

DOI: 10.31082/1728-452X-2020-217-218-7-8-20-28

УДК 616.98; 577.212.3

К ПРОБЛЕМЕ ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЁЗА: РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР

Айгуль А. АБДИРАСИЛОВА, <https://orcid.org/0000-0001-7308-2113>,
 Алтынай К. КАСЕНОВА, <https://orcid.org/0000-0002-5557-2909>,
 Алтын К. РЫСБЕКОВА, <https://orcid.org/0000-0002-8684-3425>,
 Думан Т. ЕСИМСЕЙТ, <https://orcid.org/0000-0003-2202-9333>,
 Бек З. АБДЕЛИЕВ, <https://orcid.org/0000-0002-4184-6227>,
 Зият Ж. АБДЕЛ, <https://orcid.org/0000-0003-4446-140X>,
 Марат С. СЫЗДЫКОВ, <https://orcid.org/0000-0003-1438-2145>,
 Андрей Н. КУЗНЕЦОВ, <https://orcid.org/0000-0003-2354-533X>,
 Токтасын К. ЕРУБАЕВ, <https://orcid.org/0000-0001-8894-3326>,
 Галина Г. КОВАЛЕВА, <https://orcid.org/0000-0002-2673-2213>

РГП на ПХВ «Национальный научный центр особо опасных инфекций им. М. Айкимбаева», г. Алматы, Республика Казахстан



Абдирасилова А.А.

По данным ВОЗ, ежегодно регистрируется более 0,5 млн. случаев бруцеллёза среди населения 73 стран мира. По тенденции распространения бруцеллёза Казахстан относится к гиперэндемичным странам. Хотя бактериологический посев и остается «золотым стандартом» лабораторной диагностики, диагноз бруцеллёза подтверждается результатами посевов только в 15-24% случаев. Эффективность иммунологических методов диагностики снижается из-за недостаточной специфичности. Проблему решает внедрение генетического метода – ПЦР.

Цель исследования. Совершенствование системы лабораторной диагностики бруцеллёза, для детекции в мультиплексной ПЦР с целью идентификации микроорганизмов рода *Brucella* до видов.

Материал и методы. В работе использовали референтные и вакцинные штаммы бруцелл из коллекции музея живых культур ННЦООИ. В качестве основного метода использовался метод молекулярной диагностики – ПЦР.

Результаты и обсуждение. Получены три пары праймеров фланкирующие фрагменты в 428 (Br1), 329 (Br2) и 179 (Br3) нуклеотидных пар.

Выводы. Разработанная тест-система из набора праймеров *Br1 + Br2 + Br3* на основе нуклеотидных последовательностей генов *BCAN_B0369*, *BSPT1_110384* и *BruAb1_0072* дала возможность дифференциации штаммов до видов *B. abortus*, *B. melitensis* и *B. suis*, и экспериментальная серия препарата показала высокую специфичность.

Ключевые слова: бруцеллез, бруцеллы, молекулярная диагностика, ПЦР, праймер.

Для цитирования: Абдирасилова А.А., Касенова А.К., Рысбекова А.К., Есимсейт Д.Т., Абделиев Б.З., Абдел З.Ж., Сыздыков М.С., Кузнецов А.Н., Ерубев Т.К., Ковалева Г.Г. К проблеме диагностики бруцеллёза: разработка системы праймеров для мультиплексной ПЦР // Медицина (Алматы). – 2020. - №7-8 (217-218). - С. 20-28. DOI: 10.31082/1728-452X-2020-217-218-7-8-20-28

Т Ұ Ж Ы Р Ы М

БРУЦЕЛЛЕЗДІ ДИАГНОСТИКАЛАУ МӘСЕЛЕСІ БОЙЫНША: МУЛЬТИПЛЕКСТІ ПТР АРНАЛҒАН ПРАЙМЕРЛЕР ЖҮЙЕСІН ӨЗІРЛЕУ

Айгуль А. АБДИРАСИЛОВА, <https://orcid.org/0000-0001-7308-2113>,
 Алтынай К. КАСЕНОВА, <https://orcid.org/0000-0002-5557-2909>,
 Алтын К. РЫСБЕКОВА, <https://orcid.org/0000-0002-8684-3425>,
 Думан Т. ЕСИМСЕЙТ, <https://orcid.org/0000-0003-2202-9333>,
 Бек З. АБДЕЛИЕВ, <https://orcid.org/0000-0002-4184-6227>,
 Зият Ж. АБДЕЛ, <https://orcid.org/0000-0003-4446-140X>,
 Марат С. СЫЗДЫКОВ, <https://orcid.org/0000-0003-1438-2145>,
 Андрей Н. КУЗНЕЦОВ, <https://orcid.org/0000-0003-2354-533X>,
 Токтасын К. ЕРУБАЕВ, <https://orcid.org/0000-0001-8894-3326>,
 Галина Г. КОВАЛЕВА, <https://orcid.org/0000-0002-2673-2213>

«Масғұт Айқымбаев атындағы аса қауіпті инфекциялар ұлттық ғылыми орталығы» ШЖҚ РМК,
 Алматы қ., Қазақстан Республикасы

ДДҰ деректері бойынша жыл сайын өлемнің 73 елінің тұрғындары арасында 0,5 млн. астам бруцеллез оқиғасы тіркеледі. Бруцеллездің таралу үрдісі бойынша Қазақстан гиперэндемиялық елдер қатарына жатады. Бактериологиялық егу зертханалық диагностиканың «алтын стандарты» болып қала берсе де, бруцеллез диагнозы тек 15-24% жағдайда егу нәтижелерімен раста-

Контакты: Абделиев Бек Зиятович, докторант, младший научный сотрудник, Национальный научный центр особо опасных инфекций им. Айкимбаева, г. Алматы, e-mail: abdelbeck@gmail.com

Contacts: Beck Abdelyyev, PhD, junior researcher, Masgut Aikimbayev's National Scientific Center for Especially Dangerous Infections, Almaty, e-mail: abdelbeck@gmail.com

Поступила: 21.10.2020

Рецензент: Пазылов Ерлан Куттыбаевич, кандидат ветеринарных наук, специалист Алматинского филиала РГП на ПХВ «Национальный референтный центр по ветеринарии» КВНИН МСХ РК, г. Алматы, e-mail: pazylov-67@mail.ru

лады. Иммунологиялық диагностикалық әдістердің тиімділігі спецификалық жеткіліксіздікке байланысты төмей түседі. Мәселені генетикалық әдіс – ПТР шешеді.

Зерттеудің мақсаты. Жұмыстың негізгі мақсаты – бруцеллездің зертханалық диагностикасы, *Brucella* тұқымдасындағы микроорганизмдерді детекциялау және идентификациялау жүйесін жетілдіру.

Материал және әдістері. Жұмыста АҚИҰФО тірі дақылдар музейінің коллекциясынан алынған бруцелланың референттік және вакциналық штаммдары қолданылды. Негізгі әдіс ретінде молекулалық диагностика әдісі – ПТР қолданылды.

Нәтижелері және талқылауы. 428 (Br1), 329 (Br2) және 179 (Br3) нуклеотид жұптары негізінде үш жұп праймер алынды.

Қорытынды. *BCAN_B0369*, *BSPT1_I10384* және *BruAb1_0072* гендерінің нуклеотидтік тізбегі негізінде әзірленген *Br1 + Br2 + Br3* праймерлер жүйесі штаммдарды *B. abortus*, *B. melitensis* және *B. suis* түрлеріне дейін дифференциациялауға мүмкіндік береді, және препараттың эксперименттік сериясы жоғары спецификалық ерекшелікті көрсетті.

Негізгі сөздер: бруцеллез, бруцеллалар, молекулалық диагностика, ПТР, праймер.

SUMMARY

TO THE PROBLEM OF BRUCELLOSIS DIAGNOSTICS: DEVELOPMENT OF A PRIMER SYSTEM FOR MULTIPLEX PCR

Aigul A ABDIRASSILOVA, <https://orcid.org/0000-0001-7308-2113>,
 Altynai K KASSENOVA, <https://orcid.org/0000-0002-5557-2909>,
 Altyn K RYSBEKOVA, <https://orcid.org/0000-0002-8684-3425>,
 Duman T YESSIMSEIT, <https://orcid.org/0000-0003-2202-9333>,
 Beck Z ABDELIYEV, <https://orcid.org/0000-0002-4184-6227>,
 Ziyat ZH ABDEL, <https://orcid.org/0000-0003-4446-140X>,
 Marat S SYZDYKOV, <https://orcid.org/0000-0003-1438-2145>,
 Andrey N KUZNETSOV, <https://orcid.org/0000-0003-2354-533X>,
 Toktasyn K YERUBAYEV, <https://orcid.org/0000-0001-8894-3326>,
 Galina G KOVALEVA, <https://orcid.org/0000-0002-2673-2213>

M. Aikimbayev's National Scientific Center for Especially Dangerous Infections, Almaty, Republic of Kazakhstan

According to WHO, more than 0.5 million cases of brucellosis registered annually among the population of 73 countries. According to the trend of brucellosis, Kazakhstan is a hyperendemic country. Although bacteriological seeding remains the “gold standard” of laboratory diagnostics, the diagnosis of brucellosis confirmed by the results of seeding only in 15-24% of cases. The effectiveness of immunological diagnostic methods reduced due to insufficient specificity. The problem solved by the introduction of a genetic method – PCR.

Aim. The main goal of the work was to improve the system of laboratory diagnostics of brucellosis, detection and identification of microorganisms of the genus *Brucella*.

Material and methods. The used reference and vaccine strains of *Brucella* from the Museum's collection of live cultures of NSCEDI. The main method used was the method of molecular diagnostics – PCR.

Results. Three pairs of primers were obtained flanking fragments in 428 (Br1), 329 (Br2) and 179 (Br3) base pairs.

Conclusion. The developed system of primers *Br1 + Br2 + Br3* based on the nucleotide sequences of the genes *BCAN_B0369*, *BSPT1_I10384* and *BruAb1_0072* makes it possible to differentiate strains to the species *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*, and the experimental series of the drug showed high specificity.

Keywords: brucellosis, brucella, molecular diagnostics, PCR, primer.

For reference: Abdirassilova AA, Kassenova AK, Rysbekova AK, Yessimseit DT, Abdeliyev BZ, Abdel ZZh, Syzdykov MS, Kuznetsov AN, Yerubayev TK, Kovaleva GG. To the problem of brucellosis diagnostics: development of a primer system for multiplex PCR. *Meditsina (Almaty) = Medicine (Almaty)*. 2020;7-8(217-218): 20-28. (In Russ.). DOI: 10.31082/1728-452X-2020-217-218-7-8-20-28

Бруцеллез (лат. *brucellosis*) – зоонозная инфекция, передающаяся от больных животных человеку, характеризующаяся множественным поражением органов и систем организма человека [1]. Несмотря на то, что люди являются для бруцелл тупиковыми хозяевами, бруцеллез является наиболее распространённым зоонозом и важнейшей проблемой общественного здравоохранения во всём мире. Приспособленность возбудителей рода *Brucella*

к широкому кругу хозяев, убиквитарность, высокая восприимчивость человека, склонность к хронизации инфекционного процесса, системность, отсутствие специфических симптомов, а значит, проблематичность диагностики, аллергическая перестройка организма хозяина под влиянием инфекционного процесса, тропность к органам половой сферы и ретикуло-эндотелиальной системы, высокий процент инвалидизации – неполный перечень важных особен-

ностей этой инфекции [2, 3]. Кроме того, бруцеллёз, как типичный зооноз, представляет проблему для мировой экономики, касающейся части пищевой безопасности. Животноводство – важная часть экономического благополучия любой страны, особенно стран Восточного и Южного регионов, в том числе Казахстана. Пристальное внимание мирового сообщества к проблеме бруцеллёза подтверждается многочисленными объединёнными заседаниями экспертов Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН ФАО (Food and Agricultural Organization, FAO) и Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ – World Health Organization, WHO), способствующими повышению интереса к исследованиям по данной инфекции [4].

Результаты изучения фенотипических свойств штаммов бруцелл показали, что лиофилизация культур и длительное хранение их при температуре +4°C не оказывали существенного влияния на культурально-морфологические свойства микробов. Однако они претерпевали некоторые изменения фенотипических свойств, которые выражались в изменении фагочувствительности, метаболизма тионина, акрифлавина, фукина, антибиотикочувствительности, агглютинабельности, термоагглютинации. При пассаже через специфические среды происходило восстановление фенотипических свойств штаммов, хотя в ряде случаев отмечалась реверсия из S-формы в SR- и R-формы [5].

Хотя бруцеллёз считается вакциноуправляемой инфекцией, до сих пор не разработаны эффективные вакцины, которые способствовали бы ликвидации болезни. При лабораторной и полевой апробации живых противобруцеллёзных вакцин на протяжении более 100 лет установлено, что иммунитет при бруцеллёзе относителен, непродолжителен и может быть легко преодолен массивной дозой возбудителя. Имеются сообщения об опасности для людей вакцин из штамма Rev-1 *Br. melitensis* и даже штамма 19 *Br. abortus* [6].

Как потенциальное биологическое оружие, бруцеллёз отнесен к категории «В» [7]. Виды *B. melitensis*, *B. abortus* внесены в основной список перечня «Биологических агентов для экспортного контроля», разработанной Австралийской группой (объединяет 40 стран, в группу входит и Европейская комиссия), подлежащих обязательному лицензированию экспорта как возможные агенты для разработки биологического оружия [8].

По мнению П.П. Очкур, хотя истинная заболеваемость бруцеллёзом человека неизвестна, но в эндемических районах этот показатель может колебаться в довольно широких пределах, достигая до 200 случаев на 100 000 населения [7].

По данным ВОЗ, ежегодно регистрируется более 0,5 млн. случаев бруцеллёза среди населения 73 стран мира [3]. По тенденции распространения бруцеллёза и уровню заболеваемости этой инфекцией людей и сельскохозяйственных животных Казахстан относится к гиперэндемичным странам [9]. Республика сегодня занимает одно из ведущих мест по распространенности этого заболевания среди людей – третье после Испании и Кыргызстана. По данным КООЗ МЗ РК в последние годы в Казахстане регистрируются ежегодно 2500-3500 случаев болезни. В отдельные годы эти цифры достигают 10 тысяч случаев (из

ежемесячных бюллетеней «Инфекционная заболеваемость в РК» КГСЭН РК за 2000-2012 гг.). Необходимо отметить, что официальной регистрации подлежат только случаи впервые выявленного острого бруцеллёза, в то время как вторично-хронические формы заболевания, супер- и реинфекция не учитываются [2].

Источниками бруцеллёза остаются сельскохозяйственные животные, по разным данным из них на долю МРС приходится 64-77%, КРС 19-23% и 1% других животных. Из общего числа заболевших до 80-85% составляют владельцы индивидуального скота [10]. Бруцеллёз у животных протекает хронически и в большинстве случаев без клинических признаков. Основные проявления у КРС, овец, коз и свиней – аборт и задержание последа, у производителей – орхиты и эпидидимиты. Абортируют животные обычно один раз [11]. До сих пор больной бруцеллёзом человек является «индикатором» эпизоотического неблагополучия по бруцеллёзу территории. Ветеринарная служба проводит противобруцеллезные мероприятия, в основном относительно КРС. МРС, особенно в индивидуальных хозяйствах, обследуется только по эпидемическим показаниям, когда заболевают люди. Стоит отметить, что в Республике Казахстан нет официальной регистрации заболеваемости бруцеллёзом сельскохозяйственных животных. Наличие отгонного животноводства, существование прогонных трасс на летние и зимние пастбища, слабый учёт численности частных животных и отсутствие должного эпизоотологического контроля перемещения скота способствуют распространению инфекции среди животных и возникновению новых очагов [10].

В настоящее время авторами были разработаны и созданы экспериментальные серии отечественной ПЦР тест-системы для индикации возбудителя чумы методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени [12]. Кроме этого, из-за актуальности нами разработана, создана и зарегистрирована тест-система на коронавирусную инфекцию COVID-19. Бруцеллезная инфекция в Казахстане имеет характер краевой патологии и требует незамедлительной быстрой и точной диагностики для проведения профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Диагностика бруцеллёза является весьма сложной задачей, что связано с выраженным клиническим полиморфизмом заболевания, что упоминалось выше. В системе эпизоотологического и эпизоотологического надзора за бруцеллёзом основную роль играет лабораторная диагностика с использованием комплекса микробиологических тестов [13].

Род *Brucella* состоит из 11 самостоятельных видов, различающихся по биохимическим, метаболическим, антигенным и вирулентным характеристикам: *B. melitensis* (преимущественно поражает коз и овец), *B. abortus* (преимущественно вызывает заболевание у крупного рогатого скота), *B. suis* (преимущественно инфицирует свиней), *B. neotomae* (вызывает поражение пустынных хомяков), *B. ovis* (вызывает эпидидимиты у баранов), *B. canis* (инфицирует собак), *B. ceti* (поражает китообразных), *B. pinnipedialis* (инфицирует тюленей), *B. microti* (основные хозяева – обыкновенная полёвка и рыжая лисица), *B. rapionis* (пора-

жают бабуинов) и *B. inopinata* (выделена из нагноившегося грудного имплантата; основной хозяин неизвестен) [14]. Наиболее патогенными для человека являются представители трех видов: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*. Особенностью представителей рода *Brucella* является морфологическое разнообразие штаммов. По данным Панкова Е.В., персистенция возбудителя бруцелллёза в организме различных по чувствительности к данной инфекции домашних и диких животных (свиньи, олени, волки, зайцы, песцы, горностаи) существенно отражается на фенотипических свойствах культур (степень диссоциации фенотипических признаков – 30%), что затрудняет идентификацию штаммов-изолятов. Автор выявил значительные изменения фенотипических признаков у полевых штаммов из различных климатогеографических зон РФ (Крайний Север, Калининградская обл.), Казахстана и Польши [15].

Хотя бактериологический посев и остается «золотым стандартом» лабораторной диагностики, чувствительность метода значительно уступает иммунологическим и молекулярно-генетическим методам. Выделение культуры занимает 15-30 суток. Диагноз бруцелллёза подтверждается результатами посевов только в 15-24% случаев. Результаты посева крови отрицательны более чем в 50% случаев, даже когда имеются клинические или/и лабораторные данные в пользу генерализованной инфекции. Чувствительность культурального метода существенно снижает применение антимикробной терапии [16]. Кроме того, необходимо иметь в виду существование L-форм возбудителей бруцелллёза, которые могут быть одной из причин длительного существования неманифестных очагов бруцелллёза. До настоящего времени известны лишь единичные случаи заболевания людей бруцелллёзом, которые подтвердились выделением культур L-трансформантов бруцелл. В экспериментальных исследованиях в ранние сроки S-формы бруцелл, в среднем, выделяли в 74,9% случаев. L-формы выделены только через месяц после заражения в 8,3% случаев [17].

Эффективность широко применяемых иммунологических методов диагностики бруцелллёза (реакций Райта, Хеддельсона, ИФА) снижается из-за недостаточной специфичности. У бруцелл имеются перекрестно реагирующие антигены с возбудителем туляремии, *Pasteurella*, *Bordetella bronchiseptica* и *Yersinia enterocolitica* серотипа 0:9, *Salmonella urbana group N*, *Escherichia coli* O:157, *Stenotrophomonas maltophilia* и некоторыми другими микроорганизмами (по исследованиям лабораторной группы компании Helix, Россия). Кроме того, для инфекций с внутриклеточным расположением возбудителя как при бруцелллёзе и низкой индукцией антителообразования, отсутствием протективной роли антител характерен низкий или отрицательный результат серологических реакций, направленных на выявление антител, особенно в хронической стадии заболевания. Применение живых вакцин при профилактике бруцелллёза вызывает длительную серопозитивность, что отражается на дифференциации больных от привитых [2].

Как известно, бруцелллёз не передается от человека к человеку. Эпидемический процесс напрямую связан с эпизоотическим процессом, поэтому при бруцелллёзе на

первый план выступает разработка системы противоэпизоотических мероприятий и контроля их эффективности. Ветеринарам приходится иметь дело не с отдельными животными, а с группами, поэтому результаты выборочного тестирования экстраполируются на всю обследуемую популяцию. Необходим адекватный скрининговый метод диагностики. Эту задачу, по-нашему мнению, решает внедрение генетического метода – полимеразной цепной реакции (ПЦР). Метод характеризуют одновременное исследование больших групп животных, одновременное исследование на несколько видов микроорганизмов, универсален для любого диагностического материала, возможность идентификации микроорганизма по нескольким маркерным признакам одновременно (мультиплексная ПЦР), быстрота, высокий уровень аналитических характеристик (чувствительность, специфичность), минимальная зависимость от «человеческого фактора» считывания результатов, минимальное количество привлекаемых исследователей в лаборатории.

О значении ПЦР в диагностике бруцелллёза в клинической и ветеринарной практике упоминается в работах многих исследователей [17].

Большинство лабораторий Казахстана оснащено необходимым оборудованием, имеет подготовленный персонал.

В лаборатории молекулярной диагностики и генетики ННЦООИ с 2010 года ведутся исследования по разработке праймеров и тест-систем для детекции возбудителей особо опасных бактериальных инфекций: чума, холера, сибирская язва, туляремия. Создание тест-систем для выявления ДНК возбудителей бруцелллёза было продиктовано следующими причинами. Диагностические ПЦР тест-системы для генетической детекции возбудителей бруцелллёза на рынке Казахстана представлены наборами зарубежных производителей: «Тест-система для выявления ДНК *Brucella* spp. методом ПЦР (ГенБру)», производства РосНИПЧИ «Микроб», «АмплиСенс® *Brucella* spp.-FL», разработанный специалистами ФГУН ЦНИИ эпидемиологии и ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Перечисленные наборы имеют один общий недостаток: детекция и идентификация возбудителей бруцелллёза проводятся на основе амплификации родо-специфического маркерного участка с использованием метода ПЦР в режиме униплекс, т.е. выявления ДНК возбудителя по одному маркеру. Кроме того, тест-системы не зарегистрированы, не разрешены к применению на территории страны.

Цель настоящей работы – совершенствование системы лабораторной диагностики бруцелллёза, детекции и идентификации микроорганизмов рода *Brucella*.

Задачей настоящего исследования является разработка системы оригинальных праймеров для выявления видовых маркерных генов трех основных видов бруцелл (*B. melitensis*, *B. abortus* и *B. suis*) методом стандартной ПЦР в режиме мультиплекс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали референтные и вакцинные штаммы *B. melitensis* 16M, *B. suis* 1330, *B. abortus* 544, *B. melitensis* REV-1, *B. abortus* 82, *B. abortus* 19BA, 17 штаммов бруцелл из коллекции музея живых культур ННЦООИ.

Изоляты предварительно были изучены общепринятыми методами идентификации. Для оценки специфичности разрабатываемых праймеров использованы штаммы следующих видов бактерий: *Francisella tularensis* (2), *Salmonella enterica* серотипы *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Sh. flexneri*, *Yersinia enterocolitica* (2), *Y. kristensenii* (2), *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*, *Vibrio cholera O1 Eltor*, *Bacillus anthracis* (2), *Listeria monocytogenes* (2), *Leptospira spp.*

Нуклеотидные последовательности выбранных маркерных генов бактерий рода *Brucella* видов *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* были получены из электронной базы данных GenBank. Дизайн праймеров осуществлялся с помощью online программы MPPrimer1.4. Специфичность разработанных праймеров проверялась с помощью пакета программ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Синтез осуществлялся стандартным фосфоамидитным методом с применением автоматического синтезатора ДНК/РНК «Н6» (K&A Laborgeraete GbR, Германия). Очищенные водные растворы праймеров концентрировались с помощью прибора Centri Vap (Labconco, США) до сухого состояния, а затем вновь растворялись в деионизированной воде до концентрации 100 мкМ. Концентрация раствора праймеров измерялась на приборе Nano Drop 2000C (Thermo Scientific, США).

Выделение ДНК проводили из предварительно обеззараженного материала – водных клеточных суспензий различных концентраций. Образцы обеззараживались кипячением на водяной бане в течение 20-30 мин. с момента закипания. Экстракция геномной ДНК осуществлялась с помощью набора QIAamp DNA MiniKit (QIAGEN, Promega, США). Выделенные образцы ДНК бруцелл и бактерий других видов, отобранных для исследований, далее использовались в качестве матрицы для тестирования специфичности и чувствительности, разработанных праймеров.

Проведение ПЦР осуществляли на приборе Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Австралия).

Для визуализации результатов амплификации использован метод электрофоретического разделения продуктов амплификации в 1,2-1,5% агарозном геле с 0,5 мкг/мл этидиум бромид в аппарате для горизонтального гель-электрофореза в течение 30 мин. при 50 А, 10 В/см. Результаты гель-электрофореза регистрировали с помощью системы гель-документирования (UVP Mini darkroom, Upland, CA, US) при длине волны УФ 280 нм. Специфичность полосы

амплифицированной ДНК подтверждалась ее положением по отношению к фрагментам маркера молекулярных весов «DNA Ladder 50 bp» фирмы Fermentas (Литва).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе приведены результаты исследований по созданию системы праймеров для детекции возбудителей бруцеллеза на основе стандартной ПЦР в режиме мультиплекс.

В ходе исследований были разработаны несколько вариантов праймеров для детекции бактерий рода *Brucella*.

В качестве идентифицирующих генов были выбраны ген *BCAN_B0369*, кодирующий конъюгативный транспортный белок Р-типа, характерный для видов *B. suis* и *B. canis*, ген *BSPT1_II0384*, детерминирующий белок WzxС, отвечающий за биосинтез липополисахарида, характерный для всех видов бруцелл, кроме *B. abortus*. В качестве третьего маркерного гена был выбран *BruAb1_0072*, характерный только для вида *B. abortus*, который кодирует белок внешней мембраны бруцелл.

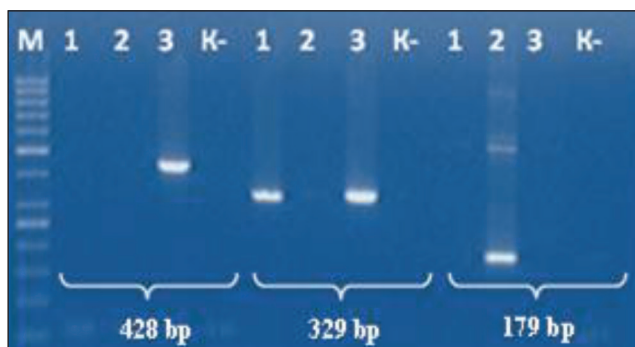
Нуклеотидные последовательности выбранных генов вводилась в соответствующее окно запроса в формате FASTA. Также задавались дополнительные параметры согласно общепринятым правилам дизайна праймеров для стандартной ПЦР. После запуска программы генерировался ряд праймеров, которые отвечали заданным параметрам. На основе полученных нуклеотидных последовательностей был проведен дизайн праймеров. Праймеры были разработаны с помощью программы MPPrimer1.4. Полученные после синтеза растворы праймеров очищались от побочных продуктов и примесей, концентрировались и разводились до стоковой концентрации. Готовые праймеры после разведения до рабочей концентрации 5-25 pmol/ul тестировались на специфичность и чувствительность в различных сочетаниях.

Всего было разработано три варианта систем праймеров для мультиплексной ПЦР. Первый вариант включал четыре праймера, фланкирующие фрагменты в 576, 428, 329 и 179 нуклеотидных пар. Второй вариант включал шесть праймеров, амплифицирующих фрагменты ДНК размерами 685, 557, 455, 363, 223 и 108 п. н. Третий вариант включал три праймера фланкирующие фрагменты в 428 (Br1), 329 (Br2) и 179 (Br3) нуклеотидных пар, который и был выбран для дальнейших исследований. В таблице 1 представлена характеристика разработанных праймеров.

Для оценки эффективности праймеры тестировались на 23-х штаммах бруцеллезного микроба, в т. ч. референтных

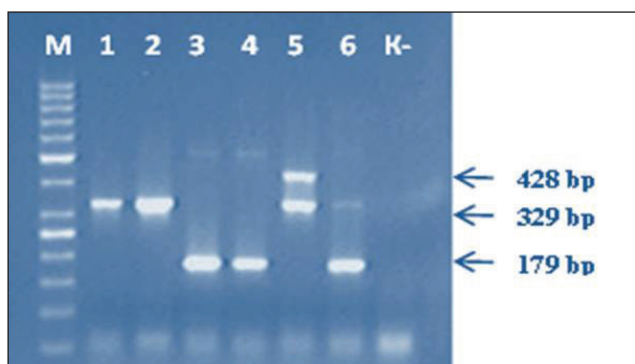
Таблица 1 – Характеристики разработанных праймеров

Локус	Маркировка праймеров	Температура плавления, °С	Последовательность нуклеотидов	Размер ампликона, п. н.
<i>BCAN_B0369</i>	Br1-F	60,2	5'-AATGGCGCAAGCACAGGAGGG-3'	428
	Br1-R	60,1	5'-TCGACTCAGCGCCGTCATCAGA-3'	
<i>BSPT1_II0384</i>	Br2-F	60,1	5'-GCGTTCAGTGCCGGCATTCTCT-3'	329
	Br2-R	59,9	5'-ACTTCCGCCGAAAACGGGTGAC-3'	
<i>BruAb1_0072</i>	Br3-F	59,7	5'-AGCAAGCATGGCACTGGCGTTA-3'	179
	Br3-R	60,1	5'-ACTGCTCCATCCGCAACATGGC-3'	



М – маркер молекулярного веса, 1 – *B. melitensis* 16М, 2 – *B. abortus* 544, 3 – *B. suis* 1330, «К-» – отриц. контроль (вода)

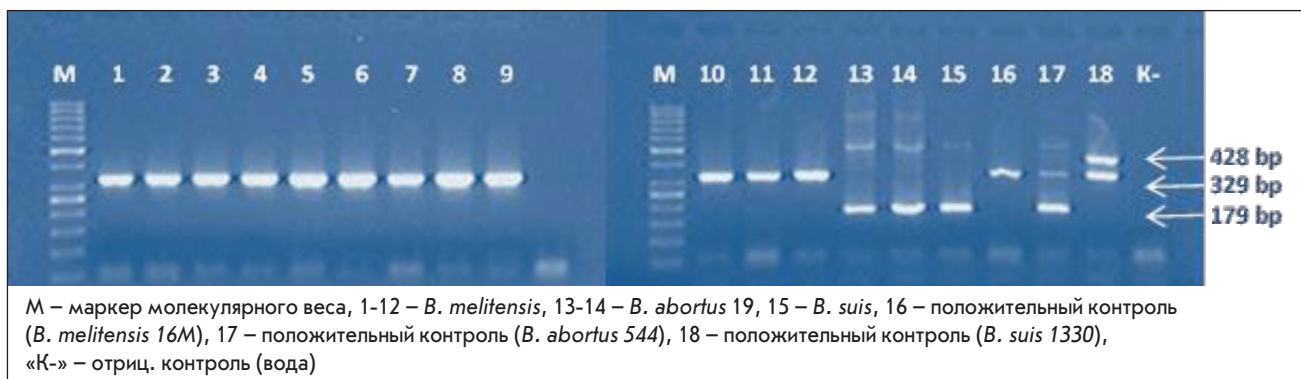
Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами Br1 (428 bp), Br2 (329 bp), Br3 (179 bp). Проверка специфичности с референтными штаммами. ПЦР в формате униплекс



М – маркер молекулярного веса, 1 – *B. melitensis* 16М, 2 – *B. melitensis* 2404, 3 – *B. abortus* 19, 4 – *B. abortus* 544, 5 – *B. suis* 1330, 6 – *B. abortus*, «К-» – отриц. контроль (вода)

Рисунок 2 – Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами Br1 (428 bp) + Br2 (329 bp) + D-BMP-1 (179 bp). ПЦР в формате мультиплекс

(*B. melitensis* 16М, *B. suis* 1330, *B. abortus* 544) и вакцинных (*B. melitensis* REV-1, *B. abortus* 82, *B. abortus* 19BA). Некоторые результаты амплификации целевых фрагментов генов в формате униплекс и триплекс представлены на рисунках 1, 2 соответственно.



М – маркер молекулярного веса, 1-12 – *B. melitensis*, 13-14 – *B. abortus* 19, 15 – *B. suis*, 16 – положительный контроль (*B. melitensis* 16М), 17 – положительный контроль (*B. abortus* 544), 18 – положительный контроль (*B. suis* 1330), «К-» – отриц. контроль (вода)

Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами Br1 (428 bp) + Br2 (329 bp) + Br3 (179 bp). ПЦР в формате мультиплекс

Как видно из рисунков, полученные праймеры позволяют проведение дифференциации основных патогенных для человека бруцелл. Пара праймеров Br1-F/R (428 bp) была специфична для *B. suis*. Праймеры Br2-F/R (329 bp) выявляли участок ДНК, маркерный для определения видов *B. melitensis* и *B. suis*. Третья пара праймеров Br3-F/R (179 bp) была строго специфична в отношении ДНК *B. abortus*.

По предварительным результатам компьютерного анализа пара праймеров Br1-F/R (428 bp) выявляет участок ДНК, маркерный не только для вида *B. suis*, но и *B. canis*. К сожалению, в коллекции МЖК нет штаммов *B. canis*. Данный факт важен в том плане, что бруцеллёз собак в последнее время приобретает актуальность в практике городских ветеринарных специалистов. Вероятность эпизоотии возросла в связи с ввозом новых пород из-за границы, где в последнее десятилетие инфекция приобрела важное эпизоотологическое и эпидемиологическое значение. По данным Alton G.G. et al. (1975), в отличие от бруцеллёза, вызываемого *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, «собачий» вид вызывает у собак заболевание, которое может протекать бессимптомно. Для заболевания характерна продолжительная бактериемия без лихорадки. Бактериемия у собак может продолжаться до 33 месяцев, по данным Carmichael L.E. (1976) – до 5 лет.

Вторая пара праймеров Br2-F/R (329 bp) по данным компьютерного анализа должна выявлять ДНК всех видов бруцелл, кроме *B. abortus*. Вновь наша группа столкнулась с проблемой отсутствия в коллекции МЖК иных видов возбудителя бруцеллёза кроме *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. suis*.

На рисунке 3 приведены результаты генетического тестирования штаммов различных видов бруцелл с использованием разработанной системы праймеров для детекции и идентификации возбудителей бруцеллёза.

Данные исследования подтвердили видовую принадлежность штаммов, кроме одного случая. Культура в пробирке №15 (дорожка №15) изначально ошибочно считалась штаммом вида *B. suis*, но результаты ПЦР свидетельствуют о принадлежности его к виду *B. abortus*.

Результаты тестов на специфическую активность праймеров для выявления бруцелл с использованием ДНК гетерологических видов бактерий приведены на рисунке 4.

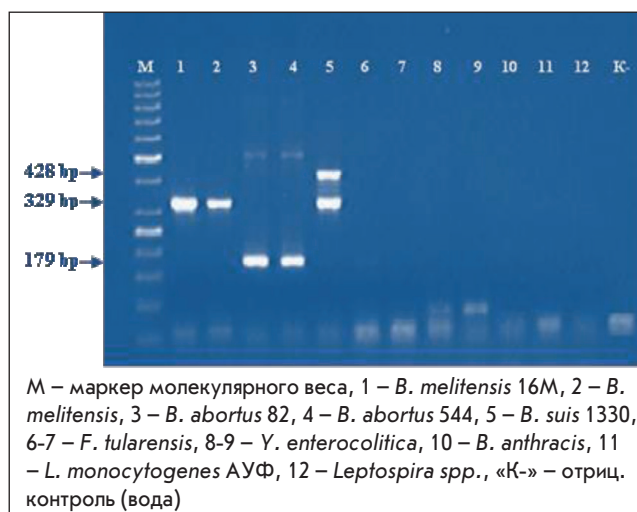


Рисунок 4 – Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами Br1 (428 bp) + Br2 (329 bp) + Br3 (179 bp). Тест на специфичность. ПЦР в формате мультиплекс

Как видно из рисунка, подобранные олигонуклеотидные праймеры Br1 + Br2 + Br3 не давали перекрестных реакций с ДНК штаммов возбудителей болезней с симптоматикой, сходной с признаками течения бруцеллезного инфекционного процесса.

ВЫВОДЫ

Таким образом, разработанная система праймеров Br1 + Br2 + Br3 на основе нуклеотидных последовательностей генов *BCAN_B0369*, *BSPT1_P0384* и *BruAb1_0072* для детекции и идентификации бруцелл в мультиплексной ПЦР дает возможность дифференциации штаммов возбудителей рода *Brucella* до видов *B. abortus*, *B. melitensis* и *B. suis*, и экспериментальная серия препарата показала высокую специфичность.

Прозрачность исследования

Исследования проводились при выполнении календарных планов и научно-технических программ (НТП 2018-2020 гг.) научного центра ННЦООИ им. М. Айкимбаева МЗ РК. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Все авторы приняли участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получают гонорар за статью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Материал из Википедии – свободной энциклопедии Бруцеллез // Википедия, Свободная энциклопедия. Проверена 27 марта 2019. Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Бруцеллез>; Время обращения: 16.10.2020 г.
- 2 Дуйсенова А.К. Зоонозные инфекции: вчера, сегодня завтра // Матер. Международной конф. «Зоонозные инфекции: вчера, сегодня, завтра». – Алматы: КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова. – 2011. – С.1-3
- 3 Ким А.А., Колмогорова Е.Л., Рахимбекова Д.К., Лукьянченко Н.Г., Каратаева Л.С. Бруцеллез – краевая патология Ка-

Вклад авторов

Айгуль Акзамовна Абдирасилова – общее руководство по проведению научно-технической деятельности исследовательской работы, участие в проведении молекулярно-генетических исследований.

Алтынай Камеловна Касенова – составление обзора литературы, проведение лабораторных молекулярно-генетических исследований.

Алтын Канатовна Рысбекова – проведение лабораторных молекулярно-генетических исследований (подбор праймеров, проверка специфичности праймеров, оптимизация праймеров и программа амплификации и т.д.).

Думан Темирбекович Есимсейит – проведение лабораторных молекулярно-генетических исследований (подбор праймеров, проверка специфичности праймеров, оптимизация праймеров и программа амплификации и т.д.).

Бек Зиятович Абделиев – проведение лабораторных молекулярно-генетических исследований (подбор праймеров, проверка специфичности праймеров, оптимизация праймеров и программа амплификации и т.д.).

Зият Жумадилович Абдел – изучение фенотипических свойств штаммов бруцелл, подготовка материала для получения бактериальной массы и получения лизатов для молекулярно-генетических исследований, составление обзора литературы, редактирование статьи.

Марат Сулейменович Сыздыков – подбор литературы, проведение анализа и предварительная рецензия, подготовка к обсуждению на научной конференции научного центра.

Андрей Николаевич Кузнецов – подбор референтных и полевых штаммов, получение экспертного заключения.

Токтасын Кенжеханович Ерубасев – подбор литературы, проведение анализа и предварительная рецензия, подготовка к обсуждению на научной конференции научного центра.

Галина Геннадьевна Ковалева – подбор референтных и полевых штаммов, получение экспертного заключения, контроль качества препаратов и проверка тест-систем на специфичность.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность

Авторы работы выражают признательность и благодарность лаборанту лаборатории Беккожиной Алме и дезинфектору Нуртаевой Ултай Асубаевне за участие и помощь в проведении данных исследований.

REFERENCES

- 1 Material iz Wikipedii – svobodnoi entciklopedii Brutcellez // Wikipedia, svobodnaya entciklopedia [Material from Wikipedia – the free encyclopedia of Brucellosis. Wikipedia]. Retrieved March 27, 2019. Available from: [https://ru.wikipedia.org/wiki/Бруцеллез#:~:text=A&text=Бруцеллез%20\(лат.,органов%20и%20систем%20организма%20человека](https://ru.wikipedia.org/wiki/Бруцеллез#:~:text=A&text=Бруцеллез%20(лат.,органов%20и%20систем%20организма%20человека).
- 2 Duissenova AK. Zoonotic infections: yesterday, today and tomorrow. In: Materily mezhdunarodnoi konferentsii “Zoonoznye infektsii: vchera, segodnya, zavtra” [Materials of the International conference “Zoonotic infections: yesterday, today and tomorrow”]. Almaty. 2011. P. 1-3

захстана // Международный журнал приклад. и фундамент. исследований. – 2013. – № 5. – С. 162-164

4 Макаров В.В., Грубый В.А., Груздев К.Н., Сухарев О.И. Список МЭБ и трансграничные инфекции животных: монография. - Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2012. – 162 с.: ил.

5 Сыздыков М.С., Кузнецов А.Н., Дуйсенова А.К., Шевцов А.Б. Фенотипические свойства и чувствительность к антибактериальным препаратам клинических изолятов бруцелл, выделенных в Казахстане // Вестник КазНМУ. - 2016. - №3. – С. 1-4

6 Иванов А.В., Салмаков К.М., Юсупов Р.Х., Фомин А.М., Чернов А.Н. Бруцеллёз животных и перспективы его специфической профилактики. // Секция 8. «Биологические и сельскохозяйственные науки». – 2011. – С. 359-363

7 Сапаргалиева А.Д. Учение о патогенезе и морфогенезе бруцеллёза П.П. Очкур в свете современного учения о воспалении // Матер. Международной конф. «Зоонозные инфекции: вчера, сегодня, завтра». – Алматы: КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова, 2011. – С. 16-19

8 Управление международной безопасности Борьба с распространением химического и биологического оружия // Интернет ресурс. Соответствие Конвенции по запрещению биологического оружия стран-участниц Австралийской группы. Режим доступа: www.australiagroup.net. Дата обращения: 05.10.2020 г.

9 Сыздыков М.С., Кузнецов А.Н., Аскараров А.М., Ерубаяев Т.К. Новые подходы к стабилизации заболеваемости бруцеллёзом в Казахстане с использованием информационных технологий // Актуальные вопросы инф. патологии под ред. проф. В.М. Семенова. Матер. Международного Евро-Азиатского конгресса по инф. болезням (Витебск, 5-6 июня 2008 г.). – Витебск, 2008. – С. 68

10 Кузнецов А.Н., Сыздыков М.С., Дуйсенова, Г.Н. Абуова, Ф.А. Бердалиева, С.Ф. Даулбаева, В.П. Садовская А.К. Информационное обеспечение эпидемиологического надзора за бруцеллёзом с использованием ГИС-технологий // Матер. Международной конф. «Зоонозные инфекции: вчера, сегодня, завтра». – Алматы: КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова, 2011. – С. 3-12

11 Манин Е.А., Лямкин Г.И. Эпизоотолого-эпидемиологическая обстановка по бруцеллёзу в Северо-Кавказском федеральном округе. // «Актуальные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в Причерноморском регионе». Матер. региональной науч.-практ. конф. с международным участием, 24-25 сентября 2013г., г. Ставрополь. Электронное издание. – Ставрополь: ФКУЗ Ставропольский противочум. ин-т Роспотребнадзора. – 2013. – С. 53-55

12 Abdirassilova A.A., Abdel Z.Zh., Kurmanov B.K., Kassenova A.K., Rysbekova A.K., Yessimseit D.T., Abdeliyev B.Z., Meka Mechenko T.V., Dalibayev Zh.S., Begimbayeva E.Zh. Development of a Real-time PCR using Fluorescent Hybridization Probes // J Res Med Dent Sci. – 2020. – Vol. 8 (1). – P. 26-36; eISSN No. 2347-2367; pISSN No. 2347-2545

13 Курчева С.А., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Жарникова И.В., Старцева О.Л. Разработка тест-системы иммуноферментной для выявления антител к возбудителю бруцеллёза и оценка ее диагностической эффективности // «Актуальные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в Причерноморском регионе». Матер. региональной науч.-практ. конф. с международным участием, 24-25 сентября 2013 г., г. Ставрополь. Электронное издание. – Ставрополь: ФКУЗ Ставропольский противочум. ин-т Роспотребнадзора, 2013. – С. 110-111

14 Xavier M.N., Paixao T.A., den Hartigh A.B. et al. Pathogenesis

5 Kim AA, Kolmogorova EL, Rakhimbekova DK, Lukianchenko NG, Karataeva LS. Brucellosis – regional pathology of Kazakhstan. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnoi i fundamentalnoi issledovaniy* = *International journal of applied and fundamental research*. 2013;5:162-164 (In Russ.)

4 Makarov VV, Grubyi VA, Gruzdev KN, Sukharev OI. *Spisok MEB i transgranichnyye infekcii zhyvotnykh* [The OIE-listed and cross-border infections in animals]. Vladimir: Monography; 2012. 162 p.

5 Syzdykov MS, Kuznetsov AN, Duisenova AK, Shevtsov AB. Phenotypic features and sensitivity to antibacterial drugs of clinical Brucella isolates isolated in Kazakhstan. *Vestnik KazNMU* = *Bulletin of KazNMU*. 2016;3:1-4 (In Russ.)

6 Ivanov AV, Salmakov KM, Iusupov RKh, Fomin AM, Chernov AN Brucellosis of animals and prospects for its specific prevention. *Sekciya 8. «Biologicheskie i selskokhozyaistvennye nauki»* = *Section 8. “Biological and agricultural sciences”*. 2011; P. 359-363

7 Sapargaliev AD. The doctrine of the pathogenesis and morphogenesis of brucellosis PP Ochkur in the light of the modern doctrine of inflammation. In: *Materily mezhdunarodnoi konferentsii “Zoonoznye infekcii: vchera, segodnya, zavtra”* [Materials of the International conference “Zoonotic infections: yesterday, today and tomorrow”]. Almaty; 2011. P. 16-19

8 *Upravlenie mezhdunarodnoi bezopasnosti Borba s rasprostraneniem khimicheskogo i biologicheskogo oruzhiya // Internet resurs. Sootvetstvie Konventcii po zapreshcheniiu biologicheskogo oruzhiya stran-uchastnic Avstraliyskoi gruppy* [Department of international security, combating the proliferation of chemical and biological weapons. Online resource. Compliance with the Convention on the prohibition of biological weapons of the member countries of the Australian group]. Available from: www.australiagroup.net.

9 Syzdykov MS, Kuznetsov AN, Askarov AM, Erubayev TK. New approaches to stabilisation of the incidence of brucellosis in Kazakhstan with the use of information technology. In: *Materily Mezhdunarodnogo Evro-Aziatskogo kongressa po infektsionnym boleznyam* [Materials of the international Euro-Asian Congress on infectious diseases]. Vitebsk; 2008. 68 p.

10 Kuznetsov AN, Syzdykov MS, Duissenova GN, Abuova FA, Berdalieva SF, Daulbaeva VP, Sadovskaya AK. Information support for epidemiological surveillance of brucellosis using GIS technologies. In: *Materily mezhdunarodnoi konferentsii “Zoonoznye infekcii: vchera, segodnya, zavtra”* [Materials of the International conference “Zoonotic infections: yesterday, today and tomorrow”]. Almaty; 2011. P. 3-12

11 Manin EA, Liamkin GI. Epizootological and epidemiological situation of brucellosis in the North Caucasus Federal district. In: *Materily regionalnoi nauch.-prakt. konf. s mezhdunarodnym uchastiem «Aktualnye voprosy obespecheniya sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya v Prichernomorskom regione»* [Materials of the regional scientific and practical conference with international participation “Topical issues of ensuring sanitary and epidemiological well-being in the black sea region”]. Stavropol; 2013. P. 53-55

12 Abdirassilova AA, Abdel ZZh, Kurmanov BK, Kassenova AK, Rysbekova AK, Yessimseit DT, Abdeliyev BZ, Meka-Mechenko TV, Dalibayev ZhS, Begimbayeva EZh. Development of a Real-time PCR using Fluorescent Hybridization Probes. *J Res Med Dent Sci*. 2020;8(1):26-36; eISSN No. 2347-2367; pISSN No. 2347-2545.

13 Kurcheva SA, Tiumentseva IS, Afanasev EN, Zharnikova IV, Startseva OL. Development of an enzyme-linked immunoassay system

of *Brucella* sp. // *The Open Veterinary Science Journal*. – 2010. – V. 4. – P. 109-118

15 Панкова Е.В. Фено-, генотипическая изменчивость бруцелл и разработка экспресс метода оценки их иммуногенности. – Автореферат дисс. ... канд. биол. наук. – Казань, 2012. – 198 с.

16 Васильева Н.В., Полищук А.Г., Руднева М.В., Дакс А.А., Шурпицкая О.А., Зайцева М.М. ПЦР с электроспрей-ионизационной масс-спектрометрией в обнаружении и идентификации патогенных микроорганизмов в гемокультурах // *Проблемы медицинской микологии*. – 2013. – Т. 15, № 3. – С. 35-41

17 Михайлов Л.М., Калиновский А.И., Баранникова Н.Л., Шестопалов М.Ю., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Кузнецов В.И., Атлас А.Г., Балахонов С.В. Особенности лабораторной диагностики экспериментального бруцеллёза, вызванного S- и L-формами возбудителя инфекции // *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. – 2012. – № 2 (84). – Часть 1. – С. 131-134

for detecting antibodies to the brucellosis pathogen and evaluating its diagnostic effectiveness. In: *Materialy regionalnoi nauch.-prakt. konf. s mezhdunarodnym uchastiem «Aktualnye voprosy obespecheniya sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya v Prichernomorskom regione»* [Materials of the regional scientific and practical conference with international participation “Topical issues of ensuring sanitary and epidemiological well-being in the black sea region”]. Stavropol; 2013. P. 110-111

14 Xavier MN, Paixao TA, den Hartigh AB, et al. Pathogenesis of *Brucella* sp. *The Open Veterinary Science Journal*. 2010;4:109-118

15 Pankova EV. Feno-, genotipicheskaya izmenchivost brutcell i razrabotka ekspress metoda otenki ikh immunogenosti [Phenotypic and genotypic variability of *Brucella* and development of a express method for assessing their immunogenicity]. Kazan: Abstract of dissertation; 2012. 198 p.

16 Vasileva NV, Polishchuk AG, Rudneva MV, Daks AA, Shurpitskaia OA, Zaitseva MM. PCR with electrospray ionization mass spectrometry in detection and identification of pathogenic microorganisms in hemocultures. *Problemy meditsinskoi mikologii = Problems of medical Mycology*. 2013; 15: 3: 35-41 (In Russ.)

17 Mikhailov LM, Kalinovskii AI, Barannikova NL, Shestopalov MYu, Andreevskaya NM, Mikhailova VA, Kuznetsov VI, Atlas AG, Balakhonov SV. Features of laboratory diagnostics of experimental brucellosis caused by S-and L-forms of the infectious agent. *Byulleten = Bulletin*. 2012;2(84):1:131-134 (In Russ.)