

ВЕТЕРИНАРДЫК ИЛИМДЕР
ВЕТЕРИНАРНЫЕ НАУКИ
VETERINARY SCIENCES

Турсумбетов М.С., Нургазиева А.Р., Чегиров С.Б., Курсанбаева К.А.

**BCSP31 ЖАНА IS711 ГЕНДЕРИНИН НУКЛЕОТИДДИК ЫРААТТУУЛУГУН
ПАЙДАЛАНУУ МЕНЕН БРУЦЕЛЛДИ ГЕНДИК ТИПКЕ АЖЫРАТУУ (генетипирлөө)**

Турсумбетов М.С., Нургазиева А.Р., Чегиров С.Б., Курсанбаева К.А.

**ГЕНОТИПИРОВАНИЕ БРУЦЕЛЛ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НУКЛЕОТИДНОЙ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА BCSP31 И IS711**

M.S. Tursumbetov, A.R. Nurgazieva, S.B. Chegirov, K.A. Kursanbaeva

**GENOTYPING OF BRUCELLA USING THE NUCLEOTIDE
SEQUENCE OF THE BCSP31 AND IS711 GENES**

УДК: 619:579.841.93

Бруцелла – жаныбарларда жана адамдарда оору козгоочу клетка ичиндеги патоген. Бул изилдөөнүн максаты – топоздун канынан болуп алынган бруцеллди, полимераздык чынчырга реакциясынын жардамы менен идентификациялоо. *B. melitensis* козгоочунун топоздор арасындагы миграция жолдорун изилдөө. Бруцелл уруунун BCSP31 праймеринин жардамы менен изилдөөдө, күтүлгөндөй эле BCSP31 генинин ампликонунун өлчөмү 223 пар нуклеотидди түздү. Кандын серопозитивдүү үлгүлөрүнүн ичинен, бөлүнүп алынган 90 ДНК-нын арасынан 82 (91,1%) үлгүсү BCSP31 праймери боюнча оң, ал эми калган 8 (8,8%) үлгү жалган терс натыйжа берди. *B. abortus* жана *B. melitensis* үлгүлөрүн спецификалык праймерлери менен изилдөө, *B. abortus* үчүн 498, *B. melitensis* үчүн 731 пар нуклеотид ампликонун берди (2,3-сүр). Молекулалык өлчөмү 498 п.н болгон ампликондор 96/108 (88,8%) ДНК үлгүлөрүнөн табылды. *B. melitensis*-тин 108 серопозитивдүү үлгүлөрүнөн 731 п.н ампликону 3/108 учурда (2,7%) гана табылган.

Негизги сөздөр: жаныбарлар, жаныбарлардын бруцеллезу, молекулалык диагноз, бруцелла, топоздор, бактериологиялык ыкмалар, спецификалык праймерлери.

Бруцелла - внутриклеточный патоген, способный заражать животных и людей. Целью данного исследования являлось идентифицирование бруцелл, в выделенных образцах крови яков с помощью полимеразной цепной реакции; изучение способов миграции возбудителя *B. melitensis* среди яков. При изучении рода бруцелл с помощью праймеров BCSP31 как и ожидалось, размер ампликона гена *bcsp31* составлял 223 пар нуклеотидов. Среди 90 выделенных ДНК из серопозитивных образцов крови 82 (91,1%) образца были положительными по праймерам BCSP31, и только 8 (8,8%) ложноотрицательные. Обнаружение *Brucella spp.* в образцах *B. abortus* и *B. melitensis* специфическими праймерами (IS 711) дало ампликоны 498 и 731 пар нуклеотидов для *B. abortus* и *B. melitensis*, соответственно (рисунки 2 и 3). Ампликоны молекулярным размером 498 п. н. были выделены в 108/96 (88,8%) образцах ДНК. Из 108 серопозитивных образцах *B. melitensis* установлено, что ампликон 731 п. н. был обнаружен только в 3/108 (2,7%) случаев.

Ключевые слова: животные, бруцеллез животных, молекулярная диагностика, бруцелла, яки, бактериологические методы, специфические праймеры.

Brucella is an intracellular pathogen that can infect animals and humans. The purpose of this study was to identify brucella in isolated yak blood samples using polymerase chain reaction; to study the migration pathways of the pathogen *B. melitensis* among yaks. When studying the brucella genus using BCSP31 primers, as expected, the amplicon size of the *bcsp31* gene was 223 nucleotide pairs. Among 90 DNA samples isolated from seropositive blood samples, 82 (91.1%) samples were positive for the BCSP31 primer, and only 8 (8.8%) were false negative. Detection of *Brucella spp.* in the samples of *B. abortus* and *B. melitensis*, specific primers (IS 711) gave amplicons of 498 and 731 nucleotide pairs for *B. abortus* and *B. melitensis*, respectively (Figures 2 and 3). Amplicons with a molecular size of 498 bp were isolated in 108/96 (88.8%) DNA samples. Out of 108 seropositive samples of *B. melitensis*, it was found that amplicon 731 bp was detected only in 3/108 (2.7%) cases.

Key words: animals, brucellosis of animals, molecular diagnostics, brucella, yaki, bacteriological methods, specific primers.

Введение. Бруцеллез остается новым и вновь возникающим зоонозом во всем мире, вызывающим высокую заболеваемость среди людей. В первую очередь он поражает лиц, постоянно подвергающихся воздействию привередливых микроорганизмов рода *Brucella*, и имеет неспецифическую клиническую картину. В этом случае, диагностика бруцеллеза может быть затруднена.

В данной работе дана характеристика метода молекулярной диагностики бруцеллеза животных на основе гена BCSP-31, IS711. Результаты экспериментов показали, что использование одноэтапной стандартной ПЦР является гораздо более чувствительным методом, в сравнение с бактериологическими методами. Он более специфичный для диагностики первичной инфекции, контроля болезни, раннего выявления рецидивов и диагностики очаговых осложнений. Геном штаммов возбудителя бруцеллеза содержит около 3 миллионов пар оснований (Mb). Геномная ДНК состоит из двух хромосом: большой (размером 2 Mb) и малой (1 Mb).

Несмотря на то, что у всех видов *Brucella* spp. число и расположение инсерционных элементов достаточно консервативно, установлено, что одна из копий IS711 локализуется на различных участках хромосомы, в зависимости от вида и биовара патогена B.J. Bricker с соавт. предложили использовать это свойство для дифференциации *B. abortus* (1, 2, 4 биовары), *B. melitensis* (все биовары), *B. suis* (1 биовар), *B. ovis*. В результате авторами была разработана система ПЦР, так называемая AMOS, основанная на анализе хромосомной инсерционной последовательности IS711. В дальнейшем модификация данной методики (AMOS-ERY) позволила идентифицировать штаммы *B. abortus* 3, 5, 6-го и 9-го биоваров O. Gal-Mor с соавтарами.

Материалы и методы. Образцом для исследований являлись полевые изоляты *B. abortus* и *B. melitensis*, выделенные от яков из разных регионов Кыргызской Республики. Материалы для исследований отбирались в течение 3-х лет. Было отобрано 2478 проб сыворотки крови и исследованы методом РБТ и ИФА с применением диагностических наборов (APHA Scientific). Из общего числа только 90 образцов крови от положительно реагирующих животных и 18 образцов от абортированных плодов желудка плода с содержимыми были повторно исследованы серологическими тестами (РБТ, ИФА).

Выделение ДНК из культуры и клинических образцов. ДНК был извлечен и очищен из образцов крови и тканей в соответствии с протоколом, описан-

ным в (Qiagen «DNeasy Blood & Tissue Kit», Германия). Концентрацию и чистоту образцов ДНК определяли спектрофотометрически (Eppendorf, Германия) путем считывания A_{260} и A_{280} .

Амплификация ДНК двумя разными мишенями. Праймеры BCSP31 (таблица 1), описанные ранее (Baili et al., 1992), использовали для обнаружения рода бруцелл, который кодирует белок *Brucella abortus* 31 кДа, BCSP31. Реакция BCSP31-ПЦР поставлена в объеме 20 мкл 2х мастер-микс для ПЦР (Ферментас, США), 1 μ г матричный ДНК, 100 нМ каждого из праймеров, вода очищенная для молекулярной биологии, без нуклеаз (Thermo FS) до 25 μ L. ПЦР была проведена на амплификаторе (iCycler, био-рад, США), с использованием следующих параметров: первичная денатурация при 95 °C в течение 5 мин, второй этап по 35 циклов денатурации при 94 °C в течение 1 мин, 30 секунд, отжиг при 64 °C и 60°C с элонгацией при 72 °C, окончательный цикл продления в течение 7 мин при 72 °C.

Другие праймеры, описанные ранее (Брикер, 2002), специфичные к *Brucella* spp, в том числе выведенные из последовательностей вставки 711 (IS711), являются уникальными для определения вида бруцелл. Но обратные праймеры бывают разные, и были выведены из *B. abortus* и *B. melitensis* конкретных локусов на хромосомных ДНК (таблице 1). Эксперимент IS711-ПЦР был проведен в общем объеме 20 мкл, как BCSP31-ПЦР использовали содержащих ту же смесь.

Таблица 1

Олигонуклеотиды для обнаружения бруцелл

№	Наименование гена (праймера)	Последовательность олигонуклеотидов	Молекулярный вес
1.	IS711, <i>B. melitensis</i>	F: 5' -TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT-3' R: 5' -AAA TCGCGTCCTTGCTGGTCTGA-3'	731 bp
2.	IS711, <i>B. abortus</i>	F: 5' -TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT-3' R: 5' -GAC GAACGGAATTTTCCAATCCC-3'	498 bp
3.	BCSP31	F: 5' -TGGCTCGGTGCCCAATATCAA-3' R: 5' -CGCGCTTGCCCTTTCAGGTCTG-3	223 bp

Программа амплификации для *B. abortus* и *B. melitensis* состояла из начальной денатурации ДНК при 95 °C в течение 3 мин. Затем повторялась 35 раз при 95 °C в течение 90 с, при 65 °C в течение 1 мин и 72 °C в течение 1 мин. Заключительный этап расширения был продолжительностью 5 минут при 72 °C. Продукты реакции (5 μ L) были обнаружены методом электрофореза на 1,5% агарозном геле и визуализированы с помощью УФ-транслюминатора после окрашивания 2 μ g/mL бромидом этидия.

ДНК выделены из *B. melitensis* 16 М, *B. abortus* и использованы в качестве положительного контроля.

Отрицательным контрольным штаммом для определения специфичности и обнаружения загрязнения на стадии экстракции ДНК и/или праймера был штамм *Escherichia coli* ATCC 8739. В качестве отрицательного контроля использована дистиллированная вода. Все пробы были исследованы дважды.

Тестирование образцов с помощью BCSP31-ПЦР. Обнаружение рода бруцелл с помощью праймеров BCSP31 показано на рисунке 1. Как и ожидалось, размер ампликона гена *bcsp31* составил 223 пар нуклеотидов. Из 90 выделенных ДНК серопозитивных образцов крови 82 (91,1%) образца были положитель-

ными по праймерам BCSP31. И было только 8 образцов (8,8%) из числа серопозитивных ложноотрицательные. Из 18 выделенных ДНК от абортинированных плодов 17 (94,4%) образцов были положительными

по праймерам BCSP31. И только 1 (5,5%) ложноотрицательный. В общей сложности 99 (91,6) из 108 образцов оказались положительными (табл. 2).

Таблица 2

Результаты ПЦР-амплификации целевого гена BCSP31 с использованием праймеров BCSP31.

№	Тип биоматериала	Кол-во выделенных ДНК	ПЦР-положительный	ПЦР отрицательный
1.	Кровь (с EDTA)	90	82 (91,1%)	8 (8,8%)
2.	Абортинированные плоды (желудок плода с содержимым)	18	17 (94,4%)	1 (5,5%)
3.	Итого	108	99 (91,6%)	9 (8,3%)

Тестирование образцов сыворотки крови с помощью IS711-ПЦР. В образцах с *B. abortus* и *B. melitensis* с применением специфических праймеров (IS 711) выявлены ампликоны 498 и 731 пар нуклеотидов для *B. abortus* и *B. melitensis*, соответственно

(рисунки 2 и 3). Ампликоны молекулярным размером 498 п. н. содержались в 96 (88,8%) образцах ДНК из 108 исследованных. Ампликон 731 п. н. содержался только в 3 (2,7%) образцах из 108 серопозитивных образцов (таблица 3).

Таблица 3

Результаты ПЦР-амплификации *B. abortus* и *B. melitensis*.

№	Тип биоматериала	Кол-во выделенных ДНК	ПЦР-положительный <i>B. melitensis</i>	ПЦР-положительный <i>B. abortus</i>	ПЦР отрицательный
1.	Кровь (с EDTA)	90	2 (2,2 %)	80 (88,8 %)	8 (8,8 %)
2.	Абортинированных плодов (желудок плода с содержимым).	18	1 (5,5 %)	16 (88,8%)	1 (5,5)
3.	Итого	108	3 (2,7)	96 (88,8)	9 (8,3)

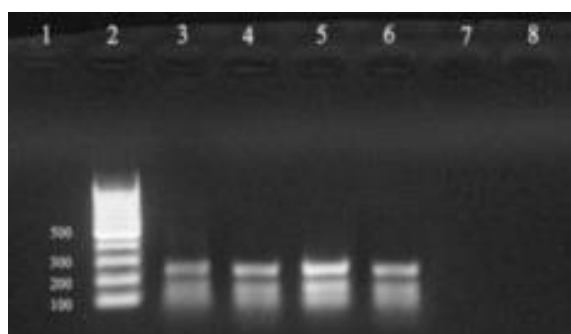


Рис. 1. Идентификация амплифицированных фрагментов ДНК методом электрофореза в 1,5% агарозном геле и окрашивания бромистым этидием. Ампликон размером 223 п. н. был получен методом ПЦР с использованием праймеров BCSP31 и стандартный ДНК выделенных из эталонных штаммов *Brucella* spp и пат материалов от яков. Полосы: 2, ДНК-маркеры (Thermo FS); 3, выделенный образец со стандартного штамма (PЦКиООИ) положительный контроль, 4, 5 положительные образцы (223 п.н.); 6, 7, отрицательные образцы; 8, отрицательный контроль.

Обсуждение. Диагностика бруцеллеза остается сложной и технически трудоемкой процедурой. Культивирование бруцелл и сероконверсия требуют много времени (Аль Даук и Ноклер, 2011). Поэтому молекулярные методы, как ПЦР, являются полноценной альтернативой в диагностике инфекционных заболеваний, вызванных сложными, медленно растущими

микроорганизмами. В данной работе нами на базе образцов крови яков раскрыты преимущества ПЦР-анализ в изучение межвидовой миграции бруцелл. Так, на основе гена IS711 с праймером *B. melitensis* (731 п.н.) в образцах крови яков была обнаружена межвидовая миграция возбудителя *B. melitensis*.

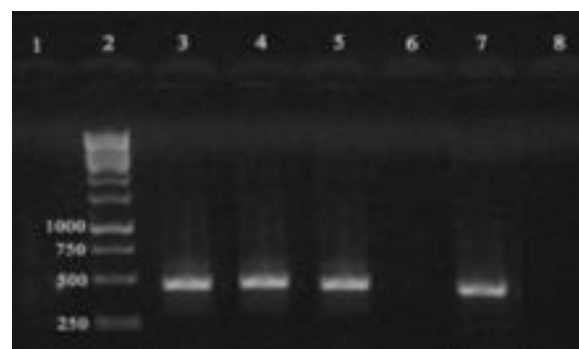


Рисунок 2. Идентификация амплифицированных фрагментов ДНК методом электрофореза в 1,5% агарозном геле и окрашивания бромистым этидием. Ампликон 498 п. н. был получен методом ПЦР с использованием специфических для *B. abortus* праймеров и ДНК бруцеллы в качестве контроля. Полосы: 2 ДНК-маркеры; 3, 4, 5 Днк образцов крови яков; 6 Положительный контроль штамма *B. melitensis* 16 М; 7 Положительный контроль на *B. abortus*; 8 Отрицательный контроль

Кроме того, была изучена эффективность двух мишеней генов *bcsp31* и *IS 711* в ПЦР в определение типа возбудителей бруцеллеза. По литературным данным у всех видов *Brucella* spp число и расположение большинства инсерционных элементов достаточно консервативно. Нашими исследованиями также подтверждено, что одна из копий *IS711* локализуется на различных участках хромосомы, в зависимости от вида и биовара патогена. Bricker B.J. с соавт. Предложили использовать это свойство для дифференциации *B. abortus* (1,2, 4 биовары), *B. melitensis* (все биовары), *B. suis* (1 биовар), *B. ovis*. В результате многочисленных экспериментов была разработана система ПЦР, так называемая AMOS, основанная на анализе хромосомной инсерционной последовательности *IS711*.

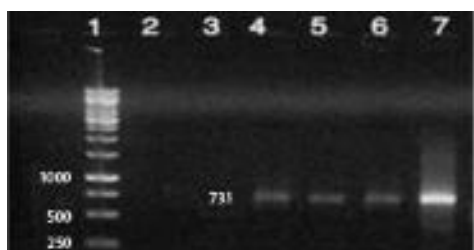


Рисунок 3. Идентификация амплифицированных фрагментов ДНК методом электрофореза в агарозном геле и окрашивания бромистым этидием. Размер ампликона 731 п. н. был получен методом ПЦР с использованием специфичных для *B. melitensis* праймеров и бруцеллы ДНК как шаблон. Полосы: 1, маркеры; 2, Отрицательный контроль; 3, Положительный контроль штамма *B. abortus*; 4,5,6 ДНК образцов яка; 7 Положительный контроль штамма *B. melitensis* 16М.

Научными исследованиями установлено, что видоспецифичный ПЦР-анализ с праймерами 711 обнаруживает большее количество *Brucella* spp в образцах. Так, было обнаружено большое количество *B. abortus* ДНК с использованием тех же праймеров. Следовательно стандарт *bcsp31*-ПЦР для определения рода бруцелл в образцах, эффективней чем *bcsp31*. А для определения миграции бруцелл и определения их типов более эффективен ПЦР-711.

В собственных исследованиях для ПЦР-анализа нами были использованы образцы сыворотки и цельной крови. Ранее сообщалось, что в сыворотке крови содержится меньше ингибиторов, чем в цельной крови, и что извлечение ДНК из сыворотки более эффективно по сравнению с цельной кровью (Zerva et al., 2001). Несмотря на полученные удовлетворительные результаты, некоторые серопозитивные образцы показали отрицательный результат в ПЦР. Эти ложноотрицательные результаты могут быть вызваны из-за деградации ДНК в образцах сыворотки крови (Romero et al., 1995). Таким образом, ПЦР как метод диагностики обладает рядом преимуществ по сравнению с

традиционными методами. Он прост в выполнении, экспрессивен и безопасен для сотрудников лабораторий, поскольку постановка ПЦР-анализа снижает риск контактов лаборантов с микроорганизмом. Таким образом, использование ПЦР - анализов на основе *BCSP*, *IS711* является перспективным методом выявления рода бруцелл и межвидовой миграции, а также идентификации *Brucella* spp в клинических образцах.

Литература:

1. Sturgill D.M. Comparative Genome Analysis of Three *Brucella* spp. and a Data Model for Automated Multiple Genome Comparison / D.M. Sturgill. – Blacksburg, Virginia, 2003. – 52 p.
2. Базиков И.А. Получение и характеристика Л-форм бруцелл и их ревертантов: автореф. дис... канд. мед. наук / И.А. Базиков. – Саратов, 1990. – 16 с.
3. Драновская Е.А. Таксономия возбудителя бруцеллеза / Е.А. Драновская // Актуальные вопросы профилактики бруцеллеза и организации мед. помощи больным: тез. докл. Всесоюз. конф., Новосибирск, 24-25 октября 1989 г. – Москва, 1989. – С. 54.
4. Касьян Ж.А. Разработка тест-системы для дифференциации видов бруцелл методом ПЦР с учётом результатов в режиме реального времени // Ж.А. Касьян, Н.А. Осина, С.А. Щербакова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – №3. – С.47- 51.
5. Клинические рекомендации «Бруцеллёз у взрослых», URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_325158/.
6. Кузнецова И.В. Изучение генетического разнообразия штаммов бруцелл, выделенных в Северо-Кавказском федеральном округе / И.В. Кузнецова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 3. – С. 58-62.
7. Кулаков Ю.К. Молекулярные аспекты персистенции бруцелл / Ю.К. Кулаков // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 2016. - № 1. - С. 3-8.
8. Хаммадов Н.И. Маркерные локусы генома бруцелл для дифференциальной ПЦР индикации патогенных штаммов / Н.И. Хаммадов [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – № 3. – С. 88-93.
9. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis / S. Al Dahouk [et al.] // J. Microbiol Methods. – 2007. – Vol.69. – P.137-145.
10. Intraspecies biodiversity of the genetically homologous species *Brucella microti* / Al S. Dahouk, E. Hofer, H. Tomaso, G. Vergnaud, Le P. Flèche, A. Cloeckert [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – Vol. 78. – P. 1534–1543.
11. Aftab H. Imported brucellosis in Denmark: molecular identification and multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) genotyping of the bacteria / H. Aftab [et al.] // Scand J. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 43. – P. 536-538.
12. Allardet-Servent A. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella* / A. Allardet-Servent [et al.] // J. of bacteriology. – 1988. – Vol. 170 (10). – P. 4603-7.
13. Gal-Mor O. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. / O. Gal-Mor, B.B. Finlay // Cell. Microbiol. – 2006. – Vol. 8. – P. 1707-1719.
14. Garcia-Yoldi D. Restriction site polymorphisms in the genes encoding new members of group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. / D. García-Yoldi, C.M. Marín, I. López-Goñi // FEMS Microbiology Letters. – 2005. – Vol. 245 (1). – P. 79-84.
15. *Brucella* spp. noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system / P.G. Cardoso [et al.] // Microb. Cell. Fact. – 2006. – Vol. 23. – P. 5-13.