

Н.А.Осина, Ж.А.Касьян, И.А.Касьян, О.Ю.Ляшова, А.В.Осин

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ШТАММОВ БРУЦЕЛЛ ИЗ ФОНДА ГОСУДАРСТВЕННОЙ КОЛЛЕКЦИИ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ «МИКРОБ» С ПОМОЩЬЮ АМПЛИФИКАЦИОННЫХ И РЕСТРИКЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

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

Цель работы. Определение таксономического положения штаммов *Brucella* spp. с использованием комплекса амплификационных и рестрикционных методов. **Материалы и методы.** Проведено уточнение видовой принадлежности 17 типовых и 48 природных штаммов из фонда Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» с использованием амплификационного («Ген *Brucella* – идентификация – РГФ»), AMOS-DEL, Bruce-Ladder, Suis-Ladder) и рестрикционного анализа *omp25*, *omp2a*, *omp2b* локусов с помощью ферментов *AluI*, *EcoRI*, *Eco32I* (*EcoRV*). **Результаты и выводы.** В ходе проведенной молекулярной идентификации у 50 штаммов бруцелл подтверждено таксономическое положение, указанное в паспорте штамма, у 12 культур уточнена видовая принадлежность. Для трех штаммов бруцелл установлены новые профили амплификации и рестрикции, что указывает на необходимость продолжения исследований. Полученные результаты в полной мере подтверждают перспективность применения комплексного подхода с использованием нескольких амплификационных систем и препаратов и рестрикционного анализа для определения видовой принадлежности штаммов к виду и биовару возбудителя бруцеллеза.

Ключевые слова: бруцеллы, идентификация, таксономическое положение, амплификационные системы, рестрикционный анализ.

Корреспондирующий автор: Наталия Александровна Осина, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

N.A.Osina, Zh.A.Kas'yan, I.A.Kas'yan, O.Yu.Lyashova, A.V.Osin

Determination of Specific Appurtenance of *Brucella* Strains Stored in the State Collection of Pathogenic Bacteria "Microbe", Using Amplification and Restriction Techniques

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Objective of the study is to identify species appurtenance of *Brucella* spp. strains, using a complex of restriction and amplification techniques. **Materials and methods.** Carried out has been revision and clarification of species appurtenance of 17 reference and 48 natural strains, stored in the biobank of the State collection at the RusRAPI "Microbe", using amplification ("Gen *Brucella* – identification – RGF", AMOS-DEL, Bruce-Ladder, Suis-Ladder) and restriction analyses of *omp25*, *omp2a*, *omp2b* loci, applying *AluI*, *EcoRI*, *Eco32I* (*EcoRV*) ferments. **Results and conclusions.** Performed molecular identification has confirmed the stated in the profile taxonomic status of 50 *Brucella* strains, while for 12 isolates species appurtenance has been rectified. New profiles of amplification and restriction have been established for three cultures, which outlines the necessity to continue further investigations. The results obtained fully substantiate the prospects of the complex approach, which implies several amplification systems and preparations, as well as restriction analysis for determination of species and biovar of brucellosis agent strains.

Key words: *Brucella*, identification, taxonomic status, amplification systems, restriction analysis.

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

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

Citation: Osina N.A., Kas'yan Zh.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. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-69-74

Бруцеллез является особо опасным и социально значимым инфекционным заболеванием, которое обуславливает высокий уровень инвалидизации больных, а также наносит значительный экономический ущерб. На сегодняшний день известно 11 видов бруцелл. В Российской Федерации зарегистрирована циркуляция 6 видов, из которых в заражении человека и животных основную роль играют виды *B. abortus* и *B. melitensis*. Идентификация возбудителя бруцеллеза до сих пор остается серьезной проблемой лабораторной диагностики.

Определение видовой принадлежности бруцелл с использованием традиционной схемы предусма-

тривает изучение роста штаммов в атмосфере с избыточным содержанием углекислоты и на средах, содержащих фуксин и тионин, образования сероводорода и наличия дезаминазной активности, агглютинабельности моноспецифическими (А-, М-, R-) сыворотками, чувствительности к бруцеллезным бактериофагам Tb (Тбилиси), Wb (Weybridge), Fi (Firenze), Bk2 (Berkley). Выполнение таких исследований трудоемко, продолжительно и не позволяет дифференцировать все основные виды бруцелл. Часть штаммов возбудителя бруцеллеза, находящаяся в фонде Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» была полу-

чена в 1923–1966 гг., когда определение их видовой принадлежности зачастую основывалось на источнике выделения патогена. В связи с этим представляет интерес исследование штаммов *Brucella* spp. с помощью современных методов лабораторной диагностики. В настоящее время все более широкое применение получают молекулярно-генетические методы исследования, такие как ПЦР и ее модификации.

За последние годы зарубежными и отечественными авторами накоплен положительный опыт по применению полимеразной цепной реакции (ПЦР) для идентификации *Brucella* spp. Одним из первых способов, разработанных с этой целью, являлась система AMOS, предложенная Bricker и соавт. в 1994 г., и позволяющая определять *B. abortus* 1, 2-го и 4-го биоваров, *B. melitensis* всех биоваров, *B. suis* 1-го биовара [2]. Позднее эта система была модифицирована (AMOS-DEL), что позволило дополнительно идентифицировать штаммы *B. abortus* 3, 5, 6-го и 9-го биоваров [4]. Однако, несмотря на то, что данный подход получил широкое применение, с его помощью невозможно определить ряд видов и биоваров бруцелл.

Одной из референтных методик по определению видовой принадлежности бруцелл в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения животных является Bruce-Ladder [5]. Предложенный способ обеспечивает идентификацию видов *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. ceti/B. pinnipedialis*, а также дифференциацию ряда вакцинных штаммов: *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51, *B. melitensis* Rev1. Однако с помощью данной методики не представлялось возможным точное определение таксонов *B. canis* и *B. suis*, вследствие близких амплификационных профилей, наблюдающихся у ряда штаммов этих видов. Позднее, практически от той же группы авторов, была предложена система Suis-Ladder, обеспечивающая идентификацию всех биоваров *B. suis*, а также видов *B. canis* и *B. microti* [6].

Ранее нами был разработан и зарегистрирован набор реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ», позволяющий дифференцировать виды или группы видов бруцелл: *B. abortus/B. ovis*; *B. melitensis*; *B. suis/B. canis*; *B. neotomae* методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени, эффективность которого подтверждена при выявлении и ускоренной идентификации бруцелл в материале от животных [1].

A. Cloeckaert *et al.* [3] показана возможность определения некоторых видов и биоваров бруцелл на основании рестрикции генов *omp25*, *omp2a*, *omp2b*.

Несмотря на очевидную перспективность применения молекулярно-генетических методов для идентификации бруцелл, все обозначенные выше приемы и тест-системы не позволяют в полной мере дифференцировать виды *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae* с учетом их биоварной принадлежности. Одним из способов в ре-

шении данного вопроса может быть использование представленных подходов в совокупности.

Целью исследования было определение таксономического положения штаммов *Brucella* spp. из фонда Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» с использованием комплекса амплификационных и рестрикционных

Материалы и методы

Всего в исследовании использовано 17 типовых и 48 природных штаммов.

Культуры выращивали на эритроцит-агаре (НИИ им. Мечникова, Москва), pH 7,2, при температуре (37±1) °C 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 (10 МЕ)), что соответствовало 1,6·10⁹ м.к./мл для возбудителя бруцеллеза. Для обеззараживания проб к ним добавляли мертиолят натрия до конечной концентрации 1:10000 (0,01 %), прогревали при 56 °C в течение 30 мин, с последующим смешиванием 100 мкл полученной суспензии с лизирующим буфером на основе 6 моль гуанидинизотиоцианата в объеме, указанном в инструкции к набору для выделения ДНК, и инкубированием 15 мин при температуре (65±1) °C. Выделение ДНК осуществляли с помощью наборов «АмплиПраймДНК-сорб В» («ООО ИнтерЛабСервис», Россия) и «PureLink™ Mini» (Invitrogen, США). Работу проводили в соответствии с инструкциями к препаратам.

Постановку ПЦР с системой AMOS-DEL осуществляли в соответствии с рекомендациями авторов [4] с некоторыми модификациями. Реакционная смесь содержала праймеры P_{Вa}, P_{Вm}, P_{Вo}, Del 569 концентрации 6 пМоль, праймер PIS711 – 25 пМоль, ионов Mg²⁺ – 1,5 мМоль, дНТФ – 0,2 мМоль, фермента SynTaq-ДНК полимеразы (ЗАО «Синтол») – 2 ед. Концентрация ДНК препаратов бруцелл была не менее 1 нг/мкл. Программа амплификации включала прогревание при: 95 °C – 10 мин; 30 циклов: 94 °C – 30 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 2 мин; 72 °C – 5 мин.

Анализ с системой Bruce-Ladder проводили в соответствии с рекомендациями авторов [5]. Реакционная смесь содержала праймеры в концентрации 6 пМоль каждого, ионов Mg²⁺ – 3 мМоль, дНТФ – 0,2 мМоль, фермента SynTaq-ДНК полимеразы (ЗАО «Синтол») – 2 ед. Концентрация ДНК препаратов бруцелл была не менее 10 нг/мкл. Программа амплификации включала прогревание при: 95 °C – 5 мин; 25 циклов: 95 °C – 30 с, 64 °C – 45 с, 72 °C – 3 мин; 72 °C – 10 мин.

Для определения биоваров *B. suis* использовали систему Suis-Ladder [6]. Реакционная смесь содержала праймеры в концентрации 6 пМоль каждого, ионов Mg²⁺ – 2 мМоль, дНТФ – 0,2 мМоль, фермента SynTaq-ДНК полимеразы (ЗАО «Синтол») – 1 ед. Концентрация ДНК препаратов бруцелл была не ме-

нее 1 нг/мкл. Программа амплификации включала прогревание при: 95 °С – 7 мин; 30 циклов: 95 °С – 35 с, 63 °С – 45 с, 72 °С – 60 с.; 72 °С – 6 мин.

Проведение реакции с набором реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» осуществляли в соответствии с инструкцией к препарату.

Постановку ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов осуществляли на приборе RotorGeneQ («Qiagen», Германия), а с электрофоретической детекцией – на амплификаторе Mastercycler Nexus (Eppendorf, Германия). Электрофорез проводили в 2 % агарозном геле, в случае учета результатов, с системами Bruce-Ladder и Suis-Ladder в 3 % агарозном геле NuSieve™ 3:1 (Lonza) при рестрикционном анализе. В качестве маркера молекулярных масс использовали GeneRuler Express DNA Ladder (Fermentas).

Рестрикцию проводили с использованием эндонуклеаз для ускоренного гидролиза ДНК: FastDigest *AluI*, *EcoRI*, *Eco32I* (*EcoRV*). Работу осуществляли в соответствии с инструкциями к препаратам.

Результаты и обсуждения

В основе системы AMOS-DEL лежит определение расположения в геноме патогена последовательности *IS711* элемента. При ее использовании у культур, относящихся к *B. abortus* 1, 2-го и 4-го биоваров наблюдается образование ампликона размером 498 п.н., к *B. abortus* 3b 5, 6, 9-го биоваров – 1700 п.н., к *B. melitensis* – 731 п.н., к *B. ovis* – 976 п.н., к *B. suis* 1-го биовара – 268 п.н. [4].

Система Bruce-Ladder направлена на амплификацию фрагментов генов *wboA*, *bp26*, *omp31*, *eryC*, участка нуклеотидной последовательности рибосомального белка *gplL* гена, транскрипционного регулятора *CRP*, гена *ABC Transporter* в разной степени встречающихся у видов бруцелл. При выполнении анализа с помощью данного подхода для штаммов *B. abortus* характерно образование ампликонов размером 1682/794/587/450/152 п.н., *B. melitensis* – 1682/1071/794/587/450/152 п.н., *B. suis* – 1682/1071/794/587/450/272/152 п.н., *B. canis* – 1682/1071/587/450/272/152 п.н., *B. ovis* – 1071/794/587/450/152 п.н., *B. neotomae* – 1682/1071/578/450/272 п.н. [5].

Определение биоваров *B. suis* при использовании метода Suis-Ladder также основано на наличии амплификации фрагментов различного размера: *B. suis* биовар 1 – 774/425/197 п.н., *B. suis* биовар 2 – 774/551/278 п.н., *B. suis* биовар 3 – 774/299/197 п.н., *B. suis* биовар 4 – 774/614/197 п.н., *B. suis* биовар 5 – 774/614/278/197 п.н. [6]. С системой Suis-Ladder также возможна идентификация представителей вида *B. canis* по образованию ампликонов размером 614 и 197 п.н., вида *B. microti* – 774 и 197 п.н.

Для проведения рестрикционного анализа нами были взяты ферменты, оказавшиеся, по данным А.Слоескаерт *et al.* [3], наиболее информативными для видовой дифференциации штаммов бруцелл *EcoRV*,

EcoRI, *AluI*. Для штаммов *B. ovis* характерен уникальный профиль рестрикции фрагмента локусов *omp25* с помощью фермента *EcoRV*, *omp2a* и *omp2b* – *AluI*. Культуры *B. neotomae* имеют специфичный только для них профиль рестрикции фрагмента гена *omp2a* ферментом *AluI*, *B. abortus* 1, 2, 4-го биоваров – гена *omp2a* ферментами *EcoRI* и *AluI*. Фрагмент локуса *omp25* у штаммов *B. melitensis* не подвергается гидролизу рестриктазой *EcoRV*.

Для оценки эффективности выбранных амплификационных и рестрикционных подходов при идентификации штаммов бруцелл на первом этапе нашей работы были исследованы типовые штаммы *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis* и *B. neotomae* с учетом биоварной принадлежности. Поскольку в коллекции не было типового штамма *B. ovis*, для анализа выбрано несколько природных штаммов данного вида.

Практически все проанализированные штаммы показали результаты, характерные для своего вида и биовара, что в полной мере подтверждает их таксономическое положение, указанное в паспорте (табл. 1).

Однако при исследовании культуры *B. abortus* 292 не подтверждена ее принадлежность к 4-му биовару данного вида. На это указывают полученные профили рестрикции фрагмента гена *omp2a* ферментами *EcoRI* и *AluI* и данные анализа с системой AMOS-DEL. Штамм *B. abortus* 63/75 7 биовара, который ранее не был изучен с помощью способа AMOS-DEL [4], имел амплификационный профиль, характерный для *B. abortus* 3b, 5, 6, 9-го биоваров. Помимо этого, культура *B. ovis* 2000 идентифицирована как *B. abortus* 3b, 5, 6, 9-го биоваров. Принадлежность к виду *B. abortus* подтверждают результаты всех использованных амплификационных и рестрикционных технологий. В то же время таксономическое положение взятых для исследования культур *B. ovis* 25-90 и И-107 не вызывает сомнения. При изучении штаммов *B. suis* 1330, Thomsen, 686, 40, 513 с помощью системы Suis-ladder в полной мере подтверждена их биоварная принадлежность: 1, 2, 3, 4-й и 5-й биовар соответственно.

Основываясь на полученных результатах, мы продолжили исследования на 48 природных штаммах бруцелл из фонда коллекции, выделенных в 1932–2014 гг. из различных источников. Результаты анализа представлены в табл. 2.

Из 10 исследованных штаммов *B. abortus*, по данным всех использованных подходов, 6 изолятов (А-81, С-442, 1271,164-70, И-199, 1552) идентифицированы как *B. abortus* 3b, 5 6-го и 9-го биоваров, и один (339) как *B. melitensis*.

У штамма *B. abortus* 290 в ПЦР с системой AMOS-DEL наблюдалось образование двух фрагментов 1700 и 498 п.н., характерных разных биоваров *B. abortus* 3b, 5, 6, 9-го и 1, 2, 4-го биоваров соответственно. В профиле амплификации с системой Bruce-Ladder у культуры *B. abortus* 3143-П от-

Результаты идентификации типовых штаммов разных видов бруцелл с использованием амплификационных систем и рестрикционного анализа

Название штамма, таксономическое положение в соответствии с паспортом	Результаты исследования								Результаты идентификации на основании проведенного анализа
	Амплификационные системы				Рестрикция				
	Набор реагентов «Brucella- идентификация – РГФ»	AMOS-Del-	Bruce-ladder	Suis-Ladder	EcoRV/omp25	EcoRI/omp2a	AluI/omp2a	AluI/omp2b	
<i>B. abortus</i> 544 ATCC 23448 1 bv	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. abortus</i> (1, 2, 4 bv)	<i>B. abortus</i>	н/и	P1	P1	P1	P1	<i>B. abortus</i> (1, 2, 4 bv)
<i>B. abortus</i> Tulya ATCC 23450 3 bv <i>B. abortus</i> B-3196 ATCC 23452 5 bv <i>B. abortus</i> 870 ATCC 23453 6 bv <i>B. abortus</i> C-68 ATCC 23455 9 bv	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)	<i>B. abortus</i>	н/и	P1	P2	P2	P1	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)
<i>B. abortus</i> 292 ATCC 23451 4 bv	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)	<i>B. abortus</i>	н/и	P1	P2	P2	P1	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)
<i>B. abortus</i> 63/75 ATCC 23454 7 bv	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)	<i>B. abortus</i>	н/и	P1	P2	P2	P1	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)
<i>B. melitensis</i> 16M ATCC 23456 1 bv <i>B. melitensis</i> 63/9 ATCC 234579 2 bv <i>B. melitensis</i> 706 ATCC 234593 3 bv	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	н/и	NR	P2	P2	P1	<i>B. melitensis</i>
<i>B. suis</i> 1330 ATCC 23444 1 bv	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	<i>B. suis</i> 1 bv	<i>B. suis</i>	1 bv	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 1 bv
<i>B. suis</i> Thomsen ATCC 23445 2 bv	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. suis</i>	2 bv	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 2 bv
<i>B. suis</i> 686 ATCC 23446 3 bv	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. suis</i>	3 bv	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 3 bv
<i>B. suis</i> 40 ATCC 23447 4 bv	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. suis</i>	4 bv	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 4 bv
<i>B. suis</i> 513 BCCN R21 5 bv	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. suis</i>	5 bv	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 5 bv
<i>B. canis</i> RM 6/66 ATCC 23365	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. canis</i>	<i>B. canis</i>	P1	P2	P2	P1	<i>B. canis</i>
<i>B. neotomae</i> 5k33 ATCC 23459	<i>B. neotomae</i>	NEG	<i>B. neotomae</i>	н/и	P1	P2	P4	P1	<i>B. neotomae</i>
<i>B. ovis</i> 2000	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)	<i>B. abortus</i>	н/и	P1	P2	P2	P1	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)
<i>B. ovis</i> 25-90, И-107	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i>	н/и	P2	P2	P3	P2	<i>B. ovis</i>

существовал фрагмент размером 1682 п.н., который должен амплифицироваться у представителей данного вида. Несмотря на атипичные результаты по одному из использованных методов, по совокупности результатов данные штаммы все же относятся к виду *B. abortus*, но имеют некоторые генетические перестройки.

Особый интерес представляют результаты идентификации штамма *B. abortus* C-549, выделенного от мышевидных грызунов в Австралии в 1980 г. При исследовании с помощью набора реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» получен новый профиль амплификации (*BRA0541*⁺, *BR0262*⁻, *ВМЕП0711*⁻), который не соответствовал ни одному из характерных для видов или групп видов бруцелл *B. abortus*/*B. ovis* (*BRA0541*⁺, *BR0262*⁻, *ВМЕП0711*⁺); *B. melitensis* (*BRA0541*⁻, *BR0262*⁻, *ВМЕП0711*⁺); *B. suis*/*B. canis* (*BRA0541*⁺, *BR0262*⁺, *ВМЕП0711*⁺); *B. neotomae* (*BRA0541*⁺, *BR0262*⁺, *ВМЕП0711*⁻). Другая картина амплификации наблюдалась и при использовании системы Bruce-Ladder – отсутствовал фрагмент размером 1682 п.н. Помимо этого, для данного штамма характерны уникальные профили рестрикции участков генов *omp2a* и *omp2b* ферментом *AluI* (рисунок), тогда как результаты рестрик-

ции *omp25*, *omp2a* локусов рестриктазами *EcoRV* и *EcoRI*, соответственно, идентичны таковым для ряда видов бруцелл. Все это указывает на то, что штамм *B. abortus* C-549 относится к роду *Brucella* spp., но определить его видовую принадлежность не представляется возможным. Очевидна необходимость дальнейшего изучения данного изолята, в том числе с использованием полногеномного секвенирования.

Полученные нами результаты согласуются и дополняют данные R.T.Tiller *et al.* [7], которые установили, что штаммы возбудителя бруцеллеза, выделенные от грызунов в 1980-е годы на территории Австралии, отличаются по ряду фенотипических и генетических признаков от известных видов бруцелл. Филогенетический анализ, проведенный авторами на основании нуклеотидной последовательности генов 16S рДНК, *recA*, *rpoB* и 15 VNTR-локусов, показал, что эти культуры имели схожесть со штаммом *B. inopinata* VO1, атипичным изолятом *Brucella* VO2, но образовывали отдельную самостоятельную ветку.

Из 14 исследованных изолятов *B. melitensis* для 11 (И-328, М-117, М-97, С563-С570) подтверждена их принадлежность к виду, указанному в паспорте. В то же время штамм *B. melitensis* 286 идентифицирован как *B. suis*, *B. melitensis* C-482 как *B. abortus*,

Результаты идентификации природных штаммов бруцелл с использованием амплификационных систем и рестрикционного анализа

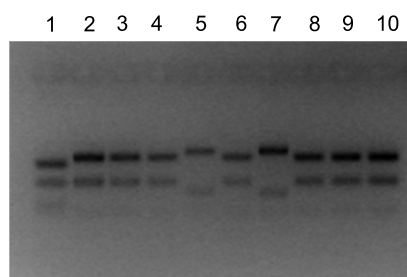
Название штамма, таксономическое положение в соответствии с паспортом	Результаты исследования								Результаты идентификации на основании проведенного анализа
	Амплификационные системы				Рестрикция				
	Набор реагентов «Brucella- идентификация – РГФ»	AMOS-Del-	Bruce-ladder	Suis-Ladder	EcoRV/omp25	EcoRI/omp2a	AluI/omp2a	AluI/omp2b	
<i>B. abortus</i> А-81, С-442, 1271, 164-70, И-199, 1552	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)	<i>B. abortus</i>	н/и	P1	P2	P2	P1	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)
<i>B. abortus</i> 290	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	н/иден	<i>B. abortus</i>	н/и	P1	P2	P2	P1	<i>B. abortus</i>
<i>B. abortus</i> 3143-П	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)	н/иден	н/и	P1	P2	P2	P1	<i>B. abortus</i>
<i>B. abortus</i> C-549	н/иден	NEG	н/иден	н/и	P1	P2	P _{new}	P _{new}	<i>Brucella spp.</i>
<i>B. abortus</i> 339	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	н/и	NR	P2	P2	P1	<i>B. melitensis</i>
<i>B. melitensis</i> И-328, М-117, М-97, С563-С570	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	н/и	NR	P2	P2	P1	<i>B. melitensis</i>
<i>B. melitensis</i> 286	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	<i>B. suis</i> 1 bv	<i>B. suis</i>		P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 1 bv
<i>B. melitensis</i> C-482	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. abortus</i> (1, 2, 4 bv)	<i>B. abortus</i>	н/и	P1	P1	P1	P1	<i>B. abortus</i> (1, 2, 4 bv)
<i>B. melitensis</i> М-114	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i>	н/и	P2	P2	P3	P2	<i>B. ovis</i>
<i>B. suis</i> 31, 61, 6, И-100	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	<i>B. suis</i> 1bv	<i>B. suis</i>	bv1	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 1 bv
<i>B. suis</i> И-99	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. suis</i>	bv2	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 2 bv
<i>B. suis</i> 214/23	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. suis</i>	bv4	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 4 bv
<i>B. suis</i> C-445	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. suis</i>	bv5	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 5 bv
<i>B. suis</i> C-450, C-451	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. suis</i>	н/иден	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i>
<i>B. ovis</i> 440, 25-90, И-107	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i>	н/и	P2	P2	P3	P2	<i>B. ovis</i>
<i>B. ovis</i> 64/1, 390-90, 10/2, 83-89, 2000	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)	<i>B. abortus</i>	н/и	P1	P2	P2	P1	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)
<i>B. ovis</i> 830	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	н/и	NR	P2	P2	P1	<i>B. melitensis</i>
<i>B. ovis</i> 712	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. suis</i>	bv5	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 5 bv
<i>B. canis</i> 666, 1066	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. canis</i>	<i>B. canis</i>	P1	P2	P2	P1	<i>B. canis</i>
<i>B. canis</i> И-966	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. suis</i>	bv4	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 4 bv
<i>B. neotomae</i> 65/168, 66/2	<i>B. neotomae</i>	NEG	<i>B. neotomae</i>	н/и	P1	P2	P4	P1	<i>B. neotomae</i>

Примечания: н/иден – идентификация бруцелл не возможна, н/и – не исследуется, NEG – отсутствие амплификации, NR– нет рестрикции.

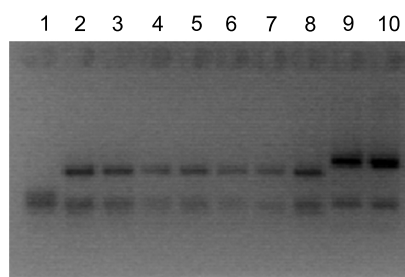
B. melitensis М-114 как *B. ovis*.

Таксономическое положение девяти изученных штаммов *B. suis*, определенное с помощью амплификационных и рестрикционных технологий, полностью совпало с паспортными данными. Особый интерес представляют результаты анализа культур *B. suis* C-450 и C-451, выделенных от лесных мышей в 1990 г., с помощью системы Suis-Ladder. У этих штаммов профиль амплификации составил 774/488/278/197 п.н., и он не соответствовал ни одному из указанных I.Lopez-Goni *et al.* [6]. Наиболее близким профилем к полученному обладали штаммы *B. suis* 5-го биовара: 774/614/278/197 п.н. Авторами в

качестве ДНК-мишени для дифференциации биоваров *B. suis* предложено использовать участок Brucе 11, содержащий вариабельные тандемные повторы (VNTR). Поэтому в ПЦР у биоваров наблюдается образование ампликонов разного размера: биовар 1 – 425 п.н. (6 повторов), биовар 2 – 551 п.н. (8 повторов), биовар 3 – 299 п.н. (4 повтора), биовар 4 и 5 – 614 п.н. (9 повторов). У изученных штаммов *B. suis* C-450 и C-451 выявлена амплификация 7 повторов (488 п.н.). Полученные результаты указывают на необходимость расширения спектра изученных штаммов данного вида с похожим источником выделения для решения вопроса о дополнении схемы интерпре-



А



Б

Результаты рестрикции *omp2b* (А) и *omp2a* (Б) ферментом *AluI* у штаммов бруцелл:

1 – *B. abortus* C-549; 2 – *B. abortus* 3143-П; 3 – *B. abortus* 1552; 4 – *B. canis* 1066; 5 – *B. canis* И-966; 6 – *B. canis* 6/66; 7 – *B. ovis* 440; 8 – *B. ovis* 712; 9 – *B. neotomae* 65/168; 10 – *B. neotomae* 66/2

тации результатов системы Suis-Ladder.

Из 10 штаммов *B. ovis* на основании проведенного анализа только три (440, 25-90, И-107) принадлежали данному виду, пять (64/1, 390-90, 10/2, 83-89, 2000) идентифицированы как *B. abortus*, один штамм (830) как *B. melitensis* и одна культура (712) – *B. suis* 5-го биовара. Результаты исследования, полученные с использованием разных амплификационных систем и рестрикционного анализа фрагментов *omp25*, *omp2a* и *omp2b* генов с помощью ферментов *EcoRV* и *AluI*, полностью совпадали.

При изучении трех штаммов *B. canis* для двух из них (666, 1066) подтверждено таксономические положения в соответствии с паспортными данными, тогда как последний (Н-966) являлся *B. suis* 4-го биовара. Оба штамма *B. neotomae* 65/168, 66/2 принадлежали к виду, указанному в паспорте.

Таким образом, применение комплекса амплификационных методов и тест-систем («Ген *Brucella* – идентификация – РФФ» или аналог, AMOS-DEL, Bruce-Ladder, Suis-Ladder) и рестрикционного анализа *omp25*, *omp2a*, *omp2b* локусов с помощью ферментов *AluI*, *EcoRI*, *Eco32I* (*EcoRV*) является эффективным подходом для определения видовой и, в ряде случаев, биоварной принадлежности бруцелл. Полученные результаты указывают на перспективность продолжения работы по уточнению видовой принадлежности штаммов, хранящихся в фонде Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб», а также на целесообразность совершенствования способов определения видовой принадлежности возбудителя бруцеллеза с помощью полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Касьян Ж.А., Осина Н.А., Касьян И.А., Шарова И.Н., Казакова Е.С. Апробация нового генодиагностического препарата при исследовании проб биологического материала на наличие возбудителя бруцеллеза. *ЗНИСО*. 2016; 4(277):48.
2. 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. Microbiology*. 1994; 32:2660–6.
3. Cloeckaert A., Verger J.-M., Grayon M., Grepinet O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology*.

1995; 141:2111–21.

4. İca T., Aydın F., Gümüşsoy K.S., Perçin D., Sümerkan A.B., Ocak F., Abay S., Doğan H.O., Findik A., Çiftçi A. Conventional and molecular biotyping of *Brucella* strains isolated from cattle, sheep and human. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* 2012; 59:259–64.

5. Lopez-Goni I., Garcia-Yoldi D., Martin C.M., Miguel M.J., Munoz P.M., Blasco J.M., Jacques I., Grayon M., Cloeckaert A., Ferreira A.C., Carloso R., Correa de Sa, 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; 46:3484–7. DOI: 10.1128/JCM.00837-08.

6. Lorpez-Goni I., Garcia-Yoldi D., Martin C.M., Miguel M.J., Barquero-Calvo E., Guzman n-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; 154:152–5. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.06.035.

7. Tiller R.V., Gee J.E., Frace M.A., Taylor T.K., Setubal J.C., Hoffmaster A.R., De B.K. Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010; 76:5837–45. DOI: 10.1128/AEM.00620-10.

References

1. Kas'yan Zh.A., Osina N.A., Kas'yan I.A., Sharova I.N., Kazakova E.S. [Validation of new gene-diagnostic preparation in tests of biological material samples for the presence of brucellosis agent]. *Zdor. Naselen. Sreda Obit.* 2016; 4(277): 48.
2. 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. Microbiology*. 1994; 32:2660–6.
3. Cloeckaert A., Verger J.-M., Grayon M., Grepinet O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology*. 1995; 141:2111–21.
4. İca T., Aydın F., Gümüşsoy K.S., Perçin D., Sümerkan A.B., Ocak F., Abay S., Doğan H.O., Findik A., Çiftçi A. Conventional and molecular biotyping of *Brucella* strains isolated from cattle, sheep and human. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* 2012; 59:259–64.
5. Lopez-Goni I., Garcia-Yoldi D., Martin C.M., Miguel M.J., Munoz P.M., Blasco J.M., Jacques I., Grayon M., Cloeckaert A., Ferreira A.C., Carloso R., Correa de Sa, 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; 46:3484–7. DOI: 10.1128/JCM.00837-08.
6. Lorpez-Goni I., Garcia-Yoldi D., Martin C.M., Miguel M.J., Barquero-Calvo E., Guzman n-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; 154:152–5. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.06.035.
7. Tiller R.V., Gee J.E., Frace M.A., Taylor T.K., Setubal J.C., Hoffmaster A.R., De B.K. Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010; 76:5837–45. DOI: 10.1128/AEM.00620-10.

Authors:

Osina N.A., Kas'yan Zh.A., Kas'yan I.A., Lyashova O.Yu., Osin A.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru

Об авторах:

Осина Н.А., Касьян Ж.А., Касьян И.А., Ляшова О.Ю., Осин А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Поступила 29.07.16.