

На правах рукописи

КАСЬЯН Жанетта Андреевна

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ
ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИДОВ И БИОВАРОВ БРУЦЕЛЛ НА
ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ**

03.02.03 – микробиология

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Саратов – 2017

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора)

Научный руководитель: кандидат биологических наук, заведующая лабораторией молекулярной диагностики
Осина Наталия Александровна

Официальные оппоненты: **Саяпина Лидия Васильевна** – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, главный эксперт Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Жарникова Ирина Викторовна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных инфекций Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Ведущая организация: Филиал (г. Киров) Центрального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации

Защита состоится «21» сентября 2017 г. в 10.00 на заседании диссертационного совета Д 208.078.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека» (РосНИПЧИ «Микроб») по адресу: 410005 г. Саратов, ул. Университетская, 46. Тел. (8452) 26-21-31, факс (8452) 51-52-12.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте <http://www.microbe.ru/disser/dissert/> ФКУЗ «Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб»

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук, старший научный сотрудник

А.А. Слудский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования и степень разработанности проблемы. Бруцеллез является особо опасной зооантропонозной инфекционной болезнью, распространенной практически во всем мире, которая наносит вред здоровью людей и значительный экономический ущерб животноводству. Возбудитель бруцеллеза относится к роду *Brucella*, который в свою очередь подразделяется на 12 видов: *B. abortus*, *B. canis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. melitensis*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata*, *B. papionis*, *B. vulpis*. На территории Российской Федерации зарегистрирована циркуляция 6 видов бруцелл: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* и *B. canis*. Наиболее вирулентными для человека являются *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*. Поэтому при проведении лабораторной диагностики бруцеллеза важное значение имеет не только выделение культуры патогена, но и её идентификация с определением видовой принадлежности.

В соответствии с действующими МУ 3.1.7.1189-03 «Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей» для дифференциации видов бруцелл необходимо определение следующих параметров: отношение к избыточному содержанию углекислоты в атмосфере воздуха; продукция сероводорода; способность редуцировать основные красители (фуксин и тионин); агглютинация моноспецифическими сыворотками *anti-abortus* и *anti-melitensis*; лизис бруцеллезным диагностическим бактериофагом Тб. Выполнение таких исследований трудоемко, продолжительно и не позволяет дифференцировать все основные виды бруцелл. Одним из перспективных подходов для определения видовой принадлежности возбудителя бруцеллеза является полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ее модификации.

На сегодняшний день наиболее широкое применение получили системы дифференциации видов бруцелл методом ПЦР с электрофоретической детекцией: AMOS, Bruce-Ladder и Suis-Ladder [Bricker *et al.*, 1994; Lopez-Goni *et al.*, 2008, 2011; Ica *et al.*, 2012]. Система AMOS, названная по аббревиатуре от *abortus*, *melitensis*, *ovis* и *suis*, предложена В.Ж. Bricker с соавторами [1994] и, на основании определения расположения инсерционной последовательности *IS711* в геноме патогена, позволяет идентифицировать *B. abortus* (1, 2, 4 биовары), *B. melitensis*, *B. suis* (1 биовар), *B. ovis*. В соответствии с рекомендациями Всемирной организации по охране здоровья животных в качестве референтного метода для идентификации бруцелл предложена система Bruce-Ladder, обеспечивающая определение видов *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. ceti/B. pinnipedialis* и

вакцинных штаммов *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51, *B. melitensis* Rev1. В качестве ДНК-мишеней авторами использованы участки генов *wboA*, *bp26*, *omp31*, *eryC*, участок нуклеотидной последовательности рибосомального белка *rpsL* гена и транскрипционного регулятора *CRP*, гена *ABC Transporter*. Для идентификации всех биоваров *B. suis*, а также видов *B. canis* и *B. microti* разработана система Suis-Ladder, основанная на амплификации локусов *BMEI1426*, *BMEI1688*, *BR1080*, *BMEI0205*, последний из которых содержит VNTR, отличающиеся у разных биоваров *B. suis*. Однако эти методики имеют определенные ограничения: невозможность точного определения *B. suis* и *B. canis* с использованием Bruce-Ladder, узкая направленность систем Suis-Ladder (только виды *B. suis*, *B. canis*, *B. microti*) и AMOS (*B. abortus* 1, 2 и 4 биоваров, *B. melitensis*, *B. suis* 1 биовар).

Имеется ряд зарубежных публикаций, посвященных определению видовой принадлежности бруцелл с помощью ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ), но разрешающая способность этих подходов наиболее часто ограничена видами *B. abortus*, *B. melitensis* и *B. suis* [Redkar *et al.*, 2001]. В нашей стране, на момент начала исследования, не было данных о применении ПЦР для идентификации видов возбудителя бруцеллеза, а зарегистрированные в Российской Федерации наборы реагентов «АмплиСенс *Brucella* spp. – FL» (ООО «ИнтерЛабСервис») и «ГенБру» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб») направлены только на родоспецифичную детекцию патогена. Поэтому остается актуальным разработка простых и быстрых способов дифференциации видов и биоваров бруцелл с помощью ПЦР и создание генодиагностических препаратов для молекулярной идентификации патогена.

Цель работы: изучение варибельности фрагментов генома бруцелл, создание препарата для идентификации бруцелл методом ПЦР-РВ и разработка методических подходов для определения видовой принадлежности возбудителя бруцеллеза с помощью молекулярно-генетических технологий.

Основные задачи исследования:

1. Изучить варибельность отдельных фрагментов генома у штаммов бруцелл различного таксономического положения с целью выбора перспективных ДНК-мишеней для видовой и биоварной идентификации возбудителя бруцеллеза методом ПЦР.
2. Разработать набор реагентов для определения видов бруцелл методом ПЦР-РВ и изучить его диагностическую ценность.
3. Предложить подходы по повышению информативности молекулярной идентификации возбудителя бруцеллеза с помощью молекулярно-генетических технологий.

4. Определить эффективность разработанных методических приемов и диагностического препарата в комплексе с референтными системами AMOS, Bruce-Ladder, Suis-Ladder и рестрикционным анализом *omp* генов для определения видовой принадлежности природных штаммов бруцелл из фонда «Государственной коллекции патогенных бактерий» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

5. Провести апробацию комплекса амплификационных и рестрикционных методов при исследовании проб биологического материала на наличие возбудителя бруцеллеза.

Научная новизна работы:

Получены новые данные по встречаемости отдельных генов у штаммов бруцелл разных видов с учетом их принадлежности к биоварам. На основании проведенного анализа *in silico* и *in vitro* определены перспективные ДНК-мишени для разработки способов молекулярной идентификации возбудителя бруцеллеза: *BR0262*, *BRA0420*, *BMEI1426*, *BMEI0994*, *BMEI0711*, *BRA0541*.

С использованием генетических маркеров *BR0262*, *BMEI0711*, *BRA0541* разработан набор реагентов для дифференциации видов и групп видов *B. abortus/B. ovis*; *B. melitensis*; *B. suis/B. canis*; *B. neotomae* методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ».

Показана высокая диагностическая чувствительность – не менее 1×10^4 м.к./мл и специфичность – 99 % препарата при исследовании культур микроорганизмов, проб биологического материала и объектов окружающей среды.

Оптимизирован способ определения видовой принадлежности бруцелл методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени, позволяющий дифференцировать основные 6 видов возбудителя бруцеллеза: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. suis*, *B. neotomae*. Способ основан на одновременной амплификации родоспецифичного гена *bcs31* и фрагментов *BRA0420*, *BMEI1426*, *BMEI0994*, *BMEI0711*, *BRA0541*, делетированных у определенных видов бруцелл. На данный способ получено положительное решение на выдачу патента (заявка № 2016137438 приоритет 19.09.2016).

Применение комплекса методических приемов, основанных на выявлении и изучении вариабельности различных участков генома бруцелл (разработанные нами способ и препарат, системы Bruce-Ladder, Suis-Ladder, AMOS-DEL, рестрикция *omp25*, *omp2a* и *omp2b* фрагментов генов ферментами *AluI*, *EcoRV*, *EcoRI* и *HindIII*), позволило с высокой точностью подтвердить и, в ряде случаев, уточнить таксономическое положение природных

штаммов возбудителя бруцеллеза из фонда «Государственной коллекции патогенных бактерий» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

С использованием комплекса молекулярно-генетических подходов у ряда штаммов *B. abortus* и *B. suis* установлены амплификационные и рестрикционные профили, которые ранее не были выявлены у представителей этих видов. Полученные данные позволяют предположить возможность наличия двух субтипов *B. suis* 5 биовара и принадлежность культур, выделенных от мышевидных грызунов в Австралии в 1980 годы, к отдельному виду бруцелл.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработанный генодиагностический препарат обеспечивает определение видов или групп видов возбудителя бруцеллеза: *B. abortus/B. ovis*; *B. melitensis*; *B. suis/B. canis*; *B. neotomae* на основе амплификации видоспецифичных для бруцелл генов *BME0711*, *BR0262*, *BRA0541* с чувствительностью – 1×10^4 м.к./мл и специфичностью – 99 %, при исследовании культур патогена, проб биологического материала и объектов окружающей среды.

2. Использование в качестве ДНК-мишеней родоспецифичного гена *bcspr31* и видоспецифичных фрагментов генома *BRA0420*, *BRA0541*, *BME11426*, *BME110711*, *BME10994*, которые делетированы у определенных видов бруцелл, позволяет быстро и с высокой чувствительностью – 5×10^3 м.к./мл идентифицировать шесть основных видов бруцелл: *B. abortus*, *B. ovis*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae* методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени.

3. Выявление и анализ вариабельности разных участков генома бруцелл с помощью комплекса амплификационных методов и рестрикции генов *omp25*, *omp2a* и *omp2b* ферментами *AluI*, *EcoRV*, *EcoRI* и *HindIII* обеспечивает повышение информативности молекулярной идентификации возбудителя бруцеллеза.

Теоретическая и практическая значимость.

Расширены существующие представления о вариабельности геномов бруцелл различного таксономического положения. Получены новые данные по встречаемости отдельных генов и фрагментов генов у штаммов бруцелл разных видов и биоваров. Результаты исследования положены в основу разработки новых подходов для молекулярной идентификации возбудителя бруцеллеза.

Разработанный набор реагентов зарегистрирован в установленном порядке:

– Регистрационное удостоверение № РЗН 2014/1948 15.09.2014 г. Набор реагентов для идентификации штаммов *Brucella* spp. методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ».

Подготовлены и утверждены Технические условия ТУ 9398-045-01898109-2013 и Инструкция по применению (приказ Росздравнадзора от 15 сентября 2014 года № 6451) на «Набор реагентов для идентификации штаммов *Brucella* spp. методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ».

С использованием разработанных методических подходов уточнено таксономическое положение 44 природных штаммов бруцелл из фонда «Государственной коллекции патогенных бактерий» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. Внесены изменения в паспорта данных культур. Определена видовая и биоварная принадлежность выделенных проб из биологического материала от сельскохозяйственных животных.

Результаты работы вошли в практическое руководство «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней» (г. Москва, 2013). Материалы диссертации используются на курсах повышения квалификации специалистов «ПЦР в диагностике инфекционных болезней и индикации патогенных микроорганизмов», проводимых на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Связь работы с научными программами и личный вклад автора в исследование. Работа выполнена в отделе диагностики инфекционных болезней ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. Результаты получены в рамках плановой НИР «Новые диагностические технологии в мониторинге особо опасных инфекционных болезней, индикации возбудителей и расширенном изучении свойств штаммов» (шифр темы 53-2-14), НИОКР по Государственным контрактам в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009-2014 гг.)» в 2009-2014 гг.: № 34-Д/1 (2012 г.) «Специфическая индикация и идентификация возбудителей особо опасных инфекций, основанная на применении полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией»; № 33-Д/1 (2013 г.) «Разработка новых и совершенствование действующих генодиагностических тест-систем для детекции, дифференциации и характеристики возбудителей особо опасных инфекций»; № 16-Д/3 (2014 г.) «Использование современных технологий для идентификации возбудителей особо опасных инфекций». Личный вклад автора состоит в

непосредственном получении и обработке экспериментальных данных, анализе литературы, изучении вариабельности участков генома разных видов и биоваров бруцелл, определении ДНК-мишеней для разработки способов идентификации видов бруцелл и конструирования набора реагентов с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени, а также разработке комплекса молекулярно-генетических методов для определения различных видов и биоваров бруцелл. Весь комплекс способов и сконструированный набор реагентов проверен автором лично на штаммах бруцелл, находящихся в фонде «Государственной коллекции патогенных бактерий» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, а также на пробах биологического материала от сельскохозяйственных животных. Проведение полногеномного секвенирования и филогенетического анализа штаммов возбудителя бруцеллеза проводилось совместно с сотрудниками лаборатории геномного и протеомного анализа ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Степень достоверности и апробация работы. Степень достоверности полученных результатов основана на использовании большого фактического материала, полученного на зарегистрированном в установленном порядке, прошедшем метрологическую поверку оборудовании с использованием современных научных методов. Все данные получены в повторяющихся экспериментах.

Материалы диссертации представлены на VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014» (г. Москва, 2014); на VII ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (г. Москва, 2015); XII Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ «Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах–участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005 г.) до 2016 года» (г. Саратов, 2016); II Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (г. Ставрополь, 2017); IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2017» (г. Москва, 2017); на научно-практических конференциях «Итоги и перспективы фундаментальных и прикладных исследований в институте «Микроб» (г. Саратов, 2014, 2015, 2017 гг.); Материалы диссертации вошли в научные отчеты по законченным техническим и медицинским испытаниям наборов реагентов.

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 8 работ, из них 3 – в периодических изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов», рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 137 страницах и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием используемых материалов и методов исследования, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 28 таблицами, 6 рисунками. Библиографический указатель включает 200 источников литературы, в том числе 37 отечественных и 163 зарубежных.

Обзор литературы. В этом разделе представлены данные отечественных и зарубежных исследований по использованию молекулярно-генетических технологий для определения видовой принадлежности бруцелл, об организации генома и перспективных генах для проведения видовой идентификации патогена.

Методология и методы исследования. Методологию работы определяли соответственно поставленной цели и задачам исследования. Применительно к проблематике диссертации использовали: микробиологические, биохимические, молекулярно-генетические, биоинформационные методы исследования. В качестве материала для исследования использовали: бактериальные взвеси культур микроорганизмов, пробы биологического материала от животных с подозрением на бруцеллез (кровь, печень, селезенка, сердце, легкие, лимфатические узлы, матки с плодами, околоплодная жидкость), а также искусственно контаминированные возбудителем бруцеллеза и гетерологичными микроорганизмами пробы биологического материала от человека (кровь, сыворотка крови, моча, желчь), пищевые продукты (молоко, сыр) и объекты окружающей среды (вода).

Для исследования было использовано 68 штаммов бруцелл разных видов и биоваров, а также 42 штамма гетерологичных микроорганизмов из фонда «Государственной коллекции патогенных бактерий» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Для выращивания микроорганизмов применяли общепринятые среды и методы. Исследование культур бруцелл и проб биологического материала осуществляли в соответствии с действующими нормативно-методическими документами по организации и проведению лабораторной диагностики данного инфекционного заболевания. Исследование возбудителя бруцеллеза с помощью микробиологических, биохимических, серологических

методов проводили с использованием коммерческих препаратов в соответствии с инструкциями изготовителей.

Для анализа нуклеотидных последовательностей различных видов и биоваров *Brucella* spp. использовали базы данных NCBI GenBank, KEGG, программы Mega 3.1., AlignX. Подбор ряда праймеров осуществляли на основании анализа *in silico* в программе BLAST и Primer Express. Подбор зондов проводили на сайте www.genscript.com.

Для выделения ДНК применяли наборы реагентов «ДНК-сорб В», «Рибо-сорб» (ООО «ИнтерЛабСервис»), «PureLink™ Mini» («Invitrogen»).

Проведение ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени осуществляли на приборах Rotor-Gene Q («Qiagen»), Rotor-Gene 6000 («Corbett Research»), постановку ПЦР с учетом результатов методом электрофореза – на амплификаторе Mastercycler Nexus («Eppendorf»). Электрофорез проводили в 2 % и 3 % агарозном геле («NuSieve™»). Результаты учитывали и документировали с помощью системы GelDoc 2000 («BioRad»).

Проведение ПЦР с системами AMOS-DEL, Bruce-Ladder, Suis-Ladder, амплификацию генов *omp25*, *omp2a*, *omp2b* осуществляли в соответствии с рекомендациями авторов с небольшими модификациями. Рестрикцию проводили с использованием ферментов: FastDigest *AluI*, *EcoRI*, *Eco32I* (*EcoRV*) («Fermentas») согласно инструкциям по применению.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработка набора реагентов для определения видовой принадлежности бруцелл методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени

На первом этапе исследования для выбора перспективных ДНК-мишеней были проанализированы работы зарубежных авторов, посвященные сравнению полных геномов возбудителя бруцеллеза [Rajashekara *et al.*, 2004; Halling *et al.*, 2005] и разработке способов идентификации бруцелл с помощью ПЦР [Lopez-Goni *et al.*, 2008; Ninic *et al.*, 2008]. Для последующего анализа были выбраны 60 локусов, встречающихся у отдельных видов и биоваров бруцелл. При дальнейшем изучении этих генов с помощью анализа *in silico* в базе данных GenBank NCBI специфичность ряда из них для определенных видов бруцелл не была подтверждена. В итоге, в качестве перспективных ДНК-мишеней нами было отобрано по одному или двум генам, специфичным для каждого из видов бруцелл: *BRA0420*, *BMEI0929*, *BRA0907*, *BRA0541-0542*, *BRA0367*, *BR0262*, *BMEI0994*, *BMEI0812*, *BMEI0711*, на основании которых сконструированы праймеры/зонды и определена их специфичность *in vitro* на выборке штаммов *Brucella* spp. различного таксономического положения.

При изучении встречаемости генов *BRA0907*, *BRA0541-0542*, *BMEI0711* в геноме разных видов бруцелл литературные данные и результаты предварительного анализа *in silico* были подтверждены в полной мере. При изучении гена *BR0262* отмечено его наличие не только у *B. suis*, но также у *B. canis* и *B. neotomae*.

Результаты, полученные при исследовании локусов *BRA0367*, *BRA0420*, *BMEI0994*, *BMEI0929*, *BMEI0812*, не полностью согласовывались с предварительным анализом *in silico*. Ген *BRA0367* амплифицировался только у штаммов *B. suis* 1 и 5 биоваров. При анализе локуса *BMEI0929* выявлено его отсутствие только у *B. abortus* 1 биовара, локус *BRA0420*, помимо *B. abortus*, не регистрировался также и у штаммов *B. ovis*, а при проведении амплификации локусов *BMEI0994*, *BMEI0812*, которые наоборот должны отсутствовать у штаммов данного вида, были получены положительные результаты. Таким образом, гены *BRA0420*, *BMEI0929*, *BMEI0994*, *BMEI0812* на момент исследований не могли быть использованы в качестве маркеров для дифференциации видов *B. abortus* и *B. ovis*.

Основываясь на результатах проведенного анализа, для конструирования набора реагентов были выбраны специфичные участки локусов *BR0262*, *BRA0541*, *BMEI0711*, выявление которых методом ПЦР позволяет дифференцировать виды *B. melitensis*, *B. neotomae* и группы видов *B. abortus/B. ovis*, *B. suis/B. canis*. Разработаны праймеры и зонды для амплификации выбранных участков, подобраны компоненты реакционных смесей. С целью упрощения и стандартизации подготовки реакционных смесей предложено объединить реагенты в три ПЦР-смеси, две из которых содержат праймеры и зонды, а последняя – буферный раствор с ионами Mg^{2+} . Для возможности проведения реакции в один этап в состав зондов были введены разные флуоресцентные метки (таблица 1).

Таблица 1 – Схема определения видовой принадлежности бруцелл с помощью разработанной мультилокусной ПЦР

Вид бруцелл	Реакционная смесь-1		Реакционная смесь-2
	JOE (<i>BMEI0711</i>)	ROX (<i>BR0262</i>)	JOE (<i>BRA0541</i>)
<i>B. abortus/B. ovis</i>	+	-	+
<i>B. melitensis</i>	+	-	-
<i>B. suis/B. canis</i>	+	+	+
<i>B. neotomae</i>	-	+	+

Необходимая концентрация реагентов, условия реакции и программа амплификации подбирались экспериментальным путем. В результате установлено, что оптимальное содержание праймеров составляет 8 пмоль, зондов – 4 пмоль, ионов Mg^{2+} – 2 ммоль, смеси

дНТФ, каждой в концентрации 1 ммоль, Таq-полимеразы – 1 ед., а программа амплификации включает: предварительную денатурацию при 95 °С – 5 мин; 10 циклов: 95 °С – 30 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 30 с; 35 циклов: 95 °С – 20 с, 57 °С – 20 с, 72 °С – 20 с. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется во втором блоке циклирования при температуре 72 °С по каналам JOE/Yellow и ROX/Orange, при этом значения пороговой линии (Treshold) для PC-1 составляют – 0,1 по каналу JOE и 0,5 по каналу ROX, для PC-2 – 0,5 по каналу JOE с устранением выбросов 10%.

В ходе экспериментов установлено, что чувствительность при амплификации каждого из использованных генов бруцелл составила не менее 5×10^3 м.к./мл, а специфичность – 100 %. При постановке ПЦР с гетерологичными микроорганизмами (*V. cholerae*, *Y. pestis*, *F. tularensis*, *Y. pseudotuberculosis*, *B. anthracis*, *S. aureus*) положительных результатов получено не было.

На основе разработанного подхода нами подготовлены экспериментальные серии «Набора реагентов для идентификации штаммов *Brucella* spp. методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген *Brucella* – идентификация – РГФ)», который включает три ПЦР-смеси: ПЦР-смесь-1 – праймеры и зонды, специфичные к локусам *BR0262* и *ВМЕИ0711*; ПЦР-смесь-2 – праймеры и зонд, специфичный к гену *BRA0541*; ПЦР-смесь-3 – буферный раствор, ионы Mg^{2+} , азид натрия; а также растворы фермента, положительного контрольного образца, ТЕ-буфера и деионизованной воды. Чувствительность разработанной тест-системы составила 1×10^4 м.к./мл.

Для определения диагностической ценности сконструированного набора реагентов на базе отдела диагностики инфекционных болезней ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора проведены межлабораторные испытания с использованием 18 типовых штаммов *Brucella* spp., 2 штаммов *B. ovis* с уточненной видовой принадлежностью, 15 гетерологичных штаммов, а также клинические испытания на базе ФКУЗ «СтавНИПЧИ» Роспотребнадзора с использованием 38 штаммов бруцелл и 12 штаммов гетерологичных микроорганизмов. В ходе испытаний была подтверждена высокая диагностическая чувствительность разработанного набора реагентов, которая составила не менее 98,5 % с доверительной вероятностью 90 %, а также диагностическая специфичность – не менее 99 % с доверительной вероятностью 90 %.

Совершенствование способов идентификации видов бруцелл методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов

Разработанный набор реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» обладает высокой чувствительностью – 1×10^4 м.к./мл и специфичностью – 99 %. Однако для ряда видов патогена с помощью данного препарата возможна только групповая идентификация: *B. abortus*/*B. ovis* и *B. suis*/*B. canis*. В связи с этим очевидна необходимость оптимизации предложенного подхода с целью повышения его информативности. Для решения данного вопроса требуется дальнейший поиск генов, специфичных для каждого вида бруцелл и оценка их перспективности для использования в качестве ДНК-матриц.

На начальном этапе работы, при выборе перспективных ДНК-мишеней для разработки набора реагентов, мы столкнулись с тем, что специфичность подобранных нами праймеров и зондов для видов бруцелл на основании анализа *in silico* и по литературным данным не совпадала с таковой по результатам исследований *in vitro*. Среди причин получения таких расхождений может быть недостаточная изученность выбранных локусов у отдельных видов и биоваров бруцелл, а также неточность в определении видовой принадлежности использованных в работе штаммов возбудителя бруцеллеза. Большинство культур было выделено в 1950-70 гг., и их таксономическое положение установлено с использованием бактериологических методов, которые не всегда позволяют провести правильную дифференциацию возбудителя.

В последние годы для этих целей разработаны и стандартизированы амплификационные системы AMOS, Bruce-Ladder, Suis-Ladder [Lopez-Goni *et al.*, 2008; 2011; Ica *et al.*, 2012], предложено использование рестрикционного анализа *omp* генов, последовательность которых имеет отличия у разных видов и биоваров бруцелл [Слоескаерт *et al.*, 1995]. Поэтому нами с помощью указанных приемов был проведен анализ взятых в исследование типовых штаммов основных 5 видов бруцелл: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae*, а также нескольких природных штаммов *B. ovis*. Установлено, что практически все референтные штаммы имели амплификационные и рестрикционные профили, характерные для своего вида. Однако, биоварная принадлежность двух штаммов *B. abortus* отличалась от указанной в паспорте. Так, при анализе штаммов *B. abortus* 292 (4 биовар), *B. abortus* 63/75 (7 биовар) с помощью системы AMOS-DEL был зарегистрирован фрагмент размером 1700 п.н., что является характерным для *B. abortus* 3b, 5, 6, 9 биоваров. Полученные профили рестрикции данного штамма ферментами *EcoRI* и *AluI* подтвердили результаты исследования с помощью AMOS-DEL. При анализе природных штаммов *B. ovis*

таксономическое положение было подтверждено у *B. ovis* 25-90 и *B. ovis* И-107. Штаммы *B. ovis* 2000, *B. ovis* 64/1, использованные на первом этапе работы, по результатам исследования были отнесены к виду *B. abortus*.

После уточнения видовой принадлежности использованной панели штаммов, исследование по поиску перспективных ДНК-мишеней для видовой идентификации бруцелл было продолжено. При повторном изучении локусов *BRA0420*, *BMEI0929*, *BMEI0994*, *BMEI0812* установлено, что ген *BRA0420* – делетирован только у *B. abortus*, а *BMEI0994* – только у *B. ovis*. Исходя из полученных результатов видно, что данные фрагменты могут быть использованы для специфичной идентификации указанных видов. Помимо этого, дополнительный анализ литературных данных показал, что участок *BMEI1426* отсутствует у всех штаммов *B. canis* [Lopez-Goni *et al.*, 2011]. Для обеспечения возможности дифференцировать культуры бруцелл, имеющие атипичные амплификационные профили переменных участков генома у разных видов патогена, представляется необходимым ввести в перечень выявляемых генетических локусов родоспецифичные гены, например, *bcs31*, кодирующий синтез белка внешней мембраны размером 31 кДа [Probert *et al.*, 2004]. Таким образом, с целью оптимизации разработанного нами ранее способа дифференциации видов или групп видов бруцелл предложено использовать в качестве ДНК-мишеней 6 генетических локусов: *bcs31*, *BRA0420*, *BRA0541*, *BMEI1426*, *BMEI0711*, *BMEI0994*.

Экспериментальным путем подобрано необходимое соотношение реагентов и условия реакции. Для проведения реакции в мультилокусном формате в состав зондов были введены флуоресцентными метки FAM, R6G, ROX и соответствующие им гасители флуоресценции RTQ1, BHQ2; праймеры и зонды на основе генов *bcs31*, *BRA0420*, *BRA0541* объединены в одну ПЦР-смесь, а на основе *BMEI1426*, *BMEI0711*, *BMEI0994* – в другую (таблица 2).

Таблица 2 – Схема определения видовой принадлежности бруцелл с использованием шести ДНК-мишеней

Вид	Реакционная смесь-1			Реакционная смесь-2		
	FAM (<i>bcs31</i>)	JOE (<i>BRA0541</i>)	ROX (<i>BRA0420</i>)	FAM (<i>BMEI1426</i>)	JOE (<i>BMEI0711</i>)	ROX (<i>BMEI0994</i>)
<i>B. abortus</i>	+	+	-	+	+	+
<i>B. melitensis</i>	+	-	+	+	+	+
<i>B. suis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>B. canis</i>	+	+	+	-	+	+
<i>B. ovis</i>	+	+	+	+	+	-
<i>B. neotomae</i>	+	+	+	+	-	+

Программа амплификации включала те же режимы термоциклирования, что и при использовании тест-системы «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ».

Предложенный способ апробирован на панели референтных штаммов бруцелл с ранее подтвержденной видовой принадлежностью, а также на гетерологичных микроорганизмах. Все исследованные образцы показали амплификационные профили, характерные для своих видов. Чувствительность реакции каждого из указанных генов составила не менее 5×10^3 м.к./мл, а специфичность – 100 %.

Таким образом, расширение спектра выявляемых видоспецифичных локусов генома бруцелл позволило повысить информативность разработанного способа определения видовой принадлежности *Brucella* spp. методом ПЦР-РВ и осуществить дифференциацию сразу шести основных видов бруцелл: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*. Показана его эффективность при исследовании типовых штаммов бруцелл.

Оценка эффективности разработанных подходов и других молекулярно-генетических методов для определения видовой принадлежности природных штаммов возбудителя бруцеллеза

При разработке диагностического препарата и способа определения видовой принадлежности бруцелл методом ПЦР-РВ, оценку диагностической ценности данных подходов в основном проводили на типовых штаммах. В то же время данных об их эффективности при изучении природных штаммов бруцелл крайне мало. Отсутствуют сведения о специфичности и других референтных систем (Bruce-Ladder, Suis-Ladder, AMOS, рестрикционного анализа) при исследовании коллекционных штаммов патогена, выделенных на территории Российской Федерации.

В связи с этим представляется необходимым провести оценку разработанных и существующих способов молекулярной идентификации бруцелл при анализе штаммов *Brucella* spp. из фонда «Государственной коллекции патогенных бактерий» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. Для оценки эффективности выбранных подходов в комплексе было изучено 44 природных штамма бруцелл, выделенных в 1932-2014 гг. из различных источников.

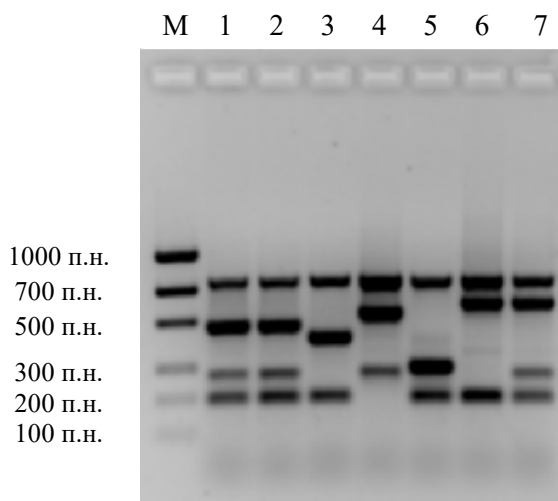
В ходе проведенного исследования у большинства штаммов подтверждено таксономическое положение, указанное в паспорте. При этом данные, полученные с использованием разных методов, полностью совпадали, что позволяет с высокой достоверностью считать результаты идентификации специфичными.

Однако у некоторых штаммов получены амплификационные и/или рестрикционные профили нетипичные для своих видов. Так, из 14 штаммов *B. melitensis* один (*B. melitensis* C-482) определен как *B. abortus*, один (*B. melitensis* 286) – как *B. suis* и один (*B. melitensis* M-114) – как *B. ovis*. Анализ шести штаммов *B. ovis* показал, что только один (440) действительно относился к данному виду. Три штамма (390-90, 10/2, 83-89), наряду с ранее исследованными *B. ovis* 64/1 и *B. ovis* 2000, были отнесены к виду *B. abortus*. Штамм *B. ovis* 830 идентифицирован как *B. melitensis*, *B. ovis* 712 – как *B. suis* 5 биовар. Из трех исследованных штаммов *B. canis* (666, 1066, H-966) один (H-966) отнесен к *B. suis* 4 биовара. При анализе десяти изолятов *B. abortus* шесть из них идентифицированы как *B. abortus* 3b, 5, 6 и 9 биоваров, а *B. abortus* 339 по результатам исследования отнесен к виду *B. melitensis*.

Помимо этого, в ряде случаев провести идентификацию штаммов бруцелл до вида или биовара было затруднительным, поскольку результаты по одному или сразу по нескольким методам были нетипичными. Так в ходе анализа *B. abortus* 290 с системой AMOS-DEL отмечено образование двух фрагментов размером 1700 и 498 п.н., характерных для разных биоваров *B. abortus*, что может быть следствием двух вариантов встраивания *IS711* элемента в геном патогена.

У двух штаммов *B. suis* C-450 и C-451, выделенных от лесных мышей, при использовании системы Suis-Ladder получены амплификационные профили, которые не соответствовали ни одному из характерных для типичных пяти биоваров *B. suis* [Lopez-Goni *et al.*, 2011]. Для определения биоваров *B. suis* Lopez-Goni с соавторами подобраны праймеры к участку Bruce 11, который содержит вариабельные тандемные повторы (VNTR). При амплификации данного локуса у разных биоваров *B. suis* регистрируется образование ампликонов различных размеров: 425 п.н. (6 повторов) у 1 биовара, 551 п.н. (8 повторов) у 2 биовара, 299 п.н. (4 повтора) у 3 биовара и 614 п.н. (9 повторов) у 4, 5 биоваров. У *B. suis* C-450 и C-451 получена амплификация фрагмента 488 п.н. (7 повторов) (рисунок 1). Для получения дополнительной информации о генетической организации данных штаммов нами проведен анализ вариабельности локусов Bruce 06 и Bruce 11 в соответствии с международными рекомендациями по MLVA-типированию бруцелл (<http://mlva.u-psud.fr/brucella>). При амплификации участка Bruce 06 отмечено образование фрагмента размером 140 п.н. (1 повтор), как и у штаммов *B. suis* 5 биовара. При исследовании локуса Bruce 11 у вышеуказанных изолятов наблюдалась амплификация фрагмента 567 п.н. (7 повторов), что полностью согласуется с результатами, полученными

нами при использовании системы Suis-Ladder. Наличие такой аллели фрагмента Bruce 11 ранее не было выявлено. Представляет интерес дальнейшее изучение штаммов данного вида с похожими источниками выделения для расширения информации о генетической организации представителей *B. suis* 5 биовара и возможности дополнения схемы интерпретации результатов системы Suis-Ladder.



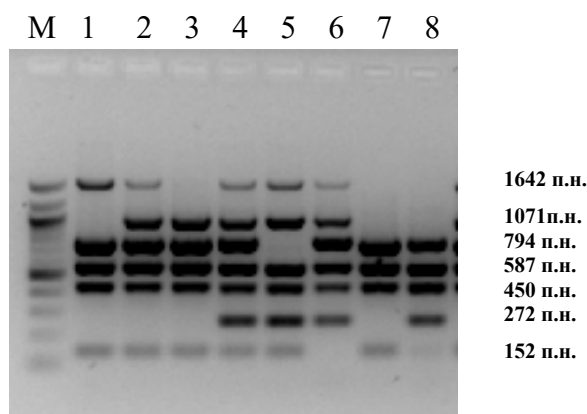
М – маркер молекулярных масс GeneRuler Express DNA Ladder (ThermoScientific);
 1 – *B. suis* C-450 (774/488/278/197 п.н.); 2 – *B. suis* C-451 (774/488/278/197 п.н.);
 3 – *B. suis* 1 биовар (777/425/197 п.н.); 4 – *B. suis* 2 биовар (774/551/278 п.н.);
 5 – *B. suis* 3 биовар (774/299/197 п.н.); 6 – *B. suis* 4 биовар (774/614/197 п.н.);
 7 – *B. suis* 5 биовар (774/614/278/197 п.н.).

Рисунок 1 – Результаты исследования штаммов *B. suis* с использованием системы Suis-Ladder

При исследовании штамма *B. abortus* 3143-П с помощью системы Bruce-Ladder выявлено отсутствие образования фрагмента локуса *BMEI0998* размером 1682 п.н., который должен присутствовать у штаммов *B. abortus* (рисунок 2), а при использовании разработанного нами способа – отсутствие амплификации локуса *BMEI0994*, наличие которого характерно для *B. abortus*. С помощью остальных подходов у данного штамма получены типичные для своего вида профили. Кроме того, проведенный филогенетический анализ на основании результатов полногеномного секвенирования показал его наибольшую близость к виду *B. abortus*. Полученные результаты указывают на то, что этот штамм, скорее всего, принадлежит к *B. abortus*, но содержит генетические перестройки в области *BMEI0994-BMEI0998*.

Особый интерес представляют результаты исследования штамма *B. abortus* C-549, который был выделен от мышевидных грызунов в Австралии в 1980 г. При его анализе с

помощью набора реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» получен новый амплификационный профиль (*BRA0541+*, *BR0262-*, *BMEI10711-*), который отличается от всех характерных для видов или групп видов бруцелл. Также не удалось идентифицировать этот штамм с помощью разработанного нами способа определения видовой принадлежности возбудителя бруцеллеза методом ПЦР-РВ: наблюдалась амплификация генов *bcspl31*, *BRA0541*, *BMEI1426*, при отсутствии амплификации локусов *BRA0420*, *BMEI0994*, *BMEI10711*. При исследовании данного штамма с помощью системы Bruce-Ladder для него было характерно образование фрагментов размером 794/587/450/272/152 п.н. и отсутствие фрагмента 1682 п.н., что также не укладывалось ни в одну картину, описанную авторами (рисунок 2). Более того, при проведении рестрикционного анализа отмечены уникальные профили рестрикции локусов *omp2a* и *omp2b* ферментом *AluI*.



М – маркер молекулярных масс 100 bp Ladder DNA marker (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1300, 1600 bp) (Axygen, США); 1 – *B. abortus* A-81; 2 – *B. melitensis* C-570; 3 – *B. ovis* 440; 4 – *B. suis* 6; 5 – *B. canis* 1066; 6 – *B. neotomae* 66/2; 7 – *B. abortus* 3143-П; 8 – *B. abortus* C-549.

Рисунок 2 – Результаты исследования штаммов *B. abortus* 3143-П, C-549 с использованием системы Bruce-Ladder

Для уточнения его видовой принадлежности нами проведен анализ встречаемости генетических локусов, ранее использованных при конструировании набора реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ»: *BRA0367* (-), *BRA0378* (-), *BRA0418-BRA0432* (-), *BRA0541* (+), *BRA0907* (+), *BR0262* (-), *BMEI0752* (+), *BMEI0929* (+), *BMEI0994-BMEI0998* (+), *BMEI1436* (+), *BMEI0428* (+), *BMEI0635* (-), *BMEI0711* (-), *BMEI0843* (-), *BMEI0987* (+). Установлено, что данный штамм не имеет сходства с каким-то конкретным

видом бруцелл и характеризуется отсутствием ряда генов, делетированных также у видов *B. abortus*, *B. ovis*, *B. canis* и *B. neotomae*.

При VNTR – анализе культуры *B. abortus* C-549 с применением праймеров, фланкирующих локус BRU1322 (Bruce 06), была выявлена одна копия тандемного повтора для данного участка (140 п.н.). Заслуживает внимания тот факт, что у этого штамма отсутствовала амплификация локуса BRU211 (Bruce 11), что согласуется с работой Ю.К. Кулакова с соавторами [2012], в которой при анализе других австралийских штаммов, выделенных от диких грызунов с неуточненной видовой принадлежностью по вышеуказанному локусу, также был получен отрицательный результат.

При сравнительном анализе штамма *B. abortus* C-549 по коровым SNP генома с нуклеотидными последовательностями 365 штаммов возбудителя бруцеллеза, находящимися в базе данных NCBI GenBank установлено, что максимально подобными с различием в 4 SNP и 22 SNP являются штаммы *Brucella* sp. NF2653, выделенный в Австралии от *Melomys lutillus*, и *Brucella* sp. 83/13, соответственно. Отличия же с веткой филогенетического дерева на которой располагались основные виды бруцелл (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinipedialis*) составили порядка 24735 SNP. Таким образом, основываясь на всех проведенных исследованиях можно сделать вывод о том, что штамм *Brucella* sp. C-549 не принадлежит ни к одному из существующих видов бруцелл и наряду с другими австралийскими штаммами может относиться к самостоятельному виду бруцелл и занимать отдельное место в таксономической классификации возбудителя бруцеллеза.

В результате проведенных исследований установлена эффективность предложенного препарата и оптимизированного способа определения видовой принадлежности бруцелл на основе ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени при изучении природных штаммов *Brucella* spp. из фонда ГКПБ ФКУЗ НИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. Подтверждена высокая специфичность подходов AMOS-DEL, Bruce-Ladder, Suis-Ladder, рестрикционного анализа *omp25*, *omp2a*, *omp2b* генов ферментами *EcoRI*, *EcoRV*, *AluI*, *HindIII*, для дифференциации видов и биоваров бруцелл.

Совпадение результатов анализа, полученных при использовании нескольких молекулярно-генетических технологий, направленных на изучение разных участков генома бруцелл, повышает достоверность молекулярной идентификации патогена и позволяет получить дополнительную информацию о его генетической организации.

Апробация комплекса молекулярно-генетических методов при идентификации возбудителя бруцеллеза в биологическом материале от сельскохозяйственных животных

В ходе проведенных исследований показана высокая эффективность разработанного нами диагностического препарата и способа идентификации основных видов бруцелл методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени, референтных систем AMOS-DEL, Bruce-Ladder, Suis-Ladder и рестрикционного анализа *omp* генов, при изучении коллекционных штаммов *Brucella* spp. Однако данные об их применении при анализе биологического материала от животных отсутствовали.

С этой целью проведено исследование 170 проб биологического материала, полученного от крупного рогатого скота (150) и мелкого рогатого скота (20), которые были отобраны на территории Саратовской области в 2015-2016 гг. Материалом для анализа служили суспензии органов животных, серопозитивных на бруцеллез.

Все поступившие образцы первоначально проанализированы с помощью наборов реагентов «АмплиСенс *Brucella* spp. – FL» и «ГенБру», направленных на родоспецифичную детекцию патогена. Из 170 исследуемых проб ДНК бруцелл была выявлена в 62 пробах: 20 суспензиях лимфатических узлов, 8 – маток, 14 – печени, 7 – селезенки, 2 – легких, 3 – сердца, 2 суспензиях объединенных органов и 6 пробах околоплодной жидкости. При исследовании 62 положительных проб с помощью тест-системы «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» специфическая амплификация наблюдалась у 57 (91,2 %) образцов. Отрицательный результат был получен в 2 пробах печени, 2 селезенки и 1 пробе матки. При исследовании этих же образцов с применением оптимизированного нами способа определения видовой принадлежности основных видов бруцелл ДНК патогена была обнаружена в 58 (93,5 %) пробах, из которых 57 были определены как *B. abortus*, а одна как *Brucella* spp. Сигнал флуоресценции отсутствовал в тех же пробах, что и при использовании набора реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ», за исключением 1 пробы печени, что может быть связано с низкой концентрацией возбудителя в исследуемых образцах.

Одновременно весь материал был исследован бактериологическим методом. Культура возбудителя бруцеллеза была выделена из 13 образцов. С помощью ряда биохимических тестов установлена принадлежность выделенных изолятов к *B. abortus* 3 биовара. С использованием всего комплекса амплификационных и рестрикционных методов в 100 % случаев определена принадлежность данных культур к *B. abortus* 3b, 5, 6, 9 биоварам, что в полной мере совпадает с данными бактериологического анализа.

Помимо этого, набор реагентов «Ген *Brucella* – идентификация РГФ» и способ определения видовой принадлежности бруцелл методом ПЦР-РВ были апробированы при исследовании 68 проб биологического материала (кровь, суспензии печени, селезенки, лимфатических узлов, околоплодная жидкость) полученных от животных в Республике Гвинея. Из всех изученных проб только в одном образце околоплодной жидкости выявлена ДНК *B. abortus*.

Таким образом, в результате выполненных в этой работе исследований нами разработан набор реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ», позволяющий определять виды или группы видов бруцелл: *B. abortus/B. ovis*; *B. melitensis*; *B. suis/B. canis*; *B. neotomae*, а также оптимизирован способ определения видовой принадлежности возбудителя бруцеллеза методом ПЦР-РВ, обеспечивающий детекцию *Brucella* spp. с одновременной идентификацией 6 основных видов: *B. abortus*, *B. ovis*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae*. Определена возможность повышения информативности молекулярной идентификации бруцелл за счет использования молекулярно-генетических методов в комплексе: разработанного набора реагентов и способа определения видовой принадлежности бруцелл методом ПЦР-РВ, системы AMOS, Bruce-Ladder, Suis-Ladder и рестрикционного анализа *omp* генов возбудителя бруцеллеза. Эффективность использования предложенного комплекса методических подходов подтверждена при исследовании как культур патогена, так и проб биологического материала от сельскохозяйственных животных. Получены новые данные о вариабельности фрагментов генома штаммов различных видов и биоваров бруцелл.

Выводы

1. На основании анализа *in silico* и *in vitro* определены перспективные ДНК-мишени для разработки способов молекулярной идентификации возбудителя бруцеллеза: *BR0262*, *BRA0420*, *BMEI1426*, *BMEI0994*, *BMEI0711*, *BRA0541*.

2. Сконструирован набор реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ», обеспечивающий дифференциацию видов или групп видов бруцелл: *B. abortus/B. ovis*; *B. melitensis*; *B. suis/B. canis*; *B. neotomae* методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени и основанный на амплификации видоспецифичных локусов *BR0262*, *BMEI0711*, *BRA0541*. Установлена чувствительность – 1×10^4 м.к./мл и специфичность – 99 % разработанного набора реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ», при исследовании культур микроорганизмов, проб биологического материала и проб из объектов окружающей среды.

3. Разработан способ определения видовой принадлежности бруцелл: *B. abortus*, *B. ovis*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae* методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени за счет одновременного выявления родоспецифичного гена *bcs31* и видоспецифичных локусов *BRA0420*, *BRA0541*, *BMEI1426*, *BMEI0711*, *BMEI0994*, характеризующийся чувствительностью – 5×10^3 м.к./мл и специфичностью – 100 %, при анализе различного вида материала.

4. Подтверждена эффективность набора реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» и способа определения видовой принадлежности бруцелл методом ПЦР-РВ для идентификации возбудителя бруцеллеза при исследовании проб биологического материала от сельскохозяйственных животных и культур патогена, выделенных из них.

5. Показано повышение информативности молекулярной идентификации штаммов бруцелл при комплексном использовании разработанного набора реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ», способа определения видовой принадлежности бруцелл методом ПЦР-РВ, зарубежных референтных методов Bruce-Ladder, Suis-Ladder, AMOS-DEL, а также рестрикционного анализа генов *omp25*, *omp2a* и *omp2b* с помощью ферментов *AluI*, *EcoRV*, *EcoRI*, *HindIII*.

6. Установлена возможность наличия двух субтипов *B. suis* 5 биовара и принадлежности штаммов бруцелл, выделенных от мышевидных грызунов в Австралии к отдельному виду возбудителя бруцеллеза.

Практические рекомендации

1. Применение предложенного нами способа определения видовой принадлежности бруцелл методом ПЦР-РВ и генодиагностического препарата «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью идентифицировать штаммы возбудителя бруцеллеза, выделенные из проб клинического, биологического материала и проб из объектов окружающей среды.
2. Использование комплекса молекулярно-генетических методов способствует повышению информативности молекулярной идентификации штаммов бруцелл.

Перспективы дальнейшей разработки темы

1. Необходимым является разработка схемы молекулярной идентификации бруцелл с использованием комплекса амплификационных систем и рестрикционного анализа и ее дальнейшая апробация при исследовании коллекционных штаммов возбудителя бруцеллеза.

2. Продолжение изучения австралийских штаммов бруцелл и штаммов *B. suis* 5 биовара будет способствовать расширению информации об их свойствах и совершенствованию систематики бруцелл.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Касьян, Ж.А.** Апробация нового генодиагностического препарата при исследовании проб биологического материала на наличие возбудителя бруцеллеза / Ж.А. Касьян, Н.А. Осина, И.А. Касьян, И.Н. Шарова, Е.С. Казакова // Здоровье населения и среда обитания. – 2016. – Вып. 4 (277). – С. 48-50. **(из Перечня ВАК)**
2. **Касьян, Ж.А.** Разработка тест-системы для дифференциации видов бруцелл методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени / Ж.А. Касьян, Н.А. Осина, С.А. Щербакова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – Вып. 3. – С. 47-51. **(из Перечня ВАК)**
3. Осина, Н.А. Определение видовой принадлежности штаммов бруцелл из фонда Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» с помощью амплификационных и рестрикционных технологий / Н.А. Осина, **Ж.А. Касьян**, О.Ю. Ляшова, А.В. Осин // Пробл. особо опасн. инфекций. – 2016. – Вып. 4. – С. 69-74. **(из Перечня ВАК)**
4. **Касьян, Ж.А.** Изучение особенностей генетической организации *Brucella* spp. / Ж.А. Касьян, Н.А. Осина, А.В. Степанов, О.Ю. Ляшова, С.А. Щербакова // Молекулярная диагностика – 2014: сб. тр. VIII Всерос. науч.-практ. конф. с международным участием. – М., 2014. – Т. 1. – С. 481-482.
5. **Касьян, Ж.А.** Применение полимеразной цепной реакции для видовой идентификации возбудителя бруцеллеза в пробах биологического материала / Ж.А. Касьян, Н.А. Осина, И.Н. Шарова, С.А. Портенко, С.А. Щербакова // Материалы VII ежегодного всероссийского конгресса по инфекционным болезням с международным участием. – М., 2015. – С. 151-152.
6. **Касьян, Ж.А.** Выявление ДНК возбудителя бруцеллеза в биологическом материале от крупного рогатого скота в Гвинейской Республике / Ж.А. Касьян Ж.А., Е.В. Найденова, М.Ю. Карташов, Р.Б. Баяндин, S. Voumbali, M.G. Diallo, I. Nourdine, Н.А. Осина Н.А, С.А. Щербакова // Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005 г.) до 2016 года: матер. XIII Межгосударственной научно-

практической конференции / Под ред. профессора А.Ю. Поповой, академика РАН В.В. Кутырева. – Саратов, 2016. – С. 104-105.

7. **Касьян, Ж.А.** Результаты молекулярной идентификации ряда природных штаммов бруцелл из фонда Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» / Ж.А. Касьян, Н.А. Осина, Ж.В. Альхова, Я.М. Краснов, О.Ю. Ляшова, А.В. Осин // Молекулярная диагностика – 2017: сб. тр. IX Всерос. науч.-практ. конф. с международным участием. – М., 2017. – Т. 1. – С. 310-311.

8. Осина, Н.А. Совершенствование способов идентификации возбудителя бруцеллеза методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов / Н.А. Осина, **Ж.А. Касьян**, Е.С. Казакова, А.В. Степанов // Молекулярная диагностика – 2017: сб. тр. IX Всерос. науч.-практ. конф. с международным участием. – М., 2017. – Т. 1. – С. 329-330.