

ВИДОСПЕЦИФІЧНА ДЕТЕКЦІЯ ЗБУДНИКА СИБІРКИ

О. Ю. Лиманська^{1,2}
Л. О. Муртазаєва¹
О. П. Лиманський¹

¹ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова
НАМН України», Харків

²Національний науковий центр «Інститут експериментальної
і клінічної ветеринарної медицини» НААН України, Харків

E-mail: olga.limanskaya@mail.ru

Отримано 26.10.2011

Проаналізовано послідовності й побудовано дендрограми для бактерій групи *Bacillus cereus sensulato* — *B. anthracis*, *B. cereus* та *B. thuringiensis* — на основі генів *rpoB*, *plcr*, *ssp* хромосомної ДНК, які можуть бути молекулярно-генетичними маркерами для їх типування. Тестування набору праймерів, цільовою мішенню для яких є фрагмент гена *ssp*, що характеризується гексануклеотидною вставкою тільки для ізолятів *B. anthracis*, дало змогу за допомогою стандартної полімеразної ланцюгової реакції надійно диференціювати бактерії *B. anthracis* від близькоспоріднених видів *B. cereus* та *B. thuringiensis*. Показано, що філогенетичне дерево можна використовувати як показник надійності й точності таксономічної класифікації видів та підвидів патогенів. На відміну від усіх проаналізованих штамів *B. anthracis*, які утворюють монофілетичний кластер на дендрограмі, існують штами *B. cereus* — філогенетично ближчі до штамів *B. thuringiensis*, а також штами *B. thuringiensis* — філогенетично ближчі до штамів *B. cereus*, що свідчить про необхідність їх рекласифікації.

Ключові слова: генотипування, збудник сибірки, *Bacillus anthracis*, полімеразна ланцюгова реакція.

Одним з основних напрямів розвитку сучасної біотехнології є медична біотехнологія, яку розглядають як необхідну складову успішного виконання пріоритетних проектів та урядових програм у галузі охорони здоров'я, традиційно орієнтованих на профілактику, запобігання розповсюдженню та ліквідацію актуальних і соціально значущих інфекційних захворювань. Природне різноманіття збудників інфекційних захворювань потребує, поряд із проведенням санітарно-гігієнічних, протиепідемічних і профілактичних заходів, удосконалення та створення ефективних засобів молекулярної діагностики. З огляду на це одне з найважливіших завдань медичної біотехнології полягає, зокрема, у створенні нових методів аналізу, розробленні та застосуванні молекулярних технологій у клінічній практиці з використанням досягнень молекулярної біології, генетики, біоінформатики з метою ідентифікації патогенів, що є інтегральною складовою моніторингу інфекції.

B. anthracis є членом так званої групи бацил *B. cereus sensu lato*, яка включає також *B. thuringiensis*, *B. cereus* та непатогенні *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* і *B. weihenstephanensis*. Ці близькоспоріднені бактерії є патогенами тварин (*B. anthracis* та *B. cereus*) і комах (*B. thuringiensis*). Група

B. cereus sensu lato є однією з найбільш таксономічно сумнівних груп бацил. ДНК-ДНК гібридизація та електрофорез у пульсівному полі свідчать про наявність високого ступеня подібності нуклеотидних послідовностей геномної ДНК серед бактерій *B. anthracis*, *B. thuringiensis* та *B. cereus* [1]. Проведене дослідження з мультилокусного електрофорезу протеїнів показало, що члени цієї групи належать до одного великого роду *Bacillus*.

Донедавна вважали, що від інших членів групи *B. cereus sensu lato* збудник сибірки відрізняється наявністю плазмід рХО1 (розмір якої становить приблизно 180 т. п. н.) та рХО2 (близько 90 т. п. н.), що кодують синтез токсину та капсули відповідно і зумовлюють вірулентність бацили. Відсутність будь-якої з плазмід призводить до атенюації штаму [2–4] або значного зменшення (хоча й не повного зникнення) вірулентності.

Деякі роки тому для ідентифікації бактерій було запропоновано ген *rpoB*, який кодує β-субодиницю РНК-полімерази. Цей ген розглядають як своєрідний «підпис» бактерій. Ген *rpoB* є висококонсервативним, і, як мінімум, одна його копія присутня в бактеріях, оскільки він відіграє значну роль у клітинному метаболізмі. Однак істотним недоліком застосування цього маркера є можливість отримання хибнопозитивних

результатів під час проведення ПЛР-аналізу з ізолятами близькоспоріднених видів *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, а також з ізолятами значно віддаленішого виду *B. megaterium* [2, 3]. Водночас аналіз таких хромосомних генів, як 16SPHK, *gyrB*, рибосомальні спейсери 16S–23S, що їх часто застосовують для бактеріального генотипування та філогенетичного аналізу, показав, що вони не мають достатнього поліморфізму для диференціації *B. anthracis* від *B. cereus* та *B. thuringiensis*.

В останні роки було досягнуто істотного прогресу в галузі ранньої детекції біологічних агентів завдяки значному фінансуванню проєктів. Проте інформацію стосовно запатентованих методів і тест-систем, як правило, подано загальними або недостатньо повними даними. Окрім того, відповідні наукові результати публікують доволі рідко [3], оскільки у деяких провідних фірмах це не узвичаєно. Тому дослідження з використанням молекулярно-генетичних методів на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з різноманітними модифікаціями можуть мати як прикладне (діагностичне) значення для вирішення проблеми біотероризму, так і фундаментальне (вивчення особливостей організації геному) — для розвитку молекулярної медицини та медичної біотехнології. Швидка та надійна ідентифікація патогенів є необхідною для проведення досліджень зразків з навколишнього середовища, підтвердження негативних результатів, проведення профілактичних досліджень, а також для запобігання непотрібним заходам з деконтамінації.

Отже, диференціація *B. anthracis* від філогенетично близьких видів *B. cereus* та *B. thuringiensis* на основі хромосомних маркерів залишається актуальною. Раніше вважали, що одночасна наявність двох великих плазмід rXO1 та rXO2, які визначають токсичні властивості *B. anthracis*, є маркером вірулентності бацили. Утворення ізолятами *B. anthracis* мономорфного галушення (кластера) усередині групи *B. cereus sensu lato* підтверджувало цю можливість, хоча штами *B. cereus* та *B. thuringiensis* є генетично близькоспорідненими до кластера *B. anthracis*. Нещодавно показано, що горизонтальне перенесення плазмід істотно змінює фенотипові властивості патогену [5]. А протягом останніх шести років від людиноподібних мавп отримали ізоляти *B. cereus*, що містять обидві плазмиди rXO1 та rXO2 [6]. Таким чином, через наявність обох плазмід rXO1 та rXO2 наразі неможливо принципово

відокремити штами *B. anthracis* від інших близькоспоріднених бацил. Основою для успішної детекції штамів *B. anthracis* та унікальності їхнього окремого кластера може стати виявлення специфічних для *B. anthracis* хромосомних точкових мутацій.

Виходячи з вищенаведеного, у цій роботі на основі комп'ютерного аналізу генів хромосомної ДНК бактерій групи *Bacillus cereus sensu lato* визначено маркери для їх видоспецифічної детекції та проведено диференціацію *B. anthracis* від близькоспоріднених видів *B. cereus* і *B. thuringiensis* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з електрофоретичною детекцією.

Матеріали і методи

Філогенетичний аналіз, множинне вирівнювання та наступну статистичну обробку здійснювали на основі комп'ютерного аналізу нуклеотидних послідовностей генів *rpoB*, *gyr*, *ssp* бактерій *B. anthracis*, *B. cereus* і *B. thuringiensis* та їхніх фрагментів за допомогою ліцензійного пакета прикладних програм GeneBee [7], термодинамічний аналіз праймерів та ампліконів — з використанням програм MeltCalc [8], Exiqon (Exiqon, Данія; <http://www.exiqon.com>) та Oligo (версія 3.0, США) [9].

Побудову філогенетичних дерев на основі нуклеотидних послідовностей після множинного вирівнювання за допомогою вбудованої в пакет програм MEGA4 програми ClustalW проводили із застосуванням методів найближчого зв'язування (neighbor-joining) та мінімальної еволюції [10] (Saitou N. and Nei M., 1987), реалізованих у пакеті MEGA 4.0 [11]. Попарні генетичні відстані між послідовностями було визначено за двопараметровою моделі Кімури [12], у якій беруться до уваги трансверсійні та трансзиційні заміни. Статистичну вірогідність отриманих дерев оцінювали бутстреп-аналізом шляхом побудови 4 000 альтернативних дерев. Для підтвердження надійності філогенетичних дерев, побудованих за допомогою пакета GeneBee, вибірково створено деякі з них із використанням пакета MEGA4. Порівняння філогенетичних дерев, отриманих за допомогою зазначених пакетів, показало, що побудовані дендрограми добре узгоджуються і не мають принципових розбіжностей.

Мультилокусний аналіз проведено на основі послідовностей чотирьох хромосомних генів (*rpoB*, *gyrB*, *plcR* та *ssp*) бактерій групи *B. cereus* [13]. Визначаючи молекулярно-

генетичні маркери на першому етапі, проаналізували фрагменти геномної ДНК понад 300 ізолятів *B. anthracis*, *B. cereus* та *B. thuringiensis* із бази даних GenBank. Для подальшого аналізу вибрали послідовності генів *rpoB* (кодує β-субодиницю РНК-полімерази), *gyrB* (β-субодиницю гірази), *ssp* (низькомолекулярний кислоторозчинний протеїн) та транскрипційного регулятора *plcR* — потенційних хромосомних маркерів для видоспецифічної детекції бактерій групи *B. cereus*.

Тестування набору праймерів для детекції *B. anthracis* проводили, застосовуючи зразки ДНК, екстрагованої з 8 ізолятів *B. cereus*, *B. pseudomycooides*, *B. anthracis*, 6 ізолятів *B. thuringiensis*, 2 ізолятів *B. weihenstephanensis*, *B. fluorescens*, *B. mycooides*, отриманих від д-ра Степаншиної В. М. (Державний науковий центр прикладної мікробіології та біотехнології, Росія) і д-ра Barker M. (Університет Heriot-Watt, Шотландія).

Стандартну ПЛР здійснювали на ампліфікаторі НВО «Точність» (Тула, Росія) за таких температурних та часових параметрів: початкова інкубація — 95 °С, 3 хв; денатурація — 95 °С, 1 хв; відпал — 60 °С, 1 хв; синтез — 74 °С, 1,3 хв; кількість циклів — 45. Для проведення ПЛР використовували універсальний набір реагентів («Ізоген», Росія), до складу якого входить термостабільна ДНК-полімераза (ДНКП), інгібована антитілами, що уможливорює поставлення ПЛР з гарячим стартом. Проводили її в об'ємі реакційної суміші 25 мкл за концентрації праймерів 0,5 мкМ. Синтезовані праймери було очищено електрофорезом у ПААГ («Синтол», Росія).

Для ампліфікації фрагмента гена *ssp* *B. anthracis* використовували розроблений набір праймерів Banssp7A — Banssp8, послідовності та позиції яких наведено нижче:

Banssp7A (1–29) 5'-gga ggt gag aaa gat gag taa aaa aca ac-3';

Banssp8 (200–175) 5'-aac tag cat ttg tgc ttt gaa tgc ta -3'.

Розрахована довжина ампліконів становила 83 та 200 п. н.

Візуалізацію ампліконів здійснювали за допомогою електрофорезу в 1,5% -му агарозному гелі (Serva, Німеччина) з наступним фарбуванням бромистим етидієм (Merck, США).

Результати та обговорення

На основі генетичної схожості було запропоновано відносити *B. anthracis*, *B. cereus* та *B. thuringiensis* до одного виду — *Bacillus*

cereus sensu lato зі збереженням статусу окремих видів [5]. Ці бактерії мають фенотипові відмінності й виявляють вірулентність різними шляхами. У бактеріях *B. cereus* та *B. thuringiensis* експресія секреції неспецифічних факторів вірулентності (гемолізинів) регулюється транскрипційним активатором PlcR. І навпаки, у *B. anthracis* PlcR інактивується через антисенсову мутацію в гені *plcR* [14]. Проведене нами множинне вирівнювання повновимірного гена *plcR* (завдовжки 858 п. н.) та його фрагментів для 12 ізолятів *B. anthracis* показало надзвичайно високий ступінь подібності (виявлено тільки одну мутацію для ізоляту AY265700; результати не наведено).

Хоча нині не існує практичних рекомендацій щодо використання відомостей про філогенію молекулярних маркерів у таксономії бактерій групи *B. cereus sensu lato*, додаткові філогенетичні дані можуть допомогти з'ясувати ситуацію для сумнівних в еволюційному та таксономічному аспектах ізолятів *B. cereus* та *B. thuringiensis*.

Транскрипційний регулятор PlcR (Phospholipase C Regulator) контролює експресію більшості відомих факторів вірулентності (ентеротоксинів, гемолізинів, фосфоліпаз та протеаз) для баціл групи *B. cereus* [15, 16]. Раніше було показано, що ген *plcR* характеризується параметрами, що істотно відрізняються від параметрів інших хромосомних генів: співвідношення варіабельних сайтів та максимальна дивергенція послідовності для гена *plcR* є значно більшими порівняно з іншими генами. Слід зазначити, що число варіабельних сайтів (N) було визначено для всіх представників групи *B. cereus* за винятком *B. mycooides*. Знайдене нами число варіабельних сайтів для диференціації *B. anthracis* тільки від *B. cereus* значно менше, ніж визначено в роботі [15], і становить 11,6%, а не 32,5%. Чим вище значення N, тим більше з'являється варіантів розроблення системи праймерів та підвищення їхньої ефективності. Так, у роботі [17] для фрагмента гена *plcR* завдовжки 103 п. н. знайдено тільки один однонуклеотидний поліморфізм. Водночас, аналізуючи повновимірний ген *plcR* (858 п. н.), ми виявили 14 однонуклеотидних поліморфізмів, які можна використовувати для видоспецифічної детекції *B. anthracis*.

Побудовані філограми на основі генів *plcR* (рис. 1) та *rpoB* (рис. 2) ще раз засвідчили суперечливість сучасної таксономічної класифікації представників групи *B. cereus*. Так, кількість підвидів патогену, що їх іден-

тифікують, має збігатися з кількістю чітко розрізнених кластерів ізолятів на філогенетичному дереві. Наприклад, у роботах Naaya-saka et al. [18, 19] з філогенетичного аналізу підвидів вірусу кліщового енцефаліту (КЕ) з різних регіонів для послідовності гена *E* завдовжки 1 488 п. н. переконливо продемонстровано наявність трьох підвидів вірусу КЕ, які на філогенетичному дереві відповідають трьом окремим кластерам ізолятів вірусу КЕ, що не перекриваються. У роботі [20] філограма, побудована на основі послідовностей генів *gyrB* та *rpoD* штамів чотирьох видів бактерій родини *Aeromonas*, також характеризується наявністю саме чотирьох кластерів, які відповідають певним видам досліджуваних бактерій.

Проведений аналіз множинного вирівнювання фрагмента гена *rpoB* для ізолятів групи *B. cereus sensu lato* підтвердив відомі дані літератури, що стосуються поліморфізму його нуклеотидної послідовності. Наші дані збігаються з результатами роботи [15], в якій визначено, що кількість варіабельних сайтів для гена *rpoB* становить лише 7,86%, тобто для фрагмента завдовжки 400 п. н.

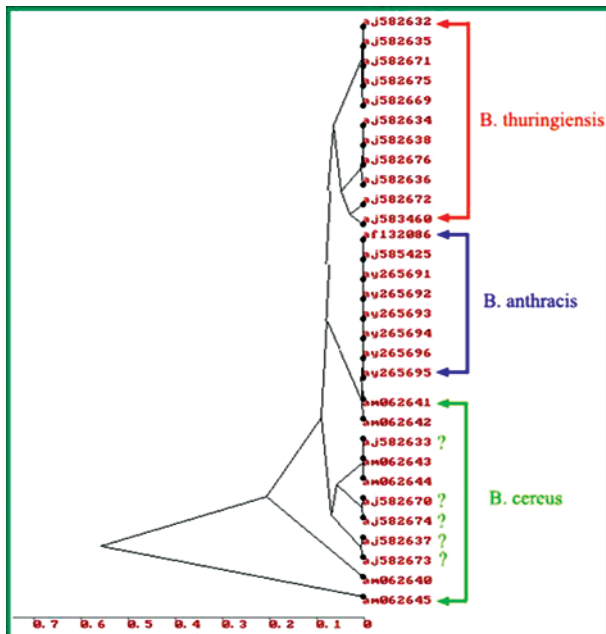


Рис. 1. Філогенетичний аналіз близькоспоріднених штамів *Bacillus anthracis*, *B. cereus* та *B. thuringiensis*.

Філограму побудовано на основі повної послідовності транскрипційного регулятора *plcR* хромосомної ДНК (завдовжки 858 п. н.) та його фрагментів (424–557 п. н.). ?–ізоляти, які належать до *B. thuringiensis*, але містяться всередині кластера ізолятів *B. cereus*. Горизонтальний відрізок вказує на різницю для нуклеотидних послідовностей

тільки 32 нуклеотиди потенційно можна використовувати для диференціації видів.

Стосовно ізолятів *B. thuringiensis*, то їх доволі складно диференціювати на основі гена *rpoB*, оскільки вони мають надзвичайно високий ступінь подібності. Більш того, деякі ізоляти *B. thuringiensis* є генетично ближчими до *B. cereus*, ніж до інших штамів *B. thuringiensis*. Про суперечливість таксономічної класифікації штамів *B. cereus* та *B. thuringiensis* свідчить побудована філограма (рис. 2). З неї видно, що штам *B. cereus* за номером AF205339 міститься всередині кластера ізолятів *B. thuringiensis*. Крім того, на побудованому дереві не можна чітко відрізнити, окрім кластера, утвореного ізолятами *B. anthracis*, ще два кластери ізолятів, які мають відповідати двом видам — *B. cereus* та *B. thuringiensis*. Якщо припустити, що ізолят *B. cereus* AF205339 помилково класифіковано як штам *B. cereus*, а ізоляти AF205345 та AF205346 помилково класифіковано як штами *B. thuringiensis*, то на філограмі (рис. 2) існуватимуть чітко відокремлені кластери *B. cereus* і *B. thuringiensis*. Отже, в цьому разі ген *rpoB*, на нашу думку, можна використовувати як маркер для генотипування бацил.

Як усі ці дані разом, так і поодинокі факти (наприклад, порівняння одного й того самого множинного вирівнювання гена *plcR* для *B. anthracis* та правильно і неправильно класифікованих ізолятів *B. cereus*) наочно демонструють як помилковість класифікації

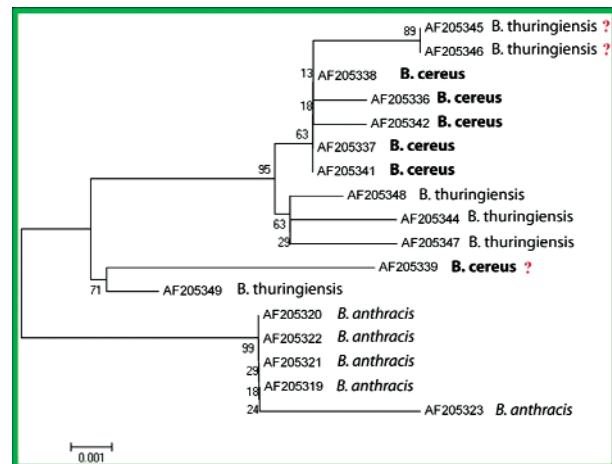


Рис. 2. Філогенетичний аналіз штамів *Bacillus anthracis*, *B. cereus* та *B. thuringiensis*.

Дендрограму побудовано на основі фрагмента гена *rpoB* хромосомної ДНК завдовжки 777 п. н. Масштаб відповідає одній нуклеотидній заміні на 1 000 н. Цифрами показано статистичну вірогідність порядку розгалуження (%), визначену за допомогою бутстреп-аналізу 4 000 альтернативних дерев. ?–ізоляти для можливої рекласифікації

вищезазначених ізолятів *B. cereus*, так і ефективність застосованої технології перевірки таксономічної класифікації патогенів.

У процесі пошуку мішеней для праймерів перед дослідником може постати питання — який із численних відомих генів вибрати з геномів повністю секвенованих ізолятів. Зазначимо, що на середину 2011 року повністю секвеновано три ізоляти *B. anthracis*, три ізоляти *B. cereus* (геном яких розміром 5 840 т. п. н. складається із шести репліконів — кільцевої хромосоми і п'яти плазмід) та один ізолят *B. thuringiensis* (його геном розміром 5 310 т. п. н. складається з двох репліконів — кільцевої хромосоми розміром приблизно 5 200 т. п. н. та плазміди або кільцевого фага рALH1) [21, 22].

Серед біомаркерів, які в останні роки визначено для ідентифікації спор *B. anthracis*, використовують ген *ssp* та родину протеїнів SASP (small acid-soluble protein), які він кодує [23]. Множинне вирівнювання послідовностей гена *ssp* для ізолятів групи *B. cereus sensu lato* уможливило виявлення недосконалого прямого повтору завдовжки 65 п. н. Усередині другого повтору гексануклеотидна інсерція 5'-tagcat-3' (виділено в консенсусній послідовності, рис. 3) є характерною

тільки для *B. anthracis* і делетованою для *B. cereus* та *B. thuringiensis*. Беручи до уваги виявлений факт, цю різницю використано як хромосомний маркер для розроблення системи видоспецифічних праймерів (Banssp7A–Banssp8) для детекції *B. anthracis*, а частиною мішені для зворотного праймера Banssp8 на 3'-кінці є зазначений гексануклеотид. Важливо, що на філогенетичному дереві для гена *ssp* (рис. 4) переважна більшість ізолятів *B. cereus* та *B. thuringiensis* міститься всередині відповідних кластерів, що свідчить про надійність таксономічної класифікації бацил, а також дає підстави сподіватися на ефективність визначених цільових мішеней для детекції *B. anthracis* на основі гена *ssp*.

Після проведення стандартної ПЛР з набором праймерів Banssp7A–Banssp8, один з яких містить характерну тільки для ізолятів *B. anthracis* 3'-кінцеву гексануклеотидну інсерцію, два амплікони очікуваного розміру (83 та 200 п. н.) було детектовано тільки для ізолятів *B. anthracis* (рис. 5, доміжки 1–7), тимчасом як для ізолятів близькородних видів *B. cereus* і *B. thuringiensis* було детектовано тільки один амплікон (83 п. н.).

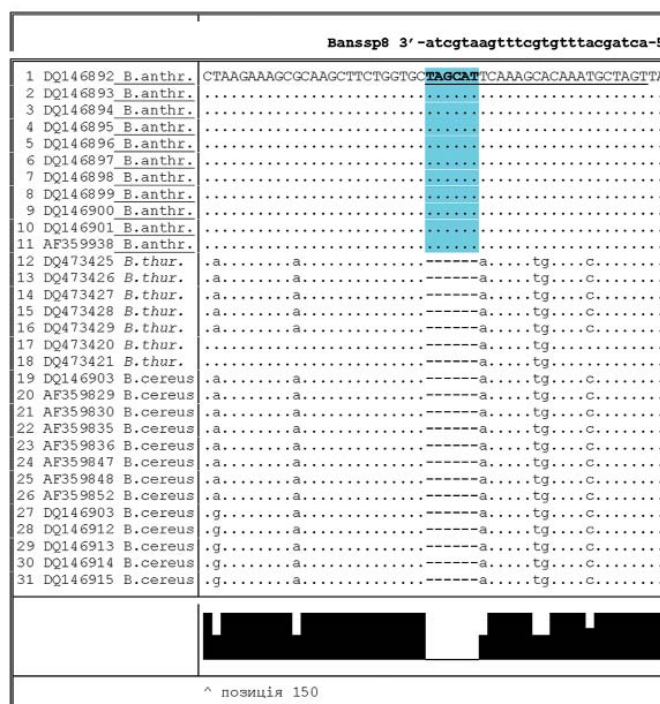


Рис. 3. Фрагмент множинного вирівнювання

гена *ssp* для 11 ізолятів *Bacillus anthracis*, 13 ізолятів *B. cereus* та 7 ізолятів *B. thuringiensis*: нуклеотиди, які не збігаються з нуклеотидами консенсусної послідовності ізоляту *B. anthracis* DQ146892, показано маленькими буквами. Наведено номери, що відповідають номерам ізолятів у базі даних GenBank. Підкреслено комплементарну праймеру Banssp8 послідовність «+»-нитки ДНК. Виділено унікальну для *B. anthracis* інсерцію завдовжки 6 н.

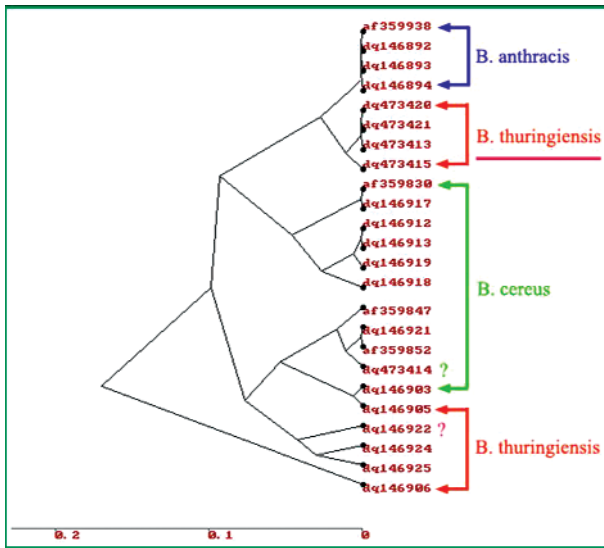


Рис. 4. Філогенетичний аналіз близькоспоріднених штамів *Bacillus anthracis*, *B. cereus* та *B. thuringiensis*:

філограму побудовано на основі повної послідовності гена *ssp* хромосомної ДНК (завдовжки 295–301 п.н.). ? — ізоляти, які віднесено до *B. thuringiensis* або *B. cereus* (з можливою рекласифікацією)

Проведені в роботі експерименти з ПЛР-детекції збудника сибірки показали, що основою для успішної високонадійної детекції зазначеного патогена може бути певна, специфічна тільки для нього, хромосомна інсерція в гені *ssp* (що кодує низькомолекулярний кислоторозчинний протеїн ендоспори) хромосомної ДНК.

Після відомих подій у США з надсиланням у поштових конвертах спор збудника сибірки у всіх поштових відділеннях країни було встановлено системи SmartCycler System (Cepheid, США) із застосуванням найчутливішої на ринку молекулярно-біологічної продукції варіанта ПЛР у реальному часі [24]. Завдяки повній автоматизації процесів пробопідготовки, ампліфікації та детекції за допомогою цього високоточного приладу закритого типу, який не потребує для обслуговування висококваліфікованого персоналу, результат тестування біологічних зразків на наявність інфекційних збудників можна отримати через 20–40 хв. Його найважливішим компонентом є молекулярно-генетична тест-система. Цікаво, що представники фірми Cepheid не розкривають навіть ген, фрагмент якого слугує для ампліфікації ДНК *B. anthracis*. Важливим

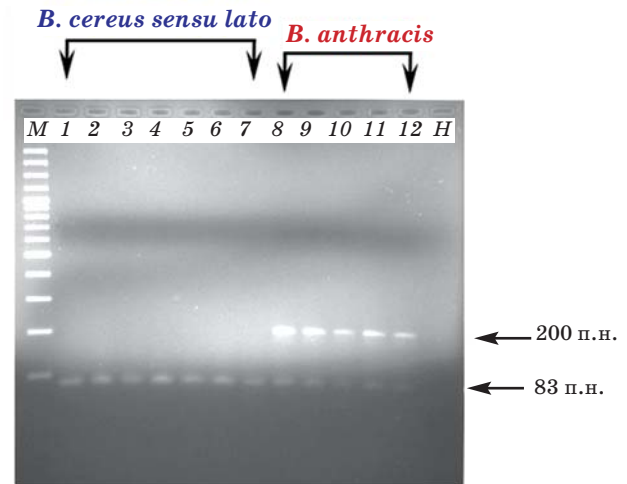


Рис. 5. Детекція продуктів ампліфікації геномної ДНК представників групи *B. cereus* за допомогою електрофорезу у 2% -му агарозному гелі після проведення стандартної полімеразної ланцюгової реакції:

M — маркер молекулярної маси, 100 п. н.;

1–3 — ДНК з ізолятів *B. cereus*;

4–7 — ДНК з ізолятів *B. thuringiensis*;

8–12 — ДНК з ізолятів *B. anthracis*;

H — негативний контроль ампліфікації.

Усі штами групи *B. cereus* мають ПЛР-продукт тільки завдовжки 83 п. н., а штами *B. anthracis* характеризуються наявністю ампліконів — 83 та 200 п. н.

показником ефективності та надійності зазначеної технології є відсутність жодного помилково визначеного позитивного результату аналізу на фоні проведених сотень тисяч аналізів.

Таким чином, розроблену авторами тест-систему для детекції *B. anthracis* на основі ампліфікації фрагмента гена *ssp* хромосомної ДНК можна запропонувати для подальших лабораторних випробувань, що стане наступним кроком на шляху підвищення рівня біобезпеки населення, території, економіки України (яка є складовою частиною національної безпеки) від можливих терористичних викликів часу.

Роботу частково підтримано грантом АМН 95/2010 від Національної академії медичних наук України.

Автори висловлюють подяку д-ру В. М. Степаншиній (Державний науковий центр прикладної мікробіології та біотехнології, Російська Федерація) за допомогу у проведенні досліджень.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dang J., Heroux K., Kearney J. et al. Bacillus spore inactivation methods affect detection assays // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2001. — V. 67, N 8. — P. 3665–3670.
2. Ellerbrok H., Nattermann H., Ozel M. et al. Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic Bacillus anthracis by real-time PCR // *FEMS Microbiol. Lett.* — 2002. — V. 214, N 1. — P. 51–59.
3. Beyer W., Pociwalsek S., Bohm R. J. Polymerase chain reaction-ELISA to detect Bacillus anthracis from soil samples-limitations of present published primers // *Appl. Microbiol.* — 1999. — V. 87, N 2. — P. 229–236.
4. Ko K., Kim J.-M., Kim J.-W. et al. Identification of Bacillus anthracis by rpoB sequence analysis and multiplex PCR // *J. Clin. Microbiol.* — 2003. — V. 41, N 7. — P. 2908–2914.
5. Orou A., Fechner B., Utermann G., Menzel H. J. Allele-specific competitive blocker PCR: a one-step method with applicability to pool screening // *Hum. Mutat.* — 1995. — V. 6, N 2. — P. 163–169.
6. Kolsto A. B., Tourasse N. J., Okstad O. A. What sets *Bacillus anthracis* apart from other Bacillus species? // *Annu Rev. Microbiol.* — 2009. — V. 63. — P. 451–476.
7. Бродский Л. И., Драчев А. Л., Татузов П. Л., Чумаков К. М. Пакет прикладных программ для анализа последовательностей биополимеров: GeneBee // Биополимеры и клетка. — 1991. — Т. 7, Вып. 1. — С. 10–14.
8. Schutz E., von Ahlsen N. Spreadsheet software for thermodynamic melting // *Biotechniques.* — 1999. — V. 27, N 6. — P. 1218–1224.
9. Rychlik W., Spencer W., Rhoads R. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro // *Nucleic Acids Res.* — 1990. — V. 18, N 21. — P. 6409–6417.
10. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* — 1987. — V. 4, N 4. — P. 406–425.
11. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 // *Ibid.* — 2007. — V. 24, N 8. — P. 1596–1599.
12. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // *J. Mol. Evol.* — 1980. — V. 16, N 2. — P. 111–120.
13. Лиманская О. Ю., Лиманский А. П. Маркеры для видоспецифической детекции бактерий группы *Bacillus cereus* // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. — 2008. — № 3. — С. 20–26.
14. Agaisse H., Gominet M., Okstad O. A. et al. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis* // *Mol. Microbiol.* — 1999. — V. 32. — P. 1043–1053.
15. Ko K. S., Kim J. W., Kim J. M. et al. Population structure of the Bacillus cereus group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the plcR gene // *Infect. Immun.* — 2004. — V. 72, N 9. — P. 5253–5261.
16. Gohar M., Faegri K., Perchat S. et al. The PlcR virulence regulon of Bacillus cereus // *PLoS ONE.* — 2008. — V. 3, N 7. — P. e2793.
17. Easterday W., Van Ert M., Simonson T. et al. Use of single nucleotide polymorphisms in the plcR gene for specific identification of Bacillus anthracis // *J. Clin. Microbiol.* — 2005. — V. 43, N 4. — P. 1995–1997.
18. Hayasaka D., Suzuki Y., Kariwa H. et al. Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and far-eastern Russia // *J. Gen. Virol.* — 1999. — V. 80. — P. 3127–3135.
19. Hayasaka D., Ivanov L., Leonova G. et al. Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and far-eastern Asia // *Ibid.* — 2001. — V. 82. — P. 1319–1328.
20. Martinez-Murcia A. J., Soler L., Saavedra M. J. et al. Phenotypic, genotypic, and phylogenetic discrepancies to differentiate *Aeromonas salmonicida* from *Aeromonas bestiarum* // *Int. Microbiol.* — 2005. — V. 8, N 4. — P. 259–269.
21. Challacombe J., Altherr M., Xie G. et al. The complete genome sequence of Bacillus thuringiensis Al Hakam // *J. Bacteriol.* — 2007. — V. 189, N 9. — P. 3680–3681.
22. Han C., Xie G., Challacombe J. et al. Pathogenomic sequence analysis of Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis isolates closely related to Bacillus anthracis // *Ibid.* — 2006. — V. 188, N 9. — P. 3382–3390.
23. Hathout Y., Setlow B., Cabrera-Martinez R.-M. et al. Small, acid-soluble proteins as biomarkers in mass spectrometry analysis of Bacillus spores // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2003. — V. 69, N 2. — P. 1100–1107.
24. Boehme C., Nabeta P., Hillemann D. et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance // *New Engl. J. Med.* — 2010. — V. 363, N 11. — P. 1005–1015.

ВИДОСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ
ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРКИ

О. Ю. Лиманская^{1,2}
Л. А. Муртазаева¹
А. П. Лиманский¹

¹ГУ «Институт микробиологии и иммунологии
им. И. И. Мечникова НАМН Украины»,
Харьков

²Национальный научный центр
«Институт экспериментальной и клинической
ветеринарной медицины» НААН Украины,
Харьков

E-mail: olga.limanskaya@mail.ru

Проанализированы последовательности и построены дендрограммы для бактерий группы *Bacillus cereus sensu lato* — *B. anthracis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis* — на основе генов *rpoB*, *plcr*, *ssp* хромосомной ДНК, которые могут быть молекулярно-генетическими маркерами для их типирования. Тестирование набора праймеров, целевой мишенью для которых является фрагмент гена *ssp*, характеризующийся гексануклеотидной вставкой только для изолятов *B. anthracis*, позволило с помощью стандартной полимеразной цепной реакции надежно дифференцировать бактерии *B. anthracis* от близкородственных видов *B. cereus* и *B. thuringiensis*. Показано, что филогенетическое дерево можно использовать как показатель надежности и точности таксономической классификации видов и подвидов патогенов. В отличие от всех проанализированных штаммов *B. anthracis*, которые образуют монофилетический кластер на дендрограмме, существуют штаммы *B. cereus*, филогенетически более близкие штаммам *B. thuringiensis*, а также штаммы *B. thuringiensis*, филогенетически более близкие штаммам *B. cereus*, что свидетельствует о необходимости их реклассификации.

Ключевые слова: генотипирование, возбудитель сибирской язвы, *Bacillus anthracis*, полимеразная цепная реакция.

SPECIES-SPECIFIC DETECTION
OF CAUSATIVE AGENT OF ANTHRAX

O. Yu. Limanskaya^{1,2}
L. O. Murtazaeva¹
A. P. Limanskii¹

¹Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv

²National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine» of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kharkiv

E-mail: olga.limanskaya@mail.ru

Nucleotide sequences were analyzed and dendrograms were obtained for members of *Bacillus cereus sensu lato* group (*B. anthracis*, *B. cereus* and *B. thuringiensis*) based on *rpoB*, *plcr*, *ssp* genes of chromosomal DNA, which may be the molecular genetic markers for their typing. Testing the primer set, which target is the *ssp* gene fragment characterized by hexanucleotide insertion only for *B. anthracis* isolates, has allowed differentiating *B. anthracis* bacteria reliably of closely related *B. cereus* and *B. thuringiensis* species by conventional polymerase chain reaction. It was shown that phylogenetic tree can be applied as an indicator of the reliability and accuracy of the taxonomical classification of species and subspecies of pathogens. Unlike all the analyzed *B. anthracis* strains, that form a monophyletic cluster on a dendrogram, there are *B. cereus* strains that are phylogenetically more related to *B. thuringiensis* strains, as well as *B. thuringiensis* strains, that are more related phylogenetically to *B. cereus* strains, suggesting that they should be reclassified.

Key words: genotyping, anthrax causative agent, *Bacillus anthracis*, polymerase chain reaction.