

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-107-114

УДК 616.98:579.841.93

Н.А. Осина, Д.А. Ситмбетов, И.В. Доманина, Е.Г. Булгакова, Ж.А. Касьян, И.А. Касьян,  
О.Ю. Ляшова, С.А. Щербакова**РАЗРАБОТКА СПОСОБА ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОВАРОВ *BRUCELLA SUIIS* МЕТОДОМ МУЛЬТИЛОКУСНОЙ ПЦР С УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель исследования – разработка методического подхода для определения биоваров *Brucella suis* методом мультилокусной ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени. **Материалы и методы.** В работе использовали 16 штаммов *B. suis* различных биоваров, по 2 шт. – *B. neotomae* и *B. canis*. Определение таксономической принадлежности штаммов бруцелл осуществляли по протоколам Bruce-ladder, Suis-ladder, БРУ-ДИФ. Подбор праймеров и зондов проводили с помощью программного обеспечения на сайте [www.genscript.com](http://www.genscript.com) и программы GeneRanner 6.5.52. Фрагментное секвенирование по Сэнгеру осуществляли на генетическом анализаторе 3500 XL в соответствии с рекомендациями производителя. Оценку гомологии нуклеотидных последовательностей проводили по алгоритму BLAST, используя базу данных GenBank NCBI. **Результаты и обсуждение.** У штаммов *B. suis* различных биоваров проведен анализ структурной организации геномных островов IncP и GI-3. Установлено, что у штаммов 2, 4 биоваров *B. suis* и *B. canis* в результате гомологичной рекомбинации в геномном острове IncP утрачена концевая часть гена *BRA0368*, включающая 21 нуклеотид (повторяющийся в гене *BRA0367*) и стоп-кодон TAA, а также практически полностью последовательность гена *BRA0367*. Прямой повтор из 21 нуклеотида и стоп-кодона TGA гена *BRA0367* заместил аналогичную область гена *BRA0368*, что привело к образованию делеции размером 185 п.н. В структуре GI-3 отличий у биоваров отмечено не было. Полученные результаты позволили разработать подход (Suis-ДИФ) для дифференциации биоваров *B. suis*, основанный на амплификации генов, расположенных в геномных островах IncP и GI-3, методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени. Подтверждена его специфичность при исследовании штаммов *B. suis* из фонда Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Проведенные исследования расширяют и дополняют сведения о генетической неоднородности видов и биоваров бруцелл. Предложенный способ определения биоваров *B. suis* методом мультилокусной ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени расширяет возможности идентификации бруцелл с помощью молекулярно-генетических методов.

**Ключевые слова:** мультилокусная ПЦР, внутривидовая дифференциация, *Brucella suis*, биовары, геномные острова IncP и GI-3, структурная организация, фрагментное секвенирование по Сэнгеру.

Корреспондирующий автор: Осина Наталия Александровна, e-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru).

Для цитирования: Осина Н.А., Ситмбетов Д.А., Доманина И.В., Булгакова Е.Г., Касьян Ж.А., Касьян И.А., Ляшова О.Ю., Щербакова С.А. Разработка способа определения биоваров *Brucella suis* методом мультилокусной ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 2:107–114. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-107-114

Поступила 15.04.2022. Принята к публ. 16.05.2022.

N.A. Osina, D.A. Sitmbetov, I.V. Domanina, E.G. Bulgakova, Zh.A. Kas'yan, I.A. Kas'yan,  
O.Yu. Lyashova, S.A. Shcherbakova**Development of a Method for Determination of *Brucella suis* Biovars Using Multilocus Real-Time PCR**

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

**Abstract.** The aim of the study was to develop a methodological approach to determination of *Brucella suis* biovars through multilocus PCR with real-time registration of results. **Materials and methods.** We used 16 strains of *B. suis* of various biovars, *B. neotomae* and *B. canis* – 2 strains of each. Determination of the taxonomic affiliation of *Brucella* strains was carried out according to the Bruce-ladder, Suis-ladder, BRU-DIF protocols. The selection of primers and probes was performed using the software on the website [www.genscript.com](http://www.genscript.com) and the GeneRanner 6.5.52 program. Fragment sequencing according to Sanger was performed on a 3500 XL genetic analyzer in accordance with the manufacturer’s recommendations. Nucleotide sequence homology was assessed using the BLAST algorithm and the GenBank NCBI database. **Results and discussion.** An analysis of the structural organization of IncP and GI-3 genomic islands has been carried out in *B. suis* strains of various biovars. It has been established that in strains of *B. suis* II, IV biovars and *B. canis*, the terminal part of the *BRA0368* gene, comprising 21 nucleotides (repeated in the *BRA0367* gene) and the “TAA” stop codon, as well as almost the entire sequence of the *BRA0367* gene were lost, owing to homologous recombination in the IncP genome island. A 21-nucleotide direct repeat and the “TGA” stop codon of the *BRA0367* gene replaced the analogous region of the *BRA0368* gene which resulted in the deletion the size of 185 bp. No differences have been noted in the structure of GI-3 in biovars. The evidence obtained made it possible to develop the approach (Suis-DIF) for differentiating *B. suis* biovars, based on the amplification of genes located in the IncP and GI-3 genomic islands using real-time PCR. Its specificity was confirmed in the study of *B. suis* strains from the fund of the State Collection of Pathogenic Bacteria of the Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. The conducted studies expand and supplement the data on the genetic heterogeneity of *Brucella* species and biovars. The proposed method for differentiating biovars of *B. suis* using multilocus PCR with real-time registration of results enhances the capacities for *Brucella* identification using molecular-genetic methods.

**Key words:** multilocus PCR, intraspecific differentiation, *Brucella suis*, biovars, IncP and GI-3 genomic islands, structural organization, Sanger fragment sequencing.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Corresponding author:** Natalia A. Osina, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

**Citation:** Osina N.A., Sitmbetov D.A., Domanina I.V., Bulgakova E.G., Kas'yan Zh.A., Kas'yan I.A., Lyashova O.Yu., Shcherbakova S.A. Development of a Method for Determination of *Brucella suis* Biovars Using Multilocus Real-Time PCR. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 2:107–114. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-107-114

Received 15.04.2022. Accepted 16.05.2022.

Osina N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0954-5683>  
 Sitmbetov D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2766-2624>  
 Domanina I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4731-8089>  
 Bulgakova E.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2405-2684>

Kas'yan Zh.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9828-3277>  
 Kas'yan I.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4998-7673>  
 Shcherbakova S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1143-4069>

Возбудитель бруцеллеза относится к роду *Brucella*, включающему на сегодняшний день 12 самостоятельных видов: *B. abortus* (7 биоваров), *B. melitensis* (3 биовара), *B. suis* (5 биоваров), *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata*, *B. rapionis*, *B. vulpis*. Наиболее вирулентными для человека являются *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. suis* 1–4-го биоваров. Поэтому при идентификации патогена представляется необходимым определение его видовой и биоварной принадлежности. Для решения данной задачи накоплен положительный опыт по применению полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретическим и гибридационно-флуоресцентным учетом результатов [1–5].

Для дифференциации биоваров *B. suis* разработан и рекомендован ВОЗ протокол Suis-ladder [3], основанный на амплификации локусов *BMEI1426* (делетирован у *B. canis*), *BMEI1688* (амплифицируется только у *B. suis* 2-го и 4-го биоваров), *BR1080* (делетирован у *B. suis* 2-го биовара), *BMEI0205* (Bruce 11 – содержит VNTRs, различающие биовары *B. suis*). Ампликоны визуализируют и определяют их размер после проведения электрофореза в агарозном геле. Ранее нами при идентификации штаммов бруцелл из фонда Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» было установлено, что профиль амплификации по протоколу Suis-ladder для ряда штаммов *B. suis* 5-го биовара не совпал ни с одним из представленных в данном протоколе [6]. Это связано с тем, что у данных штаммов в локусе *BMEI0205* было выявлено семь повторов VNTR вместо девяти, описанных в протоколе. Возможно, с увеличением количества исследуемых штаммов будут получены новые профили амплификации, что потребует внесения дополнений в протокол Suis-ladder. В связи с этим представляется актуальной разработка иных способов внутривидовой дифференциации *B. suis* с помощью молекулярно-генетических технологий.

**Целью** работы являлась разработка методического подхода для определения биоваров *B. suis* методом мультилокусной ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

### Материалы и методы

В работе использовали 20 штаммов бруцелл, из них 5 – *B. suis* 1-го биовара, 2 – *B. suis* 2-го биовара, 1 – *B. suis* 3-го биовара, 2 – *B. suis* 4-го биовара, 6 –

*B. suis* 5-го биовара, 2 – *B. neotomae*, 2 – *B. canis*. Все культуры получены из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб».

Штаммы возбудителя бруцеллеза выращивали на эритроцит-агаре (НИИ им. Мечникова, Москва) (рН 7,2) при температуре (37±1) °С в течение 48 ч. Из выросших культур готовили суспензии в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» – ОСО 42-28-85-П (10МЕ), что соответствовало 1,6·10<sup>9</sup> м.к./мл для возбудителя бруцеллеза. Затем десятикратными разведениями в 0,9 % растворе натрия хлорида микробные взвеси доводили до концентрации 1·10<sup>3</sup> м.к./мл. Количество клеток в приготовленных разведениях проверяли путем высева из концентрации 1·10<sup>3</sup> м.к./мл по 0,1 мл микробной взвеси (100 м.к.) каждого тест-штамма на три чашки Петри с соответствующей средой.

Для обеззараживания проб к ним добавляли мертиолят натрия до конечной концентрации 1:10000 (0,01 %), прогревали при 56 °С в течение 30 мин, с последующим смешиванием 100 мкл полученной суспензии с лизирующим буфером на основе 6-молярного гуанидинизотиоцианата в объеме, указанном в инструкции к набору для выделения ДНК, и инкубированием в течение 15 мин при температуре (65±1) °С. Выделение ДНК осуществляли с помощью набора «ДНК-сорб В». Работу проводили в соответствии с инструкцией к препарату.

Постановку ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов осуществляли на приборе типа RotorGene (Qiagen, Германия) и CFX96 (BioRad, США), а с электрофоретической детекцией – на амплификаторе Mastercycler (Eppendorf, Германия) и в камере SybCell GT (BioRad, США) в 2 % агарозном геле.

Определение таксономической принадлежности штаммов бруцелл осуществляли по протоколам Bruce-ladder и Suis-ladder в соответствии с рекомендациями авторов [2, 3] и по разработанному нами ранее протоколу БРУ-ДИФ [7].

Фрагментное секвенирование по Сэнгеру осуществляли на генетическом анализаторе 3500 XL в соответствии с рекомендациями производителя.

Подбор праймеров и зондов проводили с помощью программного обеспечения на сайте [www.genscript.com](http://www.genscript.com) (Bioinformatics Tools / Molecular Biology / Real-time PCR (TaqMan) Primer Design) и программы GeneRunner 6.5.52. Оценку гомологии по-

следовательностей – по алгоритму BLAST, используя базу данных GenBank NCBI.

**Результаты и обсуждение**

**Выбор ДНК-мишеней для определения биоваров *B. suis* методом мультилокусной ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени.** Ранее нами были разработаны методические подходы и диагностические препараты на их основе для определения видовой принадлежности бруцелл (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*) методом мультилокусной ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени [1, 7]. Результаты исследования подтвердили перспективность использования в качестве ДНК-мишеней для этих целей генов, которые в разной степени встречаются у отдельных видов патогена. В связи с этим, приступая к разработке способа дифференциации биоваров *B. suis* методом ПЦР-РВ, необходимо было провести поиск локусов

как лежащих в консервативных участках генома (в отличие от протокола Suis-ladder), так и делетированных у определенных биоваров.

Особого внимания в данном направлении заслуживают геномный остров IncP, характерный для *B. suis* 1–4-го биоваров, *B. canis* и *B. microti*, и GI-3, отсутствующий у данных видов [8, 9].

При изучении *in silico* встречаемости генов, входящих в остров IncP (BRA0362–BRA0379 по нуклеотидной последовательности *B. suis* 1330, хромосома 2, GenBank NCBI № AE014292), нами было показано, что локус BRA0367 обнаруживается не во всех геномах *B. suis* и *B. canis* [1]. Поэтому проведен мониторинг *in vitro* генов острова у штаммов данных видов и дополнительно *B. neotomae* методом ПЦР с электрофоретическим учетом результатов. Подбор специфических праймеров осуществляли на основе нуклеотидной последовательности *B. suis* 1330 (GenBank NCBI № AE014292) с помощью программы GeneRunner 6.5.52. (табл. 1).

Таблица 1 / Table 1

**Результаты амплификации с праймерами на гены острова IncP у штаммов *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae***  
**Results of amplification with primers for IncP island genes in *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae* strains**

Локус Locus	Нуклеотидная последовательность праймеров, 5'-3' Nucleotide sequence of primers, 5'-3'	Образование специфических ампликонов Formation of specific amplicons						
		Биовары <i>B. suis</i> Biovars of <i>B. suis</i>					<i>B. canis</i>	<i>B. neotomae</i>
		1	2	3	4	5		
BRA0362	F: aaatgcgattgaggctatc R: ggtcgccattcaccttgg	+	+	+	+	-	+	+
BRA0363	F: aaagaattaaggagagcaag R: atcaatccatgcctcgac	+	+	+	+	-	+	+
BRA0364	F: atgagtagccgaacagc R: tgccacccttctctctc	+	+	+	+	-	+	+
BRA0365	F: tacctcgtgcccgttcttc R: gcagctcgatgcaactggataag	+	+	+	+	-	+	+
BRA0366	F: acgtctccgattgagagttaac R: cgctgctagccaagaate	+	+	+	+	-	+	+
BRA0367	F: cggctgcggaattggtcatc R: tgattgcccccctctgtctc	+	-	+	-	-	-	-
BRA0368	F: ttacacggctcgggaattg R: ccagccgatgttcaaac	+	+	+	+	-	+	+
BRA0370	F: tcagtggccgcgtaatag R: cggcctagcaagagcgttatg	+	+	+	+	-	+	+
BRA0371	F: cccttgctgatccttcc R: aaactgacaatgaggcag	+	+	+	+	-	+	+
BRA0372	F: aaatgcgattgaggctatc R: ctacgagccacaatttc	+	+	+	+	-	+	+
BRA0373	F: atgatgcacatcgcacatcaacc R: gcacctgttgatggccacatg	+	+	+	+	-	+	+
BRA0374	F: tacgtttcgtctcgcgtccac R: aaggtggcagtagcggcaaac	+	+	+	+	-	+	+
BRA0375	F: ctggcgtggttcttgatg R: gatccgaggagagcgttcaac	+	+	+	+	-	+	+
BRA0376	F: tcaaggctgttgattcg R: acggctacatcatcaagag	+	+	+	+	-	+	+
BRA0377	F: tccaaactgataccaatagc R: cgcaatcgccctcactatc	+	+	+	+	-	+	+
BRA0379	F: tcatggctcttgatgctg R: atcaaagaggaagccacgaac	+	+	+	+	-	+	+

Установлено, что при исследовании штаммов *B. suis* 2-го и 4-го биоваров, *B. canis* и *B. neotomae* отсутствуют амплификации с праймерами, фланкирующими локус BRA0367. Для штаммов *B. suis* 5-го биовара отмечено отсутствие всего острова IncP, что совпадает с данными М. Mancilla *et al.* [8].

Протяженность делеции локуса BRA0367 определена с помощью праймеров, фланкирующих фрагмент BRA0366–BRA0368 размером 538 п.н.: del1456 5'-GCATCCCAAGAGCCACAAG-3' и del1993 5'-AACGTGCAGCAGCTCCAGAAG-3'. Эти праймеры при исследовании штаммов *B. suis* 1–4-го биоваров и *B. canis* методом ПЦР инициировали синтез специфичных ампликонов. Проведено определение их нуклеотидной последовательности методом фрагментного секвенирования по Сэнгеру (рис. 1).

Установлено, что у изученных в данной работе штаммов 2-го биовара – *B. suis* И-99, 4-го биовара – *B. suis* 40 и *B. canis* 6/66 в результате гомологичной рекомбинации утрачена концевая часть гена BRA0368, включающая 21 нуклеотид (повторяющийся у гена BRA0367) и стоп-кодон TAA, а также практически полностью – последовательность гена BRA0367. Прямой повтор из 21 нуклеотида и стоп-кодона TGA гена BRA0367 заместил аналогичную область гена BRA0368 (рис. 1). При такой генетической перестройке размер делеции составил 185 п.н.

Последующий анализ известных геномов бруцелл *in silico* показал, что выявленная делеция характерна для пяти штаммов *B. suis* 2-го биовара (Bs143CITA, Bs364CITA, PT09172, PT09143, Bs396CITA), двух штаммов *B. suis* 4-го биовара (40, BSP), девяти штаммов *B. canis* (GB1, FDAARGOS\_420, 2010009751, 2009013648, 2009004498, RM6/66, SVA13, Oliveri, HSK A52141), четырех штаммов *B. neotomae* (NCTC10084, NCTC10071, NCTC10070, 5K33). У штаммов *B. suis* 1-го и 3-го биоваров 60, 686, S2, 1330 и *B. microti* CCM 4915 гены BRA0366–BRA0368 были интактными. Штаммы *B. ceti* и представители *Brucella* spp. оказались гетерогенными по структуре острова IncP: содержали как интактные BRA0366–BRA0368, так и делецию локуса BRA0367.

На следующем этапе с использованием базы данных GenBank NCBI у штаммов бруцелл разных видов проанализирована структура геномного острова GI-3 (BMEI1674–BMEI1703 по нуклеотидной последовательности *B. melitensis* 16M, хромосома 1, GenBank NCBI № AE008917). Гены, входящие в состав GI-3, выявлены у штаммов *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. suis* 2-го и 5-го биоваров, что в полной мере согласуется с данными М. Mancilla *et al.* [8], а также I. Lopez-Goni *et al.* [3], которые при разработке протокола Suis-ladder наблюдали амплификацию локуса BMEI1688 острова GI-3 у штаммов *B. suis* 2-го и 5-го биоваров. При этом делеций или вставок в данной области не отмечено.

Собственные исследования и анализ депонированных геномов бруцелл позволили выбрать в каче-

стве перспективных ДНК-мишеней для дифференциации биоваров *B. suis* методом ПЦР-РВ локусы: BRA0367 – делетирован у *B. suis* 2-го и 4-го биоваров, *B. canis*, *B. neotomae*; BRA0378 – делетирован у *B. suis* 5-го биовара, BMEI1683 – делетирован у *B. suis* 1, 3 и 4-го биоваров; и локус BR0262, который был использован нами ранее как специфичный для *B. suis* / *B. canis* / *B. neotomae* [1]. Поскольку разрабатываемый методический подход будет направлен на внутривидовую дифференцию выделенных культур *B. suis*, то для снижения риска получения неспецифичных результатов из-за присутствия этих локусов у других видов бруцелл необходима предварительная идентификация *B. suis* с использованием какого-либо протокола Bruce-ladder, БРУ-ДИФ или диагностического препарата «БРУ-ДИФ-РГФ», «ОМ-скрин-Бруцелла-РВ». Поэтому вся последующая работа выполнялась только на штаммах *B. suis*.

**Разработка и условия проведения мультилокусной ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени для определения биоваров *B. suis*.** На основе нуклеотидной последовательности указанных генов подобраны олигонуклеотидные праймеры и зонды TaqMan, обеспечивающие амплификацию с учетом результатов в режиме реального времени (табл. 2). В состав зондов для возможности проведения реакции в мультилокусном формате были введены флуоресцентные метки и гасители флуоресценции FAM-BHQ1, R6G-BHQ1, ROX-BHQ2, Cy5-BHQ2.

В ходе ряда экспериментов определены оптимальные условия амплификации фрагментов указанных локусов с учетом результатов в режиме реального времени. Установлено, что образование флуоресцентного сигнала по соответствующим каналам наблюдалось при проведении реакции в моноформате, тогда как в мультилокусном формате сразу с четырьмя парами праймеров и зондов накопление флуоресценции отсутствовало. Возможно, это связано с тем, что локусы BRA0367 и BRA0378 расположены близко друг к другу. Для решения данного вопроса предложено осуществлять реакцию в двух реакционных смесях: GO – с праймерами и зондами, комплементарными локусам BR0262 и BRA0367, и RY – комплементарными локусам BMEI1683 и BRA0378. При таком подходе наблюдалось эффективная амплификация всех выбранных локусов (рис. 2).

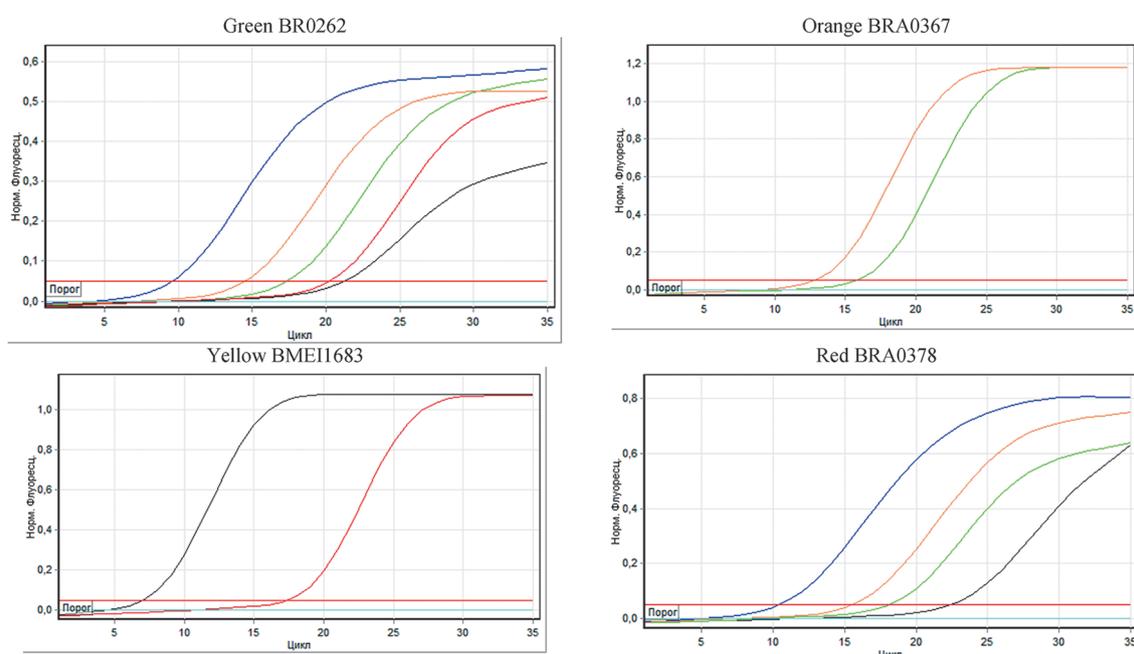
Программа амплификации в двух реакционных смесях адаптирована для амплификаторов RotorGene Q (Qiagen, Германия) и CFX96 (BioRad, США) и включала предварительную денатурацию при температуре 95 °С в течение 5 мин; 10 циклов 95 °С – 30 с, 56 °С – 30 с, 72 °С – 10 с; 35 циклов 95 °С – 30 с, 56 °С – 30 с (учет флуоресценции), 72 °С – 10 с. Для всех красителей в случае использования термоциклера RotorGene Q – границы значений по усилению сигнала 5 и 10. Для реакционной смеси GO регистрацию флуоресценции осуществляли по каналам FAM и ROX, для реакционной



Таблица 2 / Table 2

Нуклеотидная последовательность праймеров и зондов, подобранных в данной работе для определения биоварной принадлежности *B. suis*, и амплификация ДНК-мишеней с их участием у штаммов различных биоваров  
 Nucleotide sequence of primers and probes selected within the frames of this work to determine the biovar affiliation of *B. suis* and amplification of DNA targets with their participation in strains of various biovars

Локус Locus	Нуклеотидная последовательность праймеров и зондов, 5'-3' Nucleotide sequence of primers and probes, 5'-3'	Наличие амплификации Amplification				
		Bs 1 bv	Bs 2 bv	Bs 3 bv	Bs 4 bv	Bs 5 bv
<i>BR0262</i>	F: CTTGGTTTGTAGCGGTTGAC R: AAACGTCTTCGTCTCCTCAG P: FAM-ATTTCGATCCTCTTCAAGCGCCGT-RTQ1	+	+	+	+	+
<i>BMEI1683</i>	F: ATGACGGGAAATGTCGCTTG R: GCCAATTAAGCGACGCAATC P: R6G-CGCGTGCAGTTCTCTTTGCTGA-RTQ1	-	+	-	-	+
<i>BRA0367</i>	F: CAGTGCCGACCCACCAAG R: GATTTCTAAGGCGCTGATTGC P: ROX-CGCCCTCTGTCTCGTCTCGGCC-BHQ2	+	-	+	-	-
<i>BRA0378</i>	F: AGCATTTCTCTGATCCACA R: TGGGTCCACACATCATCGAA P: Cy5-CGCGCAAGACAACCCACAGC-BHQ2	+	+	+	+	-



Штамм Strains	Значения Ct Ct values			
	ПЦР-смесь GO PCR-mix GO		ПЦР-смесь RY PCR-mix RY	
	Green	Orange	Yellow	Red
	<i>BR0262</i>	<i>BRA0367</i>	<i>BMEI1683</i>	<i>BRA0378</i>
● <i>B. suis</i> bv. 1 U-100	17,42	15,84	NA	18,11
● <i>B. suis</i> bv. 2 U-99	21,25	NA	7,01	22,45
● <i>B. suis</i> bv. 3 686	14,54	12,9	NA	15,5
● <i>B. suis</i> bv. 4 214-23	9,59	NA	NA	10,45
● <i>B. suis</i> bv. 5 513	20,24	NA	17,37	NA

Примечание: NA – нет амплификации.

Note: NA – no amplification

Рис. 2. Результаты амплификации выбранных локусов в мультилокусном формате при исследовании штаммов *B. suis* различных биоваров (учет результатов в режиме реального времени на термоциклере RotorGene Q)

Fig. 2. The results of amplification of selected loci in a multilocus format in the study of *B. suis* strains of various biovars (recording of results in real time mode on the RotorGene Q thermal cycler)

Таблица 3 / Table 3

**Результаты определения специфичности разработанной мультилокусной ПЦР Suis-ДИФ**  
**The results of determining the specificity of the developed multilocus PCR Suis-DIF**

Штаммы Strains	Биовар Biovar	Специфичная флуоресценция Specific fluorescence				Результаты исследования Research results	
		ПЦР-смесь GO PCR-mix GO		ПЦР-смесь RY PCR-mix RY		Разработанная мультилокусная ПЦР Suis-ДИФ Developed multilocus PCR Suis-DIF	Suis-ladder
		<i>BR0262</i>	<i>BRA0367</i>	<i>BMEI1683</i>	<i>BRA0378</i>		
		Green	Orange	Yellow	Red		
<i>B. suis</i> 1330, 31, 6, И-100, 463	1	+	+	-	+	bv 1/3	bv 1
<i>B. suis</i> Thomsen, И-99	2	+	-	+	+	bv 2	bv 2
<i>B. suis</i> 686	3	+	+	-	+	bv 1/3	bv 3
<i>B. suis</i> 40, 214-23	4	+	-	-	+	bv 4	bv 4
<i>B. suis</i> 513, С-445, 89, 470	5	+	-	+	-	bv 5	bv 5
<i>B. suis</i> С-450, С-451	н/о n/d	+	-	+	-	bv 5	н/и n/i

Примечание: bv – биовар, н/о – не определено, н/и – биовар не идентифицируется, поскольку при использовании системы Suis-ladder получен амплификационный профиль, не описанный в данном протоколе [6].

Note: bv – biovar, n/d – not determined, n/i – biovar not identified, because when using the Suis-ladder system, an amplification profile was obtained that was not described in this protocol [6].

смеси-2 – по каналам JOE/HEX и Cy5/Quasar 670. При использовании амплификатора RotorGene Q показатели для учета результатов следующие: устранение выбросов – 10 %, Threshold/Порог по каналу FAM и Cy5 – 0,05, JOE и ROX – 0,1, коррекция уклона – не используется.

**Чувствительность и специфичность мультилокусной ПЦР Suis-ДИФ.** Для определения чувствительности и специфичности предложенного подхода (Suis-ДИФ) исследовали штаммы бруцелл различных видов и биоваров (табл. 3). Установлено, что определение биоваров *B. suis*, выполненное с помощью предложенного протокола Suis-ДИФ, по большинству штаммов совпало с данными, полученными по протоколу Suis-ladder. Более того, удалось идентифицировать биовар у двух штаммов *B. suis* – С-450 и С-451, выделенных из органов лесной мыши в Малгобекском районе Республики Ингушетия, для которых определить биовар с помощью системы Suis-ladder не представлялось возможным. Полученный у них профиль ампликации (774/488/278/197 п.н.) не представлен в указанном протоколе [6]. Количество VNTR в локусе *BMEI0205* было наиболее близким, но не идентичным для штаммов *B. suis* 5-го биовара. При использовании ДНК-мишеней, предложенных нами, амплификационный профиль этих штаммов оказался идентичным профилю штаммов *B. suis* 5-го биовара. Это, с одной стороны, говорит о хорошей биовар-дискриминирующей способности предложенного подхода Suis-ДИФ, а с другой – о наличии нового VNTR-профиля для штаммов *B. suis* 5-го биовара.

Чувствительность разработанной мультилокусной ПЦР составила  $1 \cdot 10^5$  м.к./мл. При такой концентрации патогена во всех случаях вне зависимости от биоварной принадлежности наблюдалось образование флуоресцентных сигналов по соответствующим каналам.

Таким образом, предложен методический подход, обеспечивающий определение биоваров *B. suis* на основании выявления генов, расположенных в геномных островах IncP и GI-3, методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени. Результаты экспериментов и анализ имеющихся в базе данных GenBank NCBI нуклеотидных последовательностей бруцелл свидетельствуют о различиях в структурной организации и встречаемости данных островов у разных биоваров патогена. Для выполнения анализа разработана мультилокусная ПЦР Suis-ДИФ и подтверждена ее специфичность при исследовании штаммов *B. suis* из фонда Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб». Различия в структуре IncP и GI-3 островов у штаммов *B. suis* могут быть связаны с адаптацией патогена к определенным носителям: свиньи – 1-й и 3-й биовары, зайцы и кабаны – 2-й биовар, северные олени – 4-й биовар, мышевидные грызуны – 5-й биовар. Проведенные исследования расширяют и дополняют сведения о генетической неоднородности видов и биоваров бруцелл, что играет важную роль в понимании процесса персистенции возбудителя в макроорганизме и его эволюции.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

**Список литературы**

1. Касьян Ж.А., Осина Н.А., Щербакова С.А. Разработка тест-системы для дифференциации видов бруцелл методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 3:47–51. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-47-51.
2. López-Goñi I., García-Yoldi D., Marín C.M., de Miguel M.J., Muñoz P.M., Blasco J.M., Jacques I., Grayon M., Cloeckaert A., Ferreira A.C., Cardoso R., Corrêa de Sá M.I., Walravens K., Albert D., Garin-Bastuji B. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including

the vaccine strains. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(10):3484–7. DOI: 10.1128/JCM.00837-08.

3. López-Goñi I., García-Yoldi D., Marín C.M., de Miguel M.J., Barquero-Calvo E., Guzmán-Verri C., Albert D., Garin-Bastuji B. New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Vet. Microbiol.* 2011; 154(1–2):152–5. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.06.035.

4. Probert W.S., Schrader K.N., Khuong N.Y., Bystrom S.L., Graves M.H. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(3):1290–3. DOI: 10.1128/JCM.42.3.1290-1293.2004.

5. Redkar R., Rose S., Bricker B., DelVecchio V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Mol. Cell. Probes.* 2001; 15(1):43–52. DOI: 10.1006/mcpr.2000.0338.

6. Осина Н.А., Касьян Ж.А., Касьян И.А., Ляшова О.Ю., Осин А.В. Определение видовой принадлежности штаммов бруцелл из фонда Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» с помощью амплификационных и рестрикционных технологий. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2016; 4:69–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-69-74.

7. Касьян Ж.А., Осина Н.А., Касьян И.А. Способ определения видовой принадлежности возбудителя бруцеллеза методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени. Патент РФ № RU2621864C1, опубл. 07.06.2017. Бюл. № 16.

8. Mancilla M. The *Brucella* genomic islands. In *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*. López-Goñi I., O’Callaghan D., editors. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2012. P. 36–57. DOI: 10.21775/9781913652531.

9. Paulsen I.T., Seshadri R., Nelson K.E., Eisen J.A., Heidelberg J.F., Read T.D., Dodson R.J., Umayam L., Brinkac L.M., Beanan M.J., Daugherty S.C., Deboy R.T., Durkin A.S., Kolonay J.F., Madupu R., Nelson W.C., Ayodeji B., Kraul M., Shetty J., Malek J., Van Aken S.E., Riedmuller S., Tettelin H., Gill S.R., White O., Salzberg S.L., Hoover D.L., Lindler L.E., Halling S.M., Boyle S.M., Fraser C.M. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2002; 99(20):13148–53. DOI: 10.1073/pnas.192319099.

## References

1. Kas’yan Z.A., Osina N.A., Shcherbakova S.A. [Development of the test-system for differentiation of *Brucella* species, using real-time PCR]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (3):47–51. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-47-51.

2. López-Goñi I., García-Yoldi D., Marín C.M., de Miguel M.J., Muñoz P.M., Blasco J.M., Jacques I., Grayon M., Cloeckaert A., Ferreira A.C., Cardoso R., Corrêa de Sá M.I., Walravens K., Albert D., Garin-Bastuji B. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(10):3484–7. DOI: 10.1128/JCM.00837-08.

3. López-Goñi I., García-Yoldi D., Marín C.M., de Miguel M.J., Barquero-Calvo E., Guzmán-Verri C., Albert D., Garin-Bastuji B. New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Vet. Microbiol.* 2011; 154(1–2):152–5. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.06.035.

4. Probert W.S., Schrader K.N., Khuong N.Y., Bystrom S.L., Graves M.H. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(3):1290–3. DOI: 10.1128/JCM.42.3.1290-1293.2004.

5. Redkar R., Rose S., Bricker B., DelVecchio V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Mol. Cell. Probes.* 2001; 15(1):43–52. DOI: 10.1006/mcpr.2000.0338.

6. Osina N.A., Kas’yan Z.A., Kas’yan I.A., Lyashova O.Yu., Osin A.V. [Determination of specific appurtenance of *Brucella* strains stored in the State Collection of Pathogenic Bacteria “Microbe”, using amplification and restriction techniques]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (4):69–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-69-74.

7. Kas’yan Zh.A., Osina N.A., Kas’yan I.A. [A method for determining the specific appurtenance of the brucellosis agent using PCR with hybridization-fluorescence registration of results in real-time mode]. RF patent No. RU2621864C1, publ. 06/07/2017. Bull. No. 16.

8. Mancilla M. The *Brucella* genomic islands. In *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*. López-Goñi I., O’Callaghan D., editors. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2012. P. 36–57. DOI: 10.21775/9781913652531.

9. Paulsen I.T., Seshadri R., Nelson K.E., Eisen J.A., Heidelberg J.F., Read T.D., Dodson R.J., Umayam L., Brinkac L.M., Beanan M.J., Daugherty S.C., Deboy R.T., Durkin A.S., Kolonay J.F., Madupu R., Nelson W.C., Ayodeji B., Kraul M., Shetty J., Malek J., Van Aken S.E., Riedmuller S., Tettelin H., Gill S.R., White O., Salzberg S.L., Hoover D.L., Lindler L.E., Halling S.M., Boyle S.M., Fraser C.M. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2002; 99(20):13148–53. DOI: 10.1073/pnas.192319099.

## Authors:

Osina N.A., Sitmbetov D.A., Domanina I.V., Bulgakova E.G., Kas’yan Zh.A., Kas’yan I.A., Lyashova O.Yu., Shcherbakova S.A. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

## Об авторах:

Осина Н.А., Ситмбетов Д.А., Доманина И.В., Булгакова Е.Г., Касьян Ж.А., Касьян И.А., Ляшова О.Ю., Щербаклова С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.