

Ж.А.Касьян, Н.А.Осина, С.А.Щербакова

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ВИДОВ БРУЦЕЛЛ МЕТОДОМ ПЦР С УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

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

Цель работы. создание тест-системы, позволяющей проводить видовую идентификацию возбудителя бруцеллеза с помощью полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени. **Материалы и методы.** Проведен анализ литературных источников и нуклеотидных последовательностей *Brucella* spp. с помощью специализированного программного обеспечения для выбора ДНК-мишеней, специфичных для каждого вида бруцелл, разработан методический прием и набор реагентов для идентификации видовой принадлежности возбудителя бруцеллеза методом полимеразной цепной реакции с применением термоциклера с гибридно-флуоресцентным учетом результатов типа RotorGene. **Результаты и выводы.** Разработана тест-система, позволяющая провести дифференциацию видов 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. В качестве ДНК-мишеней выбраны гены *BR0262*, *BRA0541-0542*, *BMEII0711*, которые полностью или частично делетированы у разных видов бруцелл.

Ключевые слова: идентификация, бруцеллы, видовой принадлежности, ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени.

Корреспондирующий автор: Касьян Жанетта Андреевна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Zh.A.Kas'yan, N.A.Osina, S.A.Shcherbakova

Development of the Test-System for Differentiation of *Brucella* Species, Using Real-Time PCR

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

Objective of the study is to construct a test-system allowing for specific identification of brucellosis agent, using real-time polymerase chain reaction. **Materials and methods.** Carried out has been analysis of literature sources and nucleotide sequences of *Brucella* spp., applying the specialized software for DNA-target sequence selection, specific for each brucella species. Developed is methodological tool and reagent panel for identification of brucellosis agent species appurtenance by means of RT PCR using thermocycler with hybridization-fluorescent registration of results, RotorGene type. **Results and conclusions.** Developed is the test-system, providing for differentiation of brucella species or group of species: *B. abortus/B. ovis*; *B. melitensis*; *B. suis/B. canis*; *B. neotomae*, applying real-time polymerase chain reaction. *BR0262*, *BRA0541-0542*, *BMEII0711* genes are selected as DNA-targets, being completely or partially deleted in different species of brucella.

Key words: identification, brucella, species appurtenance, real-time PCR.

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

Funding: Funding: The study was carried out within the frames of the Federal Target Program "National System of Chemical and Biological Safety in the Russian Federation (2009–2014)".

Corresponding author: Zhanetta A. Kas'yan, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Kas'yan Zh.A., Osina N.A., Shcherbakova S.A. Development of the Test-System for Differentiation of *Brucella* Species, Using Real-Time PCR. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 3:47–51. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-47-51

Возбудитель бруцеллеза является факультативным внутриклеточным патогеном, относящимся к роду *Brucella*, который, в свою очередь, подразделяется на 11 видов: *B. abortus*, *B. canis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. melitensis*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata* и *B. papionis*, шесть первых циркулируют на территории Российской Федерации. Наибольшую роль в заболевании людей и сельскохозяйственных животных играют виды *B. abortus* и *B. melitensis* [1].

С целью видовой идентификации возбудителя бруцеллеза широкое применение получили ПЦР с электрофоретической детекцией (ПЦР-ЭФ) и ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени

(ПЦР-РВ). В качестве ДНК-мишеней использовали переменные участки гена *omp2a*, *omp2b* [7], наличие видоспецифичной вставки *IS711* [4, 10, 11, 14], а также ряд генов, которые полностью или частично делетированы у разных видов бруцелл [6, 8, 9]. Однако разрешающая способность ПЦР-систем, основанных на выявлении *IS711*, ограничена видами *B. abortus* bv 1, 2, 4, *B. suis* bv 1, *B. ovis*, *B. melitensis* [4], а высокая специфичность амплификации таких мишеней в ПЦР-РВ достигается только в случае использования зондов типа FRET [14].

При оценке специфичности предложенных I.Lopez-Goni *et al.* [8, 9] и V.Hinić *et al.* [6] методических приемов установлено, что амплификация локу-

са *BMEI 1436-1435* наблюдается не только у *B. canis*, но и у ряда штаммов *B. suis*, а гена *BMEI 0466* – у *B. melitensis* (специфично), а также у *B. ovis* и *B. neotomae* (неспецифично).

В соответствии с действующими нормативно-методическими документами проведение лабораторной диагностики бруцеллеза в лабораториях территориального и регионального уровней должно осуществляться только с применением зарегистрированных препаратов [2, 3]. Этому требованию на момент начала исследования соответствовали только тест-системы, позволяющие детектировать *Brucella* spp. в пробах клинического, биологического материала и из объектов окружающей среды без определения их видовой принадлежности: «АмплиСенс *Brucella* spp. – Fl», «ГенБру». В большинстве работ, представленных выше, авторами разработаны только методические приемы, среди которых «AMOS» [4] и «Bruce-Ladder» [8] получили широкое использование, и не рассмотрены возможности создания на их основе генодиагностических препаратов.

Целью данного исследования являлось создание тест-системы, позволяющей проводить видовую идентификацию возбудителя бруцеллеза с помощью полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Материалы и методы

В работе использовано 60 штаммов микроорганизмов, из них: 14 – *B. abortus*, 18 – *B. melitensis*, 5 – *B. suis*, 2 – *B. neotomae*, 2 – *B. ovis*, 2 – *B. canis*, 3 – *Yersinia enterocolitica*, 3 – *Y. pestis*, 3 – *Y. pseudotuberculosis*, 3 – *Francisella tularensis*, 3 – *Escherichia coli*. Все культуры получены из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Штаммы возбудителей бруцеллеза выращивали на эритроцит-агаре (НИИ им. Мечникова, Москва), pH 7,2, при температуре (37±1) °C в течение 48 ч, штаммы туляремийного микроба – на питательной среде для выделения возбудителя туляремии FT (ГНЦ Прикладной Микробиологии, Оболенск), pH 7,2, при температуре (37±1) °C в течение 48 ч, штаммы *Yersinia* spp., *Escherichia* spp. выращивали на среде Хоттингера, pH 7,2, при температуре (37±1) °C в течение 24 ч.

Из выросших культур готовили суспензии в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-85-П (10МЕ)), что соответствовало $1,6 \cdot 10^9$ м.к./мл для возбудителя бруцеллеза, $1 \cdot 10^9$ – для *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *E. coli*, $5 \cdot 10^9$ – для *F. tularensis*. Затем десятикратными разведениями в 0,9 % растворе натрия хлорида микробные взвеси доводили до концентрации $1 \cdot 10^3$ м.к./мл. Количество клеток в приготовленных разведениях проверяли путем посева из концентрации $1 \cdot 10^3$ м.к./мл по 0,1 мл микробной взвеси

(100 м.к.) каждого тест-штамма на три чашки Петри с соответствующей средой.

Для обеззараживания проб к ним добавляли мертиолят натрия до конечной концентрации 1:10000 (0,01 %), прогревали при 56 °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 «ДНК-сорб В». Работу проводили в соответствии с инструкцией к препарату.

Постановку ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов осуществляли на приборе типа RotorGene («Qiagen», Германия), а с электрофоретической детекцией – на амплификаторе Терцик МС 2 («ДНК-технология», Россия) и камере SybCell GT (BioRad, США) в 2 % агарозном геле.

Подбор праймеров и зондов проводили с помощью программного обеспечения на сайте www.genscript.com и программы GeneRanner 3.1. Оценку гомологии последовательностей – по алгоритму BLAST, используя базу данных GenBank NCBI.

Результаты и обсуждение

Наибольшей разрешающей способностью для видовой дифференциации бруцелл обладают ПЦР-системы, основанные на определении наличия или отсутствия в геноме возбудителя определенных локусов. Поэтому на первом этапе нашей работы были проанализированы результаты сравнения полных геномов возбудителей бруцеллеза, полученные S.M.Halling *et al.* [5] и G.Rajashekara *et al.* [12], а также литературные источники, посвященные разработке ПЦР для идентификации видов бруцелл с целью выбора генов, наиболее перспективных для создания системы определения видовой принадлежности бруцелл методом мультилокусной ПЦР-РВ.

Для специфической детекции *B. suis* в качестве таких мишеней могут быть использованы гены *BRA0362-BRA0379*, *BR0262*, *BR1080*, *BR0951-0955*, *BR1059-1060*, которые встречаются только у данного возбудителя [5]. Однако авторами в исследование не взяты штаммы *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*. Поэтому нами проведен анализ *in silico* гомологии данных участков с последовательностями указанных видов бруцелл в базе данных GenBank NCBI. Установлено, что за исключением гена *BRA0367*, специфичного только для *B. suis*, все остальные локусы встречаются у *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae*, а участок *BR1059-1060* обнаружен также у некоторых штаммов *B. abortus* и *B. melitensis*. Помимо этого, V.G.Ratushna *et al.* [13] определили, что гены *BRA0378*, *BRA0369*, *BRA0363* имеются в составе генома только 1–4 биоваров *B. suis*. Поскольку авторы взяли для исследования локусы на протяжении всего участка *BRA0362-BRA0379*, то

можно предположить, что и остальные гены могут иметь подобную специфичность. В работе I.Lopez-Goni *et al.* [9] установлено, что ген *BR1080* не амплифицируется у 2 биовара *B. suis*. Для того, чтобы иметь в последующем возможность применения системы «Bruce-Ladder» в качестве подтверждающей при проведении верификационных исследований по идентификации штаммов бруцелл, подбираемые нами локусы должны отличаться от таковых, составляющих основу данного приема. Поэтому в качестве перспективных для выявления *B. suis* представляется использование генов *BRA0367*, *BR0262*.

По данным G.Rajashekara *et al.* [12], имеется только два локуса, которые делетированы у *B. canis*: *BMEI1435* и *BMEI0635-0636*. Оба этих гена использовали в качестве ДНК-матриц при разработке ПЦР для дифференциации видов бруцелл [6, 8]. Однако во всех случаях отмечена неспецифическая реакция по данным локусам с рядом штаммов *B. suis*. Все это определяет необходимость проведения дополнительных исследований по выявлению специфичных для штаммов *B. canis* генетических маркеров. Поэтому в нашей работе мы рассмотрели возможность групповой идентификации *B. suis/B. canis*.

Для специфической детекции *B. abortus* в качестве таких мишеней могут быть использованы гены *BRA0419-0439*, которые делетированы у данного вида бруцелл [5]. Поскольку авторами в исследовании не использованы штаммы *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, то нами проведен анализ *in silico* гомологии данных участков с последовательностями указанных видов бруцелл в базе данных GenBank NCBI. Отмечено наличие гомологичных последовательностей у *B. canis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. melitensis*. Для дальнейших исследований был выбран локус *BRA0420*.

Для штаммов *B. melitensis* также характерно наличие локусов, которые делетированы только у данного вида бруцелл. Среди них гены *BRA0173*, *BRA1080*, *BRA1096*, *BRA0541-0542*, *BRA 0630-0636*, *BRA0749-0750*, *BRA0907*, *BR1895*, *BR1182-1183*, *BR0404*, *BR0389-0391*, *BR0355*, *BR0221* [5]. Поскольку данные локусы ранее не использовались для специфической детекции *B. melitensis* в качестве ДНК-мишеней выбрали два гена, имеющие разное расположение в геноме *B. suis*: *BRA0907* и *BRA0541-0542*.

Аналогичный подход применили для выбора маркера, специфичного для *B. ovis*. G.Rajashekara *et al.* [12] показали, что гены *BMEI0899-0907*, *BMEI0993-1012* и *BMEI0129*, *BMEI0185-0226*, *BMEI0405*, *BMEI0708*, *BMEI0811-0815*, *BMEI0875-0878* полностью или частично делетированы у штаммов бруцелл данного вида. При разработке системы «Bruce-Ladder» авторы использовали в качестве ДНК-мишени локус *BMEI0998-0997* из участка *BMEI0993-1012* [8]. Поэтому нами также был выбран ген *BMEI0994* из этой области, но другого расположения. Дополнительно в качестве возможного генетического маркера для специфической детекции *B. ovis* рассмотрен локус *BMEI0812*, который,

по данным анализа *in silico*, не встречается в геноме штаммов бруцелл данного вида.

Для дифференциации *B. neotomae* представляется перспективным использование генов *BMEI0284*, *BMEI1657*, *BMEI1819*, *BMEI0710-0719*, *BMEI 0986-0988*, которые по данным G.Rajashekara *et al.* [12] не встречаются в их геноме. Ранее I.Lopez-Goni *et al.* [8] подтвердили эффективность применения локуса *BMEI 0987* для определения штаммов бруцелл данного вида. В связи с этим для дальнейших исследований выбрали ген *BMEI0711*.

На следующем этапе работы определена специфичность выбранных локусов у типовых и ряда природных штаммов бруцелл: *B. abortus* bv.1 19ВА, 544 (ATCC 23448), *B. abortus* bv.3 Tulya (ATCC 23450), *B. abortus* bv.4 292 (ATCC 23451), *B. abortus* bv.5 В-3196 (ATCC 23452), *B. abortus* bv.6 870 (ATCC 23453), *B. abortus* bv.7 63-75 (ATCC 23454), *B. abortus* bv.9 С-68 (ATCC 23455), *B. melitensis* bv.1 16М (ATCC 23456), *B. melitensis* bv.2 63/9 (ATCC 23457), *B. melitensis* bv.3 Ether 706 (ATCC 23458), *B. suis* bv.1 1330 (ATCC 23444), *B. suis* bv.2 Thomsen (ATCC 23445), *B. suis* bv.3 686 (ATCC 23446), *B. suis* bv.4 40 (ATCC 23447), *B. suis* bv.5 513 (NCTC 11996), *B. ovis* 64/1, 2000, *B. canis* 66, Н-966, *B. neotomae* 5К33 (ATCC 23459), 325. Исследование выполняли с помощью ПЦР с электрофоретическим учетом результатов (табл. 1).

Специфичность генов *BR0262*, *BRA0907*, *BRA0541-0542*, *BMEI0711*, установленная *in vitro*, полностью совпала с данными анализа *in silico*. Полученные результаты по локусам *BRA0420* и *BMEI0994*, *BMEI0812* не позволяют на данный момент выбрать их в качестве ДНК-мишеней для дифференциации видов *B. abortus* и *B. ovis*. Для решения этой задачи необходимо расширить перечень используемых штаммов и уточнить их систематическое положение, в том числе с использованием ПЦР-систем «AMOS» [4] и «Bruce-Ladder» [8].

На основании полученных результатов для дальнейшей работы выбраны гены *BR0262*, *BRA0907*/*BRA0541-0542*, *BMEI0711*, амплификация которых методом ПЦР-РВ позволит дифференцировать виды и группы видов бруцелл: *B. abortus/B. ovis*; *B. melitensis*; *B. suis/B. canis*; *B. neotomae*. С целью возможности осуществления реакции в один этап в состав зондов, комплементарных этим последовательностям введены различные флуоресцентные метки (табл. 2).

В ходе ряда экспериментов подобраны оптимальные условия ПЦР с выбранными праймерами и зондами, в том числе в мультилокусном формате. Установлено, что чувствительность реакции амплификации каждого из указанных генов была не ниже $5 \cdot 10^3$ м.к./мл, а специфичность 100 %. Во всех случаях для каждого вида бруцелл наблюдалась амплификация соответствующих генов. Со штаммами гетерологичных микроорганизмов положительной амплификации не отмечено.

Результаты определения специфичности выбранных ДНК-мишеней

Наименование локуса	Вид анализа	Наличие или отсутствие амплификации						Результаты исследования	Выводы: использование в качестве ДНК-мишени
		<i>B. abortus</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. suis</i>	<i>B. ovis</i>	<i>B. canis</i>	<i>B. neotomae</i>		
BRA0367	<i>in silico</i>	-	-	+	-	-	-	Амплифицируются только у 1 и 5 биовара <i>B. suis</i>	нет
	<i>in vitro</i>	-	-	2/5	-	-	-		
BR0262	<i>in silico</i>	-	-	+	-	+	+	Специфичная реакция	да
	<i>in vitro</i>	-	-	5/5	-	2/2	2/2		
BRA0420	<i>in silico</i>	-	+	+	+	+	+	Отсутствие амплификации не только у <i>B. abortus</i> , но и у <i>B. ovis</i>	нет
	<i>in vitro</i>	8/8	+	+	2/2	+	+		
BRA0907, BRA0541-0542	<i>in silico</i>	+	-	+	+	+	+	Специфичная реакция	да
	<i>in vitro</i>	+	3/3	+	+	+	+		
BMEI0994, BMEI0812	<i>in silico</i>	+	+	+	-	+	+	Наличие амплификации <i>B. ovis</i>	нет
	<i>in vitro</i>	+	+	+	2/2	+	+		
BMEI0711	<i>in silico</i>	+	+	+	+	+	2/2	Специфичная реакция	нет
	<i>in vitro</i>	+	+	+	+	+	2/2		

Примечание: серым показана специфичность каждого локуса; дробь – количество штаммов, имеющих, по данным *in vitro*, изучаемый locus, к числу исследованных культур; жирным – неспецифичные результаты, полученные *in vitro*.

Результаты проведенных исследований в полной мере свидетельствовали о возможности создания на основе предложенного подхода генодиагностического препарата. Поэтому нами подготовлены экспериментальные серии «Набора реагентов для идентификации штаммов *Brucella* spp. методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген *Brucella*- идентификация-РГФ)», в состав которого вошли ПЦР-смесь-1, содержащая праймеры и зонды, специфичные к генам BR0262 и BMEI0711; ПЦР-смесь-2 – праймеры и зонд, специфичный к локусу BRA0541; ПЦР-смесь-3, представляющая собой буферный раствор; растворы фермента, положительного контрольного образца, ТЕ-буфера и деионизованной воды. В ходе тестирования такой формы комплектации установлено сохранение чувствительности набора – $1 \cdot 10^4$ м.к./мл и специфичности – 100 % в течение 6 месяцев (сроки контроля – 12 месяцев).

В ходе межлабораторных и клинических испытаний на широкой выборке 111 штаммов, включающей

26 культур *B. abortus*, 30 – *B. melitensis*, 11 – *B. suis*, 4 – *B. neotomae*, 5 – *B. ovis*, 5 – *B. canis*, 6 – *Yersinia enterocolitica*, 6 – *Y. pestis*, 6 – *Y. pseudotuberculosis*, 6 – *F. tularensis*, 6 – *E. coli*, в полной мере подтверждена заявленная чувствительность и специфичность препарата. Работа по клиническим испытаниям тест-системы осуществлена в ФКУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора. Установлено, что диагностическая чувствительность медицинского изделия «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» составляет не менее 98,5 % с доверительной вероятностью 90 %, а диагностическая специфичность – не менее 99 % с доверительной вероятностью 90 %. Набор реагентов прошел государственную регистрацию в установленном порядке – Рег. уд. № РЗН 2014/1948.

Таким образом, нами разработана тест-система, позволяющая провести дифференциацию видов 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. В качестве ДНК-мишеней выбраны гены BR0262, BRA0541-0542, BMEI0711, которые полностью или частично делетированы у разных видов бруцелл. Набор реагентов характеризуется высокой специфичностью и чувствительностью.

Финансирование. Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 гг.)».

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

Таблица 2

Перечень ДНК-матриц и способ их использования для определения видовой принадлежности бруцелл, предложенный в данной работе

Вид	PC-1		PC-2
	JOE (BME0711)	ROX (BR0262)	JOE (BRA0541 или BRA0907)
<i>B. abortus/B. ovis</i>	+	-	+
<i>B. melitensis</i>	+	-	-
<i>B. suis/B. canis</i>	+	+	+
<i>B. neotomae</i>	-	+	+

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. М.: Медицина; 2013. С. 191.
2. Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей. МУ 3.1.7.1189-03. М.; 2003.
3. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней. МУК 4.2.3010-12. М.; 2013. 24 с.
4. 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. Microbiol.* 1994; 32:2660-6.
5. Halling S.M., Peterson-Burch B.D., Bricker B.J., Zuerner R.L., Qing Z., Li L.L., Kapur V., Alt D.P., Olsen S.C. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(8):2715-26. DOI: 10.1128/JB.187.8.2715-2726.2005.
6. Hinić V., Brodard I., Thomann A., Cvetnić Ž., Makaya P.V., Frey J., Abril C. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. *J. Microbiol. Methods.* 2008; 75:375-8. DOI: 10.1016/j.mimet.2008.07.002.
7. Leal-Klevezas D.S., Martinez V.I.O., Lopez M.A., Martinez S.J.P. Single step PCR for detection of *Brucella spp.* from blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33(12):3087-90.
8. Lopez-Goni I., Garcia-Yoldi D., Martin C.M., Miguel M.J., Munoz P.M., Blasco J.M., Jacques I., Grayon M., Cloeckart A., Ferreira A.C., Carosso 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.
9. Lopez-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.
10. Newby D.T., Hadfield T.L., Roberto F.F. Real-Time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR Green I, 5'-Exonuclease, and Hybridization Probe Assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69(8):4753-9. DOI: 10.1128/AEM.69.8.4753-4759.2003.
11. Probert W.S., Schrader K.N., Khuong N.Y., Bystrom S.L., Graves M.H. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella spp.*, *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(3):1290-3. DOI: 10.1128/JCM.42.3.1290-1293.2004.
12. Rajashekara G., Glasner J.D., Glover D.A., Splitter G.A. Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J. Bacteriol.* 2004; 186(15):5040-51. DOI: 10.1128/JB.186.15.5040-5051.2004.
13. Ratushna V.G., Sturgill D.M., Ramamoorthy S., Reichow S.A., He Y., Lathigra R., Striranganathan N., Halling S.M., Boyle S.M., Gibas C.J. Molecular targets for rapid identification of *Brucella* spp. *BMS Microbiol.* 2006; 6:13. DOI: 10.1186/1471-2180-6-13.
14. Redkar R., Rose S., Bricker B., DelVecchio V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, and *Brucella suis*. *Mol. Cell. Probes.* 2001; 15(1):43-52. DOI: 10.1006/mcpr.2000.0338.

References

1. Onishchenko G.G., Kutuyev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases]. M.: Meditsina; 2013. P. 191.
2. [Prophylaxis and laboratory diagnostics of brucellosis in humans]. MR 3.1.7.1189-03. M.; 2003.
3. [Procedure for organization and carrying out of laboratory diagnostics of brucellosis for the facilities at the territorial, regional, and federal levels]. MR 4.2.3010-12. M.; 2013. 24 p.
4. 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. Microbiol.* 1994; 32:2660-6.
5. Halling S.M., Peterson-Burch B.D., Bricker B.J., Zuerner R.L., Qing Z., Li L.L., Kapur V., Alt D.P., Olsen S.C. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(8):2715-26. DOI: 10.1128/JB.187.8.2715-2726.2005.
6. Hinić V., Brodard I., Thomann A., Cvetnić Ž., Makaya P.V., Frey J., Abril C. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. *J. Microbiol. Methods.* 2008; 75:375-8. DOI: 10.1016/j.mimet.2008.07.002.
7. Leal-Klevezas D.S., Martinez V.I.O., Lopez M.A., Martinez S.J.P. Single step PCR for detection of *Brucella spp.* from blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33(12):3087-90.
8. Lopez-Goni I., Garcia-Yoldi D., Martin C.M., Miguel M.J., Munoz P.M., Blasco J.M., Jacques I., Grayon M., Cloeckart A., Ferreira A.C., Carosso 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.
9. Lopez-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.
10. Newby D.T., Hadfield T.L., Roberto F.F. Real-Time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR Green I, 5'-Exonuclease, and Hybridization Probe Assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69(8):4753-9. DOI: 10.1128/AEM.69.8.4753-4759.2003.
11. Probert W.S., Schrader K.N., Khuong N.Y., Bystrom S.L., Graves M.H. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella spp.*, *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(3):1290-3. DOI: 10.1128/JCM.42.3.1290-1293.2004.
12. Rajashekara G., Glasner J.D., Glover D.A., Splitter G.A. Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J. Bacteriol.* 2004; 186(15):5040-51. DOI: 10.1128/JB.186.15.5040-5051.2004.
13. Ratushna V.G., Sturgill D.M., Ramamoorthy S., Reichow S.A., He Y., Lathigra R., Striranganathan N., Halling S.M., Boyle S.M., Gibas C.J. Molecular targets for rapid identification of *Brucella* spp. *BMS Microbiol.* 2006; 6:13. DOI: 10.1186/1471-2180-6-13.
14. Redkar R., Rose S., Bricker B., DelVecchio V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, and *Brucella suis*. *Mol. Cell. Probes.* 2001; 15(1):43-52. DOI: 10.1006/mcpr.2000.0338.

Authors:

Kas'yan Zh.A., Osina N.A., Shcherbakova S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Касьян Ж.А., Осина Н.А., Щербакова С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 21.04.16.