



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

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21), (22) Заявка: 2006118406/13, 26.05.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
26.05.2006

(43) Дата публикации заявки: 10.12.2007

(45) Опубликовано: 10.05.2009 Бюл. № 13

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: US 5654144, 05.08.1997. RU 2154106 C2,  
10.08.2000. EP 1389242, 18.02.2004.  
EP 0339783, 02.11.1989. WO 2004106553,  
09.04.2004. US 5310654, 10.05.1994. JP  
2003061655, 04.03.2003.

Адрес для переписки:

690022, г.Владивосток, пр-кт 100-летия  
Владивостоку, 159, Тихоокеанский институт  
биоорганической химии ДВО РАН,  
патентный отдел, Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

Исаева Марина Петровна (RU),  
Стенкова Анна Михайловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

ООО "НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ  
ФИРМА "ОМИКС" (RU),  
ТИХООКЕАНСКИЙ ИНСТИТУТ  
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(ТИБОХ ДВО РАН) (RU)

**(54) НАБОР РОДО- И ВИДОСПЕЦИФИЧНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ  
ДЕТЕКЦИИ И ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ИЕРСИНИЙ МЕТОДОМ  
МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области  
биотехнологии и молекулярной биологии и  
может быть использовано в медицине и  
ветеринарии, а также в исследованиях  
бактериальной обсемененности бактериями  
рода *Yersinia* эпидемиологически значимых  
объектов. Набор родо- и видоспецифичных  
олигонуклеотидных праймеров содержит два  
родоспецифичных праймера и три  
видоспецифичных праймера, которые

используют для амплификации участков  
гена *OmpF* порина иерсиний при  
осуществлении способа детекции и видовой  
идентификации бактерий рода *Yersinia* с  
помощью мультиплексной ПЦР. Применение  
изобретения позволяет одновременно  
детектировать и дифференцировать  
патогенные и непатогенные виды бактерий  
рода *Yersinia*, а также проводить видовую  
идентификацию патогенных для человека  
видов бактерий рода *Yersinia*. 3 ил., 2 табл.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

*C12N 15/11* (2006.01)*C12Q 1/68* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2006118406/13, 26.05.2006**(24) Effective date for property rights:  
**26.05.2006**(43) Application published: **10.12.2007**(45) Date of publication: **10.05.2009 Bull. 13**

Mail address:

**690022, g. Vladivostok, pr-kt 100-letija  
Vladivostoku, 159, Tikhookeanskij institut  
bioorganicheskoj khimii DVO RAN, patentnyj  
otdel, N.I. Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Isaeva Marina Petrovna (RU),  
Stenkova Anna Mikhajlovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**OOO "NAUCHNO-PROIZVODSTVENNAJA  
FIRMA "OMIKS" (RU),  
TIKHOOKEANSKIJ INSTITUT  
BIOORGANICHESKOJ KHMII  
DAL'NEVOSTOCHNOGO OTDELENIJa  
ROSSIJSKOJ AKADEMII NAUK (TIBOKh  
DVO RAN) (RU)**

**(54) SET OF GENUS- AND SPECIES-SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDE PRIMERS FOR DETECTION AND SPECIES IDENTIFICATION OF YERSINIA BY MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION METHOD**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: set of genus- and species-specific oligonucleotide primers contains two genus-specific primers and three species-specific primers which are used for amplification of sites of Yersinia porin gene OmpF when realising method of detection and species identification of genus Yersinia bacteria by

means of multiplex PCR.

EFFECT: application of invention allows simultaneous detecting and differentiating pathogenic and non-pathogenic species of genus Yersinia bacteria and carrying out species identification of pathogenic for human being species of genus Yersinia bacteria.

3 dwg, 2 tbl, 2 ex

RU 2 354 700 C2

RU 2 354 700 C2

Изобретение относится к области биотехнологии, медицины и ветеринарии, а именно к лабораторной генодиагностике, и представляет собой набор олигонуклеотидных праймеров для детекции бактерий рода *Yersinia* и идентификации патогенных для человека видов: *Y.pestis*, *Y.pseudotuberculosis* и *Y.enterocolitica*.

Род *Yersinia* включает 11 видов бактерий, среди которых медицинское значение однозначно установлено только для трех видов (*Y.pestis* - возбудитель чумы, *Y.pseudotuberculosis* - возбудитель псевдотуберкулеза и *Y.enterocolitica* - возбудитель кишечного иерсиниоза) [1]. Первый микроорганизм является причинным агентом острого инфекционного заболевания человека, бубонной и легочной форм чумы [2]. Два других вызывают острые бактериальные энтериты, основными клиническими формами которых являются энтероколит, острый мезентериальный лимфаденит и терминальный илеит. У некоторых больных при наличии факторов риска могут развиваться такие серьезные внекишечные осложнения, как реактивный артрит, узловатая эритема, септицемия, абсцессы внутренних органов [3].

Принято подразделять *Y.pestis* на три биовара (*Y.antique*, *Y.medievalis*, *Y.orientalis*). Такая классификация основывается скорее на географическом распределении штаммов, чем на биохимических и молекулярных различиях [4]. Кроме того, существует группа «атипичных» чумных штаммов, так называемых пестоидов и *Microtus*, которые вызывают эпизоотии у различных грызунов, но не вызывают заболеваний у человека или других крупных млекопитающих [5]. Наиболее гетерогенной по биохимическим и серологическим свойствам является *Y.enterocolitica*, в соответствии с которыми выделяют 6 биоваров и более 50 серотипов. Среди них представители 5 биоваров (1B, 2, 3, 4 и 5) и 11 серогрупп (главным образом, 0:3, 0:8, 0:9 и 0:5,27) наиболее часто вызывают инфекцию у человека [6]. В *Y.pseudotuberculosis* выделяют 6 серологических групп, в каждой из которых встречаются вирулентные штаммы, но наиболее часто в 1 (1B) и 2 группах [7]. Клиническое значение остальных видов (*Y.bercovieri*, *Y.mollaretii*, *Y.rohdei*, *Y.ruckeri* и *Y.aldovae*) и вариантов иерсиний, ранее относящихся к энтероколитикоподобным видам (*Y.frederiksenii*, *Y.intermedia*, *Y.kristensenii*), остается до сих пор неясным [8, 9, 10]. Определение роли этих бактерий в вызывании острой кишечной инфекционной болезни возможно только в результате совершенствования диагностики иерсиниоза.

Лабораторная диагностика иерсиний включает бактериологические, биохимические, серологические и молекулярно-генетические методы исследования [7, 11, 12, 13]. Бактериологическая диагностика иерсиний достаточно трудоемка и занимает много времени. Видовую идентификацию иерсиний проводят с помощью биохимических реакций, в основном по ферментации сахаров. Следует отметить, что эффективность культуральных методов достаточно низкая, в большей степени это касается патогенных штаммов, и составляет 15-20% положительных результатов. Серологические методы имеют серьезный диагностический недостаток - наличие перекрестных реакций.

К молекулярно-генетическим методам исследования относятся метод гибридизации нуклеиновых кислот и метод ПЦР амплификации нуклеиновых кислот. Второй метод находит более широкое применение в виду высокой специфичности, высокой чувствительности, относительной простоты и быстроты выполнения анализа. Описано много способов ПЦР диагностики иерсиний, однако все они касаются идентификации патогенных штаммов на основе выявления вирулентных генов, имеющих плазмидную (*virF*, *yadA*, *yopN/lcrE*, *yopT*) и/или хромосомную локализацию (*ail*, *inv*, *yst*) [12]. Недостатком методов, основанных на идентификации

плазмидных маркеров, является возможность элиминации вирулентных плазмид при культивировании и хранении бактериальных штаммов. Недостатком хромосомных генов патогенности является встречаемость их у представителей разных видов.

Разработаны праймеры и способы детекции видов *Yersinia* на основе амплификации генов 16S и 23S рибосомальных РНК [14]. Получены ряд патентов на праймеры, зонды, последовательности и методы для детекции отдельных видов иерсиний [15, 16, 17].

Известен способ детекции и идентификации бактерий рода *Yersinia*, согласно которому мишенями для амплификации служат нуклеотидные последовательности 16S и 23S, а также межгенного участка 16S-23S рибосомальных генов [18]. Для детекции представителей рода *Yersinia* используются fd2 и r23s праймеры. Видовая идентификация иерсиний осуществляется с помощью рестрикционного анализа путем ферментативной обработки полученных ПЦР продуктов различными мелкощепящими рестрикционными эндонуклеазами по отдельности или в смеси. Кроме того, дополнительно разработана пара праймеров (f16s и yer1) для детекции патогенных для человека видов иерсиний (*Y.pestis*, *Y.pseudotuberculosis* и *Y.enterocolitica*) с последующей видовой идентификацией иерсиний с помощью рестрикционной эндонуклеазы AluI.

К недостаткам этого метода относятся необходимость постановки нескольких последовательных или параллельных амплификационных реакций, а также проведение дополнительных анализов (рестрикционного анализа) для идентификации патогенных и непатогенных видов. В некоторых случаях такой анализ может потребовать проведение двух амплификационных реакций и нескольких ферментативных обработок продуктов реакций. Такой подход является достаточно трудоемким и приводит к значительному увеличению времени анализа. Использование рестрикционных эндонуклеаз также увеличивает стоимость анализа.

Вышеупомянутые известные способы детекции иерсиний и диагностики инфекций, вызываемых иерсиниями, недостаточно эффективны для клинического применения, так как в большинстве случаев возникает вопрос о дифференциальной диагностике и установлении причинного микроорганизма, вызвавшего заболевание. Ни один из вышеуказанных методов не позволяет одновременно детектировать в большом масштабе бактерии рода *Yersinia*, происходящие из большинства или из всех известных биосеротипов, и в тоже время идентифицировать патогенные виды, что в первую очередь важно для постановки правильного этиологического диагноза. Более того, один из представителей рода *Yersinia*, а именно *Y.pestis*, рассматривается как один из возможных агентов биотеррористических атак. В связи с вышесказанным существует необходимость в разработке эффективных методов быстрой диагностики и видовой идентификации патогенных иерсиний.

Задачей настоящего изобретения является разработка набора родо- и видоспецифичных олигонуклеотидных праймеров для детекции бактерий рода *Yersinia* и идентификации патогенных для человека видов: *Y.pestis*, *Y.pseudotuberculosis* и *Y.Enterocolitica* методом мультиплексной полимеразной цепной.

Суть изобретения заключается в создании олигонуклеотидных праймеров для одностадийной экспресс-диагностики иерсиний с помощью мультиплексного ПЦР-анализа. Настоящее изобретение позволяет усовершенствовать технику ПЦР-анализа иерсиний для рутинного использования в диагностике иерсиниозных инфекций, так как нет необходимости прибегать к использованию дополнительных методов анализа (рестрикционный анализ, гибридизация со специфическими зондами),

тем самым сокращается продолжительность выполнения анализа и снижается его себестоимость и трудоемкость.

Объектом защиты настоящего изобретения является набор олигонуклеотидных праймеров, который состоит из нуклеотидных последовательностей, обладающих

а) по меньшей мере, на 90%, с нижеуказанными последовательностями:

5'-GTCTGGGCTTTGCTGGTCTG-3' - смысловой родоспецифичный праймер Y-F (SEQ ID NO: 1),

5'-GCGTCGTATTTAGCACCAACG-3' - антисмысловой родоспецифичный праймер Y-R (SEQ ID NO: 2),

б) по меньшей мере, на 95%, с нижеуказанными последовательностями:

5'-GTGTTCAGACCGTTTGCGAT-3' - антисмысловой видоспецифичный праймер YP-R (SEQ ID NO: 3),

5'-GATGGTGAAATCATAAAAACCG-3' - антисмысловой видоспецифичный праймер YPS-R (SEQ ID NO: 4),

5'-CGTTTGCAACAGCGCTGCGAT-3' - антисмысловой видоспецифичный праймер YE-R (SEQ ID NO: 5).

Вышеуказанные олигонуклеотиды предпочтительно включают 15-30 нуклеотидов.

Выбор праймеров ограничивался такими критериями, как видоспецифичная амплификация ДНК патогенных для человека иерсиний и получение ПЦР-продуктов разной длины (характерной для каждого патогенного вида). Для этого был проведен поиск белковых последовательностей по опубликованным *ompF* генам и геномам различных видов энтеробактерий. Полученные последовательности выравнивались методами BlastX, T-Coffee и отбирались только те, которые показывали не менее 80% гомологии с установленными нами аминокислотными последовательностями OmpF поринов (*Y.pseudotuberculosis*, *Y.enterocolitica*, *Y.frederiksenii*, *Y.intermedia* и *Y.kristensenii*). Последовательности были между собой сравнены для нахождения потенциальных родо- и видоспецифичных районов и использования их в дальнейшем для составления олигонуклеотидов. Родоспецифичные участки были обнаружены в областях, соответствующих трансмембранным участкам порина, а видоспецифичные различия были найдены в районах, соответствующих наружным петлям белка. Затем проводилось сравнение нуклеотидных последовательностей *ompF* генов иерсиний (*Y.pestis*, *Y.pseudotuberculosis*, *Y.enterocolitica*, *Y.bercovieri*, *Y.mollaretii*, *Y.frederiksenii*, *Y.intermedia*), часть которых была взята из GenBank (NCBI) (фиг.1). Предполагаемые пары праймеров в дальнейшем анализировали, используя программу «FastPCR» и «PrimerPremier 3». Наличие и/или отсутствие гомологии с другими видами иерсиний и родами энтеробактерий являлось одним из критериев отбора олигонуклеотидов.

Таким образом, были подобраны праймеры для детекции рода и антисмысловые праймеры для идентификации каждого патогенного для человека вида иерсиний.

Фиг.1. Сравнение нуклеотидных последовательностей OmpF поринов *Yersinia* spp. - *Y.pestis* (91001 (NP\_992548.1), KIM (NP\_670060.1)), *Y.pseudotuberculosis* (3260 (AAW83204.1), 32953 (YP\_069966.1)), *Y.enterocolitica* (164 (собственные исследования), YE-11 (собственные исследования)) *Y.frederiksenii* (4849 (собственные исследования), 33641 (AALE01000006.1)) и *Y.intermedia* (29909 (ZP\_00834634), 253 (собственные исследования)). Полужирным курсивом показаны нуклеотидные участки *ompF* порина, к которым направлены олигонуклеотидные праймеры. Над стрелками приведены названия соответствующих олигонуклеотидных праймеров.

Длины ПЦР-продуктов, образованных в мультиплексной ПЦР с помощью набора праймеров, указаны выше в п.1 и 2 (а, б, в) и для наглядности представлены в таблице 1.

| 5  | Таблица 1<br>Длины ПЦР-продуктов, образованных в мультиплексной ПЦР |                       |                                                                  |                                 |
|----|---------------------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
|    | Род/вид                                                             | Антисмысловый праймер | Смысловый праймер Y-F(SEQ ID NO: 1)<br>Длина ПЦР продукта (п.н.) | Число специфичных ПЦР-продуктов |
|    | Yersinia spp. непатогенные                                          | Y-R (SEQ ID NO: 2)    | 427-472                                                          | 1                               |
| 10 | Y.pestis                                                            | YP-R (SEQ ID NO: 3)   | 754 430                                                          | 2                               |
|    | Y.pseudotuberculosis                                                | YPS-R (SEQ ID NO: 4)  | 503 430                                                          | 2                               |
|    | Y.enterocolitica                                                    | YE-R (SEQ ID NO: 5)   | 270 465                                                          | 2                               |

Отработка условий амплификации проводилась при использовании ДНК 4-х штаммов Y.pseudotuberculosis, 3-х штаммов Y.enterocolitica, по одному штамму Y.frederiksenii, Y.intermedia, Y.kristensenii и Y.pestis. В качестве контроля бактерий, не входящих в род Yersinia, - E.coli (таблица 2).

| 20 | Таблица 2<br>Штаммы, использованные в работе |                                  |                                                          |
|----|----------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------|
|    | Название штамма/плазмиды                     | Описание генотипа                | Откуда получены                                          |
|    | 3260 (82-, 48-)                              | Y.pseudotuberculosis IB серотип  | НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, г.Владивосток |
|    | M4835, M4836                                 | Y.pseudotuberculosis IB серотип  |                                                          |
|    | M3159                                        | Y.pseudotuberculosis III серотип |                                                          |
| 25 | M3747                                        | Y.pseudotuberculosis IV серотип  |                                                          |
|    | 164                                          | Y.enterocolitica                 |                                                          |
|    | 1234                                         | Y.enterocolitica                 |                                                          |
|    | 6579                                         | Y.enterocolitica                 |                                                          |
|    | 4849                                         | Y.frederiksenii                  |                                                          |
|    | 253/8744                                     | Y.intermedia                     |                                                          |
| 30 | 991                                          | Y.kristensenii                   |                                                          |
|    | EV                                           | Y.pestis                         | ГНЦ прикладной микробиологии, г.Оболensk                 |
|    | DH5α                                         | E.coli штамм для клонирования    | Gibco-Life BRL                                           |

Примеры конкретного осуществления изобретения.

Пример 1. Мультиплексный ПЦР-анализ.

Способ осуществляется следующим образом.

Условия проведения реакции

Амплификация проводится с горячим стартом с использованием Hot Start Taq ДНК полимеразы («Сибэнзим», г.Новосибирск) по следующей схеме: денатурация при 95°C - 3 мин (1 цикл); затем 35 циклов: денатурация при 95°C - 20 с, отжиг при 60°C - 20 с, синтез при 72°C - 20 с; синтез при 72°C - 7 мин (1 цикл).

Инкубационная смесь конечным объемом 25 мкл содержит: 1,5 мМ Mg-буфер, 0,2 мМ дНТФ, 2,5 мкМ праймеров (по 0,5 мкМ каждого праймера: Y-F (SEQ ID NO: 1), Y-R (SEQ ID NO: 2), YP-R (SEQ ID NO: 3), YPS-R (SEQ ID NO: 4) и YE-R (SEQ ID NO: 5)), 25 нг ДНК - матрицы, 0,25 ед. ДНК-полимеразы, оставшийся объем - вода. В качестве матрицы используют геномную ДНК, полученную из разных штаммов бактерий рода Yersinia.

Анализ продуктов амплификации

Анализ продуктов амплификации проводится в 2% агарозном геле.

На фиг.2. Представлен результат электрофоретического разделения фрагментов ДНК, полученных после мультиплексной ПЦР при использовании родо- и

видоспецифичных олигонуклеотидных праймеров.

Видно, что все иерсинии, патогенные для человека, образуют характеристичные по размеру фрагменты ДНК. Все четыре штамма *Y.pseudotuberculosis*, принадлежащие IB, III и IV серотипам, показывают два фрагмента длиной 430 и 503 п.н. (дорожки 1-4).  
 5 Все три штамма *Y.enterocolitica* показывают два фрагмента длиной 270 и 465 п.н. (дорожки 5-7). Штамм *Y.pestis* показывает два фрагмента длиной 430 и 754 п.н. (дорожка 10). Другие виды иерсинии детектируются и показывают только один фрагмент длиной 430-470 п.н. (дорожки 8, 9 и 11). В отрицательном контроле  
 10 (реакционная смесь, не содержащая ДНК матрицу) продукты амплификации отсутствуют (дорожка 13).

Пример 2. Анализ клинического материала методом мультиплексной ПЦР.

Апробацию набора праймеров Y-F (SEQ ID NO: 1), Y-R (SEQ ID NO: 2), YP-R (SEQ ID NO: 3), YPS-R (SEQ ID NO: 4) и YE-R (SEQ ID NO: 5) проводили с использованием  
 15 образцов клинического материала (кровь) от 5 больных. ДНК образцы приготовлены из цельной крови с помощью набора «ДНК-сорб-В-50» (ЦНИИ Эпидемиологии МЗ РФ) в соответствии с рекомендациями производителя. Затем проводили мультиплексную амплификацию фрагментов гена *OmpF* порина бактерий  
 20 рода *Yersinia*, как указано в примере 1.

Электрофоретическое разделение амплификатов выполнялось в 2% агарозном геле. На фиг.3 представлен результат исследования образцов клинического материала методом мультиплексной ПЦР. ДНК *Y.enterocolitica* обнаружена в 3 образцах (4-6 дорожки), ДНК непатогенных иерсиний в 1 образце (7 дорожка). Положительные  
 25 контроли *Y.pseudotuberculosis* (2 дорожка), *Y.enterocolitica*, (3 дорожка). М - ДНК-маркер (1 дорожка).

#### Литература

1. Bockemuhl J., Wong J. *Yersinia*. In: Murray P.R., et al. Manual of clinical microbiology. 8<sup>th</sup> ed. Washington (DC): ASM Press; 2003. P.672-83.  
 30
2. Butler, T. 1998. Yersiniosis and plague, p.281-293. In S.R.Palmer, L.Soulsby, and D.I.H. Simpson (ed.), Zoonoses. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
3. Schiemann, D.A. 1989. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*, p.601-672. In M.P.Doyle, (ed.), Foodborne bacterial pathogens. Marcel Dekker, New York, N.Y.  
 35
4. Achtman M., Morelli G., Zhu P., Wirth T., Diehl I., Kusecek B., et al. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. PNAS. 2004. vol.101, no.51. P.17837-17842.
5. Anisimov, A.P., Lindler, L.E., Pier, G.B. Clin. Microbiol. Rev. 2004. V.17, C.434-464.
6. Bottone, E.J. 1999. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates.  
 40 Microbes Infect. 1: 323-333.
7. Псевдотуберкулез. Под ред. Сомова Г.П., Покровского В.И., Беседновой Н.Н. Москва: Медицина. 1990.
8. Loftus C.G., Harewood G.C., Cockerill F.R., Murray J.A. Clinical Features of Patients with Novel *Yersinia* Species. In Digestive Diseases and Sciences. Publisher: Springer  
 45 Netherlands. 2002. Vol.47, N.12, P.2805-2810.
9. Singh I, Viridi J.S. Production of *Yersinia* stable toxin (YST) and distribution of *yst* genes in biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica*. Journal of Medical Microbiology (2004), 53, 1065-1068.
- 50 10. Grant, T., Bennett-Wood, V. & Robins-Browne, R.M. (1999). Characterization of the interaction between *Yersinia enterocolitica* biotype 1A and phagocytes and epithelial cells in vitro. Infect Immun 67, 4367-4375.
11. RU 2264455 C1, 28.01.2004.

12. Fredriksson-Ahomaa M., Korkeala H. Low Occurrence of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Clinical, Food, and Environmental Samples: a Methodological Problem. *Clinical microbiology reviews*. 2003. P.220-229.

13. Куляшова Л.Б., Ценева Г.Я., Буйневич Ю.Б. Роль антигенов наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* в патогенезе и диагностике псевдотуберкулеза. Журн. Микробиологии, эпидемиологии, иммунологии. 1997. №1. С.14-18.

14. Trebesius, K., D.Harmsen, A.Rakin, J.Schmelz, and J.Heesemann. Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labeled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. *J.Clin. Microbiol.* 1998. V.36. C.2557-2564.

15. EP 0645460 B1, 17.03.1989.

16. US 6197514 B1, 12.04.1999.

17. US 0197789 A1, 21.05.2002.

18. US 5654144, 24.04.1995.

### Формула изобретения

Набор родо- и видоспецифичных олигонуклеотидных праймеров, используемых для амплификации участков гена *OmpF* порина иерсиний при осуществлении способа детекции и видовой идентификации иерсиний с помощью мультиплексной ПЦР, состоящий из:

а) нуклеотидной последовательности, обладающей гомологией по меньшей мере на 90% с последовательностью

5'-GTCTGGGCTTTGCTGGTCTG-3' - смысловой родоспецифичный праймер Y-F (SEQ ID NO: 1),

б) нуклеотидной последовательности, обладающей гомологией по меньшей мере на 90% с последовательностью

5'-GCGTCGTATTTAGCACCAACG-3' - антисмысловой родоспецифичный праймер Y-R (SEQ ID NO: 2),

в) нуклеотидной последовательности, обладающей гомологией по меньшей мере на 95% с последовательностью

5'-GTGTTCAGACCGTTTGCGAT-3' - антисмысловой видоспецифичный праймер YP-R (SEQ ID NO: 3),

г) нуклеотидной последовательности, обладающей гомологией по меньшей мере на 90% с последовательностью

5'-GATGGTGAAATCATAAAAACCG-3' - антисмысловой видоспецифичный праймер YPS-R (SEQ ID NO: 4),

д) нуклеотидной последовательности, обладающей гомологией по меньшей мере на 90% с последовательностью 5'-CGTTTGCAACAGCGCTGCGAT-3' - антисмысловой видоспецифичный праймер YE-R (SEQ ID NO: 5).



```

ompF_YF_4849 (935) AATATGTTTCTGTTGGTTCTTACTACTACTTCAACAAAAACATGCTACCTATGTTGATTACAAAATCAACTTGCTGGACGAAGATACCTTCACTGTTAA
ompF_YF (947) AATATGTTTCTGTTGGTACTTACTACTACTTCAACAAAAACATGCTACCTATGTTGATTACAAAATCAACTTGCTGGATGAAGATAACTTCACCCGTGC
ompF_Y253 (947) AATATGTTTCTGTTAGGTTCTACTACTACGCGTTCAACAAAAACATGACTACTATGTTGATTACAAAATCAACTTGCTGGATGAAGACAACCTTCACCCGCAA
ompF_YI (977) AATATGTTTCTGTTGGTACTTACTACTACGCGTTCAACAAAAACATGACTACTATGTTGATTACAAAATCAACTTGCTGGATGAAGATAATTCACCCGTGC
ompF_YE03 (962) AATATGTTTCTGTTAGGTTCTTACTACTACTTCAACAAAAACATGCTACCTATGTTGATTACAAAATCAACTTGCTGGACGAAAATGACTTCACCTCGTGC
ompF_YE164 (962) AATATGTTTCTGTTAGGTTCTTACTACTACTTCAACAAAAACATGCTACCTATGTTGATTACAAAATCAACTTGCTGGACGAAAATGACTTCACCTCGTGC

```

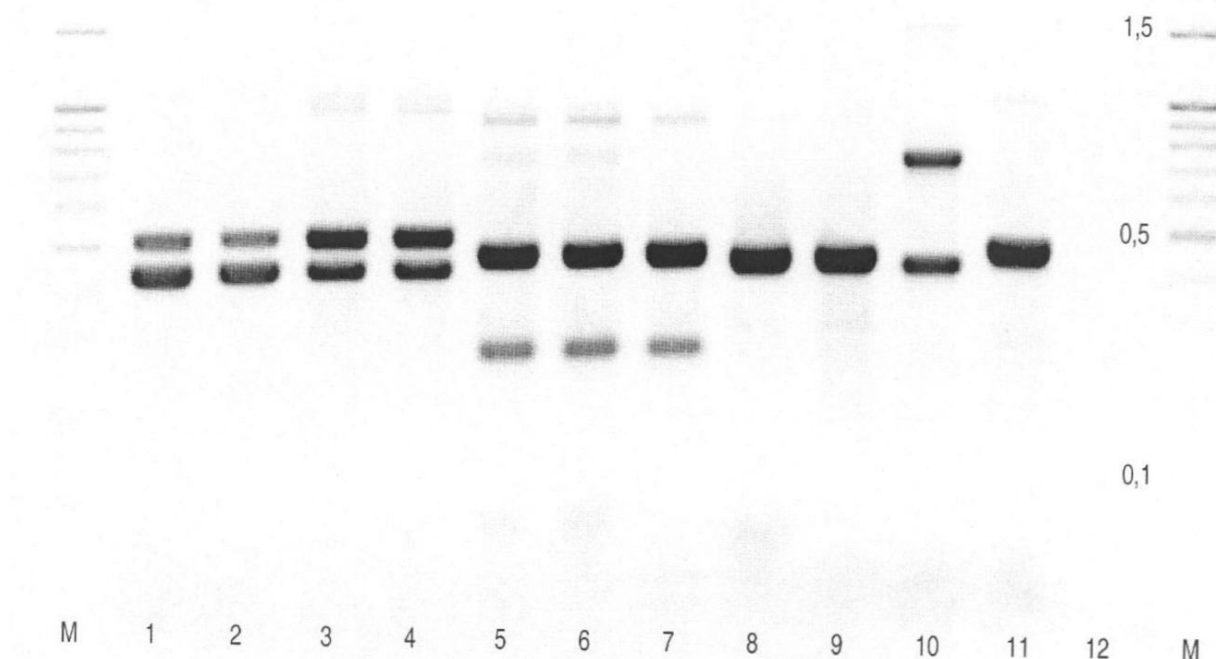
```

YP-R
-----
1101 1155
ompF_Kim (1029) AAACGGTCTGAACACCGACACGTTGTTGCTGTTGGCTTGGTTTACCAGTTCTAA
ompF_Yp_91001 (1035) AAACGGTCTGAACACCGACACGTTGTTGCTGTTGGCTTGGTTTACCAGTTCTAA
ompF_YPS_3260 (1029) TAACCGAATCATGACAGACGACGTTGTTGCTGTTGGCTTGGTTTACCAGTTCTAA
ompF_YPS_32953 (1029) TAACCGAATCATGACAGACGACGTTGTTGCTGTTGGCTTGGTTTACCAGTTCTAA
ompF_YF_4849 (1035) AAACGGTCTGAACACAGACACGTTGTTGCTGTTGGCTTGGTTTACCAGTTCTAA
ompF_YF (1047) TAACAGCCTGAACACAGACGACGTTGTTGCTGTTGGCTTGGTTTACCAGTTCTAA
ompF_Y253 (1047) TAACAGCCTGAACACAGACGACGTTGTTGCTGTTGGCTTGGTTTACCAGTTCTAA
ompF_YI (1077) AAATGGCCTGAACACCTGATGACGTTGTTGCTGTTGGCTTGGTTTACCAGTTCTAA
ompF_YE03 (1062) AAACGGTCTGAACACAGACGACGTTGTTGCTGTTGGCTTGGTTTACCAGTTCTAA
ompF_YE164 (1062) AAACGGTCTGAACACAGACGACGTTGTTGCTGTTGGCTTGGTTTACCAGTTCTAA

```

Сравнение нуклеотидных последовательностей OmpF поринов *Yersinia* spp.

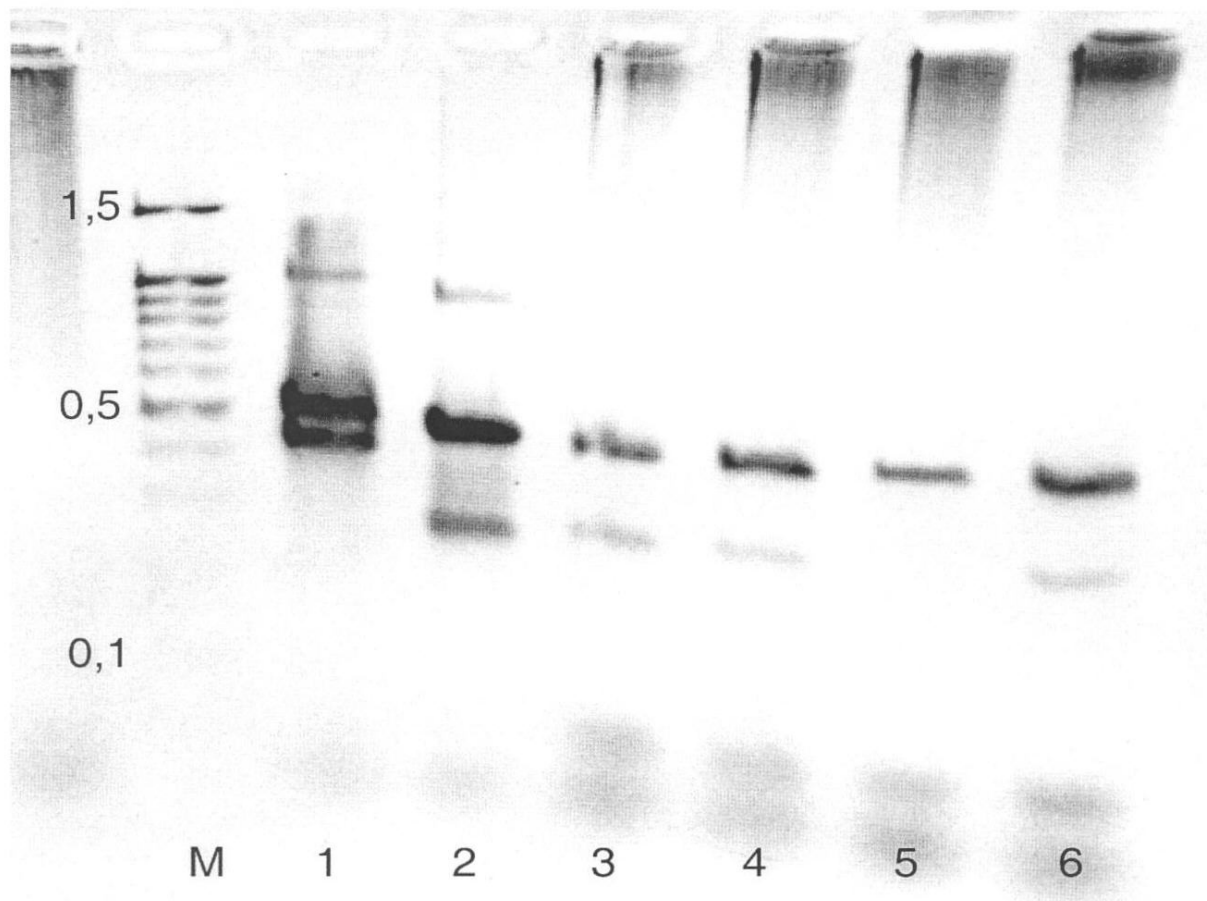
Фиг. 1



Результат электрофоретического разделения в 2% геле агарозы фрагментов ДНК, полученных после мультиплексной ПЦР при использовании родо-и видоспецифичных олигонуклеотидных праймеров.

1. *Y. pseudotuberculosis* IB серотип, штамм 3260(82-, 48-); 2. *Y. pseudotuberculosis* IB серотип, штамм M4835, M4836; 3. *Y. pseudotuberculosis* III серотип, штамм M3159; 4. *Y. pseudotuberculosis* IV серотип, штамм M3747; 5. *Y. enterocolitica*, штамм 164; 6. *Y. enterocolitica*, штамм 1234; 7. *Y. enterocolitica*, штамм 6579; 8. *Y. frederiksenii* 9. *Y. intermedia*, штамм 293; 10. *Y. pestis*, штамм EV; 11. *Y. kristensenii*, штамм 991; 13 - Отрицательный контроль. М. ДНК-маркер.

Фиг.2



Результат исследования образцов клинического материала методом  
мультиплексной ПЦР.

М. ДНК-маркер (в тыс.п.н.). 1. *Y. pseudotuberculosis*; 2. *Y. enterocolitica*; 3. образец № 1; 4. образец  
№ 2; 5. образец № 3; 6. образец № 4.

Фиг. 3