

- al. *Burkholderia cepacia* complex infection in Italian patients with cystic fibrosis: prevalence, epidemiology, and genovar status. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 8: 2891 — 2896.
3. Clode F.E., Kaufmann M.E., Malnick H. et al. Distribution of genes encoding putative transmissibility factors among epidemic and nonepidemic strains of *Burkholderia cepacia* from cystic fibrosis patients in the United Kingdom. *Ibid.* 2000, 5: 1763 — 1766.
 4. Henry D.A., Mahenthiralingam E., Vandamme P. et al. Phenotypic methods for determining genovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. *Ibid.* 2001, 3: 1073 — 1078.
 5. Ledson M.J., Gallagher M.J., Corkill J.E. et al. Cross infection between cystic fibrosis patients colonized with *Burkholderia cepacia*. *Torax.* 1998, 53: 432 — 443.
 6. Mahenthiralingam E., Bischof J., Byrne S.K. et al. DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis* and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 9: 3165 — 3173.
 7. Marmur G. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 1961, 3: 208 — 218.
 8. Smith D.L., Gumery L.B., Smith E.G. et al. Epidemic of *Pseudomonas cepacia* in an adult cystic fibrosis unit: evidence of person-to-person transmission. *J. Clin. Microbiol.* 1993, 11: 3017 — 3022.

Поступила 10.06.07
С переработки 10.10.07

© О.Ю.ЛИМАНСКАЯ, А.П.ЛИМАНСКИЙ, 2008

О.Ю.Лиманская, А.П.Лиманский

МАРКЕРЫ ДЛЯ ВИДОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ БАЦИЛЛ ГРУППЫ *BACILLUS CEREUS*

Институт микробиологии и иммунологии, Киев, Украина

Проанализированы последовательности и построены филогенетические деревья для генов и фрагментов генов *rpoB* и *gyr* хромосомной ДНК бактерий группы *B.cereus* — *B.anthraxis*, *B.cereus* и *B.thuringiensis*, которые являются потенциальными маркерами для их генотипирования. Разработаны наборы праймеров для видоспецифической детекции этих бактерий с помощью мультиплексной ПЦР, а также наборы праймеров, которые позволяют дифференцировать штаммы *B.anthraxis* с различным профилем плазмид, определяющие патогенные свойства штаммов, т.е. изоляты *B.anthraxis*, которые содержат обе плазмиды ($pXO1^+$ и $pXO2^+$), и штаммы, в которых отсутствуют одна ($pXO1^+$, $pXO2^-$ и $pXO1^-, pXO2^+$) или обе плазмиды ($pXO1^-, pXO2^-$). Наборы праймеров оптимизированы по температурам отжига и длине ампликонов. Показано, что филогенетическое дерево можно использовать как показатель надежности и точности таксономической классификации видов и подвидов микроорганизмов. Сравнение последовательностей плазмид $pXO1$ и $pXO2$ *B.anthraxis* показало, что они содержат 18 и 4 инвертированные последовательности, которые потенциально могут образовывать термодинамически стабильные шпильчатые структуры.

Журн. микробиол., 2008, № 3, С. 20—26

Ключевые слова: ПЦР, конструирование праймеров, генотипирование, *B.anthraxis*, *B.cereus*, *B.thuringiensis*, инвертированные повторы

O.Yu.Limanskaya, A.P.Limansky

MARKERS FOR SPECIES-SPECIFIC DETECTION OF BACTERIA FROM *BACILLUS CEREUS* GROUP

Institute of Microbiology and Immunology, Kiev, Ukraine

rpoB and *gyr* genes (and their fragments) of chromosomal DNA of bacteria from *Bacillus cereus* group — *B.anthraxis*, *B.cereus*, and *B.thuringiensis* — which are the potential markers for their genotyping were sequenced and phylogenetic trees were constructed. Sets of primers for species-specific detection of *B.anthraxis*, *B.cereus*, and *B.thuringiensis* by multiplex polymerase chain reaction were designed. Also primers sets, which allow to differentiate strains of *B.anthraxis* with various plasmid profiles (containing both plasmids ($pXO1^+$, $pXO2^+$), and without one ($pXO1^+$, $pXO2^-$ or $pXO1^-, pXO2^+$) or both plasmids ($pXO1^-, pXO2^-$)), determining pathogenic characteristics of the strains, were developed. For multiplex PCR primer sets were optimized on the annealing temperature of primers and amplicon length. It was shown that phylogenetic tree can be applied as an indicator of reliability and accuracy of taxonomical classification of microorganisms' species and subspecies. Comparison of $pXO1$ and $pXO2$ plasmid sequences of *B.anthraxis* showed that these plasmids contain 18 and 4 palindrome sequences respectively which can potentially form thermodynamically stable hairpin-loop structures.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2008, No. 3, P. 20—26

Key words: polymerase chain reaction, primers construction, genotyping, *B.anthraxis*, *B.cereus*, *B.thuringiensis*, inverted repeats

ВВЕДЕНИЕ

Bacillus anthracis является этиологическим агентом сибирской язвы, опасного заболевания человека и животных. Благодаря высокой патогенности и способности образовывать споры *B. anthracis* является потенциальным оружием массового поражения [6].

B. anthracis — член группы бацилл *B. cereus*, которая включает также *B. thuringiensis*, *B. cereus* и *B. mycoides*. Эти близкородственные бациллы являются патогенами животных (*B. anthracis* и *B. cereus*) и насекомых (*B. thuringiensis*). Группа *B. cereus* является одной из наиболее таксономически сомнительных групп бацилл. ДНК-ДНК гибридизация и электрофорез в пульсирующем поле показали наличие высокой степени гомологии среди *B. anthracis*, *B. thuringiensis* и *B. cereus*. Проведенное исследование протеинов с использованием мультилокусного электрофореза показало, что представители этой группы относятся к одному роду.

От остальных членов этой группы *B. anthracis* отличается присутствием плазмид рХО1 и рХО2, кодирующих синтез токсина и капсулы соответственно и обуславливающих ее вирулентность. Отсутствие любой из плазмид приводит к аттенуации штамма.

Бациллы сибирской язвы часто определяют на основе морфологических или фенотипических исследований (грамположительная окрасивание, негемолитическая реакция на агаре с кровью овцы, чувствительность к пенициллину и другим антибиотикам, неспособность ферментировать салицин и т.д.). Для выявления *B. anthracis* в клинических образцах используют микробиологические методы в сочетании с иммунологическими тестами. Кроме продолжительности недостатком этих методов является большая вероятность получения ложноположительных результатов вследствие относительно недостаточной специфичности. Детекция возбудителя сибирской язвы в образцах окружающей среды является сложной и длительной, поскольку вирулентные штаммы *B. anthracis* необходимо отличить от непатогенных штаммов *B. anthracis* и других близкородственных непатогенных видов *Bacillus*.

Использование молекулярно-генетических методов на основе ПЦР позволяет поднять детекцию и дифференциацию бацилл на качественно новый уровень. Так, авторы работы [12] осуществляли детекцию ДНК патогенных штаммов *B. anthracis* в

образцах клинической крови и носовых смывах больных септической сибирской язвой с помощью стандартного варианта ПЦР и ПЦР в реальном времени. При этом для идентификации бацилл использовали в основном плазмидные маркеры. В работе [6] предложены специфические праймеры и олигонуклеотидные пробы для идентификации только патогенных штаммов *B. anthracis* в образцах грунта на основе детекции *pag* и *cap* генов плазмид рХО1 и рХО2 соответственно с помощью TaqMan ПЦР и показана возможность количественного анализа спор. В работе [15] использован микроанализ ряда плазмидных и только одного хромосомного маркера для идентификации возбудителя сибирской язвы и его дифференциации от близкородственных видов *Bacillus* и непатогенных штаммов *B. anthracis*.

Поскольку плазмиды являются нестабильными генетическими элементами по сравнению с хромосомной ДНК, при разработке наборов праймеров для ПЦР тест-систем для генотипирования *B. anthracis* необходимо использовать хромосомные маркеры в сочетании с плазмидными. Известно, что существуют изоляты, в которых отсутствуют одна или обе плазмиды. Кроме того, возможен перенос плазмид среди родственных видов или плазмиды рХО2 может быть естественно утерянной [6]. Поэтому дифференцирование *B. anthracis* от *B. cereus* и *B. thuringiensis* с помощью только анализа плазмидных генов представляется проблематичным. Следовательно, важным является поиск генетических маркеров, которые позволили бы осуществлять быструю и надежную детекцию *B. anthracis* при проведении исследований клинических образцов и образцов из окружающей среды, подтверждение отрицательных результатов и проведение профилактических исследований.

Стандартный вариант ПЦР имеет невысокую надежность по отношению к другим модификациям ПЦР-анализа. Это связано с тем, что при визуализации электрофореграммы продуктов ПЦР фрагменты ДНК разной длины могут иметь одинаковую, а фрагменты ДНК одинаковой длины — разную подвижность. В зависимости от АТ/ГС состава анализируемого ампликона возможно образование им изгибов, неканонических структур и т.д., что ведет к изменению конформации ПЦР-продукта и, следовательно, изменению его подвижности в электрическом поле. Поэтому со-

вершенно естественной выглядит разработка наборов для детекции инфекционных агентов с помощью объединения методов ПЦР с ПДРФ-анализом (полиморфизм длины рестрикционных фрагментов) вследствие их высокой надежности.

ПЦР с последующим ПДРФ-анализом или секвенированием ДНК являются мощными инструментами для анализа и идентификации штаммов микроорганизмов, однако возможностей ПДРФ недостаточно для определения связи или различий между эволюционно родственными изолятами. Такая информация может быть получена из секвенирования ампликона и последующего построения филогенетического дерева.

В данной работе на основе компьютерного анализа генов хромосомной ДНК *V.anthraxis*, *V.cereus* и *V.thuringiensis* определены маркеры для их дифференциации и разработаны наборы праймеров для видоспецифической детекции *V.anthraxis* от близкородственных видов *V.cereus* и *V.thuringiensis* с помощью мультиплексной ПЦР. Также созданы две пары праймеров, которые позволяют дифференцировать штаммы *V.anthraxis* с разным профилем плазмид, определяющих патогенные свойства штаммов. Кроме того, проанализированы инвертированные повторы, которые существуют в плазидах рХО1 и рХО2 *V.anthraxis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для компьютерного анализа последовательностей генов *groV* и *guy* *V.anthraxis*, *V.cereus* и *V.thuringiensis* использовали пакет прикладных программ GeneVee [1]. Множественное выравнивание, его статистический анализ и построение филогенетического дерева проводили с помощью модулей Malign, Stalign и Tree. Для анализа праймеров с учетом их термодинамических характеристик была использована программа Oligo [13].

Благодаря завершению проекта по секвенированию генома *V.anthraxis* была установлена полная последовательность хромосомной ДНК *V. anthracis* (номер в GenBank/ EMBL/DDBJ AE017024), а также полностью секвенированы последовательности двух изолятов плазмиды рХО2 (длина 96231 п.н., номер NC_002146, или AF 188935) и 94829 п.н. (номер AE 011191) и двух изолятов плазмиды рХО1 (длина 181677 п.н., номер AE 011190) и 181654 п.н. (номер NC_001496). Для компьютерного

анализа *groV* гена хромосомной ДНК было использовано 17 изолятов *V.anthraxis*, 6 — *V.cereus* и 6 — *V.thuringiensis*, которые имели перекрывающиеся фрагменты гена *groV*.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При разработке наборов праймеров на первом этапе нами были проанализированы фрагменты геномной ДНК свыше 200 изолятов *V.anthraxis*, *V.cereus* и *V.thuringiensis* из баз данных EMBL, GenBank, DDBJ. Последовательности *groV* гена — потенциального хромосомного маркера для видоспецифической детекции бацилл группы *V.cereus* — выбраны для дальнейшего анализа.

Из приведенного фрагмента компьютерного анализа для *groV* гена хромосомной ДНК 29 штаммов *V.anthraxis*, *V.thuringiensis* и *V.cereus* (рис. 1) видно, что *groV* ген можно использовать для видоспецифической детекции *V.anthraxis* за счет несопадающего нуклеотида на 3'-конце праймера по сравнению с изолятами *V.cereus* и *V.thuringiensis*. На основе компьютерного и термодинамического анализа был создан набор праймеров *Banth1-Banth2* (табл.), комплементарных фрагментам *groV* гена, позволяющий дифференцировать *V.anthraxis* от близкородственных штаммов *V.thuringiensis* и *V.cereus* за счет неспаренного нуклеотида на 3'-конце праймера.

В то же время, изоляты *V.thuringiensis* невозможно дифференцировать от изолятов *V.cereus* на основе *groV* гена, поскольку они имеют чрезвычайно высокую степень гомологии. Более того, некоторые изоляты *V.thuringiensis* генетически являются более близкими к *V.cereus*, чем к другим штаммам *V.thuringiensis*. О противоречивости таксономической классификации штаммов *V.cereus* и *V.thuringiensis* свидетельствуют построенные филогенетические деревья, на которых видно, что штаммы *V.cereus* AF205339 и AF205342 находятся внутри кластера изолятов *V.thuringiensis*. Кроме того, на построенном дереве невозможно четко отличить два кластера изолятов, которые должны соответствовать двум видам — *V.cereus* и *V.thuringiensis*. Если предположить, что изоляты *V.cereus* AF205339 и AF205342 ошибочно классифицированы как штаммы *V.cereus*, то на дендрограмме будут существовать четко выделенные кластеры *V.cereus* и *V.thuringiensis*. Следовательно, в этом случае *groV* ген можно использовать как маркер для генотипирования.

AF205337	B.c	AACATTAGTGGATCCAGAAACTGGTGAATTTTAGCGGCAGAAGGAACAATCTTAGATCG
AF205336	B.cn.....
AF205338	B.c
AF205339	B.c
AF205341	B.c
AF205342	B.c
AF205344	B.tg.....
AF205345	B.tg.....
AF205346	B.tg.....
AF205347	B.t
AF205348	B.t
AF205349	B.t
AF205319	B.aa.....
AF205320	B.aa.....
AF205321	B.aa.....
AF205322	B.aa.....
AF205323	B.aa.....
AF205324	B.aa.....
AF205325	B.aa.....
AF205326	B.aa.....
AF205327	B.aa.....
AF205328	B.aa.....
AF205329	B.aa.....t.....
AF205330	B.aa.....
AF205331	B.aa.....
AF205333	B.aa.....
AF205334	B.aa.....
AF205335	B.aa.....
AE017024	B.aa.....



Рис. 1. Фрагмент множественного выравнивания фрагмента генов, кодирующего β -субъединицу РНК-полимеразы, 29 изолятов *B.anthraxis* (B.a.), *B.cereus* (B.c.) и *B.thuringiensis* (B.t.) из баз данных секвенированных последовательностей нуклеиновых кислот EMBL, GenBank и DDBJ.

Черная полоса — присутствие высококонсерв. локусов, провалы — нуклеотиды, отл. от нуклеотидов консенс. последовательности B.c. AF205337. Нуклеотиды, которые не совп. — маленькие буквы. Приведены номера, соотв. номерам в базах данных. AE017024 — B.a. с полностью секв. геномом.

Также было проведено множественное выравнивание с последующим построением филогенетического дерева для другого маркерного гена, кодирующего гиразу — *gug* гена хромосомной ДНК *B.anthraxis*, *B.cereus* и *B.thuringiensis*. При этом для компьютерного анализа были взяты фрагменты *gug* гена длиной 1212 п.н. 2 изолятов *B.anthraxis*, 2 изолятов *B.thuringiensis* и 4 изолятов *B. cereus*. Построенное филогенетическое дерево (рис. 2) демонстрирует, что изоляты *B.anthraxis* образуют отдельный кластер. Однако изоляты *B.cereus* AF135387 и *B.thuringiensis* AF090331 не отвечают вышеприведенным критериям: эти изоляты проявляют большую гомологию один к другому, чем к изолятам соответствующих видов. Поэтому при разработке набора праймеров для дифференциации *B.cereus* от *B.thuringiensis* на основе *gug* гена мы не включали изоляты *B.cereus* AF135387 и *B.thuringiensis* AF090331. Это дало нам возможность четко определить несовпадающие нуклеотиды для штаммов *B.cereus* по сравнению с *B.thuringiensis* и *B.anthraxis*. На основе проведенного компьютерного анализа нами определены маркеры (фрагмен-

ты *gug* гена) для видоспецифической детекции бактерий *B.cereus*, которые также могут быть использованы как дополнительные хромосомные маркеры для детекции *B.anthraxis*.

Для дифференциации патогенных и непатогенных штаммов *B.anthraxis* созданный набор видоспецифических праймеров был дополнен праймерами, комплементарными плазмидам *pXO1* и *pXO2* (табл.), присутствие которых является характерной особенностью вирулентных штаммов *B.anthraxis*. Известно, что существуют 4 варианта штаммов *B.anthraxis* с разным плазмидным профилем: изоляты, содержащие обе плазмиды (*pXO1*⁺, *pXO2*⁺), и штаммы, в которых отсутствуют одна (*pXO1*⁺, *pXO2*⁻ или *pXO1*⁻, *pXO2*⁺) или обе плазмиды (*pXO1*⁻, *pXO2*⁻). В отличие от опубликованной тест-системы для мультиплексной ПЦР-детекции штаммов *B.anthraxis* [5] с разным плазмидным профилем, в которой наименьшая разница между размерами ампликонов составляет 63 п.н., в разработанных нами наборах праймеров длина ПЦР-продуктов отличается как минимум на 99 п.н. Такое увеличение минимальной раз-

ницы между размерами ампликонов может способствовать повышению надежности интерпретации результатов ПЦР-анализа, поскольку при достаточно большой концентрации ампликона, которая, в свою очередь, зависит от начальной концентрации ДНК бактерий и изменяется в широком интервале, при анализе клинических образцов иногда довольно трудно на электрофореграмме различить две полосы, соответствующие близким по длине ампликонам.

Нами также охарактеризованы термодинамически стабильные инвертированные повторы, которые образуют шпильчатые структуры, или шпильки, которые могут возникать в плазмидах рХО1 и рХО2 штаммов *V.anthraxis*. Ранее для суперспиральных ДНК, последовательности которых содержат инвертированные повторы, или палиндромы, было установлено, что при физиологических условиях возможно образование шпилек как фрагментов крестообразной структуры с длиной стебля не менее 7 пар нуклеотидов и петель, размер которой не превосходит 4 — 5 нуклеотидов [9]. Исходя из этих параметров, нами были определены термодинамически стабильные инвертированные повторы как в последовательности плазмиды рХО1, так и в последовательности плазмиды рХО2 патогенного штамма A2012 *V.anthraxis*.

Компьютерный анализ показал, что плазмиды рХО1 и рХО2 могут содержать 18 и 4 шпильчатые структуры. Инвертированные последовательности, которые потенциально могут образовывать шпильки путем межцепочечного комплементарного спаривания нуклеотидов в одноцепочечной ДНК и РНК, условно можно разделить на длинные (длиной больше 45 нуклеотидов) и короткие (длиной меньше 45 нуклеотидов) повторы. Плаزمиды рХО1

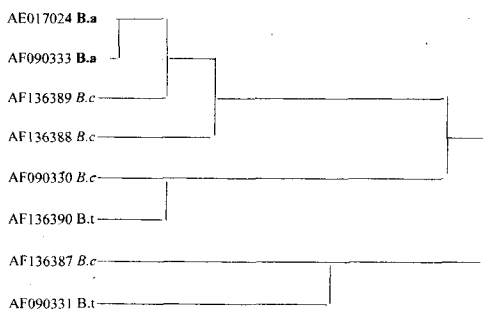


Рис. 2. Филогенетический анализ штаммов *V.anthraxis*, *V.cereus* и *V.thuringiensis*.

Дерево построено на основе фрагмента *gyrB* гена хромосомной ДНК длиной 1212 п.н., кодирующего гиразу. Обозначения те же, что на рис. 1.

может содержать 5 длинных палиндромов длиной 45 — 62 нуклеотида с энергией ΔG -45,1 — 25,9 ккал/моль и 13 коротких палиндромов длиной 26 — 41 нуклеотид с энергией ΔG -10,8 — 23,1 ккал/моль. Плазмиды рХО2 может потенциально содержать 1 длинный палиндром длиной 48 нуклеотидов с энергией ΔG -35 и 3 коротких палиндромов длиной 28 — 36 нуклеотидов с энергией ΔG -20,1 — 12,9 ккал/моль. Эти результаты демонстрируют, что длинные инвертированные повторы являются высокостабильными генетическими элементами для плазмид рХО1 и рХО2.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее разработанная стратегия создания наборов праймеров для ПЦР-детекции инфекционных агентов базируется на компьютерном анализе максимально возможного количества последовательностей гена или фрагментов гена возбудителя для уменьшения риска ложноположительных результатов ПЦР-анализа ввиду наличия некомплементарных нуклеотидов в комплексе праймер-однонитевой продукт ПЦР [2, 3]. Такая стратегия позволяет выявлять высококонсервативные локусы, а также несовпадающие нуклеотиды и с высокой вероятностью прогнозировать, что созданные праймеры будут связываться с фрагментами соответствующих генов новых неизвестных изолятов бактерий, которые будут секвенированы в будущем.

Известно [11], что *groV* ген является высококонсервативным и, как минимум, одна его копия присутствует в бактериях, поскольку он играет значительную роль в клеточном метаболизме. Этот ген вместе с *groC* геном, кодирующим β' -субъединицу, составляет основу пентамерной бактериальной РНК-полимеразы. РрОВ благодаря

Праймеры для видоспецифической детекции *V.anthraxis*, *V.cereus* и *V.thuringiensis* и дифференциации штаммов *V.anthraxis* с различным плазмидным профилем

Праймер	Последовательность	Размер ампликона	Положение
Banth1	5'- cca cca aca gta gaa aat gct -3'	173	320-340
Banth2	5'- att tca cca gtt tet gga tct -3'		492-473
Bthur1	5'- ctt act tgt tgc tgc ttt ctt c -3'	272	368-389
Bthur2	5'- gca taa atc tta ata gat tgc ag -3'		639-617
Bcer1	5'- ctt act tgt tgc tgc ttt ctt t -3'	372	368-389
Bcer2	5'- gga tat cac ctg gtg tga tgt -3'		729-709
рХО2-1	5'- cca tat caa aag agt caa ttg c -3'	471	835-856
рХО2-2	5'- ctt ctg tta caa aga aat cag tac -3'		1305-1282
рХО1-1	5'- gca gct gtt gtt cta tta acc -3'	578	1372-1392
рХО1-2	5'- cca gtc aat cga aga gta acc -3'		1949-1929

своей дискриминаторной мощности был использован для разработки проб для специфической детекции патогенов *Coxiella burnettii*, *Rickettsia* и *Yersinia pestis*. Интересно отметить, что нуклеотидная мутация *groV* гена, которая позволяет дифференцировать все известные изоляты *V.anthraxis* от эволюционно близких видов *V.cereus* и *V.thuringiensis*, является синонимической нуклеотидной заменой, т.е. нейтральной мутацией, которая не влияет на фенотипические признаки микроорганизма.

Принято считать, что на филогенетическом дереве должно присутствовать такое количество кластеров, четко отделенных один от другого и соответствующих числу видов или подвидов, для которых была построена дендрограмма. Важно отметить, что в случае корректного генотипирования изоляты одного вида находятся в пределах одного кластера. Так, в работе [8] по филогенетическому анализу подвидов вируса клещевого энцефалита из разных регионов для последовательности *E* гена длиной 1488 п.н. убедительно продемонстрировано наличие 3 подвидов вируса КЭ, которые на филогенетическом дереве соответствуют 3 отдельным неперекрывающимся кластерам изолятов вируса КЭ.

На построенном филогенетическом дереве на основе *groV* гена для трех видов *Bacillus* sp. с добавлением штаммов *V.anthraxis* можно видеть, что изоляты *V.anthraxis* образуют отдельный кластер, штаммы которого не пересекаются с изолятами *V.cereus* и *V.thuringiensis*. Таким образом, построение филогенетического дерева даже на основе фрагмента гена, а не его полной последовательности может служить своеобразным показателем надежности и точности таксономической классификации видов или подвидов инфекционных возбудителей. В данном случае нами продемонстрировано, что два штамма *V.cereus* (AF 205339 и AF 205342) ошибочно классифицированы. Поэтому при создании праймеров мы не учитывали эти два изолята. Наборы праймеров оптимизировали по температурам отжига праймеров и длине ампликонов таким образом, что возможно типирование этих филогенетически близких видов в одной реакции при проведении мультиплексной ПЦР и последующей визуализации ампликона с использованием маркера молекулярного веса 100 п.н.

Ранее было показано, что инвертированные повторы образуют крестообразные

структуры в отрицательно суперспирализованных ДНК *in vivo* и *in vitro* [16]. Для детекции шпилечных структур *in vitro* были разработаны генетические [10] и биофизические методы. В то время как молекулярно-биологические методы, основанные на рестрикции нуклеазами петли шпильки, позволяют определить последовательность и локализовать положение инвертированного повтора на геноме, с помощью современных методов нанобиологии, а именно атомно-силовой микроскопии, шпилечная структура была непосредственно визуализирована в суперспиральной плазмидной ДНК pUC8 [4]. Интерес к возможности образования таких структур возник в связи с тем, что они являются одним из факторов, регулирующих стабильность мРНК микроорганизмов [7]. Один из возможных механизмов стабилизации мРНК связан с образованием вторичной структуры на 3'- или 5'-конце мРНК. Так, например, образование такой шпильки на 5'-конце стабилизирует мРНК *Escherichia coli* путем предотвращения взаимодействия 5'-конца мРНК с РНК E [14].

Нами разработаны наборы праймеров для видоспецифической детекции бактерий группы *V.cereus*, а также для дифференциации вирулентных штаммов *V.anthraxis*, которые содержат плазмиды pXO1 и pXO2. Кроме того, сконструированные праймеры, специфические к плазмидам pXO1 и pXO2, позволяют дифференцировать непатогенные штаммы *V.anthraxis*, в которых отсутствуют обе или одна из плазмид. Продукты ПЦР, специфические для каждого вида, отличаются длиной ампликона приблизительно на 100 п.н. Объединение этих наборов с использованием хромосомных и плазмидных маркеров позволяет проводить эффективную дифференциальную детекцию *V.anthraxis*, *V.cereus* и *V.thuringiensis* с помощью мультиплексной ПЦР как в клинических образцах, так и в образцах окружающей среды.

Проведенный анализ последовательностей плазмид pXO1 и pXO2 *V.anthraxis* показал, что плазмиды содержат 18 и 4 инвертированные последовательности соответственно, которые потенциально могут образовывать термодинамически стабильные шпилечные структуры. Длина шпилек варьирует от 62 до 26 нуклеотидов, а энергия — от —45,1 до —10,8 ккал/моль. Можно предположить, что одна из биологических функций данных шпилек заключается в защите плазмид, обуславливающих ви-

рулентность бацилл, от деградирующей активности разных ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бродский Л.И., Драчев А.Л., Татузов Р.Л. и др. Пакет прикладных программ для анализа последовательностей биополимеров: GeneVec. Биополимеры и клетка. 1991, 7 (1): 10 — 14.
2. Лиманская О., Rola M., Viska L. и др. Детекция провирусной ДНК вируса иммунодефицита крупного рогатого скота посредством полимеразной цепной реакции. Вopr. вирусол. 2005, 2: 38 — 43.
3. Лиманский А.П., Минухин В.В., Лиманская О.Ю. и др. Видоспецифическая детекция ДНК *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis* посредством полимеразной цепной реакции. Журн. микробиол. 2005, 3: 33 — 39.
4. Лиманський О.П., Лиманська О.Ю. Вивчення геномної ДНК мікроорганізмів методом атомносилової мікроскопії. Цитология и генетика. 2002, 36 (4): 30 — 36.
5. Цыганкова О.И., Еременко Е.И., Рязанова А.Г. и др. Мультиплексная амплификационная тест-система для идентификации и дифференциации *Bacillus anthracis*. Журн. микробиол. 2005, 3: 69 — 73.
6. Chunsun R., Kyunghee L., Cheonkwon Y. et al. Sensitive and rapid quantitative detection of anthrax spores isolated from soil samples by real-time PCR. Microbiol. Immunol. 2003, 47 (10): 693 — 699.
7. Deutscher M., Li Z. Exoribonucleases and their multiple role in RNA metabolism. Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol. 2001, 66: 67 — 105.
8. Hayasaka D., Ivanov L., Leonova G. et al. Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and far-eastern Asia. J. Gen. Virol. 2001, 82: 1319 — 1328.
9. Lyamichev V., Panyutin I., Mirkin S. The absence of cruciform structures from pAO3 plasmid DNA in vivo. J. Biomol. Struct. Dyn. 1984, 2 (2): 291 — 301.
10. Nasar F., Jankowski C., Nag D. Long palindromic sequences induce double-stranded breaks during meiosis in yeast. Mol. Cell. Biol. 2000, 20 (10): 3449 — 3458.
11. Qi Y., Patra G., Liang X. et al. Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. Appl. Environ. Microbiol. 2001, 67 (8): 3720 — 3727.
12. Rantakokko-Jalava K., Viljanen M.K. Application of *Bacillus anthracis* PCR to simulated clinical samples. Clin. Microbiol. Infect. 2003, 9 (10): 1051 — 1056.
13. Rychlik W., Spencer W., Rhoads R. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. Nucl. Acids Res. 1990, 18: 6409 — 6417.
14. Unniraman S., Chatterji M., Nagaraja V. A hairpin near the 5' end stabilises the DNA gyrase mRNA in *Mycobacterium smegmatis*. Ibid. 2002, 30 (24): 5376 — 5381.
15. Volokhov D., Pomerantsev A., Kivovich V. et al. Identification of *Bacillus anthracis* by multiprobe microarray hybridization. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2004, 49: 163 — 171.
16. Vologodskii A. Formation of unusual structures in the supercoiled DNA. Influence of transitions. Molecular Biology. 1988, 22 (3): 687 — 692.

Поступила 10.10.07

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2008

*И.Н.Лаврентьева, В.В.Семериков,
А.Б.Жебрун, И.В.Фельдблум,
А.В.Марков*

КРАСНУХА В РОССИИ: ИЗМЕНЧИВОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЯ В ПЕРИОД ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИИ

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург; Пермская государственная медицинская академия; ООО НПФ «Хеликс», Санкт-Петербург

Цель. Определение влияния вакцинопрофилактики краснухи на генетическую изменчивость вируса краснухи. *Материалы и методы.* Вакцинные штаммы вируса краснухи Wistar27/3, «Орлов-В», сыворотки больных краснухой,

*I.N.Lavrentyeva, V.V.Semerikov,
A.B.Zhebrun, I.V.Feldblyum,
A.V.Markov*

RUBELLA IN RUSSIA: VARIABILITY OF THE INFECTIOUS AGENT DURING THE PERIOD OF VACCINE PROPHYLAXIS

Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St.-Petersburg; State Medical Academy, Perm; "Cheliks", St.-Petersburg, Russia

Aim. To assess influence of vaccination against rubella on the genetic diversity of rubella virus. *Materials and methods.* Vaccine strains of rubella virus Wistar 27/3 and Orlov-B as well as sera from patients with rubella obtained in Perm region dur-