

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И  
БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА  
ФКУЗ РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ  
ИНСТИТУТ «МИКРОБ»**

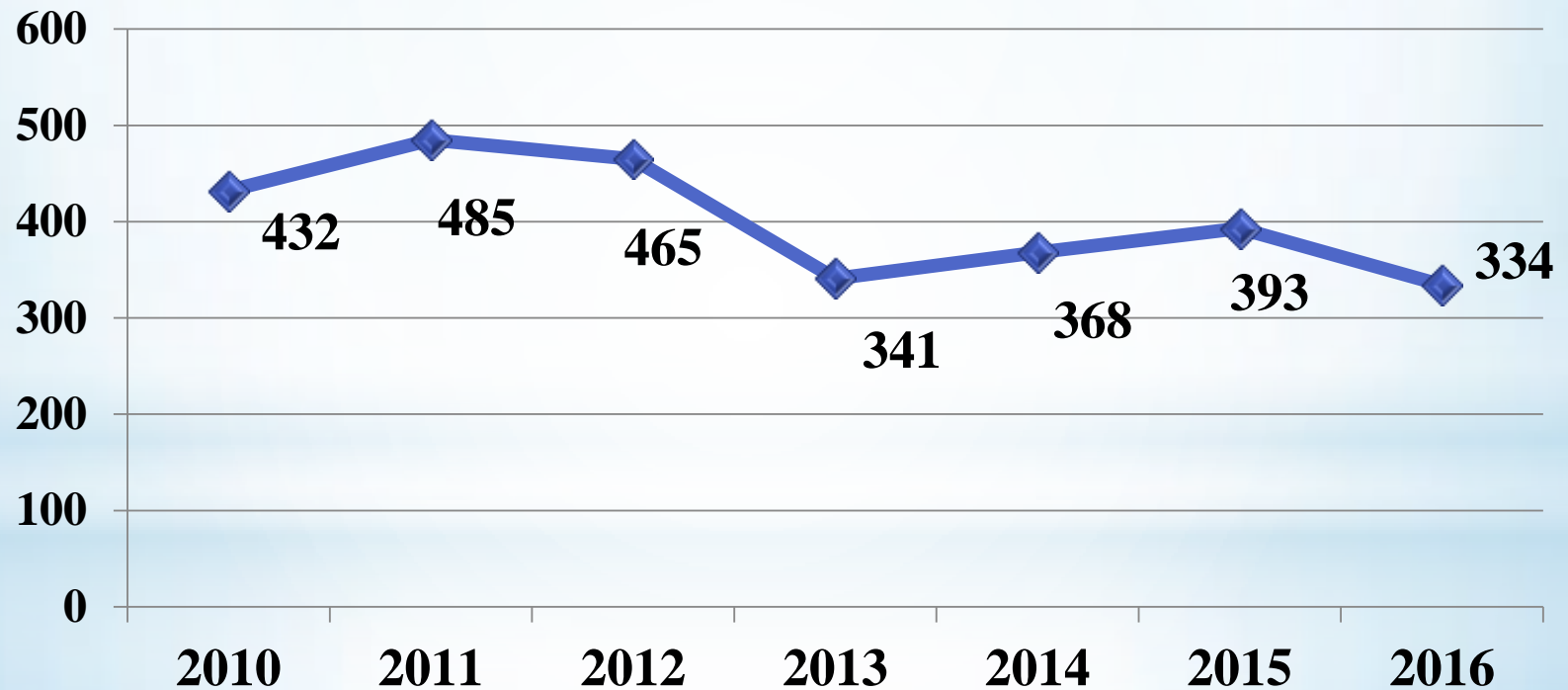
# **Совершенствование молекулярной идентификации бруцеллеза**

**Касьян Ж.А., Осина Н.А., Щербакова С.А.**

**Ставрополь, 05-06 апреля 2017 г.**

## Эпидемиологическая обстановка

**Заболеваемость бруцеллезом в Российской Федерации на протяжении последних лет не имеет тенденции к снижению и стабилизировалась на уровне 300–500 случаев впервые выявленного бруцеллеза в год.**



## Индикация возбудителя бруцеллеза

**Микроскопия мазков:** (окраска по Граму, Козловскому)

**МФА:** ИДБЛ (ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ)

**ИФА:** «ИФА-Бру-СтавНИПЧИ» (ФКУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора)

**ПЦР:** «ГенБРУ» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»)

«АмплиСенс *Brucella*-spp.- Fl» (ФГУН «ЦНИИ Эпидемиологии»  
Роспотребнадзора)

**РНАт:** эритроцитарный бруцеллезный антигенный диагностикум  
(ФКУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора)

## Идентификация бруцелл в соответствии с МУ 3.1.7.1189-03:

- отношение к избыточному содержанию углекислоты в воздухе
- способность к образованию сероводорода
- редуцирующая активность в отношении красителей
- агглютинация моноспецифическими А-, М-, R- сыворотками
- чувствительность к бруцеллезному диагностическому бактериофагу



**Выполнение исследований: трудоемко, продолжительно, не позволяет дифференцировать все виды и биовары бруцелл**



# Молекулярно-генетические методы для определения видовой принадлежности бруцелл

## Зарубежные системы:

**AMOS** и его модификации

электрофоретический учет результатов, низкая чувствительность, возможность определения *B. abortus* (не все биовары), *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. suis* bv 1.

**Bruce-ladder**

электрофоретический учет результатов, низкая чувствительность, не дифференцирует *B. canis* и *B. suis* bv 4.

**Suis-Ladder**

электрофоретический учет результатов, дифференциация только *B. suis*, *B. canis*, *B. microti*; низкая чувствительность.

**ПЦР-РВ**

возможность определения лишь *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, постановка ПЦР не в мультиплексном формате.

## В Российской Федерации

**ПЦР**

регламентирован только для родоспецифичной детекции бруцелл

## Наборы реагентов

«Ген-*Brucella* - идентификация -РГФ»

«ОМ-Скрин-бруцеллёз-РВ»

не обеспечивают дифференциацию основных видов бруцелл

## Основные направления совершенствования молекулярной идентификации бруцелл

1. Разработка способа определения основных видов бруцелл: *B. abortus*, *B. ovis*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*; *B. neotomae*, методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени.
2. Оценка эффективности предложенного способа и зарубежных референтных методик при исследовании природных штаммов возбудителя бруцеллеза, выделенных на территории РФ.
3. Определение подходов, повышающих информативность молекулярной идентификации возбудителя бруцеллеза.

Выбранные ДНК-мишени для разработки способа определения  
видовой принадлежности возбудителя бруцеллеза методом  
ПЦР-РВ

*Brucella* spp.  
наличие *bcspr31*

*B. abortus*  
делеция BRA0420

*B. melitensis*  
делеция BRA0541

*B. ovis*  
делеция BMEI0994

*B. canis*  
делеция BMEI1426

*B. suis*  
наличие всех генов

*B. neotomae*  
делеция BMEI0711



Чувствительность разработанного способа составила –  $5 \times 10^3$  м.к./мл, специфичность – 100 %, при анализе различного вида материала.

На данный способ получено положительное решение на выдачу патента (заявка № 2016137438 приоритет 19.09.2016).

Вид	Реакционная смесь-1			Реакционная смесь-2		
	FAM <i>bccsp31</i>	JOE BRA0541	ROX BRA0420	FAM BMEI1426	JOE BMEI0711	ROX BMEI0994
<i>B. abortus</i>	+	+	-	+	+	+
<i>B. melitensis</i>	+	-	+	+	+	+
<i>B. suis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>B. canis</i>	+	+	+	-	+	+
<i>B. ovis</i>	+	+	+	+	+	-
<i>B. neotomae</i>	+	+	+	+	-	+



## Оценка эффективности молекулярно-генетических методов для идентификации возбудителя бруцеллеза.

**Исследовано:** 66 штаммов возбудителя бруцеллеза из фонда ГКПБ «Микроб»: 17- *B. abortus*; 17 - *B. melitensis*, 14 - *B. suis*; 4 - *B. canis*; 10 - *B. ovis*; 4 - *B. neotomae*.

Методический подход	Разрешающая способность
<b>Способ определения видовой принадлежности возбудителя бруцеллеза методом ПЦР-РВ</b>	<i>B. abortus</i> ; <i>B. ovis</i> ; <i>B. melitensis</i> ; <i>B. suis</i> ; <i>B. canis</i> ; <i>B. neotomae</i>
<b>AMOS-DEL</b>	<i>B. abortus</i> ; <i>B. melitensis</i> ; <i>B. suis</i> (1 биовар); <i>B. ovis</i>
<b>Bruce-Ladder</b>	<i>B. abortus</i> ; <i>B. melitensis</i> ; <i>B. suis</i> ; <i>B. canis</i> ; <i>B. ovis</i> ; <i>B. neotomae</i> ; <i>B. ceti</i> / <i>B. pinnipedialis</i> ; вакцинные штаммы: <i>B. abortus</i> S19, <i>B. abortus</i> RB51, <i>B. melitensis</i> Rev1
<b>Suis-Ladder</b>	<i>B. suis</i> 1-5 bv; <i>B. canis</i> ; <i>B. microti</i>
<b>Рестрикционный анализ генов <i>omp25</i>, <i>omp2a</i>, <i>omp2b</i> с помощью ферментов <i>AluI</i>, <i>EcoRV</i>, <i>EcoRI</i>, <i>HindIII</i></b>	<i>B. abortus</i> bv. 1, 2, 4, R; <i>B. abortus</i> bv. 3, 5, 6, 9; <i>B. melitensis</i> ; <i>B. suis</i> ; <i>B. ovis</i> ; <i>B. canis</i> ; <i>B. neotomae</i>

## Результаты исследования 66 штаммов *Brucella* spp. с помощью молекулярно-генетических методов

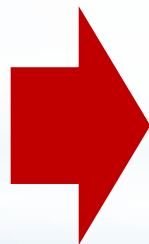
Для 49 штаммов бруцелл (*B. abortus* – 14, *B. ovis* – 3, *B. melitensis* – 13, *B. canis* – 3, *B. suis* – 12, *B. neotomae* – 4) подтверждено их таксономическое положение указанное в паспорте.

Для 12 штаммов возбудителя бруцеллеза систематическое положение уточнено:

### Результат идентификации

паспортные данные

*B. melitensis* C-482  
*B. melitensis* 286  
*B. melitensis* M-114  
*B. ovis* 390-90  
*B. ovis* 64/1  
*B. ovis* 2000  
*B. ovis* 10/2  
*B. ovis* 83-89  
*B. ovis* 830  
*B. ovis* 712  
*B. abortus* 339  
*B. canis* H-966



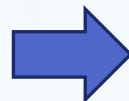
*B. abortus*  
*B. suis*  
*B. ovis*  
*B. abortus*  
*B. abortus*  
*B. abortus*  
*B. abortus*  
*B. abortus*  
*B. melitensis*  
*B. suis* 5 биовар  
*B. melitensis*  
*B. suis* 4 биовар

совпадение данных с использованием разных подходов

## Результаты исследования 66 штаммов *Brucella* spp. с помощью молекулярно-генетических методов (продолжение)

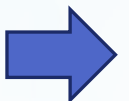
Для 5 штаммов бруцелл определить их таксономическое положение было затруднительно, поскольку с одним или, в ряде случаев, с несколькими методами были получены другие амплификационные и рестрикционные профили

*B. suis* C-450  
*B. suis* C-451



другие амплификационные профили с системой Suis-Ladder

*B. abortus* 290



образование фрагментов 498 и 1700 п.н. с системой AMOS-DEL

*B. abortus* 3143-П



другие амплификационные профили с Bruce-Ladder, способом определения видовой принадлежности возбудителя бруцеллеза методом ПЦР-РВ

*B. abortus* C-549



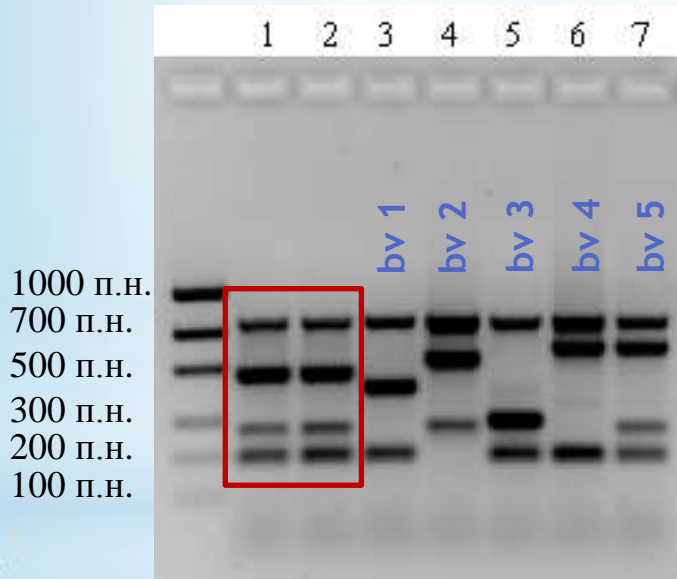
другие амплификационные профили с Bruce-Ladder, способом определения видовой принадлежности возбудителя бруцеллеза методом ПЦР-РВ, новые рестрикционные профили

## Результаты исследования штаммов *B. suis* C-450 и C-451

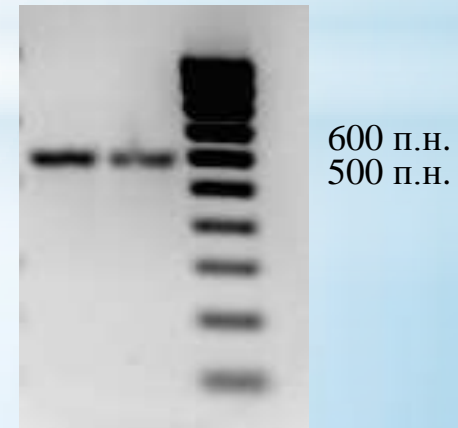
- Способ определения основных видов бруцелл методом ПЦР-РВ
- Bruce-Ladder
- AMOS-DEL: нет амплификации;
- Рестрикционный анализ генов *omp2a* и *omp2b*

*B. suis*

### Suis-Ladder: выявления локусов BMEI1426/BMEI0205 (VNTR)/ BMEI1688/BR1080.



- 1 – *B. suis* C-450 (774/**488 (7 повторов)**/278/197) п.н.;
- 2 – *B. suis* C-451 (774/**488 (7 повторов)**/278/197) п.н.;
- 3 – *B. suis* 1 биовар (774/425 (6 повторов)/-/197) п.н.;
- 4 – *B. suis* 2 биовар (774/551 (8 повторов)/278/-) п.н.;
- 5 – *B. suis* 3 биовар (774/299 (4 повтора)/-/197) п.н.;
- 6 – *B. suis* 4 биовар (774/614 (9 повторов)/-/197) п.н.;
- 7 – *B. suis* 5 биовар (774/614 (9 повторов)/278/197) п.н.



MLVA-типирование *B. suis* C-450 и *B. suis* C-451

BRU1322 (Bruce 06) – фрагмент размером 140 п.н. (1 повтор)

BRU211 (Bruce 11) – фрагмент размером 567 п.н. (7 повторов)

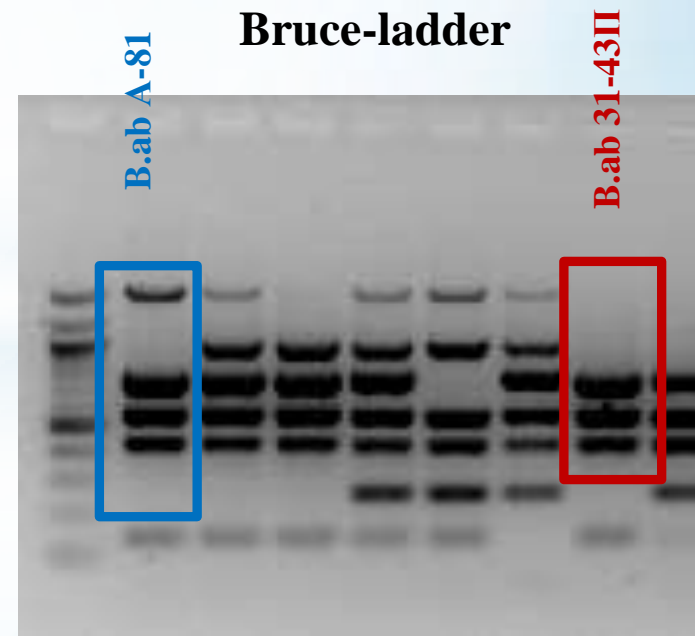
## Результаты исследования штамма *B. abortus* 3143-П

- Способ определения основных видов бруцелл методом ПЦР-РВ : *bcspr31* +, BRA0541 +, BMEI1426 +, BRA0420 -, **BMEI0994 -**, BMEI0711+
- Bruce-Ladder: 794/587/450/152 п.н. - **отсутствие фрагмента 1682 п.н. (BMEI0998)**
- AMOS-DEL : *B. abortus* (3b, 5, 6, 9 bv)
- Рестрикционный анализ генов *omp2a* и *omp2b*: типичные профили рестрикции для *B. abortus*
- Филогенетический анализ показал наибольшую близость к *B. abortus* (*B. abortus* 80\_102, *B. abortus* 90\_12178)



*B. abortus*, содержащий делецию  
BMEI0994 -BMEI0998

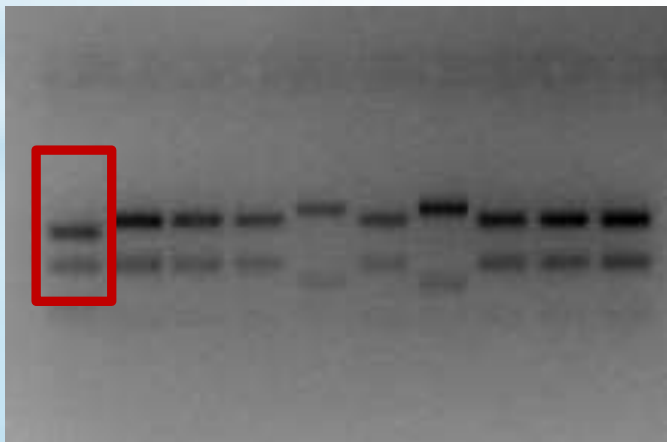
1642 п.н.  
1071 п.н.  
794 п.н.  
587 п.п.  
272 п.н.  
152 п.н.



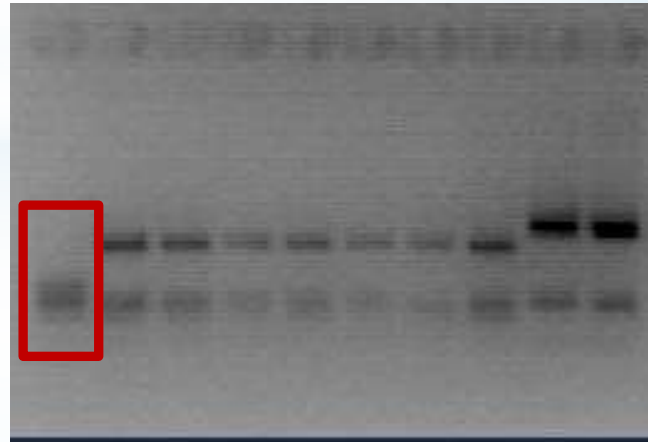
## Результаты исследования штамма *B. abortus* C-549

- Способ определения основных видов бруцелл методом ПЦР-РВ : *bcspr31* +, BRA0541 +, BMEI1426 +, BRA0420 -, **ВМЕI0994 -, ВМЕI0711-**
- Bruce-Ladder: 794/587/450/272/152 п.н. - **отсутствие фрагмента 1682 п.н., наличие фрагмента 272 п.н.**
- AMOS-DEL : нет амплификации
- Рестрикционный анализ генов *omp2a* и *omp2b* ферментом *AluI* : **новые профили рестрикции**
- MLVA-типирование: BRU1322 – фрагмент размером 140 п.н. (1 повтор)  
BRU211– отсутствие продуктов амплификации

рестрикция *omp2a* *AluI*

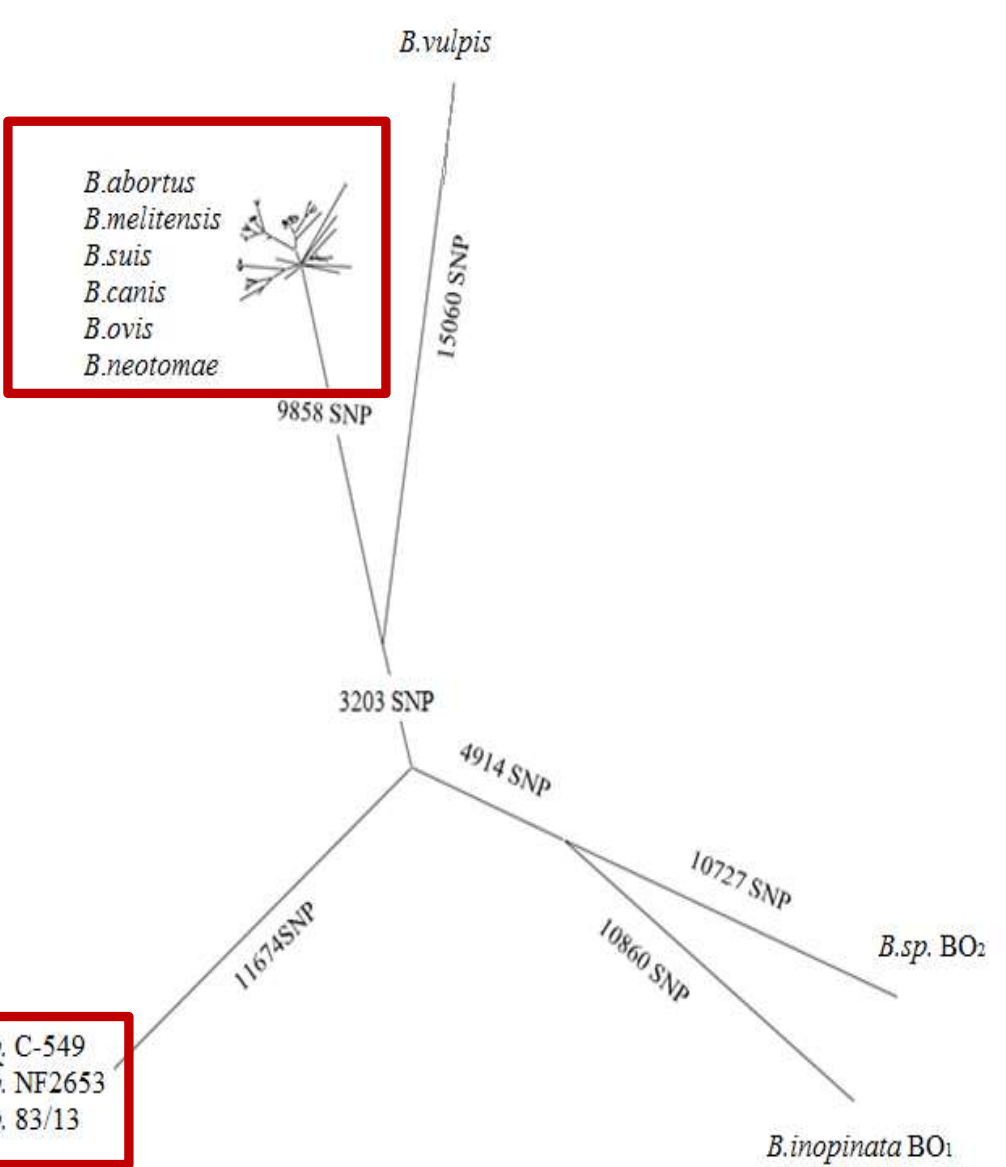


рестрикция *omp2b* *AluI*





# Филогенетические связи штамма *B. abortus* C-549 и других представителей рода *Brucella* spp. на основании анализа коровых SNP полных геномов патогена.



Проведен сравнительный анализ подобия по коровым SNP его генома с нуклеотидными последовательностями 365 штаммов возбудителя бруцеллеза, находящимися в базе данных NCBI GenBank.

Различие в 4 SNP - *Brucella* sp. NF265  
 Различие в 22 SNP - *Brucella* sp. 83/13  
 Различия с основными видами бруцелл (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinipedialis*), составили порядка 24735 SNP



## Выводы

1. Повышению информативности молекулярной идентификации штаммов бруцелл способствует использованию комплекса молекулярно-генетических методов.
2. Предложенный нами способ определения видовой принадлежности возбудителя бруцеллеза методом ПЦР-РВ позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью идентифицировать виды *B. abortus*, *B. ovis*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*; *B. neotomae*.
3. Для зарубежных референтных систем AMOS-DEL, Bruce-Ladder, Suis-Ladder, а также рестрикционного анализа *omp25*, *omp2a*, *omp2b* генов ферментами *EcoRI*, *EcoRV*, *AluI*, *HindIII* при исследовании коллекционных штаммов подтверждена характерная для каждого метода специфичность.

## Перспективы исследований

1. Разработать совместно с референс-центром по бруцеллезу схему молекулярной идентификации бруцелл с использованием комплекса амплификационных систем и рестрикционного анализа, дополнив её методами молекулярного типирования патогена. Провести апробации предложенного алгоритма при исследовании коллекционных штаммов возбудителя бруцеллеза.
2. Изучение австралийских штаммов бруцелл и штаммов *B. suis* с похожими источниками выделения для расширения информации о генетической организации представителей *Brucella* spp.

**Спасибо за внимание!**

