

DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-88-93

УДК 616.98:576.841.93

Н.И. Хаммадов¹, К.А. Осянин¹, К.В. Усольцев¹, Т.Х. Фаизов¹, А.В. Хаммадова², Э.А. Шуралев^{1,2,3}

МАРКЕРНЫЕ ЛОКУСЫ ГЕНОМА БРУЦЕЛЛ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ПЦР ИНДИКАЦИИ ПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ

¹ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Казань, Российская Федерация;²ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Российская Федерация; ³Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Казань, Российская Федерация

Цель работы направлена на разработку алгоритмов дифференциальной ПЦР индикации бактерий рода *Brucella* с использованием баз данных их геномов. **Материалы и методы.** В работе использовались ресурсы Национального центра биотехнологической информации (NCBI) и программные утилиты «BLAST» и «Vector NTI 9.1.0». Для ПЦР амплификации использовались нуклеиновые кислоты *B. suis*, *B. abortus*, *B. melitensis*, а также плазмидная ДНК с маркерными вставками. **Результаты и обсуждение.** Проанализированы последовательности генов бруцелл, одни из которых имеются у бактерий рода *Brucella*, другие лишь у представителей вида *B. melitensis*, третьи лишь у представителей вида *B. abortus*. В результате дизайна праймеров и зондов для индикации бактерий рода *Brucella* и представителей видов *B. melitensis* и *B. abortus* установлены критерии, позволяющие амплифицировать маркерные последовательности этих бактерий, с одновременной их дифференциацией в условиях одной реакции. Определение штаммовых различий в пределах одного вида бруцелл описано в методике мультилокусного VNTR анализа, а профили тандемных повторов различных штаммов *B. melitensis* и *B. abortus* имеются в открытом доступе. Для контроля хода амплификации разработан положительный контроль, имеющий нуклеотидную последовательность всех маркерных областей. По тексту статьи указаны все нуклеотидные последовательности праймеров, зондов и положительного контроля, что предоставляет возможность самостоятельно их приобретения в компетентных организациях.

Ключевые слова: бруцеллы, индикация, дифференциация, вид, штамм, ПЦР, MLVA

Корреспондирующий автор: Хаммадов Наиль Ильдарович, e-mail: nikhammadov@mail.ru.

Для цитирования: Хаммадов Н.И., Осянин К.А., Усольцев К.В., Фаизов Т.Х., Хаммадова А.В., Шуралев Э.А. Маркерные локусы генома бруцелл для дифференциальной ПЦР индикации патогенных штаммов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 3:88–93. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-88-93

N.I. Khammatov¹, K.A. Osyanin¹, K.V. Usol'tsev¹, T.Kh. Faizov¹, A.V. Khammatova², E.A. Shuralev^{1,2,3}Marker Loci in *Brucella* Genome for Differential PCR Indication of Pathogenic Strains¹Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation; ²Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation; ³Kazan State Medical Academy, Kazan, Russian Federation

Abstract. Objective of this work was to develop the algorithms for differential PCR indication of *Brucella* genus strains using databases of their genomes. **Materials and methods.** Resources of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and BLAST and Vector NTI 9.1.0 software utilities. For PCR amplification, *B. suis*, *B. abortus*, *B. melitensis* nucleic acids, as well as plasmid DNA with marker insertions were used. **Results and conclusions.** We assessed *brucella* gene sequences, some of which are found in *Brucella* genus bacteria, others only in representatives of *B. melitensis*, and the third ones – only in representatives of *B. abortus*. As a result of primers and probes designing for indication of *Brucella* genus bacteria and representatives of *B. melitensis* and *B. abortus* species, criteria for marker sequence amplification have been established. These criteria provide for simultaneous differentiation in a single reaction. The determination of strain differences within one species of *Brucella* is described in multilocus VNTR assay technique, and the profiles of tandem repeats of various *B. melitensis* and *B. abortus* strains are available in the public domain. To monitor the progress of amplification, a positive control has been developed that has the nucleotide sequence of all marker regions. The text of the paper discloses all the nucleotide sequences of primers, probes and positive control, which makes it possible to independently acquire them in competent organizations.

Key words: *Brucella*, indication, differentiation, species, strain, PCR, MLVA.

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

Corresponding author: Nail' I. Khammatov, e-mail: nikhammadov@mail.ru.

Citation: Khammatov N.I., Osyanin K.A., Usol'tsev K.V., Faizov T.Kh., Khammatova A.V., Shuralev E.A. Marker Loci in *Brucella* Genome for Differential PCR Indication of Pathogenic Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; 3:88–93. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2018-3-88-93

Received 09.07.18. Revised 17.08.18. Accepted 24.08.18.

Род *Brucella* объединяет девять самостоятельных видов, вызывающих заболевание у различных видов животных и человека. Так, в данный род входят следующие биологические виды: *B. melitensis*,

B. abortus, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis* и *B. microti* [4]. Обнаружение в скотоводческом хозяйстве *B. abortus*, овцеводческом хозяйстве и на козьях фермах *B. melitensis*, на

свинокомплексе *B. suis* является причиной неблагополучия по бруцеллезу (СП 3.1.7.2613-10).

Особую актуальность представляет индикация особо опасного вида *B. melitensis*, представляющего опасность для человека. При этом наиболее высокий уровень заболеваемости по России, вызванный *B. melitensis*, отмечается в Северо-Кавказском и Южном федеральных округах [1, 5]. Ограничения, накладываемые на продукцию животноводства при бруцеллезу, а также подходы к его ликвидации, зависят от биологического вида возбудителя [8]. Быстрая и точная индикация вида возбудителя возможна при использовании ПЦР, основу которой составляет биоинформационный анализ [2]. Мультипраймерный подход при постановке ПЦР позволяет идентифицировать не только виды, но и штаммы различных патогенов [3]. Кроме видовой и родовой индикации бруцелл есть методики дифференциации различных штаммов одного вида, наиболее информативной методикой является анализ «вариабельного количества tandemных повторов» – VNTR или VNTR (variable number tandem repeats) [13, 14]. Цель исследования направлена на разработку алгоритмов дифференциальной ПЦР индикации бактерий рода *Brucella* с использованием баз данных их геномов.

Материалы и методы

Использованная в данной работе методология биоинформационного анализа геномов различных видов и штаммов бактерий рода *Brucella* с последующим дизайном праймеров и зонда имеет общие принципы, которые используются и для других микроорганизмов [6, 11]. Нуклеотидные последовательности бруцелл определены путем поисковых запросов баз данных ресурсов NCBI (Национального центра биологической информатизации). Специфичность и видовое (штаммовое) разнообразие выявляемых бруцелл (с применением анализируемого генетического маркера) определяли в программной утилите «BLAST», а дизайн нуклеотидных последовательностей праймеров и зондов проводили используя программу «Vector NTI 9.1.0» (Invitrogen Corporation). При этом учитывали возможность амплификации видовых и родových ДНК-маркеров в одной реакции. В ходе дизайна праймеров и зондов конструировали также нуклеотидную последовательность, содержащую видовые и родových ДНК-маркеры для контроля их амплификации.

Для ПЦР амплификации использовались нуклеиновые кислоты положительной плазмидной ДНК и ДНК, выделенной из бактериальных культур *B. suis*, *B. abortus*, *B. melitensis*. Выделение нуклеиновых кислот производили набором «МАГНО-сорб» вариант 100-200 согласно инструкции производителя. ПЦР осуществляли на амплификаторе С1000 с оптическим блоком CFX96 (BioRad). Методика проведения ПЦР амплификации аналогична описанной ранее [11], со следующими модификациями: зонд для

ПЦР, прямой и обратный праймеры применялись индивидуально (специфично) для каждого вида ПЦР; реакционная смесь для MLVA содержала 10x буфера для ПЦР с красителем EvaGreen. Температура отжига праймеров при определении видовой/родовой принадлежности составляла 60 и 51 °C для VNTR анализа, при этом детекция результата ПЦР (флуоресценции) происходит на каждом цикле ПЦР, при 60 °C по каналам FAM, Rox и R6G, для VNTR анализа при 51 °C по каналу FAM.

Результаты и обсуждение

Для подбора генов и локусов ДНК, пригодных для использования при индикации различных видов штаммов бруцелл, анализировали геномы следующих микроорганизмов: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* и *B. microti*. Результатом такого анализа было определение следующих генов: locus «BSCP31» (шифр на сайте NCBI – KX529834) – для индикации рода *Brucella*; locus «BAW_20982» (расположен во второй хромосоме в позиции с 1003355 по 1004575 bp штамм Wisconsin) – для индикации *B. abortus*; locus «C0R52_12390» (локализован во второй хромосоме в позиции с 906042 по 906524 bp штамм B3) – для индикации *B. melitensis*.

В пределах представленных выше локусов произведен дизайн праймеров и зондов для ПЦР (таблица), при этом предъявлялись следующие требования: одинаковая температура плавления праймеров ($\pm 0,5$ °C); минимум димеров и вторичных структур; минимум GC на 3' конце; для зонда – отсутствие G на 5' конце (первый нуклеотид).

Локусы, применяемые при VNTR анализе бруцелл, имеются в открытом доступе на сайте <http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/query.php>, нуклеотидная последовательность этих локусов определена в базах данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/puccore>), основой такого поиска являлись нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для VNTR анализа [7]. Для удобства постановки реакции выполнен редизайн праймеров, которые представлены в таблице с обозначением «Bru».

Разработанные праймеры для родовой и видовой индикации бруцелл имеют температуру плавления ($59,73 \pm 0,23$) °C, а праймеры для определения количества tandemных повторов имеют температуру плавления ($50,83 \pm 0,27$) °C, это позволяет проводить амплификацию каждой группы праймеров при единых условиях реакции (60 °C – отжиг праймеров при индикации бруцелл и 51 °C – отжиг праймеров при VNTR анализе).

Первым этапом работы при индикации вида и штамма бруцелл является определение видовой принадлежности исследуемого образца, после чего можно осуществить MLVA (мультилокусный VNTR анализ) для определения штаммов *B. abortus* и *B. melitensis*. Повторяющиеся последовательности ДНК могут содержать точечные замены. Размер ам-

Нуклеотидная последовательность разработанных праймеров и зондов для ПЦР

Nucleotide sequence of the designed primers and probes for PCR

Определяемый патоген / VNTR маркер	Кодировка праймера / зонда	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
род <i>Brucella</i>	Bru F	tcgaatggctcggttgcca
	Bru R	egggtaaagcgtgccagaa
	Bru P	(Fam)cgatcaagtcggcgctctgga(BHQ1)
<i>B. abortus</i>	Bru abortus F	gcaatcgtcgtattgccactataatcat
	Bru abortus R	gacggcgcagttctcgaacaa
	Bru abortus P	(ROX)ccgaaaggatcagcgtgccagaa(BHQ2)
<i>B. melitensis</i>	Bru meli F	tgtttggcacctcggaacac
	Bru meli R	attcccgaagccgatagagtgtga
	Bru meli P	(R6G)tgaagcgtcgcagacaaatttgacttcc(BHQ2)
Bru4	VBru4F	ctgacgaaggaaggcaa
	VBru4R	aggcgtctggagattatcg
Bru6	VBru6F	gggatgtgtaggtaaatcg
	VBru6R	gcgtgacaatcgactttttg
Bru7	VBru7F	agctgacggggaagaacat
	VBru7R	ctttttcagtcaggcaaat
Bru8	VBru8F	attattcgcaggctctgga
	VBru8R	caaacagaaggtttccagct
Bru9	VBru9F	catggcggattcgttct
	VBru9R	gggagtatgtttgtgtgacatag
Bru11	VBru11F	gctgtgatctgacctgca
	VBru11R	ccagacaacaactacgtcct
Bru16	VBru16F	ggagttttgtgtcacaatgtt
	VBru16R	gccatgtttccggttgattat
Bru18	VBru18F	atgttagggcaataggcgag
	VBru18R	gatggttgagagcattgtgaag
Bru19	VBru19F	cgaccggaccatgtct
	VBru19R	tcaccgtaacgtcgtggat
Bru21	VBru21F	gctcatgcgcaacaaa
	VBru21R	atctcgtggtcgataatctcatt
Bru30	VBru30F	tgaccgcaaacacatattcc
	VBru30R	aatatgtgcagagcttcatgttc
Bru42	VBru42F	tcgcctcaactataaccgca
	VBru42R	accgcaaaattacgcatc
Bru43	VBru43F	tcaagcccgatatggagaat
	VBru43R	tccgctgcccataaac
Bru45	VBru45F	tcactctgctctcctctac
	VBru45R	gggtaaatcaatggcttgg
Bru55	VBru55F	aggctgttctgcatgtcttt
	VBru55R	tctggcgttcagtggttc

плифицируемого продукта складывается из «размера ампликона без повторов» и числа повторов «размера переменного участка», содержащегося в геноме конкретного штамма. Анализ количества таких повторов осуществляли путем определения размера ампликона (по результатам электрофореза). MLVA профиль (характеристика количества tandemных повторов по нескольким VNTR локусам) штаммов

и изолятов *B. abortus* и *B. melitensis* представлен по ссылке <http://vnivi.ru/images/mlva.xls>. Кроме того, в данном файле имеется возможность установления количества tandemных повторов по каждому из локусов анализируемого образца. Определение количества tandemных повторов в анализируемом локусе опирается на информацию о размере амплифицируемого фрагмента. Использование вышеуказанного документа сводится к введению установленного в результате электрофореза размера ампликона в соответствующую строку (строка соответствует анализируемому локусу, название локуса указано в столбце «D») столбца «F», количества tandemных повторов в анализируемом локусе документ рассчитает без участия пользователя (автоматически), результат расчета будет представлен в соответствующей строке (строка соответствует анализируемому локусу, название локуса указано в столбце «D») столбца «G». Получив данные о количестве tandemных повторов по каждому локусу, будет составлен MLVA профиль для анализируемого образца, а сопоставив его с имеющимися в том же документе MLVA профилями известных штаммов *B. abortus* и *B. melitensis*, можно установить MLVA-тип штамма в исследуемом образце.

Для контроля результата амплификации был создан положительный контроль, представляющий собой специфическую вставку (содержащую все маркерные локусы) в плазмидной ДНК. Нуклеотидная последовательность вышеупомянутой вставки, с направлением молекулы 5'→3' «5'tcgaatggctcggttgccagcaatgctgtattgccactataatcattgcttggcacctcggaaacaccgatcaagtcggcgctctggaccgaaaggatcagcgtgcccagaatgaagcgctgcagacaaatttgacttctctggcgcagctttaccggtgttcgagaactcgccgtctcaaacctatcggttctgggaatg3'» визуальна представлена на рис. 1, с отображением маркерных участков каждого праймера и зонда. ПЦР с таким контролем инициирует синтез ампликона 162–164 bp, на каждый из выявляемых маркеров.

Сконструированный в итоге плазмидный вектор «pAL2-T» с разработанной вставкой синтезирован по нашему заказу в ЗАО «Евроген». Данную плазмиду и ДНК бруцелл амплифицировали с разработанными выше праймерами и зондами. Результат амплификации олигонуклеотидов для индикации бактерий рода *Brucella* и определения их принадлежности к видам *B. melitensis* и *B. abortus* изображен на рис. 2 А, а рис. 2 В демонстрирует амплификацию ДНК бруцелл с праймерами для VNTR анализа в присутствии красителя EvaGreen.

Амплификация с праймерами для индикации рода *Brucella* и видов *B. abortus*, *B. melitensis* и ДНК положительного контроля среагировала положительно, что подтверждает правильность составления реакционной смеси и корректность режимов ПЦР. В результате амплификации с ДНК *B. suis* положительный результат установлен лишь с родовыми праймерами и зондом (по каналу FAM), так как в геноме данного микроорганизма нет маркерных участков характерных для *B. abortus* и *B. melitensis*.

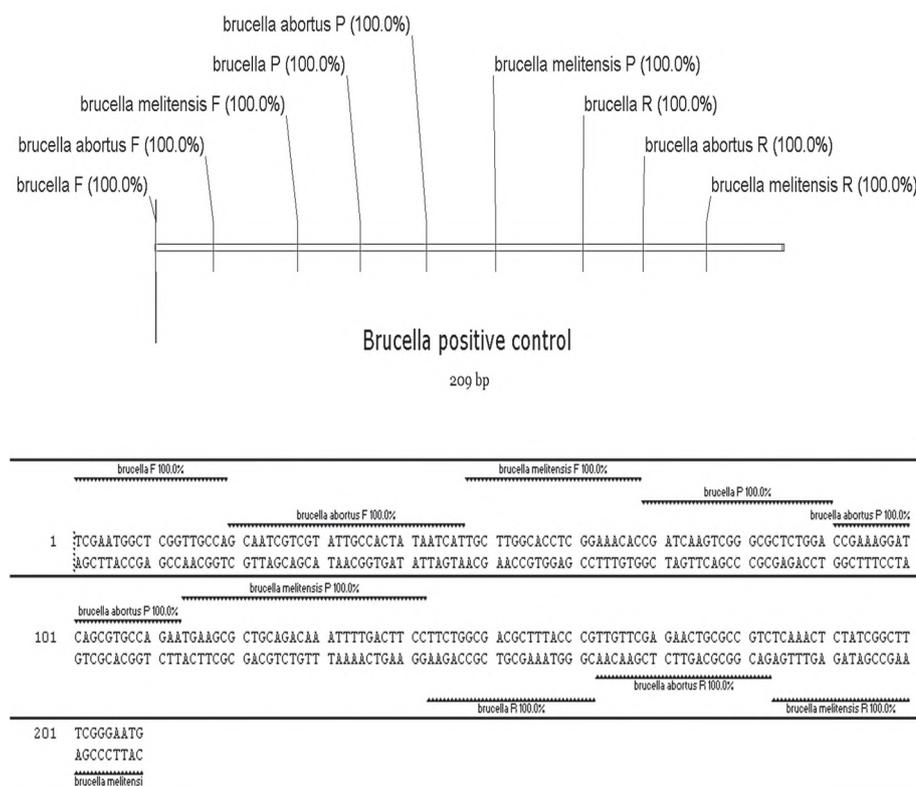


Рис. 1. Нуклеотидная последовательность положительного контрольного образца

Примечание: кроме последовательности ДНК на данном рисунке представлена комплементарность праймеров и зондов для индикации бактерий рода *Brucella*, видов *B. abortus* и *B. melitensis* к нуклеотидной последовательности положительного контроля

Fig. 1. Nucleotide sequence of positive control sample

Note: Except from DNA sequence, the figure shows primers and probes' complementarity for indication of *Brucella* genus bacteria, *B. melitensis* and *B. abortus* species, to nucleotide sequence of positive control

Амплификация с ДНК *B. abortus* и *B. melitensis* реагировала положительно по маркерам рода *Brucella*, и со специфическими, предназначенными для индикации данных бактерий, праймерами и зондами (по каналу Rox и R6G соответственно). Специфическая амплификация происходила лишь с искомой ДНК. Амплификация ДНК бактерии вида *B. melitensis* штамм Rev.1 с праймерами для VNTR анализа (рис. 2 В) проходила в присутствии интерколирующего агента «EvaGreen», что позволило контролировать успешность прохождения реакции в ПЦР-РВ. Для интерпретации количества повторов в каждом локусе необходимо ввести в алгоритм проведение электрофореза амплифицированной ДНК.

В литературе описывается множество примеров индикации бруцелл, при этом в большинстве случаев дифференциация вида биопатогена основывается на определении размера ампликона в таких локу-

сах как: IS711, BME2, BME1 r02, omp 31, omp 25b, wbo A и других [9, 10, 12], в указанных публикациях представлена успешная индикация бактерий рода *Brucella* и дифференциация вида бактерий данного рода. Однако изложенная в этих публикациях методика исследований имеет ряд недостатков, связанных с риском контаминации (из-за электрофореза), трудности исполнения (много разных ПЦР, электрофорез) и интерпретации результата (сличение размеров продуктов амплификации с ДНК-маркером по каждому ампликону). Предложенная нами методика, в сочетании с высокой специфичностью маркерных локусов к искомым патогенам, позволяет избежать указанных недостатков.

Исходя из нуклеотидной последовательности геномов бруцелл определены локусы ДНК пригодные для индикации бактерий рода *Brucella* (BSCP31) и выявления видов *B. abortus* (BAW_20982) и

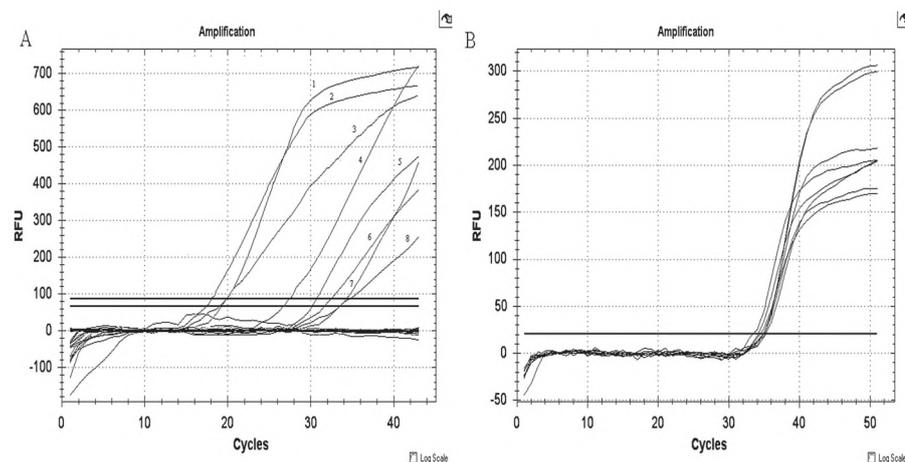


Рис. 2. Амплификация маркерных локусов бруцелл:

А – ПЦР с праймерами для индикации рода *Brucella* и видов *B. abortus* и *B. melitensis*; ДНК положительного контроля (1, 2, 3), ДНК *B. suis* (4), ДНК *B. abortus* (5, 7), В – ДНК *B. melitensis* (6, 8); амплификация с праймерами для VNTR анализа

Fig. 2. Amplification of *Brucella* marker loci: А – PCR with primers for indication of *Brucella* genus and *B. melitensis* and *B. abortus* species; positive control DNA (1, 2, 3), *B. suis* DNA (4), *B. abortus* DNA (5, 7), В – *B. melitensis* DNA (6, 8); amplification with primers for VNTR analysis

B. melitensis (COR52_12390). В пределах этих локусов произведен дизайн праймеров и зондов для ПЦР. Точность амплификации ДНК-маркеров для индикации бактерий рода *Brucella* и подтверждения их принадлежности к указанным видам определялась с использованием контрольной плазмиды.

Для удобства учета количества VNTR повторов по различным локусам и сличения полученных MLVA профилей с аналогичными профилями различных штаммов и изолятов *B. abortus* и *B. melitensis* рекомендуется использовать сформированную в ходе выполнения данной работы базу данных, находящуюся в открытом доступе по ссылке <http://vnivi.ru/images/mlva.xls>.

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

Список литературы

1. Агольцев В.А., Веселовский С.Ю., Частов А.А., Попова О.М. Эпидемиологические и эпизоотологические особенности бруцеллеза в Саратовской и в Западно-Казахстанской областях. *Научная жизнь*. 2017; 7:92–100.
2. Адиева А.А., Израилова Г.Р., Халилов Р.А., Меджидова М.Г., Умарова Ю.А. Использование биоинформационных методов при конструировании праймеров конститутивного гена, кодирующего белок тубулин для проведения ОТ-ПЦР. *Современные проблемы науки и образования*. 2016; 6:526–33.
3. Александрова Н.М., Хаммадов Н.И., Шуралев Э.А., Елизарова И.А. Дифференциальная диагностика туберкулеза у человека и животных с применением мультиплексной тест-системы. *Молекулярная диагностика: сб. трудов IX Всерос. науч.-практич. конференции с междунар. участием*. Тамбов: ООО «Юлис»; 2017. Т. 1. С. 493.
4. Желудков М.М., Церельсон Л.Е. Резервуары бруцеллезной инфекции в природе. *Зоологический журнал*. 2010; 89(1):53–60.
5. Лямкин Г.И., Головнева С.И., Худолеев А.А., Чеботарева Е.Н., Шакирова Л.И., Куличенко А.Н. Обзор эпизоотической и эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2013 г. и прогноз на 2014 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014; 2:29–32. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-2-29-32.
6. Ндайишимье Э.В., Хаммадов Н.И., Осянин К.А., Фаизов Т.Х., Шуралев Э.А., Мукминов М.Н. Биоинформационный анализ олигонуклеотидов для молекулярно-генетической индикации возбудителей аспергиллеза и аскаридоза пчел. *Ветеринарный врач*. 2015; 2:3–9.
7. Садикалиева С.О., Строчков В.М., Орынбаев М.Б., Шораева К.А., Еспембетов Б.А., Сансызбай А.Р., Султанкулова К.Т. Молекулярно-генетическое типирование бактерий рода *Brucella*, циркулирующих в республике Казахстан. *Вестник Башкирского университета*. 2017; 22(2):403–8.
8. Сафина Г.М., Фомин А.М., Косарев М.А. Аprobация новой системы специальных противобруцеллезных мероприятий на заключительном этапе оздоровления хозяйств от бруцеллеза крупного рогатого скота. *Ветеринарный врач*. 2016; 4:12–5.
9. Garcia-Yoldi D., Marin C.M., de Miguel M.J., Muñoz P.M., Vizmanos J.L., López-Gofi 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. *Clin. Chem.* 2006; 52(4):779–81. DOI: 10.1373/clinchem.2005.062596.
10. Kang S.I., Her M., Kim J.W., Kim J.Y., Ko K.Y., Ha Y.M., Jung S.C. Advanced multiplex PCR assay for differentiation of *Brucella* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(18):6726–8. DOI: 10.1128/AEM.00581-11.
11. Khammadova A.V., Shuralev E.A., Khammadov N.I., Oumarou B.M., Faizov T.K., Mukminov M.N. Design of primers for identification of honey bee viruses in multiplex-PCR. *Astra Salvensis*. 2017; 5(1):481–9.
12. Livia de Lima Orzil, Ingrid Sales Preis, Iassudara Garcia de Almeida, Patricia Gomes de Souza, Paulo Martins Soares Filho, Fabricio Barcelos Jacinto, Antônio Augusto Fonseca Júnior. Validation of the multiplex PCR for identification of *Brucella* spp. *Ciência Rural, Santa Maria*. 2016; 46(5):847–52. DOI: 10.1590/0103-8478cr20150065.
13. Mustafa A.S., Habibi N., Osman A., Shaheed F., Khan M.W. Species identification and molecular typing of human *Brucella* isolates from Kuwait. *PLoS One*. 2017; 12(8):e0182111. DOI: 10.1371/journal.pone.0182111.
14. Shevtsova E., Shevtsov A., Mukanov K., Filipenko M., Kamalova D., Sytnik I., Syzdykov M., Kuznetsov A., Akhmetova A., Zharova M., Karibaev T., Tarlykov P., Ramanculov E. Epidemiology of brucellosis and genetic diversity of *Brucella abortus* in Kazakhstan. *PLoS One*. 2016; 11(12):e0167496. DOI: 10.1371/journal.pone.0167496.

References

1. Agol'tsev V.A., Veselovsky S.Yu., Chastov A.A., Popova O.M. [Epidemiological and epizootiological features of brucellosis in the Saratov and West Kazakhstan Regions]. *Nauchnaya zhizn'*. 2017; 7:92–100.
2. Adieva A.A., Izrailova G.R., Khalilov R.A., Medzhidova M.G., Umarova Yu.A. [The use of bioinformatics techniques in constructing primers of a constitutive gene encoding a tubulin protein for RT-PCR]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2016; 6:526–33.
3. Aleksandrova N.M., Khammadov N.I., Shuralev E.A., Elizarova I.A. [Differential diagnosis of tuberculosis in humans and animals using a multiplex test system]. *Molecular Diagnostic: Proceeding of IX Russian Research Conference with international participation*. Tambov: «Yulis»; 2017. Vol. 1. P. 493.
4. Zheludkov M.M., Tserel'son L.E. [The reservoirs of brucellosis infection in nature]. *Zoologicheskii Zhurnal*. 2010; 89(1):53–60.
5. Lyamkin G.I., Golovneva S.I., Khudoleev A.A., Chebotareva E.N., Shakirova L.I., Kulichenko A.N. [Review of epizootic and epidemic situation on brucellosis in the Russian Federation in 2013 and the forecast for 2014]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii*. 2014; 2:29–32. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-2-29-32.
6. Ndayishimiye E.V., Khammadov N.I., Osyenin K.A., Faizov T.Kh., Shuralev E.A., Mukminov M.N. [Bioinformatics analysis of oligonucleotides for molecular-genetic indication of pathogens of bees aspergillosis and ascospherosis]. *Veterinarny Vrach*. 2015; 2:3–9.
7. Sadikalieva S.O., Strochkov V.M., Orynbaev M.B., Shoraeva K.A., Espembetov B.A., Sansyzbay A.R., Sultankulova K.T. [Molecular-genetic typing of *Brucella* genus bacteria circulating in the Republic of Kazakhstan]. *Vestnik Bashkirskogo Universiteta*. 2017; 2(2):403–8.
8. Safina G.M., Fomin A.M., Kosarev M.A. [Approbation of a new system of special anti-brucellosis measures at the final stage of farms' rehabilitation from brucellosis in cattle]. *Veterinarny Vrach*. 2016; 4:12–5.
9. Garcia-Yoldi D., Marin C.M., de Miguel M.J., Muñoz P.M., Vizmanos J.L., López-Gofi 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. *Clin. Chem.* 2006; 52(4):779–81. DOI: 10.1373/clinchem.2005.062596.
10. Kang S.I., Her M., Kim J.W., Kim J.Y., Ko K.Y., Ha Y.M., Jung S.C. Advanced multiplex PCR assay for differentiation of *Brucella* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(18):6726–8. DOI: 10.1128/AEM.00581-11.
11. Khammadova A.V., Shuralev E.A., Khammadov N.I., Oumarou B.M., Faizov T.K., Mukminov M.N. Design of primers for identification of honey bee viruses in multiplex-PCR. *Astra Salvensis*. 2017; 5(1):481–9.
12. Livia de Lima Orzil, Ingrid Sales Preis, Iassudara Garcia de Almeida, Patricia Gomes de Souza, Paulo Martins Soares Filho, Fabricio Barcelos Jacinto, Antônio Augusto Fonseca Júnior. Validation of the multiplex PCR for identification of *Brucella* spp. *Ciência Rural, Santa Maria*. 2016; 46(5):847–52. DOI: 10.1590/0103-8478cr20150065.
13. Mustafa A.S., Habibi N., Osman A., Shaheed F., Khan M.W. Species identification and molecular typing of human *Brucella* isolates from Kuwait. *PLoS One*. 2017; 12(8):e0182111. DOI: 10.1371/journal.pone.0182111.
14. Shevtsova E., Shevtsov A., Mukanov K., Filipenko M., Kamalova D., Sytnik I., Syzdykov M., Kuznetsov A., Akhmetova A., Zharova M., Karibaev T., Tarlykov P., Ramanculov E. Epidemiology of brucellosis and genetic diversity of *Brucella abortus* in Kazakhstan. *PLoS One*. 2016; 11(12):e0167496. DOI: 10.1371/journal.pone.0167496.

Authors:

Khammadov N.I., Osyenin K.A., Usol'tsev K.V., Faizov T.Kh. Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety. Nauchny Gorodok-2, Kazan, Tatarstan, 420075, Russian Federation. E-mail: vnivi@mail.ru.

Khammadova A.V. Kazan Federal University. 18, Kremlyovskaya St., Kazan, Tatarstan, 420008, Russian Federation. E-mail: ecology@kpfu.ru.

Shuralev E.A. Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety; Nauchny Gorodok-2, Kazan, Tatarstan, 420075, Russian Federation. Kazan Federal University; 18, Kremlyovskaya St., Kazan, Tatarstan, 420008, Russian Federation. Kazan State Medical Academy; 36, Butlerova St., Kazan, Tatarstan, 420012, Russian Federation.

Об авторах:

Хаммадов Н.И., Осянин К.А., Усольцев К.В., Фаизов Т.Х. Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности. Российская Федерация, 420075, Татарстан, г. Казань, Научный городок-2. E-mail: vnivi@mail.ru.

Хаммадова А.В. Казанский (Приволжский) федеральный университет. Российская Федерация, 420008, Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, 18. E-mail: esology@kpfu.ru.

Шуралев Э.А. Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности; Российская Федерация, 420075,

Татарстан, г. Казань, Научный городок-2. Казанский (Приволжский) федеральный университет; Российская Федерация, 420008, Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, 18. Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Российская Федерация, 420012, Татарстан, г. Казань, ул. Бутлерова, 36.

Поступила 09.07.18.

Отправлена на доработку 17.08.18.

Принята к публ. 24.08.18.