



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2008147520/13, 01.12.2008

(23) Дата поступления дополнительных
материалов к ранее поданной заявке:
29.04.2008
(2006118406 от 26.05.2006)

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
01.12.2008

(45) Опубликовано: 10.04.2010 Бюл. № 10

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2006118406 А, 10.12.2007. US 5654144
А, 05.08.1997.

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):

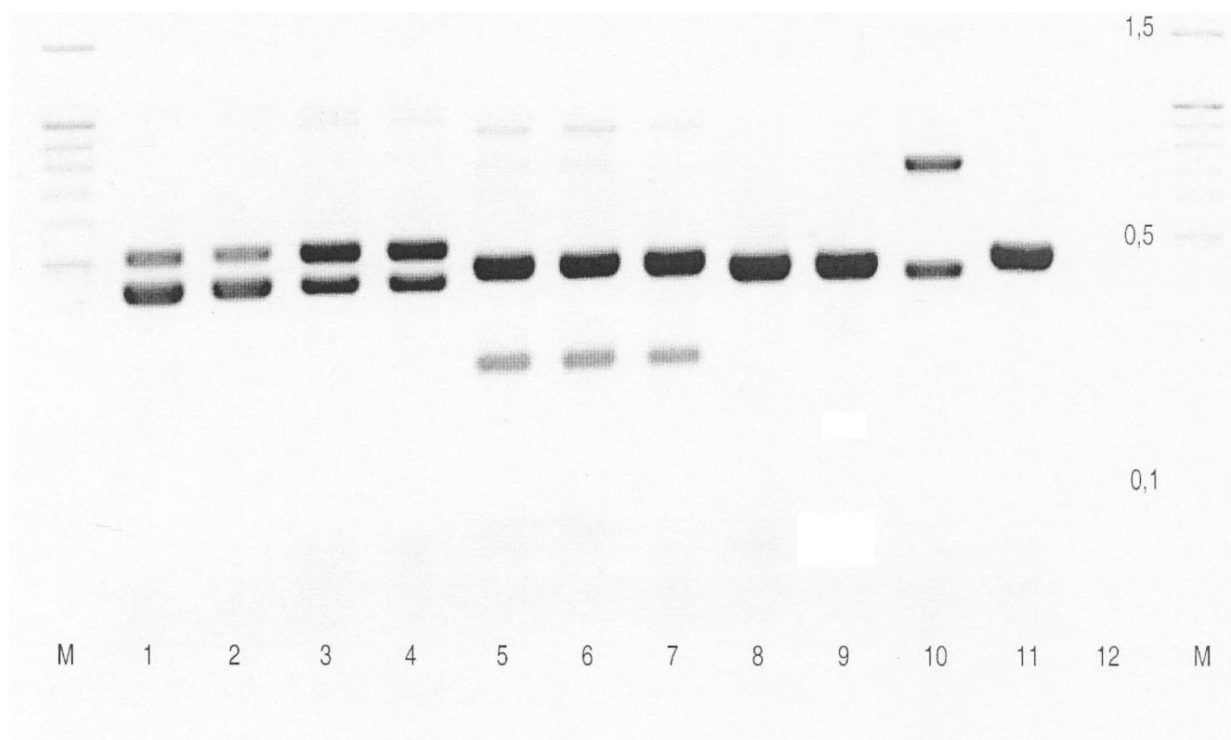
ООО "НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ
ФИРМА "ОМИКС" (RU),
ТИХООКЕАНСКИЙ ИНСТИТУТ
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ТИБОХ ДВО РАН) (RU)

**(54) СПОСОБ ДЕТЕКЦИИ БАКТЕРИЙ РОДА *Yersinia* И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПАТОГЕННЫХ
ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИДОВ ИЕРСИНИЙ МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Разработан способ экспресс диагностики бактерий рода *Yersinia*, который основан на методе мультиплексной ПЦР с последующим анализом длин амплифицированных фрагментов и предусматривает родовую идентификацию бактерий рода *Yersinia* и видовую идентификацию патогенных для человека видов (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*). В качестве мишени выбран ген, кодирующий *OmpF* порин. Изобретение позволяет осуществлять одновременную детекцию и дифференциальную диагностику патогенных и непатогенных видов иерсиний, а также видовую идентификацию патогенных для человека видов бактерий рода *Yersinia*, при

этом повышается специфичность диагностики, уменьшается время проведения анализа, происходит упрощение анализа, уменьшается стоимость диагностики. Изобретение может быть использовано в медицине для диагностики острых и хронических форм инфекций, вызываемых бактериями рода *Yersinia*; в ветеринарной практике для выявления инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных, вызываемых иерсиниями, и бактерионосителей, а также для проведения исследований бактериальной обсемененности иерсиниями эпидемиологически значимых объектов (теплиц, овощехранилищ, пищеблоков и т.п.). 2 ил., 2 табл.



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; 12 - отрицательный контроль. М. ДНК-маркер.

Фиг. 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 2008147520/13, 01.12.2008

(23) 29.04.2008
(2006118406 от 26.05.2006)

(24) Effective date for property rights:
01.12.2008

(45) Date of publication: 10.04.2010 Bull. 10

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):

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

(54) METHOD OF DETECTION BACTERIA *Yersinia* AND DIFFERENTIATION OF *YERSINIA* PATHOGENIC FOR HUMAN BY MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION

(57) Abstract:

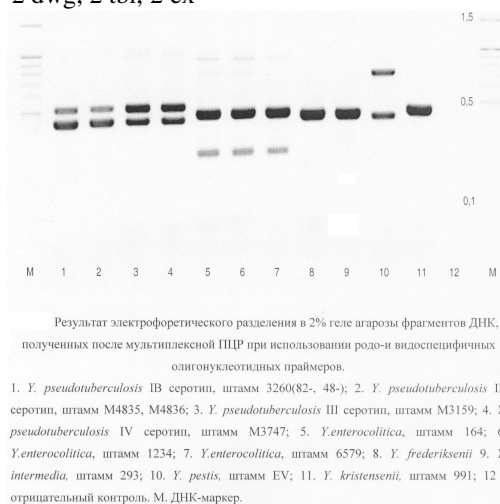
FIELD: medicine.

SUBSTANCE: there is developed an express diagnostic technique for bacteria *Yersinia* which is based on the multiplex PCR followed with analysing the lengths of amplified fragments and provides a generic identification of bacteria *Yersinia* and a specific identification of those pathogenic for human (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica*). As a target, a gene coding OmpF porin is specified. The invention allows for simultaneous detection and differential diagnostics of pathogenic and nonpathogenic *Yersinia*, and also the specific identification of *Yersinia* pathogenic for human; herewith diagnostic specificity is improved, the analysis time decreases, the analysis is simplified, and diagnostic cost is reduced. The invention can be used in medicine to diagnose acute and chronic infections caused by bacteria *Yersinia*; in veterinary practice to detect *Yersinia* caused infectious diseases of farm animals, and bacilli

carriers, and also to study *Yersinia* bacterial semination of epidemiologically significant objects (greenhouses, vegetable stores, kitchens, etc.).

EFFECT: improvement of the method.

2 dwg, 2 tbl, 2 ex



Изобретение относится к области биотехнологии, медицины и ветеринарии, а именно к лабораторной генодиагностике, и представляет собой способ для детекции бактерий рода *Yersinia* и дифференциации 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. 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*) [4]. Кроме того, существует группа «атипичных» чумных штаммов, так называемых пестоидов и *Microtias*, 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, O:3, O:8, O:9 и O: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. В литературе имеются отдельные сообщения о выделении непатогенных иерсиний из клинического материала. Они могут составлять до 20% от всех изолятов иерсиний [8]. Показано, что непатогенные иерсинии могут обладать некоторыми факторами патогенности, в частности продуцировать энтеротоксины [9], и, следовательно, быть причиной пищевого отравления. Кроме того, некоторые варианты способны проникать внутриклеточно и, следовательно, избегать фагоцитоза [10]. Определение роли этих бактерий в возникновении острой кишечной инфекционной болезни возможно только в результате совершенствования диагностики иерсиниоза.

Лабораторная диагностика иерсиний включает бактериологические, биохимические, серологические и молекулярно-генетические методы исследования. Бактериологическая диагностика иерсиний достаточно трудоемка и занимает много времени. Ряд методик по выделению иерсиний предусматривают предварительное культивирование бактерий в средах обогащения при 4-25°C в течение 1-28 дней с последующим пересевом в селективные среды и культивированием при 22-30°C в течение 1-7 дней [7, 11, 12].

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. Для серологической диагностики иерсиний разработано много методов: реакция торможения непрямой гемагглютинации (РТГА), реакция непрямой гемагглютинации

(РНГА), реакция агглютинации (РА), иммуноферментный анализ (ИФА). Этими методами в ранние сроки заболевания антиген иерсиний выявляется в 40-60% случаев. Антитела в диагностически значимых титрах в основном определяются только на второй неделе заболевания. В РНГА этот показатель составляет в среднем 40-50%, в РА - 60-80% случаев. Кроме того, серологические методы имеют серьезный диагностический недостаток - перекрестные реакции не только в пределах рода (близкое антигенное родство, отсутствие моноклональных антител), но и с представителями других родов [7, 12, 13].

К молекулярно-генетическим методам исследования относятся метод гибридизации нуклеиновых кислот и метод ПЦР амплификации нуклеиновых кислот. Вторым методом находит более широкое применение ввиду 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 наличие 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, 23S и 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 (*fl6s* 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, т.к. 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 то же 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 специфичного, чувствительного и экономичного способа, позволяющего определять принадлежность микроорганизмов к роду *Yersinia*, а также идентифицировать и дифференцировать патогенные для человека виды иерсиний.

Заявляемый способ основан на мультиплексной ПЦР с последующим гель-электрофорезным анализом длин амплифицированных фрагментов, и заключается в:

1) детекции нуклеиновых кислот иерсиний путем амплификации участка гена *OmpF* порина иерсиний с помощью праймеров Y-F (SEQ ID NO:1) и Y-R (SEQ ID NO:2) на основе образования ПЦР-продукта, длина которого составляет 427-472 п.н.;

2) идентификации и дифференциации патогенных видов иерсиний путем:

а) амплификации участка гена *OmpF* порина *Y. pestis* с помощью праймеров Y-F (SEQ ID NO:1) и YP-R (SEQ ID NO:3) и образования ПЦР-продукта, длина которого составляет 754 п.н.;

б) амплификации участка гена *OmpF* порина *Y. pseudotuberculosis* с помощью праймеров Y-F (SEQ ID NO:1) и YPS-R (SEQ ID NO:4) и образования ПЦР-продукта, длина которого составляет 503 п.н.;

в) амплификации участка гена *OmpF* порина *Y. enterocolitica* с помощью праймеров Y-F (SEQ ID NO:1) и YE-R (SEQ ID NO:5) и образования ПЦР-продукта, длина которого составляет 270 п.н.;

3) дифференциальной диагностики непатогенных видов рода *Yersinia* от патогенных видов этого рода, согласно которой у непатогенных видов иерсиний с помощью 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)) образуется только один специфичный ПЦР-продукт, а у патогенных видов иерсиний (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*) образуются два специфичных ПЦР-продукта.

Набор олигонуклеотидных праймеров охарактеризован в заявке №2006118406, опубл. 10.12.2007. Набор состоит из следующих нуклеотидных последовательностей:

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

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

- YP-R (SEQ ID NO:3) - 5'-GTGTTTCAGACCGTTTGCGAT-3' - антисмысловой видоспецифичный праймер;

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

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

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.

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в следующем:

- одновременная детекция и дифференциальная диагностика патогенных и непатогенных видов иерсиний, а также видовая идентификация патогенных для человека видов бактерий рода *Yersinia*;

- более высокая специфичность диагностики;

- уменьшение времени проведения анализа (менее 3,5 час, не включая подготовку пробы). Известный метод [18] требует на диагностику 48-72 час.

- упрощение анализа (3 процедуры, а в известном способе - 6-9 процедур);

- уменьшение стоимости диагностики;

- возможность использования в скрининговых исследованиях.

В качестве мишени выбран ген, кодирующий OmpF порин, порообразующий белок наружной мембраны грамотрицательных бактерий, нуклеотидная последовательность которого имеет консервативные и вариабельные для иерсиний участки.

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

Длины ПЦР-продуктов, образованных в мультиплексной ПЦР					Таблица 1
Род/вид	Антисмысловый праймер	Смысловый праймер Y-F (SEQ ID NO:1)		Число специфичных ПЦР-продуктов	
		Длина ПЦР продукта (п.н.)			
Yersinia spp.непатогенные	Y-R (SEQ ID NO:2)	427-472		1	
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).

Штаммы, использованные в работе		
Название штамма/плазмиды	Описание генотипа	Откуда получены
3260(82-, 48-)	<i>Y. pseudotuberculosis</i> IB серотип	НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, г.Владивосток
M4835, M4836	<i>Y. pseudotuberculosis</i> IB серотип	
M3159	<i>Y. pseudotuberculosis</i> III серотип	
M3747	<i>Y. pseudotuberculosis</i> IV серотип	
164	<i>Y. enterocolitica</i>	
1234	<i>Y. enterocolitica</i>	
6579	<i>Y. enterocolitica</i>	
4849	<i>Y. frederiksenii</i>	
253/8744	<i>Y. intermedia</i>	
991	<i>Y. kristensenii</i>	
EV	<i>Y. pestis</i>	ГНЦ прикладной микробиологии, г.Оболensk
DH5α	<i>E.coli</i> 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.1 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). Все три штамма *Y. enterocolitica* показывают два фрагмента длиной 270 и 465 п.н. (дорожки 5-7). Штамм *Y. pestis* показывают два фрагмента длиной 430 и 754 п.н. (дорожка 10). Другие виды иерсиний детектируются и показывают только один фрагмент длиной 430-470 п.н. (дорожки 8, 9 и 11). В отрицательном контроле (реакционная смесь, не содержащая ДНК матрицу) продукты амплификации отсутствуют (дорожка 12).

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 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 рода *Yersinia*, как указано в примере 1.

Электрофоретическое разделение амплификатов выполнялось в 2% агарозном геле. На фиг.2 представлен результат исследования образцов клинического материала методом мультиплексной ПЦР. ДНК *Y. enterocolitica* обнаружена в 3 образцах (клинические образцы №1, №2 и №4), ДНК непатогенных иерсиний в 1 образце (клинический образец №3).

Литература

1. Bockemuhl J., Wong J. *Yersinia*. In: Murray P.R., et al. Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington (DC): ASM Press; 2003. P.672-83.
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.
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. Microbes Infect. 1:323-333.

7. Псевдотуберкулез. Под ред. Сомова Г.П., Покровского В.И., Беседновой Н.Н. -М.: 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 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.

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.

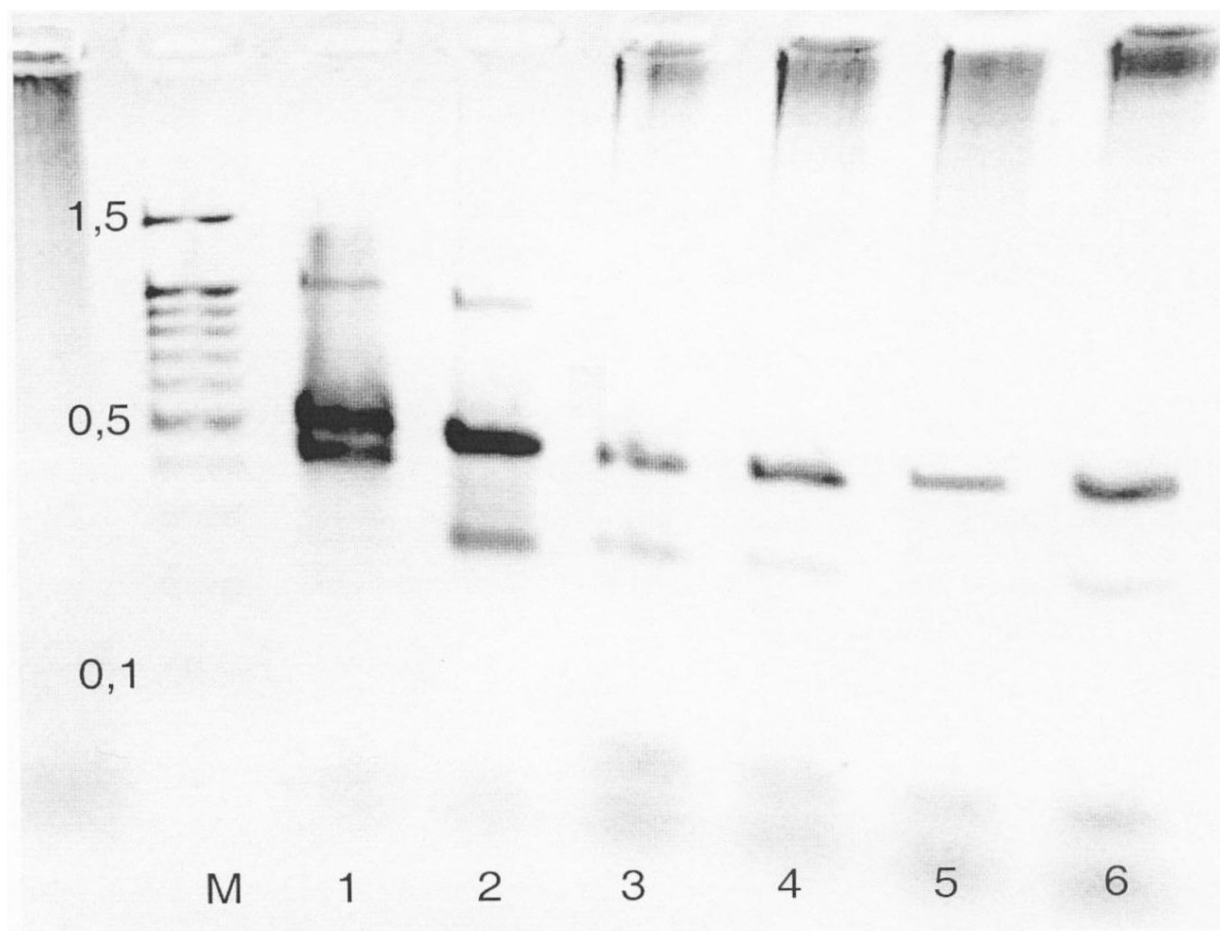
16. US 6197514 B1, 12.04.1999.

17. US 0197789 A1, 21.05.2002.

18. US 5654144, 24.04.1995.

Формула изобретения

Способ детекции бактерий рода *Yersinia* и дифференциации патогенных для человека видов иерсиний методом мультиплексной ПЦР с последующим гель-электрофорезным анализом длин амплифицированных фрагментов, заключающийся в том, что детекцию иерсиний осуществляют путем амплификации участка гена OmpF порина иерсиний с помощью праймеров Y-F (SEQ ID NO:1) и Y-R (SEQ ID NO:2) на основе образования ПЦР-продукта, длина которого составляет 427-472 п.н.; идентификацию и дифференциацию патогенных видов иерсиний путем: а) амплификации участка гена OmpF порина *Y. pestis* с помощью праймеров Y-F (SEQ ID NO:1) и YP-R (SEQ ID NO:3) и образования ПЦР-продукта с длиной 754 п.н.; амплификации участка гена OmpF порина *Y. pseudotuberculosis* с помощью праймеров Y-F (SEQ ID NO:1) и YPS-R (SEQ ID NO:4) и образования ПЦР-продукта с длиной 503 п.н.; в) амплификации участка гена OmpF порина *Y. enterocolitica* с помощью праймеров Y-F (SEQ ID NO:1) и YE-R (SEQ ID NO:5) и образования ПЦР-продукта с длиной 270 п.н.; дифференциальную диагностику непатогенных видов рода *Yersinia* от патогенных видов этого рода, согласно которой у непатогенных видов иерсиний с помощью 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)) образуется только один специфичный ПНР-продукт, а у патогенных видов иерсиний (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*) образуются два специфичных ПЦР-продукта.



Результат исследования образцов клинического материала методом мультиплексной ПЦР.

М - ДНК-маркер; 1. *Y. pseudotuberculosis* (положительный контроль); 2. *Y. enterocolitica*, (положительный контроль); 3. клинический образец №1; 4. клинический образец №2; 5. клинический образец №3; 6. клинический образец №4.

Фиг. 2