС и 11 от МРС) изолировали 13 штаммов *B. melitensis* и 13 *B. abortus*. ДНК экстрагировали «PureLink Genomic DNA Kits» (Invitrogen). Фрагментный анализ проводили при помощи стандартной методики с небольшой модификацией [53]. Было исследовано 16 локусов генов [54].

В мастер –микс 2 x (Thermo Scientific) содержал также 10 пмоль праймера и 10 нг матрицы. Использовали LIZ 1200 и LIZ 600. Фрагментный анализ осуществили на секвенаторе ABI 3500, с использованием программного обеспечения GeneMapper 4.1. Штаммы *B. abortus* 544 и *B. melitensis* 16 М были контролем для проверки исследуемых с данными интернета. Биоинформатическую обработку осуществили программным обеспечением BioNumerics7.5 (Applied Maths, Бельгия). Возбудителей сгруппировали с помощью подхода UPGMA. Филогенетические деревья построили на основе данных категорического коэффициента. Полученные результаты сравнивали с общедоступной публичной базой данных MLVA.

#### **Результаты и обсуждение**

В результате проведенных исследований, от 13 голов крупного рогатого скота было выявлено 4 генотипа *B. abortus* (1,2,7,30), от 11 голов мелкого рогатого скота и 2 голов крупного рогатого скота было выявлено 2 генотипа *B. melitensis* (3,16) (таблица и рисунок).

Таблица – Штаммы *Brucella*, циркулирующие в Западно-Казахстанской области

№	Название пробы	Вид	Биовар	Вид, хозяин	Область	Район	Поселок	Год	Генотип
<b><i>B. abortus</i></b>									
1	39123998	abortus	3	КРС	ЗКО	Казталовский	Кабинск	2015	1
2	192	abortus	3	КРС	ЗКО	Бокеординский	Сайхин	2015	1
3	44	abortus	5	КРС	ЗКО	Жангалинский	Маштексай	2015	1
4	11	abortus	3	КРС	ЗКО	Жангалинский	Кызылоба	2015	1
5	1869	abortus		КРС	ЗКО	Теректинский	Чапаево	1969	1
6	134	abortus	3	КРС	ЗКО	Таскалинский	Мерей	2015	2
7	38572468	abortus	3	КРС	ЗКО	Байтерекский	Кушум	2015	2
8	194	abortus	3	КРС	ЗКО	Жангалинский	Жангала	2015	2
9	39186845	abortus	3	КРС	ЗКО	Байтерекский	Кушум	2015	2
10	37	abortus	3	КРС	ЗКО	Таскалинский	Мерей	2015	2
11	13	abortus	3	КРС	ЗКО	Таскалинский	Мерей	2015	2
12	39007031	abortus	1	КРС	ЗКО	Бокеординский	Мураксай	2015	7
13	1813	abortus	3	КРС	ЗКО	Теректинский	Чапаево	1969	30
<b><i>B. melitensis</i></b>									
14	55	melitensis	1	овцы	ЗКО	Акжайкский	Будалинск	2015	3
15	231397270	melitensis	1	овцы	ЗКО	Теректинский	Долиный	2015	3
16	39149027	melitensis	1	КРС	ЗКО	Казталовский	Болашак	2015	3
17	233655336	melitensis	1	козы	ЗКО	Каратобинский	Жусандык	2017	3
18	31527722	melitensis	1	овцы	ЗКО	Казталовский	Бирлик, Ажебай	2015	3
19	30712885	melitensis	1	овцы	ЗКО	Чингирлауский	Белагорск	2015	3
20	30437355	melitensis	1	овцы	ЗКО	Чингирлауский	Ченгирлау, Улгеле	2015	3
21	30712832	melitensis	1	овцы	ЗКО	Чингирлауский	Белагорск	2015	3
22	41	melitensis	1	овцы	ЗКО	Каратобинский	Коскуль	2015	3
23	233026596	melitensis	1	козы	ЗКО	Каратобинский	Жусандык	2017	3
24	39149001	melitensis	1	КРС	ЗКО	Казталовский	Болашак	2015	3
25	231868943	melitensis	1	овцы	ЗКО	Акжайкский	Караултобе	2017	16
26	231866736	melitensis	1	овцы	ЗКО	Акжайкский	Караултобе	2017	16

Как видно из таблицы и рисунка, в Жангалинском, Бокеординском, Теректинском районах у крупного рогатого скота циркулируют 2 генотипа (1 и 2; 1 и 7; 1 и 30, соответственно). Следует отметить, что генотип 1 циркулирует с 1969 года. Среди мелкого рогатого скота в Акжайкском районе также циркулируют 2 генотипа - 3 и 16. В данном исследовании была выявлена перекрестная контаминация, а именно у двух голов крупного рогатого скота был обнаружен возбудитель вида *B. melitensis*. Самым распространенным генотипом у мелкого рогатого скота являлся *B. melitensis* генотип 3, который циркулировал в Акжайкском, Теректинском, Казталовском, Каратобинском, Чингирлауском районах. Данный генотип относится к Восточно-Средиземноморской линии и циркулирует по всему азиатскому континенту.

Среди крупного рогатого скота распространены *B. abortus* генотипы 1 и 2. Интересно отметить, что генотип 2 также обнаружен в Жангалинском районе, который не граничит с Байтерекским и Таскалинским районами. Вероятно, распространение произошло в результате массовой миграции жителей с Жангалинского района в вышеуказанные.



Рисунок –Географическое распространение изолятов *Brucella spp.* в Западно-Казахстанской области

Вспышка и распространение бруцелл в Западно-Казахстанской области происходит в результате неконтролируемого обмена домашним скотом между Российской Федерацией в прошлом и продолжающееся в настоящее время трансграничное перемещение заражённых животных. Распространение случаев бруцеллеза животных из одного соседнего района в другой способствует неконтролируемое перемещение животных из одного стада в другое и использование общих пастбищ.

### Заклучение

Генетические исследования определяют происхождении возбудителя болезни, но проблема заключается в том, что бактерии бруцелл генетически консервативны. Для дискриминации изолятов бруцелл по генотипам в эпидемиологических исследованиях применяют мультилокусный анализ переменного количества tandemных повторов.

Для предотвращения бруцеллёза важно импортировать животных только из гарантированно свободных стран по бруцеллёзу. Необходимо регулярно проводить информационные и просветительские работы. Необходимо эффективное сотрудничество между Министерствами здравоохранения, сельского хозяйства, экологии и природных ресурсов для улучшения эпиднадзора и контроля вспышек бруцеллёза с целью достижения оптимального состояния здоровья людей, животных и окружающей среды. Необходимо создание благоприятных условий для развития профессиональной ветеринарной службы, улучшения сотрудничества между фермерами и Правительством.

Штамм *B. melitensis* циркулирующий на территории Казахстан произошел со средиземноморского региона. Штаммы *B. abortus* отличаются от штаммов, зарегистрированных в мировой базе данных. Генотипирование необходимо для определение источника возбудителя и путей его распространения.

## Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант № АП19676357 «Выявление факторов вирулентности изолятов *Brucella* от домашнего скота в Казахстане методом полногеномного секвенирования»).

## Литература:

- 1 Martins R.daC., Irache J.M., Gamazo C. Acellular vaccines for ovine brucellosis: a safer alternative against a worldwide disease. *Expert Rev. Vaccines*. 2012, 11: 87–95. (doi: 10.1586/erv.11.172)
- 2 Ducrotoy M., Bertu W.J., Matope G., Cadmus S., Conde-Álvarez R., Gusi A.M., et al. *Brucellosis* in sub-Saharan Africa: current challenges for management, diagnosis and control. *Acta Trop*. 2017, 165: 179–193. (doi: 10.1016/j.actatropica.2015.10.023)
- 3 Khan A.U., Melzer F., Sayour A.E., Shell W.S., Linde J., Abdel-Glil M., et al. Whole-Genome Sequencing for Tracing the Genetic Diversity of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* Isolated from Livestock in Egypt. *Pathogens*. 2021, 10:759. (doi: 10.3390/pathogens10060759)
- 4 Chain P.S.G., Comerci D.J., Tolmasky M.E., Malfatti S.A., Vergez L.M., Agüero F. et al. Whole-Genome Analyses of Speciation Events in Pathogenic *Brucellae*. *Infection and immunity*. 2005, 73: 8353–8361 (doi:10.1128/IAI.73.12.8353–8361.2005)
- 5 Foster G., Osterman B.S., Godfroid J., Jacques, I., Cloeckaert, A., et al. *Brucella ceti sp. nov.* and *Brucella pinnipedialis sp. nov.* for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2007, 57: 2688–2693. (doi: 10.1099/ijs.0.65269-0)
- 6 Scholz H.C., Nockler K., Gollner C., Bahn P., Vergnaud G., Tomaso H. et al. *Brucella inopinata sp. nov.*, isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010, 60: 801–808. (doi: 10.1099/ijs.0.011148-0)
- 7 Whatmore A.M, Davison N., Cloeckaert A., Al Dahouk S., Zygmunt M.S., Brew S.D. et al. *Brucella papionis sp. nov.*, isolated from baboons (*Papio spp.*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2014, 64: 4120–4128. (doi: 10.1099/ijs.0.065482-0)
- 8 Ronai Z., Kreizinger Z., Dan A., Drees K., Foster J.T., Bányai K., et al. First isolation and characterization of *Brucella microti* from wild boar. *BMC Vet Res*. 2015, 11:14. (doi: 10.1186/s12917-015-0456-z)
- 9 Scholz H.C., Revilla-Fernandez S., Al Dahouk S., Hammerl J.A., Zygmunt M.S., Cloeckaert A., et al. *Brucella vulpis sp. nov.*, isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2016, 66: 2090–2098. (doi: 10.1099/ijsem.0.000998)
- 10 List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN). Species. Available online: <http://www.bacterio.net/-allnamesac.html> (accessed on 1 August 2018).
- 11 Leclercq S.O., Cloeckaert A., Zygmunt M.S. Taxonomic organization of the family *Brucellaceae* based on a phylogenomic approach. *Front. Microbiol*. 2020, 10:3083 (doi: 10.3389/fmicb.2019.03083)
- 12 Pelerito A., Nunes A., Grilo T., Isidro J., Silva C., Ferreira A.C., et al. Genetic Characterization of *Brucella spp.*: Whole Genome Sequencing-Based Approach for the Determination of Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Profiles. *Front. Microbiol*. 2021, 12:740068. (doi: 10.3389/fmicb.2021.740068)
- 13 Corbel M.J. *Brucellosis in Humans and Animals*. Geneva: World Health Organization. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241547130>
- 14 Akoko J. M., Pelle R., Lukambagire A.S., Machuka E.M., Nthiwa D., Mathew C., et al. Molecular epidemiology of *Brucella* species in mixed livestock-human ecosystems in Kenya. *Sci. Rep*. 2021, 11:8881. (doi: 10.1038/s41598-021-88327-z)
- 15 Spickler A.R. *Brucellosis: Brucella abortus*. Available online: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php> (accessed on 1 January 2019).
- 16 Richomme C., Gauthier D., Fromont, E. Contact rates and exposure to inter-species disease transmission in mountain ungulates. *Epidemiol. Infect*. 2006, 134: 21–30. (doi: 10.1017/S0950268805004693)
- 17 Saeed U., Ali S., Khan T.M., El-Adawy H., Melzer F., Khan A.U., et al. Seroepidemiology and the molecular detection of animal brucellosis in Punjab, Pakistan. *Microorganisms*. 2019, 7: 449. (doi: 10.3390/microorganisms7100449)

- 18 Sayour A.E., Elbauomy E., Abdel-Hamid N.H., Mahrous A., Carychao D., Cooley M.B., et al. MLVA fingerprinting of *Brucella melitensis* circulating among livestock and cases of sporadic human illness in Egypt. *Transbound. Emerg. Dis.* 2020, 67: 2435–2445. (doi: 10.1111/tbed.13581)
- 19 Wareth G., El-Diasty M., Melzer F., Schmoock G., Moustafa S.A., El-Beskawy M., et al. MLVA-16 genotyping of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* isolates from different animal species in Egypt: Geographical relatedness and the mediterranean lineage. *Pathogens.* 2020, 9:498. (doi: 10.3390/pathogens9060498)
- 20 Samaha H., Al-Rowaily M., Khoudair R.M., Ashour H.M. Multicenter study of brucellosis in Egypt. *Emerg. Infect. Dis.* 2008, 14: 1916–1918. (doi: 10.3201/eid1412.071452)
- 21 Preena P., Darshana U.W., Naveen K.V., Shefeena S., Ganesan P.I., Balakrishnan S., et al. Cross-Species Transmission of *Brucella abortus* in an Aborted Sow. *J. Entomol. Zool.* 2000, 8: 1793-1795 <https://www.entomoljournal.com/archives/?year=2020&vol=8&issue=3&ArticleId=7001>
- 22 Alvarez J., Suaez J.L., Garcia N., Serrat C., Perez-Sancho M., Gonzalez S., et al. Management of an outbreak of brucellosis due to *B. melitensis* in dairy cattle in Spain. *Res. Vet. Sci.* 2011, 90: 208–211. (doi:10.1016/j.rvsc.2010.05.028)
- 23 Blasco J.M., Molina-Flores B. Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2011, 27: 95–104. (doi: 10.1016/j.cvfa.2010.10.003)
- 24 Management of an outbreak of brucellosis due to *B. melitensis* in dairy cattle in Spain. *Res. Vet. Sci.* 2011, 90: 208–211. (doi: 10.1016/j.rvsc.2010.05.028)
- 25 Ledwaba B., Mafofo J., van Heerden H. Genome sequences of *Brucella abortus* and *Brucella suis* strains isolated from bovine in Zimbabwe. *Genome Announc.* 2014, 2: 01063-14. (doi: 10.1128/genomeA.01063-14)
- 26 Wareth G., Melzer F., Tomaso U., Roesler H., Neubauer H. Detection of *Brucella abortus* DNA in aborted goats and sheep in Egypt by real-time PCR. *BCM Res.Notes.* 2015, 8:212. (doi: 10.1186/s13104-015-1173-1)
- 27 Hegazy, Y.M., Abdel-Hamid, N.H., Eldehieh, M., Oreiby, A.F., Algabbary, M.H., Hamdy, M.E. et al. Trans-species transmission of *Brucellae* among ruminants hampering brucellosis control efforts in Egypt. *J.Appl. Microbiol.* 2021, 132: 90-100 (doi: 10.1111/jam.15173)
- 28 Zowghi E., Ebadi A., Yarahmadi M. Isolation and identification of *Brucella* organisms in Iran. *J.Clin. Infect. Dis.* 2008, 4:185-188. (<https://brieflands.com/articles/archcid-73413>)
- 29 Georgi E., Walter M.C., Pfalzgraf M.T., Northoff B.H., Holdt L.M., Scholz H.C., et al. Whole genome sequencing of *Brucella melitensis* isolated from 57 patients in Germany reveals high diversity in strains from Middle East. *PLoS ONE.* 2017, 12:175425. (doi: 10.1371/journal.pone.0175425)
- 30 Dadar M., Yazdani Y., Wareth G. Molecular diagnosis of acute and chronic brucellosis of human. *Microbial Technology for the Welfare of Society.* Springer. 2019, 223-245. (doi:10.1007/978-981-13-8844-6\_16)
- 31 Solera J., Lozano E., Martínez-Alfaro E., Espinosa, A. Castillejos M.L., Abad L. *Brucellar* spondylitis: review of 35 cases and literature survey. *Clin. Infect. Dis.* 1999, 29: 1440-1449. (doi: 10.1086/313524)
- 32 Young E.J. “*Brucella* species,” in *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th Edn. eds. G. L. Mandell, J. E. Bennet and R. Dolin (Philadelphia: Churchill Livingstone). 2005: 2669–2772. (doi:10.1001/jama.2010.1643)
- 33 Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N., Christou L., Tsianos E.V. The new global map of human brucellosis, *Lancet Infect. Dis.* 2006, 6: 91-99.(doi: 10.1016/S1473-3099(06)70382-6)
- 34 Ariza J., Bosilkovski M., Cascio A., Colmenero J.D., Corbel M.J., Falagas M.E., et al. Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: the Ioannina recommendations. *PLoS Med.* 2007, 4: 317. (doi:10.1371/journal.pmed.0040317)
- 35 Dean A.S., Crump L., Greter H., Schelling, E., Zinsstag J. Global Burden of Human Brucellosis: A Systematic Review of Disease Frequency. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012, 6: 1865. (doi: 10.1371/journal.pntd.0001865)
- 36 Yumuk Z., O'Callaghan D. Brucellosis in Turkey- an overview, *Int. J. Infect. Dis.* 2012, 16: 228-235. (<https://www.aaem.pl/Brucellosis-in-humans-etiology-diagnostics-clinical-forms,71918,0,2.htm>)
- 37 Galinska E.M., Zagorski J. Brucellosis in humans—etiology, diagnostics, clinical forms. *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM.* 2013, 20: 233–238. (doi: 10.5812/jjm.7197)

- 38 Mirnejad R., Mohammadi M., Majdi A., Taghizoghi N., Piranfar V. Molecular typing of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* from human blood samples using PCR-RFLP Method. Jundishapur J. Microbiol. 2013, 6: 1-6 (doi: 10.5812/jjm.7197)
- 39 Urazayeva S.T., Begalin T., Tolgombaeva V.S., Urazayeva A.B., Amanshieva A.A., Nurmaganbetova G.Zh., et al. The problem of vaccination rejections and ways of solution. Microbiology and virology. 2023, 4: 110-117. (doi: 10.53729/MV-AS.2023.04.06)
- 40 Sun M., Jing Z., Di D., Yan H., Zhang Z., Xu Q., et al. Multiple locus variable – number tandem – repeat and single – nucleotide polymorphism – based *Brucella* typing reveals multiple lineages in *Brucella melitensis* currently endemic in China. Front. Vet. Sci. 2017, 4:215. (doi: 10.3389/fvets.2017.00215)
- 41 OIE. Brucellosis (infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 7th ed.; World Health Organization for Animal Health: Paris, France. 2018, 1: 355–398. (doi: 10.2903/j.efsa.2017.4889)
- 42 Khan A.U., Shell W.S., Melzer F., Sayour A.E., Ramadan E.S., Elschner M.C., et al. Identification, genotyping and antimicrobial susceptibility testing of *Brucella spp.* isolated from livestock in Egypt. Microorganisms. 2019, 7: 603. (doi: 10.3390/microorganisms7120603)
- 43 Bricker B.J., Halling S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. J. Clin. Microbiol. 1994, 32: 2660–2666. (doi: 10.1128/jcm.32.11.2660-2666.1994)
- 44 Garcia-Yoldi D., Marin C.M., de Miguel M.J., Munoz P.M. Vizmanos, J.L. Lopez-Goni I. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. Clin. Chem. 2006, 52: 779–781. (doi: 10.1373/clinchem.2005.062596)
- 45 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, 6:9. (doi: 10.1186/1471-2180-6-9)
- 46 Al Dahouk S., Le Fleche P., Nockler K., Jacques I., Grayon M., Scholz H.C., et al. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. J. Microbiol. Methods. 2007, 69: 137–145. (doi: 10.1016/j.mimet.2006.12.015)
- 47 Foster J.T., Beckstrom-Sternberg S.M., Pearson T., Beckstrom-Sternberg J.S., Chain P.S., Roberto F.F., et al. Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella*. J. Bacteriol. 2009, 191: 2864–2870. (doi: 10.1128/JB.01581-08)
- 48 Wattam A.R., Foster J.T., Mane S.P., Beckstrom-Sternberg S.M., Beckstrom-Sternberg J.M., Dickerman A.W., et al. Comparative phylogenomics and evolution of the *Brucellae* reveal a path to virulence. J. Bacteriol. 2014, 196: 920–930. (doi: 10.1128/JB.01091-13)
- 49 Johansen T.B., Schefer L., Jensen V.K., Bohlin J., Feruglio S.L. Whole-genome sequencing and antimicrobial resistance in *Brucella melitensis* from a Norwegian perspective. Sci. Rep. 2018, 8:8538. (doi: 10.1038/s41598-018-26906-3)
- 50 Yang X., Piao D., Mao L., Pang B., Zhao H., Tian G., et al. Whole-genome sequencing of rough *Brucella melitensis* in China provides insights into its genetic features. Emerg. Microbes Infect. 2020, 9: 2147-2156. (doi: 10.1080/22221751.2020.1824549)
- 51 Whatmore A.M., Foster J.T. Emerging diversity and ongoing expansion of the genus *Brucella*. Infect. Genet. Evol. 2021, 92:104865. (doi: 10.1016/j.meegid.2021.104865)
- 52 Ashford R.T., Whatmore A.M. "*Brucella*." In Molecular Typing in Bacterial Infections. Filippis I. de. Cham: Springer International Publishing. 2022, 2:217–245. (<https://www.semanticscholar.org/paper/Brucella-Ashford-Whatmore/16ee23b326b2c3790f6fc7e331c1e331403392b0>)
- 53 Daugaliyeva A., Peletto S., Sultanov A., Baramova S., Acutis P.L., Adambaeva A., Tusipkanuly O., Usserbayev B. 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. 2016, 3: 53–59. (doi: 10.1016/j.meegid.2017.12.022)
- 54 Garofolo, G., Ancora, M., Di Giannatale, E., MLVA-16 loci panel on *Brucella spp.* using multiplex PCR and multicolour capillary electrophoresis. J. Microbiol. Methods. 2013, 92:103–107. (doi: 10.1016/j.mimet.2012.11.007)