DOI: 10.48612/sbornik-2026-1-24
УДК 616.98:579.841.93

ВИДОСПЕЦИФИЧНАЯ ПРАЙМЕРНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ *BRUCELLA ABORTUS* И *BRUCELLA MELITENSIS*

Осянин Константин Анатольевич, канд. биол. наук
Косарев Максим Аркадьевич, канд. биол. наук
Горбунова Мария Евгеньевна, канд. биол. наук
Додонова Екатерина Алексеевна
Шангараев Рафкат Искандарович, канд. вет. наук
Громова Елизавета Алексеевна, канд. биол. наук
ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, Российская Федерация

В статье приводятся результаты по разработке праймерной ПЦР-РВ тест-системы для выявления и идентификации B. abortus и B. melitensis. В рамках настоящей работы сконструированы две комбинации олигонуклеотидных праймеров и зонды, пригодные для индикации искомых бруцелл методом ПЦР-РВ в одной пробирке, используя разные каналы флуоресценции, а также положительный контрольный образец, который представляет собой генетическую конструкцию плазмидной ДНК (5433 п.н.). Проверка при исследовании штаммов патогенных бруцелл, близкородственных и гетерологичных микроорганизмов показала 100 % специфичность разработанной тест-системы. Чувствительность разработанного ПЦР-РВ теста для диагностики B. abortus и B. melitensis может достигать – 18 молекул ДНК в одном мкл исследуемого образца.

Ключевые слова: бруцеллез; Brucella abortus; Brucella melitensis; олигонуклеотиды; диагностика

SPECIES-SPECIFIC PRIMER TEST SYSTEM FOR IDENTIFICATION OF *BRUCELLA ABORTUS* AND *BRUCELLA MELITENSIS*

Osyanin Konstantin Anatolyevich, PhD Biol. Sci.
Kosarev Maksim Arkadyevich, PhD Biol. Sci.
Gorbunova Maria Evgenievna, PhD Biol. Sci.
Dodonova Ekaterina Alekseevna
Shangaraev Rafkat Iskandarovich, PhD Vet. Sci.
Gromova Elizaveta Alekseevna, PhD Biol. Sci.
Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation

The article presents the results of developing a primer PCR-RT test system for detecting and identifying *B. abortus* and *B. melitensis*. In this work, two combinations of oligonucleotide primers and probes were designed for the detection of *Brucella* spp. using PCR-RT in a single tube, using different fluorescence channels, as well as a positive control sample, which is a genetic construct of plasmid DNA (5433 bp). The test system was tested on pathogenic *Brucella* spp., closely related microorganisms, and heterologous microorganisms, and showed 100% specificity. The sensitivity of the developed PCR-RT test for the diagnosis of *B. abortus* and *B. melitensis* can reach 18 DNA molecules per microliter of the test sample.

Keywords: brucellosis; *Brucella abortus*; *Brucella melitensis* oligonucleotides; diagnosis

Бруцеллез представляет собой одну из наиболее опасных высококонтагиозных бактериальных болезней, возбудители которой поражают многих видов животных, а также человека [1]. Болезнь характеризуется у взрослых животных поражением репродуктивной системы (аборты, бесплодие, орхиты, эпидидимиты), маститами, у молодняка –

неонатальной пневмонией. Бруцеллез у человека характеризуется лихорадкой, слабостью, поражениями суставов, увеличением лимфоузлов, печени, селезенки. Также необходимо отметить, что данная болезнь у человека плохо лечится, даже с комбинированным применением разных групп антибиотиков [2].

Возбудитель бруцеллеза – грамотрицательные мелкие палочковидные и кокковые неподвижные бактерии, которые входят в род *Brucella*. Данные микроорганизмы патогенны для копытных, морских млекопитающих, грызунов, плотоядных и приматов. Ветеринарное и медико-санитарное значение имеют следующие виды бруцелл: *B. melitensis, B. abortus, B. suis, B. canis* и *B. ovis*. *B. melitensis* вызывает заболевание у мелкого рогатого скота (овцы, козы), *B. abortus* поражает крупный рогатый скот, *B. suis* – свиней, *B. canis* – собак и *B. ovis* – овец. *B. abortus, B. melitensis* и *B. suis* патогенны для человека [3]. Бруцеллы имеют следующие факторы вирулентности: система секреции IV типа (T4SS) – представлена 11 белками, принимающими участие в патогенезе инфекции. Аутотранспортерные адгезины представляют собой белки, обеспечивающие прикрепление бруцелл клеткам макроорганизма. При лизисе бруцелл выделяется эндотоксин, который обладает пирогенным действием. Также бруцеллы выделяют патогенные ферменты – гиалуронидазу, нейраминизазу, каталазу и уреазу [7].

В Российской Федерации (РФ) бруцеллез относится к числу наиболее значимых социально-экономических заболеваний [2]. Эпизоотическая ситуация так же, как и эпидемиологическая по бруцеллезу в РФ остается напряженной. Основными причинами, способствующими распространению бруцеллеза, являются неэффективная диагностика в связи с низкой аналитической чувствительностью и специфичностью применяемых диагностических тестов, а также неполный охват при скрининговых исследованиях животных [4]. Также особую опасность в распространении бруцеллеза представляют животные, рожденные от инфицированных матерей, а также молодняк, контактирующий с больными, которые в раннем возрасте не реагируют на серологические тесты, но при этом являются резервуаром инфекции для здорового поголовья [4].

В стратегии мер борьбы с бруцеллезом диагностика занимает основное место. Применение высокочувствительных экспресс-методов позволило бы выявлять бактерионосительство и тем самым повышать эффективность противоэпизоотических мероприятий. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) благодаря высокой чувствительности и специфичности с успехом применяется для индикации специфических локусов генома бруцелл. ПЦР дает возможность провести как родовую индикацию, так и видовую дифференциацию бруцелл [8]. Одним из основных этапов ПЦР-диагностики является выбор генетической мишени, от которого зависит чувствительность и специфичность анализа. По данным литературы, известны следующие маркерные генетические локусы для молекулярной диагностики бруцеллеза: гены *omp2*, *omp31*, 16S рРНК, IS711, bcsp31.

Целью данной работы являлось конструирование видоспецифичной праймерной тест-системы для идентификации *B. abortus* и *B. melitensis.*

Методика исследований. Объектом исследования являлись 16 штаммов микроорганизмов (Государственная коллекция микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ») из них пять *B. abortus* – №54, №19, №82, УФ-1, Ниви-86; три *B. melitensis* – 16М, ЯГ-56, Казак; два *B. suis* – №1330 и № 6989; два *Escherichia coli* – ПЗ-3, КВ-1; три *Clostridium perfringens* – №28, №392, №213; один *Staphylococcus aureus.* Экстракцию ДНК проводили с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» («АмпліСенс», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Состав реакционной смеси: специфические олигонуклеотидные праймеры и зонды с флюоресцентной меткой, дезоксирибоонуклеотидтрифосфаты, ПЦР-буфер, $MgCl_2$ и Taq-полимераза (набор реагентов R-412 ЗАО, «Синтол» (Россия), очищенная ДНК. Постановку ПЦР-РВ и последующий анализ результатов осуществляли на измерительном модуле CFX96 в составе термоциклеров для амплификации нуклеиновых кислот («Bio-Rad», Сингапур).

В работе использовали нуклеотидные последовательности референсные штаммы *B. abortus* и *B. melitensis,* депонированные в базу данных GenBank. Множественное выравнивание нуклеиновых последовательностей бруцелл проводили в онлайн программе NCBI MSA Viewer 1.26.0. Дизайн олигонуклеотидов и положительного контрольного образца (ПКО) осуществляли с использованием программы

Vector NTI 9.1 (Invitrogen Corporation) в соответствии с общими принципами, которые ранее описывали при разработке ПЦР-РВ тест-систем для индикации других патогенов [5, 6]. Олигонуклеотидные праймеры, зонды, ПКО синтезированы в ЗАО «Евроген» (Россия).

Результаты исследований и их обсуждение. При разработке праймерной тест-системы для обнаружения и идентификации возбудителей бруцеллеза были проанализированы 19 нуклеотидных последовательностей изолятов *B. abortus* и 17 штаммов *B. melitensis* депонированных в базу данных GenBank. В качестве гена интереса были выбраны инсерционные последовательности: для *B. abortus* – локус «BAW-20082» (GenBank LT671513.1: 1003355 – 1004575), для *B. melitensis* – фрагмент «C0R52_12390» (GenBank CP026006.1: 906042 – 906524). По данным *in-silico* выбранные геномные участки является уникальным для каждого вида бруцелл и отсутствует у других представителей рода *Brucella*. Далее в пределах данных локусов были подобраны две комбинации специфических олигонуклеотидов. Первая пара праймеров обозначенных нами как Bru abortus F, Bru abortus R комплементарны локусу гена «BAW-20082» и предполагает амплификацию фрагмента ДНК *B. abortus.* Праймеры Bru meli 3F, Bru meli 3R специфичны участку гена «C0R52_12390» и обеспечивают амплификацию локуса ДНК только штаммов *B. melitensis.* С учетом того, что указанные выше комбинации олигонуклеотидов объединены в единую мультипраймерную смесь для визуализации сигнала флуоресценции, связанного с амплификацией ДНК *B. abortus* использовали канал CY5, *B. melitensis* – HEX. Такое разделение позволит провести отдельную одновременную детекцию разных видов бруцелл.

Для контроля специфичности ПЦР в состав любой тест-системы должны быть включены контрольные образцы. В настоящей работе при создании положительного контрольного образца (ПКО) была использована нуклеотидная последовательность, которая представляет собой чередование разработанных праймеров и зондов для индикации *B. abortus* и *B. melitensis* (рисунок).

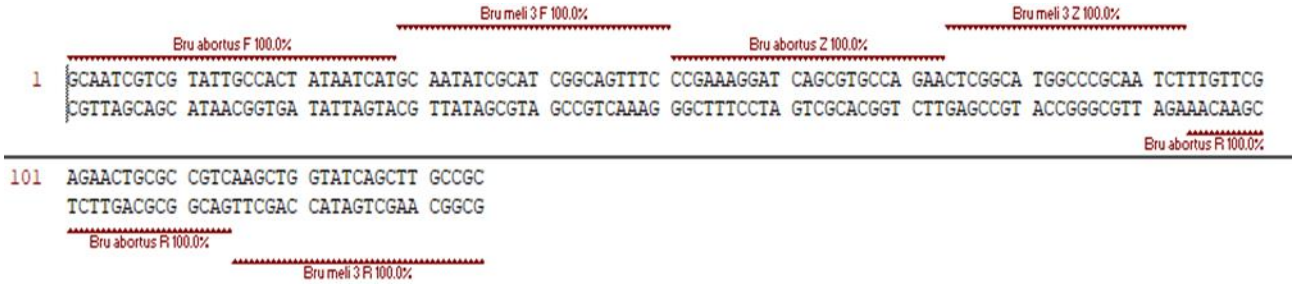

Рисунок – Нуклеотидная последовательность разработанной генетической вставки ПКО

Нуклеотидную последовательность, представленную на рисунке 1 после синтеза, клонировали в вектор pET-28a+ («Евроген», г. Москва). В результате конструирования длина вектора, содержащего маркерные последовательности для индикации анализируемых патогенов, составила 5433 п.н.

Оптимальную температуру отжига праймеров подбирали экспериментальным путем. В качестве матрицы использовали полученный после синтеза препарат ПКО. Программа амплификации при которой происходит стабильное нарастание уровня флуоресценции по каналу детекции (HEX и CY5) - начальная денатурация ДНК при 95 °С - 5 мин, 5 циклов: денатурация 95 °С – 15 с, отжиг олигонуклеотидов 61 °С – 35 с, далее 40 циклов: денатурация 94 °С – 15 с, отжиг праймеров 61 °С – 35 с (учет флуоресцентного сигнала по каналам HEX/CY5). Максимальная величина порогового цикла (Ct), при котором результат реакции считается положительным: <32 для канала HEX и <32 для канала CY5. Учет результатов осуществляли по каждому каналу отдельно.

Специфичность разработанной праймерной системы проверяли с использованием ДНК различных штаммов *B. abortus, B. melitensis*, близкородственных и гетерологичных микроорганизмах. Амплификация наблюдалась только по каналу CY5 с ДНК всех исследованных штаммов *B. abortus*; флуоресценция по каналу HEX регистрировалась для всех штаммов *B. melitensis*. Проверка на штам-

мах близкородственных - *B. suis* и гетерологичных микроорганизмов (*E. coli*, *C. perfringens*, *S. aureus*) показала 100 % специфичность разработанной тест-системы только для возбудителей *B. abortus* и *B. melitensis.*

Чувствительность тест-системы оценивали на серии 10-кратных разведений ПКО из начальной концентрации (17510448044 молекул/мкл) до концентрации 1,75 молекул/мкл. Минимальная концентрация *B. abortus* и *B. melitensis* в образце, при которой был зарегистрирован положительный результат (Ct менее 32), составляет 18 молекул ДНК в одном мкл исследуемого образца.

Выводы. В ходе проведенных исследований сконструированы две комбинации оригинальных систем олигонуклеотидных праймеров и зондов, пригодных для индикации *B. abortus* и *B. melitensis* методом ПЦР-РВ в одной пробирке, используя разные каналы флуоресценции, а также положительный контрольный образец, который представляет собой генетическую конструкцию плазмидной ДНК (5433 п.н.). Специфичность подобранных систем праймеров составила 100%. Чувствительность разработанного ПЦР-РВ теста может достигать – 18 молекул ДНК в одном мкл исследуемого образца. Таким образом представленная в настоящем исследовании праймерная тест-система обладает высокой чувствительностью и специфичностью, и позволяет не только обнаруживать, но и дифференцировать два вида патогенных бруцелл.

Список литературы

1. Исалиева К. М. Эпизоотологический мониторинг среди крупного и мелкого рогатого скота на бруцеллез в Ак-Талинском районе / К. М. Исалиева, М. С. Турсумбетов, А. Н. Нуржанова // Наука, новые технологии и инновации Кыргызстана. – 2021. – № 3. – С. 56–59.

2. Бруцеллез крупного и мелкого рогатого скота в России: эпизоотическая ситуация и нормативно-правовое регулирование проблемы / Г. А. Нурлыгаянова, А. А. Разумова, В. И. Белоусов [и др.] // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных : материалы V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Ставрополь, 24–25 апреля 2024 года. – Ставрополь : ООО «Экспо-Медиа», 2024. – С. 153–155.

3. Применение HRM-анализа кривых плавления, полученных после амплификации VNTR-локусов, для идентификации и дифференциации штаммов бруцелл / Е. А. Анисимова, Д. А. Миргазов, Е. А. Додонова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2023. – № 4. – С. 42–49. – DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-42-49.

4. Применение ПЦР в ранней диагностике бруцеллеза / М. М. Микаилов, О. Ю. Черных, Ш. А. Гунашев [и др.] // Прикаспийский вестник ветеринарии. – 2025. – № 3 (12). – С. 28–33. – DOI: 10.33580/29490898_2025_3_12_28.

5. Разработка олигонуклеотидных праймеров для идентификации вируса инфекционной анемии лососевых / К. А. Осянин, Е. А. Громова, Е. А. Додонова [и др.] // Ветеринарный врач. – 2025. – № 4. – С. 81–85. – DOI: 10.33632/1998-698X_2025_4_81.

6. Подбор генетических маркеров для ПЦР-РВ индикации возбудителя бабезиоза крупного рогатого скота / Р. И. Шангараев, К. В. Усольцев, М. Е. Горбунова [и др.] // Ветеринарный врач. – 2026. – № 1. – С. 87–93. – DOI: 10.33632/1998-698X_2026_1_87.

7. Identification, Genotyping and Antimicrobial Susceptibility Testing of Brucella spp. Isolated from Livestock in Egypt / A.U. Khan, W.S. Shell, F. Melzer [et al.] // Microorganisms. – 2019. – Vol. 7, No. 12. – P. 603. – DOI: 10.3390/microorganisms7120603.

8. Brucellosis: Bacteriology, pathogenesis, epidemiology and role of the metallophores in virulence: a review / G. Ghssein, Z. Ezzeddine, S. Tokajian [et al.] // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2025. – Vol. 15. – P. 1621230. – DOI: 10.3389/fcimb.2025.1621230.