



(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011138215/10, 16.09.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 16.09.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.09.2011

(45) Опубликовано: 27.10.2012 Бюл. № 30

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: RU 2422535 C1, 27.06.2011. RU 2354700 C2,
 10.05.2009. WO 2002095066 A3, 28.11.2002. RU
 2385941 C1, 10.04.2010. RU 2377308 C1,
 27.12.2009.

Адрес для переписки:

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
 НИИЭМ им. Пастера, патентный отдел, Г.Л.
 Никифоровой

(72) Автор(ы):

**Кокорина Галина Ивановна (RU),
 Воскресенская Екатерина
 Александровна (RU),
 Чеснокова Маргарита Валентиновна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Федеральное бюджетное учреждение науки
 "Санкт-Петербургский научно-
 исследовательский институт эпидемиологии
 и микробиологии им. Пастера" (RU)**

**(54) ТЕСТ-ШТАММ YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ
 БАКТЕРИЙ YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ГРУППЫ II**

(57) Реферат:

Штамм бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* 1068 выделен от больного псевдотуберкулезом, депонирован в коллекции РосНИПЧИ «Микроб» под номером КМ 213 и предназначен в качестве тест-штамма для дифференциации бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* генетической группы II. Особенностью штамма является содержание хромосомного гена суперантигена *Y.pseudotuberculosis YPMa/YPMc*

(*ypmA/C*) и плазмиды *pVM 82 (dotO)* с молекулярной массой 82МДа, которые определяют методом ПЦР. Изобретение позволит проводить эпидемиологическое расследование спорадических и групповых заболеваний псевдотуберкулеза: установления источника инфекции в очаге заболевания и идентификации факторов передачи, а также для мониторинга за циркуляцией штаммов на различных территориях. 2 ил., 1 табл.

RU 2 4 6 5 3 1 7 C 1

RU 2 4 6 5 3 1 7 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2011138215/10, 16.09.2011**

(24) Effective date for property rights:
16.09.2011

Priority:

(22) Date of filing: **16.09.2011**

(45) Date of publication: **27.10.2012 Bull. 30**

Mail address:

**197101, Sankt-Peterburg, ul. Mira, 14, NIIeHM im.
Pastera, patentnyj otdel, G.L. Nikiforovoj**

(72) Inventor(s):

**Kokorina Galina Ivanovna (RU),
Voskresenskaja Ekaterina Aleksandrovna (RU),
Chesnokova Margarita Valentinovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe bjudzhetnoe uchrezhdenie nauki
"Sankt-Peterburgskij nauchno-issledovatel'skij
institut ehpidemiologii i mikrobiologii im.
Pastera" (RU)**

(54) **YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS TEST STRAIN FOR DIFFERENTIATION OF YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS BACTERIA GENETIC GROUP II**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: Yersinia pseudotuberculosis 1068 bacterial strain is recovered from a patient suffering pseudotuberculosis, deposited in the collection of the Russian Science and Research Antiplague Institute Microbe, No. KM 213 and is applicable as a test strain for differentiation of Yersinia pseudotuberculosis bacteria genetic group II. The characteristic of the strain is the content of chromosomal gene of the Y.pseudotuberculosis

YPMa/YPMc (urtA/C) superantigen and the pVM 82 (dotO) plasmid of molecular weight 82MDa determined by PCR method.

EFFECT: invention shall enable epidemiologic study of sporadic and group cases of pseudotuberculosis: specifying an infection source in a hotbed of the disease and identifying transmission factors, as well as monitoring strain circulation at various territories.

2 dwg, 1 tbl

Изобретение относится к медицинской микробиологии и представляет собой оригинальный штамм возбудителя псевдотуберкулеза, содержащий хромосомный ген суперантигена Y.pseudotuberculosis YPMa/YPMc (урmA/C), плазмиды с мол. массой 82МДа (pVM82) и используемый как тест-штамм для дифференциации

бактерий Y.pseudotuberculosis генетической группы II.

Псевдотуберкулез регистрируется в России практически повсеместно, при этом наиболее высокие показатели заболеваемости характерны для территорий с умеренным и холодным климатом (Сибирский, Дальневосточный, Северо-Западный ФО).

Известно, что псевдотуберкулез в различных географических регионах характеризуется определенными клиническими симптомами (Fukushima H., Matsuda Y., Seki R., et al. Geographical Heterogeneity between Far Eastern and Western Countries in Prevalence of the Virulence Plasmid, the Superantigen Yersinia pseudotuberculosis-Derived Mitogen, and the High-Pathogenicity Island among Yersinia pseudotuberculosis Strains. J Clin Microbiol. 2001; 39 (10): 3541-3547): в Европе для этой инфекции характерны, главным образом, наличие лихорадки, гастроинтестинальных симптомов и мезентериального лимфаденита, тогда как в России - это системные проявления, такие как сыпь, узловатая эритема, артриты.

Такой полиморфизм клинических проявлений заболевания обусловлен наличием у возбудителя большого набора факторов патогенности хромосомной и плазмидной природы. Так, гены «острова» высокой патогенности НР1, расположенного на хромосоме, ответственны за биосинтез и регуляцию системы утилизации железа, необходимого для экспрессии высоковирулентного фенотипа энтеробактерий (Camiel E. The Yersinia high-pathogenicity island: an iron-uptake island. Microbes and Infection, 3, 2001, 561-569). Суперантигены YPMs в организме хозяина стимулируют поликлональную активацию Т-лимфоцитов (CD4+, CD8+). При этом во взаимодействии вовлекаются от 10 до 40% всех лимфоцитов. Это ведет к гиперпродукции цитокинов, таких как IL-2, TNF- α , IFN- γ , что может вызвать синдром токсического шока (Шурыгина И.А., 2003). Известно три группы суперантигенов - YPMa, YPMb, YPMc, кодируемых соответствующими генами урmA, урmB и урmC (Carnoy C., Floquet S., Marceau M., et al. The superantigen gene ypm is located in an unstable chromosomal locus of Yersinia pseudotuberculosis. J Bacteriol. 2002, 184(16):4489-99). YAPI - адгезивный «остров» патогенности иерсиний, несет гены, кодирующие пили IV типа (филаментозные структуры, отходящие от поверхности бактериальной клетки, короче и многочисленнее жгутиков). Пили IV типа вовлечены в различные бактериальные функции, включая адгезию на клетках пейеровых бляшек, бактериофагальную адсорбцию, плазмидный перенос и флагеллин-независимую подвижность (Collyn F., Léty M.A., Nair S., et al. Yersinia pseudotuberculosis harbors a type IV pilus gene cluster that contributes to pathogenicity. Infect Immun., 2002, 70(11):6196-205). Плазмида с мол. массой 82 МДа (pVM82), присутствующая у некоторых штаммов Y.pseudotuberculosis, оказывает иммуносупрессорное и антифагоцитарное действие на иммунные структуры макроорганизма (Дубровина В.И., Голубинский Е.П., Борсук Г.И. и авт. Особенности фагоцитоза Yersinia pseudotuberculosis с разным набором плазмид. Мед. паразитол., 1999, 4:50-53). М.В.Чеснокова и соавт. (Чеснокова М.В., Климов В.Т., Марамович А.С. Генотипирование Yersinia pseudotuberculosis, выделенных в Сибири и на Дальнем Востоке. Журн. микробиол., 2006, 6, 20-25) показали, что штаммы Y.pseudotuberculosis, обладающие плазмидой pVM82, вызывают более тяжелое течение псевдотуберкулеза.

Ранее методом ПЦР штаммы Y.pseudotuberculosis были исследованы на наличие

таких генов вирулентности, как гены суперантигенов (*урпА*, *урпВ* и *урпС*), гены «острова» высокой патогенности НР1, и по результатам работы разделены на генетические группы (Fukushima H., Matsuda Y., Seki R., et al. Geographical Heterogeneity between Far Eastern and Western Countries in Prevalence of the Virulence Plasmid, the Superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-Derived Mitogen, and the High-Pathogenicity Island among *Yersinia pseudotuberculosis* Strains. J Clin Microbiol. 2001; 39(10):3541-3547).
Недостатком этого исследования является то, что не были учтены другие факторы патогенности - адгезивный «остров» патогенности иерсиний и плазида pVM82.

В настоящее время для эпидемиологического расследования случаев спорадических и групповых заболеваний псевдотуберкулезом и проведения мониторинга за возбудителями на различных территориях исследуют содержание плазмид *Y. pseudotuberculosis*, которые выделяют по методу Т.Кисер в несколько этапов, а также методом ПЦР определяют наличие генов «острова» высокой патогенности НР1 и суперантигена (Чеснокова М.В., Климов В.Т., Марамович А.С. Генотипирование *Yersinia pseudotuberculosis*, выделенных в Сибири и на Дальнем Востоке. Журн. микробиол., 2006, 6, 20-25). Штамм-аналог получить не удалось.

За прототип выбран штамм *Y. pseudotuberculosis* КМ-9 /2160 (Мессорош В.Г. Биологические свойства *Yersinia pseudotuberculosis* и совершенствование лабораторной диагностики псевдотуберкулеза. Автореф. дисс.... канд. мед. наук, СПб, 1993, 18 с.), используемый в качестве эталона для определения вирулентности, депонированный в коллекции патогенных микроорганизмов РосНИПЧИ «Микроб». Степень вирулентности определяли при конъюнктивальном заражении морских свинок, энтеральном заражении белых мышей и морских свинок и инфицировании культур тканей линий НЕР-2, HeLa. Изучение наличия генов вирулентности не проводилось. Поэтому применение штамма для выполнения задач мониторинга за циркулирующей возбудителя псевдотуберкулеза и поиска источника инфекции нецелесообразно.

Изобретение направлено на получение тест-штамма *Y. pseudotuberculosis* генетической группы II.

Технический результат - дифференциация бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* генетической группы II по содержанию генов вирулентности, что позволит устанавливать источник инфекции в очаге заболевания и идентифицировать факторы передачи, а также проводить мониторинг за циркулирующей штаммов на различных территориях.

Полученный штамм *Y. pseudotuberculosis* 1068 депонирован в коллекции патогенных микроорганизмов РосНИПЧИ «Микроб» КМ 213. Особенностью штамма является содержание хромосомного гена суперантигена *Y. pseudotuberculosis* YPMa/YPMc (*урпА/С*), плазмиды с мол. массой 82МДа (pVM 82).

Штамм семейства Enterobacteriaceae род *Yersinia* вид *Y. pseudotuberculosis* выделен от больного псевдотуберкулезом генерализованной формы средней степени тяжести, г.Иркутск, 2002 г.

Морфологические и физиологические характеристики. Грамотрицательные аспорогенные бескапсульные палочковидные клетки 1-3 мкм, слабоподвижны при температуре ниже 30°C, при 37°C неподвижны. На жидких питательных средах в аэробных условиях при 28°C или при 37°C образуют равномерное помутнение. На агаре Хоттингера при 28°C через 48 ч образуют выпуклые прозрачные серовато-желтые блестящие колонии с относительно ровным краем и приподнятым центром размером до 1,2-1,8 мм. На среде с бромтимоловым синим при 28°C через 48 ч на сине-голубом фоне среды образуют мелкие (1-2 мм), голубовато-зеленые, с приподнятым

центром, выпуклые, сухие, с матовым налетом колонии с фестончатым краем.

Биохимическая активность. Ферментирует с образованием кислоты: глюкозу, маннит, ксилозу, не ферментирует лактозу, сахарозу, сорбит. Пробы на индол и сероводород отрицательны. Продуцирует каталазу, не продуцирует оксидазу.

5 Гидролизует мочевины, не ферментирует салицин. Не продуцирует орнитиндекарбоксилазу.

Антигенные свойства. Вступает в реакцию агглютинации с диагностической сывороткой к *Y.pseudotuberculosis* 0:1.

10 Генетические особенности. Содержит хромосомный ген суперантигена *YPMa/YPMc* (*урmA/C*) и плазмиду *pVM82 (dotO)*; отсутствуют ген адгезивного «острова» патогенности иерсиний *YAP1 (pilPQ)*, хромосомный ген «острова» высокой патогенности *HPI (fyuA)* и ген суперантигена иерсиний *YPMb (урmB)*.

15 По сравнению со штаммом аналогом в настоящем изобретении изучают также наличие хромосомного фактора патогенности - *YAP1*. Преимуществом данного исследования является использование только метода ПЦР для поиска всех генов вирулентности.

Сущность изобретения поясняется чертежами.

20 На ФИГ.1 представлены результаты ПЦР со штаммом *Yersinia pseudotuberculosis* №1068 (группа II), где М - маркер молекулярного веса ДНК (10000 b.p.; Eurogentec); 1 - *урm A/ C* (422 b.p.); 2 - *урmB* (268 b.p.); 3 - *fyuA* (149 b.p.); 4 - *pilPQ* (569 b.p.); 5 - *dotO* (2811 b.p.).

25 На ФИГ.2 - результаты ПЦР со штаммами *Yersinia pseudotuberculosis* №1068 дорожки (1-5), №1067 дорожки (6-10) и №620 дорожки (11-15), где М - маркер молекулярного веса ДНК (VI.; Eurogentec); 1, 6, 11 - *урm A/ C* (422 b.p.); 2, 7, 12 - *урmB* (268 b.p.); 3, 8, 13 - *fyuA* (149 b.p.); 4, 9, 14 - *pilPQ* (569 b.p.); 5, 10, 15 - *dotO* (2811 b.p.).

Изобретение реализуется следующим образом.

30 Пример 1. Способ получения штамма

Чистую культуру штамма выращивают на агаре Хоттингера при 28°C в течение 24 ч.

35 Готовят взвесь бактерий с концентрацией 10^8 м.к./мл в стерильной дистиллированной воде, 100 мкл взвеси кипятят 5 мин, центрифугируют при 10 тыс. об/мин 1 мин, используют надосадок. Бактерии исследуют методом полимеразной цепной реакции с праймерами к участкам генов, кодирующим факторы патогенности *Y.pseudotuberculosis* производства ООО «Синтол» (Москва) (таблица 1).

40

45

50

Таблица 1

Ген	Локализация гена	Праймер последовательность (5' -3')	Длина ПЦР продукта (п.н.)
на хромосоме			
<i>fyuA</i>	НР1	Forward CTTTATCCTCTGGCCTTGGG Reverse CTGACAACAGTAGACGAG	149
<i>pilPQ</i>	YAP1	Forward TATGTTGCTGGAGGCTCAG Reverse GCGAACTATCAGCTATACG	569
<i>урmA/C</i>	Локус YPMa/YPMc	Forward CACTTTTCTCTGGAGTAGCG Reverse ACAGGACATTTCTGCA	422
<i>урmB</i>	Локус YPMb	Forward TTTCTGTCATTA CTGACATTA Reverse CCTCTTTCCATCCATCTCTTA	268
на плазмиде			
<i>dotO</i>	pVM82	Forward ATGATGGATGGTTCACTGGG Reverse ATTGATTGCTTGAGGTCTTGG	2811

Реакционную смесь для проведения ПЦР готовят с использованием стандартных реагентов производства «Fermentas» согласно прилагаемой инструкции: 2,5 мкл 10x Taq буфера с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 мМ/мкл MgCl_2 , 0,2 мМ/мкл каждого дНТФ, 0,4 мкМ/мкл прямого и обратного праймеров, 0,625 U Taq-ДНК-полимеразы, с добавлением 4 мкл исследуемого образца до конечного объема 25 мкл. ПЦР проводят по программе: 1 цикл 95°C - 5 мин; 25 циклов 94°C - 1 мин, 55°C - 1 мин, 72°C - 1 мин; 1 цикл 72°C - 7 мин. Для учета результатов ПЦР проводят электрофорез в 1,5% агарозном геле при постоянном напряжении 75 В в ТВЕ буфере (0,9 М Tris, 0,9 М борная кислота, 20 мМ EDTA·Na₂) с окрашиванием этидий бромидом.

На ФИГ.1 представлен результат электрофоретического разделения фрагментов ДНК, полученных после проведения ПЦР.

Видно, что у штамма 1068 присутствуют два фрагмента ДНК, длиной 422 п.н. и 2811 п.н. (дорожки 1 и 5), что соответствует участкам генов *урmA/C* и *dotO*. На дорожках 2, 3, 4 ампликонов нет.

Пример 2. Исследование ДНК штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*

Методом ПЦР с использованием праймеров к хромосомным генам *Yersinia* (*fyuA*, *pilPQ*, *урmA/C*, *урmB*) и к плазмидному гену (*dotO*) были исследованы ДНК штаммов №1067 и №620, которые были выделены в стационаре при лечении sporadic больных псевдотуберкулезом. В качестве контроля использован штамм *Y.pseudotuberculosis* KM 213.

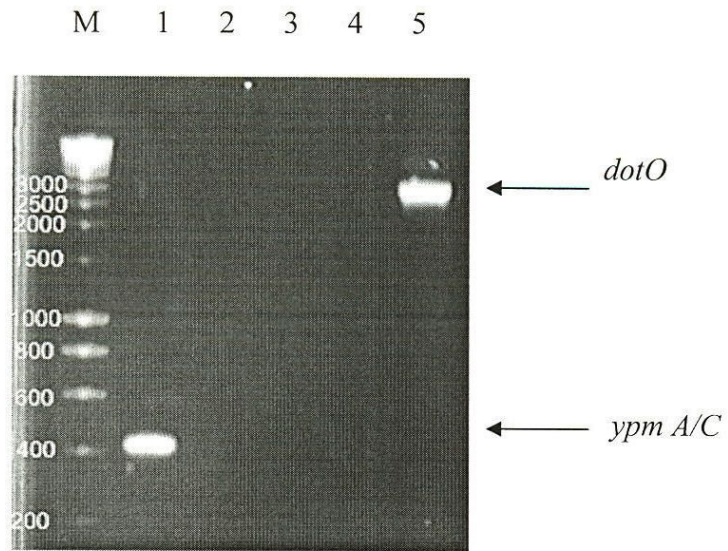
Результаты исследования представлены на ФИГ.2.

Видно, что у всех исследованных штаммов *Y.pseudotuberculosis* присутствуют два фрагмента ДНК длиной 422 п.н. (дорожки 1, 6, и 11) и 2811 п.н. (дорожки 5, 10, 15), как и у полученного тест-штамма и, соответственно, они могут быть отнесены к генетической группе II. Таким образом, установлен факт генетического сходства исследованных штаммов, что позволяет судить о циркуляции *Y.pseudotuberculosis* данной генетической группы на исследуемой территории.

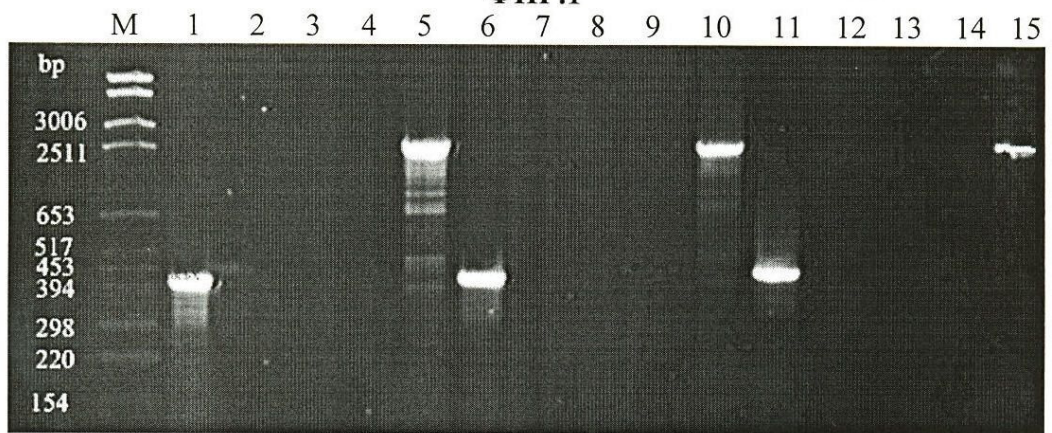
Таким образом, заявленный штамм пригоден для дифференциации бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* генетической группы II по содержанию генов вирулентности, что позволит устанавливать источник инфекции в очаге заболевания и идентифицировать факторы передачи, а также проводить мониторинг за циркуляцией штаммов на различных территориях.

Формула изобретения

Тест-штамм *Yersinia pseudotuberculosis*, РосНИПЧИ «Микроб» КМ 213, для дифференциации бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* генетической группы II.



ФИГ.1



ФИГ.2