



(51) МПК  
*C12Q 1/68* (2006.01)  
*C12N 15/31* (2006.01)  
*C12R 1/01* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2010119796/10, 17.05.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 17.05.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.05.2010

(45) Опубликовано: 10.08.2011 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
 поиске: RU 2332464 C1, 27.08.2008. RU 2288275 C1,  
 27.11.2006. DE 10124342 A1, 28.11.2002. WO  
 2004106553 A2, 09.12.2004.

Адрес для переписки:

410005, г.Саратов, ул. Университетская, 46,  
 РосНИПЧИ "Микроб"

(72) Автор(ы):

Одиноков Георгий Николаевич (RU),  
 Ерошенко Галина Александровна (RU),  
 Павлова Алла Ивановна (RU),  
 Анисимова Любовь Владимировна (RU),  
 Кутырев Владимир Викторович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Российская Федерация, от имени которой  
 выступает Федеральная служба по надзору в  
 сфере защиты прав потребителей и  
 благополучия человека (RU),  
 Федеральное государственное учреждение  
 здравоохранения "Российский научно-  
 исследовательский противочумный  
 институт "Микроб" Федеральной службы по  
 надзору в сфере защиты прав потребителей  
 и благополучия человека ("РосНИПЧИ  
 "Микроб") (RU)

**(54) СПОСОБ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ ОСНОВНОГО И  
 НЕОСНОВНЫХ ПОДВИДОВ И ВОЗБУДИТЕЛЯ ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗА МЕТОДОМ  
 ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области  
 биотехнологии, конкретно к способу  
 дифференциации штаммов возбудителя чумы  
 основного и неосновных подвидов и  
 возбудителя псевдотуберкулеза. Способ  
 предусматривает выделение ДНК исследуемого  
 штамма, проведение ПНР с использованием  
 нуклеотидных праймеров на гены *terC*, *ilvN*  
 и *inv*, имеющих следующие  
 последовательности:

	89-S	-
AATCAAATCTCGCCCAGC,	89-As	-
GCTGCGTATCATTTACACC;	45-S	-
AGTGGTCTGCTTCTCTGG,	45-As	-

CGGCATACACAGAATACC;	<i>inv839</i>	-
TACCTGCACTCCCACAAC,	<i>inv1007</i>	-
CCCATACGCTGATCTACC.		

Дифференциацию  
 исследуемых штаммов проводят путем  
 сравнения размеров полученных фрагментов  
 генов *terC*, *ilvN* и *inv* с аналогичными  
 фрагментами у типичных штаммов  
 возбудителей чумы основного и неосновных  
 подвидов. Предложенное изобретение  
 позволяет быстро, эффективно и надежно  
 проводить дифференциацию штаммов *Y. pestis*  
 основного и неосновных подвидов и *Y.*  
*pseudotuberculosis*. 1 табл.

RU 2 4 2 5 8 9 1 C 1

RU 2 4 2 5 8 9 1 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 425 891** (13) **C1**

(51) Int. Cl.  
*C12Q 1/68* (2006.01)  
*C12N 15/31* (2006.01)  
*C12R 1/01* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2010119796/10, 17.05.2010**

(24) Effective date for property rights:  
**17.05.2010**

Priority:

(22) Date of filing: **17.05.2010**

(45) Date of publication: **10.08.2011 Bull. 22**

Mail address:

**410005, g.Saratov, ul. Universitetskaja, 46,  
RosNIPChI "Mikrob"**

(72) Inventor(s):

**Odinokov Georgij Nikolaevich (RU),  
Eroshenko Galina Aleksandrovna (RU),  
Pavlova Alla Ivanovna (RU),  
Anisimova Ljubov' Vladimirovna (RU),  
Kutyrev Vladimir Viktorovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Rossijskaja Federatsija, ot imeni kotoroj  
vystupaet Federal'naja sluzhba po nadzoru v  
sfere zashchity prav potrebitelej i  
blagopoluchija cheloveka (RU),  
Federal'noe gosudarstvennoe uchrezhdenie  
zdravookhraneniya "Rossijskij nauchno-  
issledovatel'skij protivochumnyj institut  
"Mikrob" Federal'noj sluzhby po nadzoru v sfere  
zashchity prav potrebitelej i blagopoluchija  
cheloveka ("RosNIPChI "Mikrob") (RU)**

(54) **METHOD OF DIFFERENTIATION OF STRAINS OF PRINCIPAL AND NONPRINCIPAL CAUSATIVE  
PLAGUE AGENT AND PSEUDOTUBERCULOSIS AGENT BY POLYMERASE CHAIN REACTION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method provides recovery of DNA of an analysed strain followed by PCR with using nucleotide primers of terC, ilvN and inv genes of the following sequences: 89-S - AATCAAATCTCGCCCAGC, 89-As -GCTGCGTATCATTTTACC; 45-S - AGTGGTCTGCTTCTCTGG, 45-As -CGGCATACACAGAATACC; inv839 -

TACCTGCACTCCCACAAC,

inv1007 -CCCATACGCTGATCTACC. The analysed strains are differentiated by matching the sizes of the derived fragments of terC, ilvN and inv genes with the similar fragments in typical strains of principal and nonprincipal plague agents.

EFFECT: invention allows quick, effective and reliable differentiation of the strains.

1 tbl, 3 ex

R U 2 4 2 5 8 9 1 C 1

R U 2 4 2 5 8 9 1 C 1

Изобретение относится к области медицинской микробиологии, в частности к подвиговой дифференциации штаммов возбудителя чумы и дифференциации чумного и псевдотуберкулезного микробов.

Чума, возбудителем которой является вид бактерий *Yersinia pestis*, все еще представляет реальную угрозу для здоровья людей, связанную с существованием на различных континентах многочисленных активных природных очагов чумы, а также с возможностью использования возбудителя чумы в биотеррористических актах. Ежегодно в мире регистрируется достаточно большое количество случаев заболевания чумой, которые часто приводят к летальному исходу. Ввиду этого важное значение имеет разработка точных методов детекции *Y.pestis* и дифференциации этого возбудителя от других бактерий, в частности от близкородственной *Yersinia pseudotuberculosis*. Сам вид *Y.pestis* неоднороден по составу и делится на основной подвид - subspecies (ssp) *pestis* и группу неосновных подвидов: алтайский - ssp.*altaica*, кавказский - ssp.*caucasica*, улегейский - ssp.*ulegeica*, гиссарский - ssp.*hissarica*. Подвиды возбудителя чумы отличаются по вирулентности и эпидемической значимости. Штаммы основного подвида характеризуются высокой вирулентностью и имеют высокий эпидемический потенциал. Штаммы неосновных подвидов имеют избирательную вирулентность, эпидемически малозначимы и практически не вызывают заболеваний человека. В связи с этим наряду с необходимостью дифференциации возбудителя чумы и псевдотуберкулезного микроба не менее важное значение имеет и дифференциация подвидов *Y.pestis*, и, в частности, детекция среди них штаммов основного подвида. Разработка эффективных и надежных методов быстрой идентификации основного подвида *Y.pestis* среди близкородственных патогенных иерсиний имеет важное практическое значение.

В настоящее время дифференциацию штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов проводят с учетом различной экспрессии ряда биохимических признаков: ферментации моносахаридов - рамнозы, мелиобиозы, продукции изоцитратлиазы и других. Однако проявление фенотипических свойств возбудителя чумы зависит от условий культивирования штаммов, качества используемых сред, а также от выделения культур возбудителя в чистом виде, что значительно усложняет и увеличивает сроки проведения анализа.

Большой эффективностью и быстротой получения результатов отличается метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), основанный на использовании генетических особенностей штаммов различных бактерий. Для проведения ПЦР не обязательно выделение чистых культур возбудителя, поскольку метод отличается высокой чувствительностью и позволяет проводить определение видовой и подвиговой принадлежности бактерии при наличии небольшого количества клеток в материале исследуемого образца.

До настоящего времени метод ПЦР использовали для детекции возбудителя чумы, а также для дифференциации его от возбудителя псевдотуберкулеза, но практически не применяли его для дифференциации основного и неосновных подвидов *Y.pestis*. При этом для детекции возбудителя чумы в ПЦР использовали нуклеотидные последовательности различных генов *caf*, *pla*, *lcrV*, *3a*, *irp-2* (Neubauer H. et al., 2000; Rahalison L. et al., 2000; Hongwei Z.J.L., 2000; Балахонов С.В. с соавт.2000; Гаранина С.Б. с соавт., 2001; Сучков И.Ю. с соавт., 2001; Radnedge L. et al., 2001; Савостина Е.П., 2004; Kuske C.R. et al., 2006; Куклев В.Е. с соавт. 2006).

Так, известен способ детекции бактерий рода *Yersinia* и дифференциации патогенных для человека видов иерсиний методом полимеразной цепной реакции

(патент RU 2354700, опубликован 10.05.2009 г.) на основе использования последовательности участка гена *ompF* порина. Этот способ позволяет разделять виды патогенных иерсиний - возбудителей чумы, псевдотуберкулеза, кишечного иерсиниоза на видовом уровне, но он не предусматривает проведения идентификации штаммов *Y.pestis* основного и неосновных подвидов.

Известен другой способ быстрой детекции и дифференциации *Y.pestis* и *Y.pseudotuberculosis* (DE 10124342 (A1), опубликован 28.11.2002 г.), который предусматривает двухэтапную детекцию ДНК возбудителей чумы и псевдотуберкулеза: методом ПЦР и методом гибридизации со специфическими зондами, что повышает надежность и эффективность способа. Однако этот способ также не позволяет дифференцировать штаммы *Y.pestis* основного и неосновных подвидов.

Наиболее близким к предлагаемому изобретению по совокупности существенных признаков является способ дифференциации чумного и псевдотуберкулезного микробов с одновременной внутривидовой дифференциацией штаммов чумного микроба (RU 2332464, опубликован 27.08.2008 г.), который основан на использовании варибельности нуклеотидной последовательности участка хромосомы *hutG* - YP01967.

Однако недостаток способа заключается в том, что участок *hutG* - YP01967 расположен в нестабильной области генома *Y.pestis*, которая может часто утрачиваться у штаммов основного подвида, что делает невозможной дифференциацию таких штаммов с помощью предложенного метода. Кроме того, этот способ сложен в интерпретации, требует использования большой группы референтных штаммов, а также имеет некоторые погрешности, поскольку не позволяет избежать совпадения размеров ПЦР фрагментов у некоторых штаммов основного и неосновных подвидов, что требует проведения дополнительных исследований (например, секвенирования) для определения подвидовой принадлежности штамма. Другие публикации об использовании метода ПЦР для дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов в литературе отсутствуют, как отсутствуют и данные об участках генома *Y.pestis*, применение которых позволило бы быстро и эффективно провести такую дифференциацию.

Задачей изобретения является разработка простого в интерпретации, надежного и быстрого способа дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновного подвидов и штаммов возбудителя псевдотуберкулеза методом ПЦР.

Технический результат заключается в повышении эффективности дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов с одновременной дифференциацией штаммов возбудителя псевдотуберкулеза.

Заявляемый способ основан на использовании в качестве ДНК-мишеней хромосомных генов жизнеобеспечения *terC*, *ilvN* и *inv*, кодирующих соответственно белок резистентности к теллурию, ацетолактатсинтазу и инвазин-адгезин.

Технический результат достигается способом дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов и возбудителя псевдотуберкулеза методом полимеразной цепной реакции, который предусматривает выделение ДНК штамма, проведение полимеразной цепной реакции с амплификацией фрагментов генов *terC*, *ilvN* и *inv* исследуемого штамма, при этом праймеры на эти гены имеют следующие последовательности:

89-S - AATCAAATCTCGCCCAGC,  
89-As - GCTGCGTATCATTTACAC;

45-S - AGTGGTCTGCTTCTCTGG,  
 45-As - CGGCATACACAGAATACC,  
 inv839 - TACCTGCACTCCCACAAC,  
 inv1007 - CCCATACGCTGATCTACC,

5 и определение размеров амплифицированных фрагментов с последующей дифференциацией исследуемых штаммов, которую проводят путем сравнения размеров полученных фрагментов генов *terC*, *ilvN* и *inv* с аналогичными фрагментами у типичных штаммов возбудителей чумы основного и неосновных подвидов.

10 Способ осуществляют следующим образом.

Выделение ДНК исследуемого штамма чумного микроба проводят по стандартной методике в соответствии с МУ 1.3.1794-03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами 1-11 групп патогенности».

15 Полимеразную цепную реакцию осуществляют по стандартной методике (МУ 1.3.1794-03) с применением вышеуказанных праймеров на гены *terC*, *ilvN* и *inv*. Олигонуклеотидные праймеры, используемые для амплификации в ПЦР фрагментов *terC*, *ilvN* и *inv*, рассчитаны на основе нуклеотидных последовательностей этих генов у штаммов чумного микроба *Y. pestis* CO92, KIM, Antiqua, Nepal516, Angola, 20 91001, Pestoides F и *Y. pseudotuberculosis* IP31758, представленных в базе данных NCBI GenBank. С помощью рассчитанных праймеров проводят в ПЦР амплификацию фрагментов генов *terC*, *ilvN* и *inv* и определяют размеры полученных фрагментов генов. Праймеры на гены *terC*, *ilvN* и *inv* имеют следующие последовательности:

25 89-S - AATCAAATCTCGCCCAGC,  
 89-As - GCTGCGTATCATTTTACC;  
 45-S - AGTGGTCTGCTTCTCTGG,  
 45-As - CGGCATACACAGAATACC,  
 30 mv839 - TACCTGCACTCCCACAAC,  
 inv1007 - CCCATACGCTGATCTACC.

Полимеразную цепную реакцию с амплификацией фрагментов генов *terC*, *ilvN* и *inv* осуществляют по следующей программе: 1 цикл 94°C в течение 5 мин, затем 35 циклов при 94°C 45 сек, 55°C 1 мин, 72°C 45 сек и завершающий цикл 3 мин при 72°C.

35 Определение размеров образованных в ПЦР фрагментов генов *terC*, *ilvN* и *inv* у исследуемых штаммов проводят методом электрофореза в 3% агарозном геле относительно стандарта маркеров молекулярных масс с размером от 100 до 1000 п.н. Нами установлено, что типичные штаммы возбудителя чумы основного подвида 40 имеют размеры образуемых в ПЦР фрагментов генов *terC* - 300 п.н., *ilvN* - 515 п.н. и *inv* - 877 п.н.; штаммы неосновных подвидов соответственно 389, 560 и 877; а штаммы псевдотуберкулезного микроба - 389, 560 и 169 (таблица). В дальнейшем дифференциацию исследуемого штамма проводят путем сравнения с данными представленными в таблице.

45 Сущность изобретения поясняется примерами.

Пример 1. Дифференциация штамма №1 (Модельный эксперимент).

50 Выделение ДНК штамма №1 проводят стандартным методом с помощью лизирующего раствора на основе 6М гуанидинизотиоцианата с предварительным обеззараживанием культуры путем добавления мертиолята натрия до концентрации 1:10000 с последующим прогреванием при температуре 56°C в течение 30 мин. (Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности. МУ 1.3.1794-03).

Полимеразную цепную реакцию проводят в объеме 25 мкл; реакционная смесь содержит: 1х буфер (10х ПЦР-буфер - 2,5 мкл), MgCl<sub>2</sub> - 2,0 мМ, смесь dNTP - 0,3 мМ, олигонуклеотидные праймеры - 2 пмол, Taq DNA полимеразы - 0,1 ед., исследуемой ДНК - 10 мкл. Продукты амплификации анализируют в 3% агарозном геле с добавлением этидиум бромид и просматривают в УФ-свете.

Определяют размеры образовавшихся фрагментов генов *terC*, *ilvN* и *inv*. Они составляют 300, 515, 877 п.н., что соответствует размерам фрагментов генов у штаммов основного подвида. Исследуемый штамм №1 относят к основному подвиду *Y.pestis*.

Пример 2. Дифференциацию штамма №2 проводят аналогично примеру №1.

Размеры образуемых в ПЦР фрагментов генов *terC*, *ilvN* и *inv* составляют 389, 560 и 877 п.н., что соответствует размерам фрагментов, образуемых у штаммов возбудителя чумы неосновных подвинов. Штамм №2 относят к неосновным подвидам *Y.pestis*.

Пример 3. Дифференциацию штамма №3 проводят аналогично примеру №1.

Размеры образуемых в ПЦР фрагментов генов *terC*, *ilvN* и *inv* составляют 389, 560 и 169 п.н., что соответствует размерам фрагментов, образуемых у штаммов возбудителя псевдотуберкулеза. Штамм №3 относят к *Y.pseudotuberculosis*.

Таким образом, заявленный способ дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвинов методом ПЦР, основанный на вариативности последовательностей генов жизнеобеспечения *terC*, *ilvN* и *inv* позволяет быстро, эффективно и надежно проводить дифференциацию штаммов *Y.pestis* основного и неосновных подвинов и *Y.pseudotuberculosis*.

Вид, подвида	Размеры генов		
	<i>terC</i>	<i>ilvN</i>	<i>inv</i>
<i>Y.pestis</i> основной подвида	300	515	877
<i>Y.pestis</i> неосновные подвины	389	560	877
<i>Y.pseudotuberculosis</i>	389	560	169

### Формула изобретения

Способ дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвинов и возбудителя псевдотуберкулеза, включающий выделение ДНК, проведение ПЦР с амплификацией фрагментов генов исследуемого штамма, отличающийся тем, что при проведении ПЦР используют нуклеотидные праймеры на гены *terC*, *ilvN* и *inv*, имеющие следующие последовательности:

89-S - ААТСАААТСТСГССССАГС,

89-As - GCTGCGTATCATTTTACC;

45-S - AGTGGTCTGCTTCTCTGG,

45-As - CGGCATACACAGAATACC;

*inv*839 - ТАССТГСАСТСССАСААС,

*inv*1007 - СССАТАСГСТГАТСТАСС;

дифференциацию штаммов проводят путем сравнения размеров полученных фрагментов генов *terC*, *ilvN* и *inv* исследуемых штаммов с аналогичными фрагментами у типичных штаммов возбудителей чумы основного, неосновных подвинов и псевдотуберкулезного микроба, при этом типичные штаммы возбудителя чумы основного подвида имеют размеры образуемых в ПЦР фрагментов генов *terC* - 300 п.н., *ilvN* - 515 п.н. и *inv* - 877 п.н.; штаммы неосновных подвинов соответственно 389,

560 и 877; а штаммы псевдотуберкулезного микроба - 389, 560 и 169.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50