

УДК 619:616-07

РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БРУЦЕЛЛ

Г.Д. Абишева¹, А.Д. Каиржанова¹, Е.С. Шевцова¹, Т.Б. Карибаев²,
А.С. Джайлбекова², И.И. Сытник², С.Б. Тюлегенов¹, А.Б. Шевцов¹, К.К. Муканов¹

¹Национальный центр биотехнологии, ул. Ш. Валиханова, 13/1, г. Астана, 010000, Казахстан

²Национальный референтный центр по ветеринарии, ул. 150 лет Абая, 223, (п. Коктал), 010000, г. Астана, Казахстан

nbshevtsov@gmail.com

Несмотря на значительный прогресс в контроле и борьбе с инфекционными заболеваниями, бруцеллез остается одной из самых важных зоонозных инфекций, с огромным ареалом распространения. Существует много различных факторов, которые препятствуют полной и устойчивой ликвидации бруцеллеза животных. Эффективность борьбы с бруцеллезом напрямую зависит от эффективности диагностических мероприятий, которые в первую очередь должны быть направлены на раннее выявление инфекции. Выбор метода диагностики зависит от общей эпидемиологической ситуации в регионе и задач исследования, а также от оснащенности специализированных лабораторий. В Казахстане для массового контрольного исследования на бруцеллез применяются серологические методы - реакция связывания комплемента и иммуноферментный анализ. Высокий уровень инфицирования домашних животных обуславливает широкое распространение заболевания среди людей. Целью работы является разработка полимеразной цепной реакции протокола для использования в ветеринарных лабораториях. В статье приводятся результаты исследований по разработке протокола ПЦР для выявления бруцелл. Чувствительность ПЦР протокола по выявлению ДНК бруцелл составила 21 геномный эквивалент. Определение специфичности ПЦР путем анализа 78 образцов ДНК показала ее специфичность на уровне около 100%.

Ключевые слова: бруцеллез, ПЦР, диагностика, протокол, штамм, специфичность.

DEVELOPMENT OF THE PCR-BASED PROTOCOL FOR DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS WITH DETECTION ON AGAROSE GEL

G.D. Abisheva¹, A.D. Kairzhanova¹, E.S. Shevtsova¹, T.B. Karibaev²,
A.S. Dzhaibekova², I.I. Sytnik², S.B. Tjulegenov², A.B. Shevtsov², K.K. Mukanov¹

¹National Center for Biotechnology, c. Astana, 13/1 Valikhanov str., 010000, Kazakhstan

²National Reference Center on Veterinary, 223, 150 let Abaya str., (Koktal), 010000, Kazakhstan

nbshevtsov@gmail.com

Despite significant progress in monitoring and control of infectious diseases, brucellosis remains one of the most important zoonotic infections with a vast distribution area. Efficiency of anti-brucellosis campaign depends on the effectiveness of diagnostic procedures that must be focused on early detection of infection. In Kazakhstan, serological methods are used for mass confirmatory analysis of brucellosis. These methods include complement fixation (CF) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). High infection rate among domestic animals gives rise to widespread distribution of the disease among people. The aim is to develop a PCR protocol for application in veterinary laboratories. As a result of this study, the new protocol for PCR detection of *Brucella* is presented in this article. Sensitivity of the PCR protocol in detection of *Brucella* DNA was 21 genome equivalents. Determination of the specificity of PCR by analyzing a DNA sample 78 showed its specificity level of about 100%.

Keywords: Brucellosis, PCR, diagnosis, protocol, strain, specificity.

ВВЕДЕНИЕ

Бруцеллез – инфекционная болезнь, поражающая животных всех видов, а также

человека, представляет собой серьезную проблему для здравоохранения и животноводства [1, 2]. Бруцеллез наносит большой экономический ущерб животноводству, который складывается из ряда прямых факторов: аборт, рождение нежизнеспособного приплода, бесплодие, снижение молочной продуктивности. Роль данного заболевания для здравоохранения объясняется прямой или косвенной передачей инфекции от зараженных животных к человеку, что приводит к тяжелому заболеванию [3, 4].

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежегодно регистрируется более 500 тыс. новых случаев бруцеллеза у людей [5]. Наиболее широко бруцеллез распространен в странах Средиземноморья, Малой Азии, Юга и Юго-Восточной Азии, Африки, Центральной и Южной Америки [6]. Казахстан входит в десятку стран с самыми высоким уровнем регистрации бруцеллеза среди людей [6]. Ежегодно в Казахстане регистрируется тысячи новых случаев бруцеллеза людей, и в 2006 году показатель составил 17,5 на 100000 населения, в 2010 году - 13,3 случая на 100000 населения, также наблюдается высокий уровень зараженности домашних животных - 0,2–0,4% [7, 8]. Вместе с тем, ряд стран (Англия, Дания, Германия, Финляндия, Швеция, Норвегия, Швейцария, Чехия, Словакия, Румыния, Япония) добились практически полной ликвидации этой болезни среди животных и людей [6].

При выделении положительно реагирующих в РСК и ИФА животных требуется подтверждение диагноза бактериологическим методом. Бактериологический метод диагностики с постановкой биологической пробы занимает длительное время - от 2 недель до 3 месяцев, что неблагоприятно влияет на проведение оздоровительных мероприятий и последующую ликвидацию болезни. Кроме того, чувствительность бактериологического метода варьирует от 30 до 90% [9, 10]. Внедрение в практику методов ПЦР позволит сократить время постановки диагноза до одного рабочего дня и снизить вероятность инфицирования персонала. По своей чувствительности и специфичности ПЦР приравнивается к «золотому стандарту». Однако, стоимость коммерчески доступных наборов высока, поэтому этот фактор ограничивает широкое использование ПЦР-метода в ветеринарных лабораториях Республики Казахстан. Целью настоящих исследований является разработка ПЦР протокола, обладающего высокой специфичностью и чувствительностью для выявления бруцелл.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы

В работе были использованы 56 штаммов бруцелл: *B. abortus* - 20 штаммов; *B. melitensis* – 22 штамма; *B. suis* – 11 штаммов; *B. canis* - 2 штамма; *B. ovis* – 1 штамм, а также штаммы гетерологичных микроорганизмов, вызывающие инфекционные заболевания животных: 2 - *L. monocytogenes*, 3 - *P. multocida*; 1 - *C. fetus*; 1 - *C. coli*; 3 - *E. coli*; 3 - *Salmonella spp.*, сапрофитные микроорганизмы: 6 - *Lactobacillus spp.*; 2 - *Enterococcus spp.*; включая генетически близкий *Ochrobactrum thiophenivorans*. Родовая принадлежность штаммов бруцелл подтверждена на основе анализа нуклеотидной последовательности *16S rRNA* гена. Видовая принадлежность штаммов бруцелл была подтверждена с использованием мультиплексной ПЦР-реакции – «Bruce-ladder» [11].

Электрофоретический анализ продуктов амплификации

Анализ амплифицированных целевых фрагментов ДНК проводили методом разделения фрагментов ДНК в агарозном геле (концентрация агарозы от 1-2%, в зависимости от длины анализируемого фрагмента), в присутствии интеркалирующего агента – бромистого этидия, который был использован с целью дальнейшей визуализации ДНК. Документирование полученных результатов проводили с использованием системы документаций гелей Gel Doc (Bio-Rad), с программным обеспечением QuantityOne (Bio-Rad). Размеры молекул анализируемых образцов ДНК определяли путем сопоставления их

электрофоретической подвижности в геле с подвижностью маркеров – фрагмент ДНК известной молекулярной массы.

Дизайн и конструирование праймеров

Конструирование специфических праймеров проводили с использованием программ Primer Select (DNASTAR). В качестве генетического маркера была выбрана нуклеотидная последовательность гена *omp2*. Предварительную оценку специфичности праймеров и ампликонов проводили с использованием BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Выделение ДНК

Бактерии культивировались на жидких питательных средах, после этого штаммы бруцелл были инактивированы добавлением равного объема хлороформа. Суспензию бактериальных клеток центрифугировали при 10 000 g в течение 10 минут, надосадочную жидкость удаляли, осадок клеток использовали для выделения ДНК методом фенол-хлороформной экстракции, описанным К. Wilson [12]. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре NanoDrop 1000.

Постановка ПЦР

Реакция амплификации была выполнена в общем объеме 25 мкл. Реакционная смесь включала праймеры 10 пмоль каждого, 1Ед. Taq DNA Polymerase (Fermentas); 0,2 mM каждого дНТФ; 1-х ПЦР буфер (Fermentas, 10 mM Tris-HCl (pH 8,8 при 25°C), 50 mM KCl, 0,08% (объем/объем) Nonidet P40), MgCl₂ в концентрациях от 1,5 до 3,0 mM. Оптимизацию температуры отжига праймеров проводили в градиенте от 57 до 65°C, используя амплификатор CFX96 (BioRad).

Определение чувствительности и оценка специфичности

Определение чувствительности разработанного протокола ПЦР было выполнено методом постановки ПЦР на ряде двукратных разведений образцов ДНК *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis* и *B. ovis* в концентрациях от 5 нг до 1,12 фг (фемтограмм 10¹⁵ грамм). ПЦР-реакцию выполняли по оптимизированным условиям.

Специфичность протокола определяли методом постановки ПЦР на контрольных образцах ДНК бактерий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность и чувствительность ПЦР реакции во многом зависит от праймеров [13]. Подбор праймеров был осуществлен к нуклеотидной последовательности *omp2* гена, кодирующий белок внешней мембраны [14]. Данный регион встречается у всех видов бруцелл, достаточно консервативен и неоднократно использовался в ПЦР для диагностики бруцеллеза [15, 16].

Анализ нуклеотидной последовательности гена *omp2* позволил подобрать праймеры Omp2a-AB-F 5'- ttcgatcgctggtggtgttg-3' и Omp2a-AB-R 5' -gtcttgccccagtcgtcat -3'. Праймеры были синтезированы в лаборатории органического синтеза РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК и были использованы для оптимизации условий ПЦР реакции.

Важными компонентами в стратегии повышения специфичности и чувствительности ПЦР является оптимизация концентрации ионов магния и температуры отжига праймеров [17]. Несмотря на огромный выбор программного обеспечения, позволяющего теоретически выбрать оптимальную температуру отжига праймеров и состав буферной системы, оптимальные их значения приходится определять эмпирическим путем.

Температура отжига праймеров зависит от нуклеотидного состава и длины праймеров. Существует множество алгоритмов расчета оптимальной температуры отжига праймеров [18], при этом расчетные значения могут отличаться на десятки градусов

Цельсия. Анализ подобранных праймеров в программном обеспечении Beacon Designer 8.2 (Premier Biosoft), PrimerSelect (DNAStar) и интернет ресурса PrimerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) позволил определить температуру плавления для прямого и обратного праймера: 67,6/68,7°C, 57/52°C и 61,29/59,7°C соответственно.

Учитывая большой разброс в расчетных параметрах температуры, при оптимизации условий ПЦР был использован интервал температур от 57 до 65°C и содержанием ионов магния от 1,5 до 3,0 mM. В качестве отрицательного контроля была использована ДНК генетически близкого вида *O. thiophenivorans* в концентрации 20 нг в реакционной смеси, за положительный контроль была взята ДНК *B. abortus* в концентрации 2 нг в ПЦР смеси.

Из результатов, приведенных на рисунке 2, видно, что праймеры работают в широком температурном диапазоне (65-57°C) при концентрациях магния от 1,5 mM до 3,0 mM, о чем свидетельствует наличие в дорожках специфического ПЦР-продукта молекулярной массой 246 п.н. в образцах, содержащих ДНК *B. abortus*. Однако, в положительном контроле можно наблюдать появление неспецифических фрагментов при концентрации ионов магния 3,0 mM. На рисунке 1 видно, что увеличение температуры приводит к уменьшению эффективности ПЦР-реакции, о чем свидетельствует градиент интенсивности окраски целевых бендов. В дорожках с отрицательным контролем неспецифические ПЦР-продукты менее 200 п.н. выявлены при низких температурах. Так, при концентрации ионов магния 2 mM неспецифические ПЦР-продукты выявлены при температурах 57-60,2°C, при 2,5 mM MgCl₂ в температурном градиенте 62-57°C, в концентрациях 3,0 mM неспецифические продукты регистрируются на всем протяжении температурного градиента. Чтобы понизить вероятность неспецифического отжига праймеров, была выбрана оптимальная температура отжига праймеров 62°C, при концентрации ионов магния 2,0 mM.

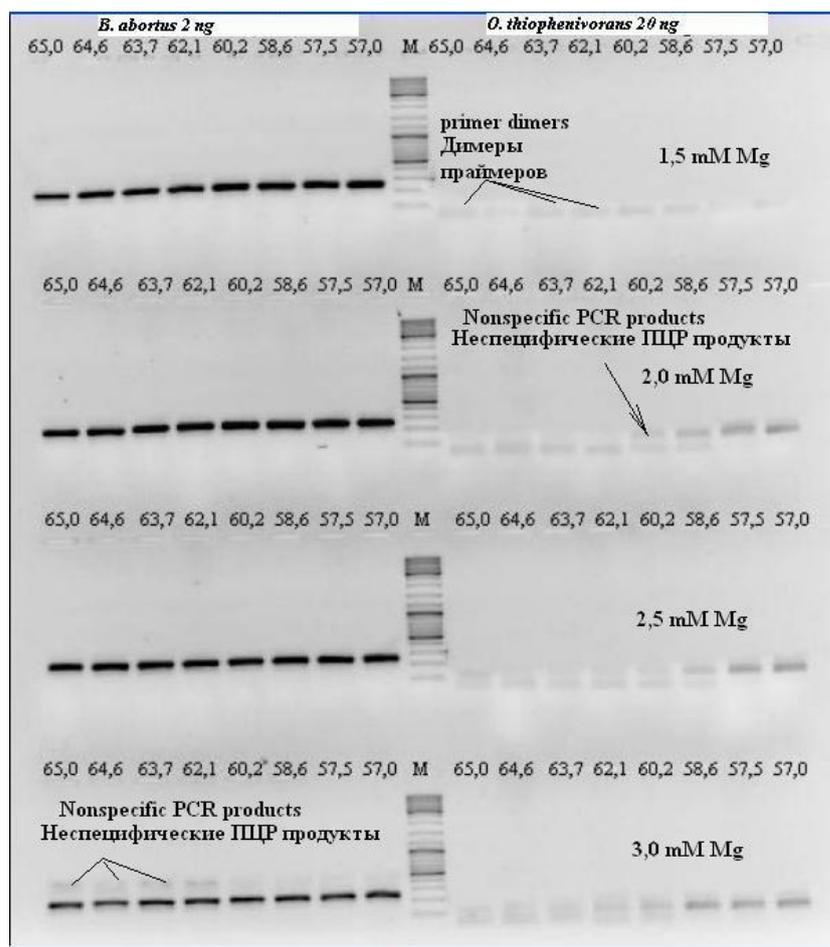
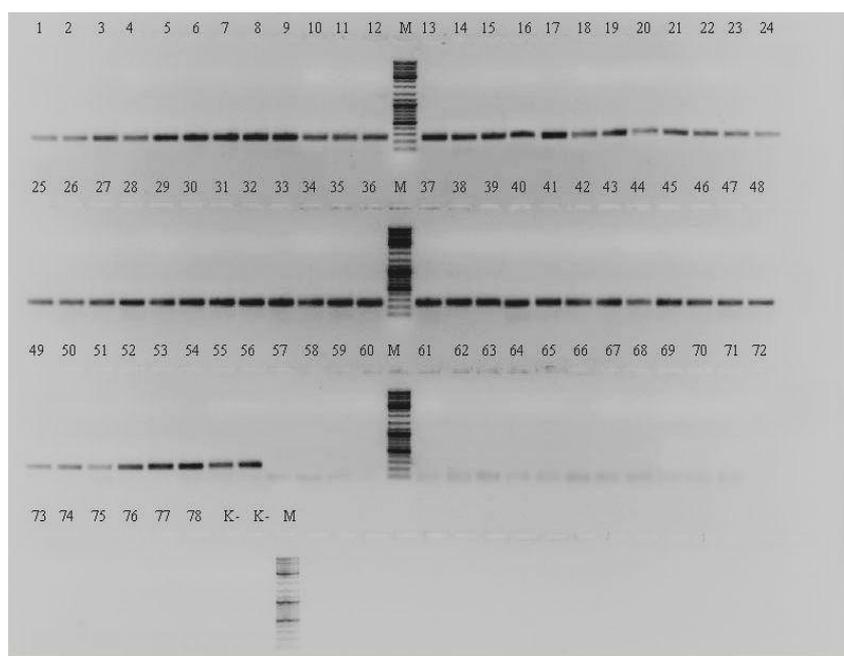


Рисунок 1 – Результаты оптимизации условий ПЦР амплификации
Figure 1 - Results of optimization of PCR amplification conditions

Как видно из рисунка 1, установлена прямая корреляция между концентрацией ДНК и уровнем интенсивности окраски ПЦР-продуктов. Наименьшая концентрация ДНК, при которой отчетливо регистрируется ПЦР-продукт, составляет 76 фг. Таким образом, чувствительность ПЦР-протокола составляет не менее 76 фг или около 21 геномной копии ДНК. Расчет копийности ДНК проводили согласно данным Sidor I.F. [19].

Специфичность ПЦР-протокола была проверена на 78 коллекционных образцах ДНК (рисунок 2). ПЦР была выполнена в общем объеме 25 мкл. В состав реакционной смеси входили: праймеры по 10 пмоль каждого; ДНК бруцелл в концентрации 2-4 нг и ДНК остальных видов бактерий в концентрации не менее 20 нг в реакции (таблица 1); 1Ед. Taq DNA Polymerase (Fermentas); 0,2 мМ каждого дНТФ; 1-х ПЦР буфер (Fermentas, 10 мМ Tris-HCl (pH 8,8 при 25°C), 50 мМ KCl, 0,08% (объем/объем) Nonidet P40); ионы магния от 2,0 мМ; воды до 25 мкл.



1-22 - *B. Abortus*; 23-42 - *B. Melitensis*; 43-53 - *B. Suis*; 54-55 - *B. Canis*; 56 - *B. Ovis*; 57-58 - *L. Monocytogenes*; 59-61 - *P. multocida*; 62 - *C. fetus*; 63 - *C. coli*; 64-66 - *E. coli*; 67-69 - *Salmonella spp.*; 70-75 - *Lactobacillus spp.*; 76-77 - *Enterococcus spp.*; 78 - *O. Thiophenivorans*; M – маркер молекулярного веса (Fermentas) (100 – 10000 п.н., от 100-1000 шаг 100 п.н.); M - molecular-weight size marker (Fermentas) (100 – 10000 b.p., 100-1000 with 100 b.p. increment)

Рисунок 2 – Электрофорерограмма оценки специфичности разработанного протокола выявления бруцелл

Figure 2 - Electropherogram of the specificity evaluation of the developed protocol for the detection of *Brucella*

Из результатов, приведенных на рисунке 2, видно, что разработанный ПЦР-протокол позволяет амплифицировать фрагмент целевого гена *omp2* только в образцах, содержащих ДНК бруцелл. Отсутствие неспецифических ПЦР-продуктов в образцах ДНК посторонней микрофлоры доказывает специфичность отжига праймеров на целевые фрагменты ДНК, даже при содержании посторонней ДНК матрицы в концентрации от 2 до $8 \cdot 10^6$ геномных эквивалента (расчет количества копий ДНК проводили с использованием интернет ресурса <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>). Полученные результаты указывают на высокую специфичность разработанного протокола.

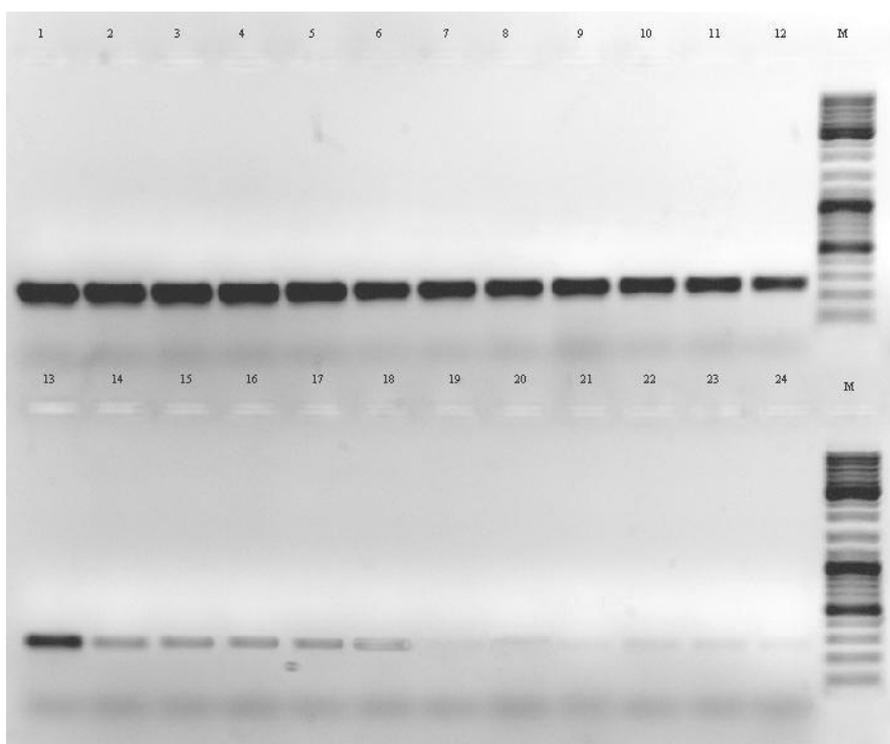
С целью оценки чувствительности разработанного протокола было проведено двукратное разведение ДНК 5 видов бруцелл (таблица 1). При анализе использована программа ПЦР амплификации и состав реакционной смеси, как и при оценке специфичности ПЦР-протокола.

Таблица 1 - Концентрация ДНК при оценке чувствительности ПЦР

Table 1 - DNA concentration and evaluation of PCR sensitivity

Номер п/п number	Концентрация ДНК (нг) DNA concentration(ng)	Номер п/п number	Концентрация ДНК (нг) DNA concentration(ng)	Номер п/п number	Концентрация ДНК (нг) DNA concentration(ng)
1	5	9	0,01953125	17	7,62939E-05
2	2,5	10	0,009765625	18	3,8147E-05
3	1,25	11	0,004882813	19	1,90735E-05
4	0,625	12	0,002441406	20	9,53674E-06
5	0,3125	13	0,001220703	21	4,76837E-06
6	0,15625	14	0,000610352	22	2,38419E-06
7	0,078125	15	0,000305176	23	1,19209E-06
8	0,0390625	16	0,000152588	24	Отриц. контроль

По окончании ПЦР амплификации проводили электрофоретический учет результатов. На рисунке 3 представлены результаты оценки чувствительности протокола с использованием ДНК *B abortus*.



1-24 - образцы согласно таблице 1; М – маркер молекулярного веса (Fermentas) (100 – 10000 п.н., от 100-1000 шаг 100 п.н.)

Рисунок 3 – Электрофореграмма оценки чувствительности разработанного протокола ПЦР

Samples 1-24 are according to Table 1; M - molecular-weight size marker (Fermentas) (100 – 10000 b.p., 100-1000 with 100 b.p. increment)

Figure 3 - Electrophoregram evaluation of PCR sensitivity of the developed protocol

Описанные в литературе протоколы выявления бруцелл обладают различной чувствительностью. Например, ПЦР в режиме реального времени, основанный на специфической амплификации IS711, предложенный Probert с соавторами, позволяет выявлять не менее 150 фг [20]. Предел чувствительности - 2000 фг для *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* и 200 фг - для *B. neotomae* и *B. ovis* был описан Bogdanovich с соавторами [21]. Чувствительность разработанного нами протокола ПЦР составила 76 фг, что является достаточным для его использования при выявлении бруцелл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ежегодно на территории Казахстана выявляются около 80 тыс. животных, положительно реагирующих в серологических реакциях. Продукция от этих животных отправляется на техническую переработку или уничтожается. Патологический материал от данных животных подлежит микробиологическим исследованиям. Диагноз на бруцеллез считается установленным после бактериологического выявления возбудителя бруцеллеза. Стандартными микробиологическими методами с постановкой биопробы продолжительность постановки диагноза составляет до 90 дней. ПЦР позволяет выявить генетический материал, а соответственно и самого возбудителя в течение одного рабочего дня. Ранняя достоверная диагностика позволит сократить сроки ликвидации бруцеллеза, тем самым снизив прямые и косвенные затраты на борьбу с заболеванием. Разработанный ПЦР-протокол выявления бруцелл обладает 100% специфичностью и чувствительностью - около 21 геномной копии ДНК. Разработанный протокол перспективен для последующей разработки ПЦР тест-системы для диагностики бруцеллеза.

Финансирование

Работа выполнялась по проекту «Разработка тест систем на основе ПЦР для выявления и видовой идентификации бруцелл» в рамках реализации Межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Corbel M.J. Brucellosis: an overview // *Emerging Infectious Diseases*. - 1997. - №3. - P.213–221.
2. Asaad A.M., Alqahtani J.M. Serological and molecular diagnosis of human brucellosis in Najran, Southwestern Saudi Arabia // *Journal of Infection and Public Health*. – 2012. - №5. - P.189-194.
3. Xavier M.N., Paixão T.A., den Hartigh A.B., Tsolis R.M. and Santos R.L. Pathogenesis of *Brucella* spp. // *The Open Veterinary Science Journal*. – 2010. - №4. – P. 109-110.
4. Poester P.P., Nielsen K., Samartino L.E. and Yu W.L. Diagnosis of Brucellosis // *The Open Veterinary Science Journal*. – 2010. - №4. - P. 46-60.
5. World Health Organization, “Fact Sheet N173”. – Geneva, 1997.
6. Pappasa Dr G., Papadimitrioub P., Akritidisc N., Christoua L., Tsianosa E.V. The new global map of human brucellosis // *The Lancet Infectious Diseases*. - 2006. - Vol. 6. - P. 91-99.
7. Grushina T., Atshabar B., Syzdykov M., Daulbaeva S., Tserelson L., Kuznetsov A., Baramova Sh., Seidakhmetova R., Sultanov A., Ospanov Y., Mikhalev A., Amireev S., Ospanov K., Kazakov S., Mizanbayeva S., Myrzabekov A., Rementsova M., Berezovskiy D., Akasheva R., Khasenov M., Nussipova Zh., Yu W., Nielsen K. Universal indirect enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring of human and animal brucellosis in Kazakhstan // *Vaccine*. - 2010. – Vol. 5. – P. 46-48.
8. Кузнецов А.Н., Сыздыков М.С., Дуйсенова А.К., Абуова Г.Н., Бердалиева Ф.А., Даулбаева С.Ф., Садовская В.П. Информационное обеспечение эпидемиологического

надзора за бруцеллёзом с использованием ГИС-технологий // Центрально-Азиатский научно-практический журнал по общественному здравоохранению. - 2011. – №4.

9. Yagupsky P. Detection of brucellae in blood cultures // *J Clin Microbiol.* - 1999. - Vol. 37. - P. 3437-3442.

10. Kattar M.M., Zalloua P.A., Araj G.F, Samaha-Kfoury J., Shbaklo H., Kanj S.S., Khalife S., Deeb M. Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis // *Diagn Microbiol Infect Dis.* - 2007. - Vol. 59. - P. 23-32.

11. Garcia-Yoldi D., Marin C.M., Miguel M.J., Munoz P.M., Vizmanos J.L., Lopez-Goni I. Multiplex PCR Assay for the Identification and Differentiation of all Brucella Species and the Vaccine Strains Brucella abortus S19 and RB51 and Brucella melitensis Rev1 // *Clinical Chemistry.* - 2006. - Vol. 52. - P. 779-781.

12. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // *Current Protocols in Molecular Biology.* - 1987. - P. 650.

13. Elnifro E.M., Ashshi A.M., Cooper R.J., Klapper P.E. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology // *Clin Microbiol Rev.* - 2000. - Vol. 13. - P. 559-570.

14. Marquis H., Ficht T.A. The omp2 gene locus of Brucella abortus encodes two homologous outer membrane proteins with properties characteristic of bacterial porins // *Infect Immun.* - 1993. - Vol. 61. - P. 3785-3790.

15. Mukherjee F., Jain J., Patel V., Nair M. Multiple genus-specific markers in PCR assays improve the specificity and sensitivity of diagnosis of brucellosis in field animals // *J Med Microbiol.* - 2007. - Vol. 10. - P. 1309-1316.

16. El Kholly A.A1., Gomaa H.E., El Anany M.G., Abd El Rasheed E. Diagnosis of human brucellosis in Egypt by polymerase chain reaction // *East Mediterr Health J.* – 2009. - Vol. 5. - P.1068-1074.

17. Roux K.H. Cold Optimization and troubleshooting in PCR // *Spring Harbor protocols.* – 2009. - P. 380.

18. Chen H., Zhu G. Computer program for calculating the melting temperature of degenerate oligonucleotides used in PCR or hybridization // *Biotechniques.* - 1997. - Vol. 22. - P.1158-1160.

19. Sidor I.F., Dunn J.L., Tsongalis G.J., Carlson J., Frasca S. Jr. A multiplex real-time polymerase chain reaction assay with two internal controls for the detection of Brucella species in tissues, blood, and feces from marine mammals // *Vet Diagn Invest.* - 2013. - Vol. 25. - P. 72-81.

20. 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. - Vol. 42. - P. 1290-1293.

21. Bogdanovich T., Skurnik M., Luëbeck P.S., Ahrens P., Hoorfar J. Validated 5' Nuclease PCR Assay for rapid identification of the genus Brucella // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. - Vol. 42. - P. 2261–2263.

22. Newby D.T., Hadfield T.L., Roberto F.F. Real-time PCR detection of Brucella abortus: a comparative study of SYBR green I, 59-exonuclease, and hybridization probe assays // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. - Vol. 69. - P. 4753-4759.

REFERENCES

1. Corbel M.J. Brucellosis: an overview. *Emerging Infectious Diseases*, 1997, no. 3, pp. 213–221.

2. Asaad A.M., Alqahtani J.M. Serological and molecular diagnosis of human brucellosis in Najran, Southwestern Saudi Arabia. *Journal of Infection and Public Health*, 2012, no. 5, pp.189-194. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2012.02.001>

3. Xavier M.N., Paixão T.A., den Hartigh A.B., Tsolis R.M. and Santos R.L. Pathogenesis of *Brucella* spp. *The Open Veterinary Science Journal*, 2010, vol. 4, pp. 109-110.
4. Poester P.P., Nielsen K., Samartino L.E. and Yu W.L. Diagnosis of Brucellosis. *The Open Veterinary Science Journal*, 2010, no. 4, pp. 46-60. Available at: <http://dx.doi.org/46-601874-3188/10>
5. *World Health Organization*, "Fact Sheet N173". Geneva, 1997.
6. Pappasa Dr G., Papadimitrioub P., Akritidisc N., Christoua L., Tsianosa E.V. The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 2006, vol. 6, pp 91-99.
7. Grushina T., Atshabar B., Syzdykov M., Daulbaeva S., Tserelson L., Kuznetsov A., Baramova Sh., Seidakhmetova R., Sultanov A., Ospanov Y., Mikhalev A., Amireev S., Ospanov K., Kazakov S., Mizanbayeva S., Myrzabekov A., Rementsova M., Berezovskiy D., Akasheva R., Khasenov M., Nussipova Zh., Yu W., Nielsen K. Universal indirect enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring of human and animal brucellosis in Kazakhstan. *Vaccine*, 2010, vol 5, pp. 46-48. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.052>.
8. Kuznecov A.N., Syzdykov M.S., Dujsenova A.K., Abuova G.N., Berdalieva F.A., Daulbaeva S.F., Sadvorskaja V.P. Informacionnoe obespechenie jepidemiologicheskogo nadzora za brucelljozom s ispol'zovaniem GIS-tehnologij [Information support for epidemiological surveillance of brucellosis using GIS technology]. *Central'no-Aziatskij Nauchno-Prakticheskij Zhurnal po obshhestvennomu zdravoohraneniu*, 2011, Vypusk 10, no. 4.
9. Yagupsky P. Detection of brucellae in blood cultures. *J Clin Microbiol*, 1999, vol. 37, pp. 3437-3442.
10. Kattar M.M., Zalloua P.A., Araj G.F., Samaha-Kfoury J., Shbaklo H., Kanj S.S., Khalife S., Deeb M. Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007, vol. 59, pp. 23-32.
11. Garcia-Yoldi D., Marin C.M., Miguel M.J., Munoz P.M., Vizmanos J.L., Lopez-Goni I. Multiplex PCR Assay for the Identification and Differentiation of all *Brucella* Species and the Vaccine Strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clinical Chemistry*, 2006, vol. 52, pp. 779-781.
12. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*, 1987. pp. 650.
13. Elnifro E.M., Ashshi A.M., Cooper R.J., Klapper P.E. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev*, 2000, vol. 13, pp. 559-570.
14. Marquis H., Ficht T.A. The omp2 gene locus of *Brucella abortus* encodes two homologous outer membrane proteins with properties characteristic of bacterial porins. *Infect Immun*, 1993, vol. 61, pp. 3785-3790.
15. Mukherjee F., Jain J., Patel V., Nair M. Multiple genus-specific markers in PCR assays improve the specificity and sensitivity of diagnosis of brucellosis in field animals. *J Med Microbiol*, 2007, vol. 10, pp.1309-1316.
16. El Kholly A.A1., Gomaa H.E., El Anany M.G., Abd El Rasheed E. Diagnosis of human brucellosis in Egypt by polymerase chain reaction. *East Mediterr Health J*, 2009, vol. 5, pp.1068-1074.
17. Roux K.H. Cold Optimization and troubleshooting in PCR. *Spring Harbor protocols*, 2009, pp. 380.
18. Chen H., Zhu G. Computer program for calculating the melting temperature of degenerate oligonucleotides used in PCR or hybridization. *Biotechniques*, 1997, vol. 22, pp. 1158-1160.
19. Sidor I.F., Dunn J.L., Tsongalis G.J., Carlson J., Frasca S.Jr. A multiplex real-time polymerase chain reaction assay with two internal controls for the detection of *Brucella* species in tissues, blood, and feces from marine mammals. *Vet Diagn Invest*, 2013, vol. 25, pp. 72-81.

20. 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, vol. 42, pp. 1290-1293.

21. Bogdanovich T., Skurnik M., Luëbeck P.S., Ahrens P., Hoofar J. Validated 5' Nuclease PCR Assay for rapid identification of the genus *Brucella*. *J. Clin. Microbiol*, 2004, vol. 42, pp. 2261–2263.

22. Newby D.T., Hadfield T.L., Roberto F.F. Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR green I, 59-exonuclease, and hybridization probe assays. *Appl. Environ. Microbiol*, 2003, vol. 69, pp. 4753-4759.

ТҮЙІН

Қазақстан аумағында жыл сайын шамамен 80 мың жануар серологиялық реакциядан оң нәтиже көрсетеді. Бұл жануарлардан алынған өнім техникалық өңдеуге жіберіледі немесе жойылады. Аталған жануарлардан алынған патологиялық материал микробиологиялық зерттеулерден өту тиіс. Бруцеллез диагнозы қоздырушыны бактериологиялық жолмен анықтағаннан кейін қойылады. Биологиялық сынама қойылатын стандартты микробиологиялық әдістермен диагноз қою уақыты 90 күнге дейін барады. ПТР генетикалық материалды, яғни қоздырғыштың өзін бір жұмыс күн ішінде анықтауға мүмкіндік береді. Ерте және сенімді балау бруцеллез ауруын жою мерзімін, нәтижесінде аурумен күресудің тікелей және жанама шығынын азайтуға мүмкіндік береді. Құрастырылған бруцелланы анықтау протоколының телімдігі мен сезімталдығы 100%, яғни шамамен 21 ДНҚ көшірмесі. Құрастырылған протоколдың кейінгі бруцеллез ауруын анықтайтын ПТР тест жүйесін құрастыру үшін маңызы зор.

Кілтті сөздер: бруцеллез, ПТР, диагностика, хаттама, штамм, арнайылық.