УДК 616.98:579.852.11

Н.А.Шишкова, А.Н.Мокриевич, В.М.Павлов, Л.И.Маринин, Г.М.Вахрамеева, Т.Ю.Кудрявцева, И.А.Дятлов

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ CHI-ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ ОТ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ БАЦИЛЛ

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск, Российская Федерация

Целью работы было сравнение микроорганизмов, принадлежащих к шести различным видам рода *Bacillus*, по распределению подвижности ампликонов, полученных с использованием праймера, содержащего chi-последовательность *Bacillus subtilis*. В работе были проанализированы 30 штаммов *Bacillus anthracis* и близкородственных бацилл. Культуры выращивали на L-агаре и в L-бульоне при температуре 37 °С. ДНК выделяли из вегетативных культур *B. anthracis* и *Bacillus spp.* с использованием лизоцима и фенольной депротеинизации. Для однопраймерной ПЦР был сконструирован праймер ChiBs – 5`-CTAGGAGCGGG-3`. Однопраймерную амплификацию (30 циклов) проводили при температуре отжига 47 °С. Сравнительный анализ индивидуальных электрофоретических профилей ампликонов, полученных в реакции ПЦР с помощью праймера, содержащего chi-последовательность *B. subtilis,* позволяет выявлять генетическую внутривидовую вариабельность и проводить дифференциацию штаммов *B. anthracis* от атипичных штаммов и близкородственных видов бацилл.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, дифференциация, ПЦР, chi-последовательность.

N.A.Shishkova, A.N.Mokrievich, V.M.Pavlov, L.I.Marinin, G.M.Vakhrameeva, T.Yu.Kudryavtseva, I.A.Dyatlov

Usage of chi-Sequence for Differentiation between the Strains of Anthrax Etiological Agent and Closely Related Bacilli

State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Objective of the study was to carry out comparison between the microorganisms appurtenant to six different species of *Bacilli* genus as regards mobility of the amplicons obtained using the primer that contained chi-sequence of *Bacillus subtilis*. Therewith, analyzed were 30 *Bacillus anthracis* strains and closely related bacilli. Cultures grew on L-agar and L-broth at 37 °C. DNA was isolated from vegetative *B. anthracis* and *Bacillus spp*. cultures introducing lysozyme and phenol de-proteinizing. In order to perform single-primer PCR constructed was ChiBs primer – 5'-CTAGGAGCGGG-3'. Single-primer amplification (30 cycles) was carried out at annealing temperature of 47 °C. Comparative analysis of individual electrophoretic amplicon profiles, obtained by means of ChiBs-primer PCR, allows for identification of genetic intraspecific variability and differentiation of *B. anthracis* strains from the atypical ones and closely related species of bacilli.

Key words: *Bacillus anthracis,* differentiation, PCR, chi-sequence.

Ежегодно в результате природных катаклизмов, расширения территорий строительства и сельскохозяйственного землепользования происходят случаи обнаружения и вскрытия скотомогильников, где сибиреязвенные микробы сохраняются десятилетиями. На территории Российской Федерации постоянно регистрируют единичные и реже – групповые случаи сибирской язвы у людей и животных, в том числе со смертельными исходами, в связи с чем возникает проблема своевременного выявления и идентификации выделенных из различных источников сибиреязвенных штаммов и тщательная дифференциация их от близкородственных видов.

Возбудитель сибирской язвы *Bacillus anthracis* и другие члены группы *Bacillus cereus* филогенетически и таксономически очень тесно связаны, и некоторые авторы предполагают, что они принадлежат к одному виду [9]. По данным гибридизации, уровень гомологии хромосомных ДНК отдельных штаммов *B. anthracis* и *B. cereus* достигает 99 % [14], однако один микроорганизм вызывает летальную инфекцию, а другой является почвенным сапрофитом.

Для индикации *B. anthracis* используется ПЦР с праймерами, комплементарными к генам сибиреязвенного токсина: *pag*, *lef* и *cya* плазмиды pXO1, гену *cap* плазмиды pXO2 и гену *Ba813* из хромосомы [13]. Однако данные праймеры выявляют и некоторые штаммы *B. cereus*. По мнению Roloff и соавт. [14], не всегда представляется возможным идентифицировать некоторые сибиреязвенные штаммы, в особенности те, которые утратили плазмиды вирулентности, с помощью молекулярных методов. В частности показано, что ДНК некоторых изолятов *B. cereus* содержит фрагменты, сходные более чем с половиной последовательностей открытых рамок считывания плазмиды pXO1 *B. anthracis*, причем основная часть ДНК-фрагментов *B. cereus* имела сходство от 80 до 98 % [9]. *B. anthracis* представляет собой вид бацилл с исключительно мономорфным геномом. Только в середине 90-х гг. американским исследователям [5] удалось обнаружить в геноме *B. anthracis* открытую рамку считывания vrtA, которая содержала повторяющиеся короткие нуклеотидные последовательности. Однако из-за высокой степени гомологии ДНК представителей группы *B. cereus,* указанный ген не позволяет отличить возбудителя сибирской язвы от

близкородственных видов [12].

Другими авторами в 2001 г. предложена схема типирования возбудителя сибирской язвы по 17 локусам мультилокусного анализа вариабельности нуклеотидных тандемных повторов MLVA [11]. Применение этого метода также, как и генотипирование по P.Keim *et al*. [10], позволяет проводить сравнительное изучение сибиреязвенных штаммов различного географического происхождения. В настоящее время для типирования штаммов *B. anthracis* широко используется MLVA по 25 локусам и SNP-анализ [4]. Наиболее полное внутривидовое типирование может быть осуществлено в результате анализа нуклеотидных последовательностей геномов изучаемых штаммов бацилл.

Одним из вариантов диагностических ПЦР является амплификация участков генома со «случайными» повторами в условиях нестрогого связывания коротких праймеров (RAPD-ПЦР). Данный метод широко используется для демонстрации генетического разнообразия и дистанции между родственными штаммами микроорганизмов ввиду его доступности и относительной дешевизны [15]. В геномах различных видов бактерий были обнаружены chi-сайты – короткие нуклеотидные последовательности, узнаваемые специфической нуклеазой, которые являются «горячими» точками гомологичной рекомбинации [6, 7, 8, 16, 17].

В настоящей работе для дифференциации штаммов возбудителя сибирской язвы от атипичных и близкородственных видов бацилл был использован метод однопраймерной ПЦР с праймером, содержащим chi-последовательность *B. subtilis*. Полученные этим методом данные были сравнены с результатами анализа vrrA локуса, гена *pag* и культурально-морфологических и биологических свойств.

Материалы и методы

Работа проведена на 30 штаммах из Государственной коллекции ФБУН ГНЦ ПМБ «ГКПМ-Оболенск». Культуры выращивали на плотной и жидкой питательных средах [2] при температуре 37 °С в течение 18 ч. Пробоподготовку, выделение ДНК из *B. anthracis* и *Bacillus spp.* проводили в соответствии с методическими указаниями «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I–IV групп при работе методом ПЦР» [3].

Праймер, содержащий chi-последовательность *B. subtilis* из пяти нуклеотидов [8], фланкированную с обеих сторон пятью и одним нуклеотидом соответственно ChiBs – 5`-CTAGG-AGCGG-G-3`, был синтезирован в ЗАО «Синтол». Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 10х буфер для ДНК-полимеразы фирмы «Fermentas», Литва (75 мМ трис-HCl, pH 8,8, 20 мМ $(NH_4)_2 SO_4$, 0,01 % Tween 20), 2,5 мМ $MgCl_2$, 0,4 пкМ праймера, 0,2 мкМ каждого дНТФ, 1 ед Taq ДНК-полимеразы фирмы «Fermentas», Литва и 50–100 нг ДНК. Перед постановкой реакции матрицу прогревали при температуре 95 °С в течение 10 мин. Условия проведения ПЦР-амплификации: начальная денатурация 94 °С (3 мин); 30 циклов, состоящих из денатурации при 94 °С (30 с), отжига при 47 °С (30 с) и элонгации при 72 °С (1 мин); завершающая элонгация при 72 °С (5 мин). Амплификацию проводили на термоциклере «Apllied byosystem 2700», США. Ампликоны разделяли электрофорезом в 1,8 % агарозном геле в буфере ТЕА [1], ДНК в геле окрашивали бромистым этидием. Фотодокументирование проводили с помощью системы для гель-документирования Vilber-Lourmat (Франция), при ультрафиолетовом освещении с использованием трансиллюминатора фирмы «Cole Parmer», США. Для определения размеров ампликонов применяли маркер молекулярных весов GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, «Fermentas», Литва.

Результаты и обсуждение

Профиль ампликонов, полученных с помощью *ChiBs* праймера, 21 штамма разных видов *B. anthracis* и 9 штаммов других видов бацилл показаны на рис. 1 и 2.

Ампликоны, полученные с помощью праймера ChiBs, для большей части штаммов *B. anthracis* имели размеры ~270 и ~1500 п.о. У штаммов *B. anthracis* 492/497 и *B. anthracis* 71/171 выявляются два мажорных ампликона размерами 350 и 700 п.о., а у штамма *B. anthracis* 747/8 – только один ампликон размером 350 п.о. Анализ штаммов, принадлежащих к другим видам рода *Bacillus*, показывает, что ChiBs праймер инициирует синтез набора фрагментов ДНК, различающихся по молекулярной массе и интенсивности для каждого вида бацилл, внутри видов также наблюдается полиморфизм (рис. 2).

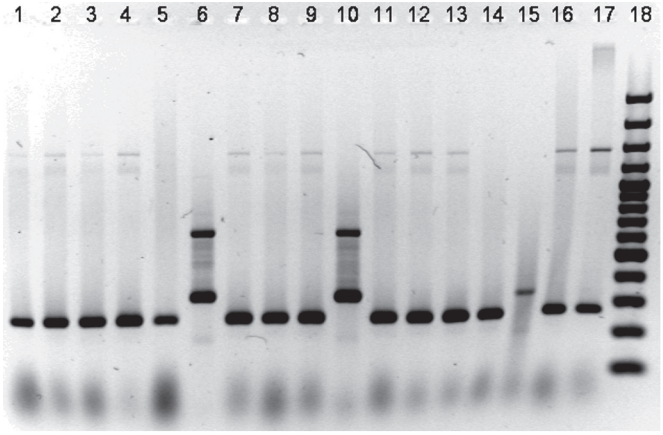

Рис. 1. Электрофореграмма ампликонов, полученных с праймером *ChiBs* и ДНК:

1 – B. anthracis 914/213, *2 – B. anthracis* 1259, *3 – B. anthracis* 1168/6-102, *4 – B. anthracis* 1184, *5 – B. anthracis* 1030/213, *6 – B. anthracis* 492/497, *7 – B. anthracis* 50/31, *8 – B. anthracis* 28/83, *9 – B. anthracis* 275/107-Д, *10 – B. anthracis* 71/171, *11 – B. anthracis* 363/17, *12 – B. anthracis* 427/618, *13 – B. anthracis* 546/714, *14 – B. anthracis* 555/288, *15 – B. anthracis* 747/8, *16 – B. anthracis* 560/258, *17 – B. anthracis* 71/12 (контроль), *18 –* GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder

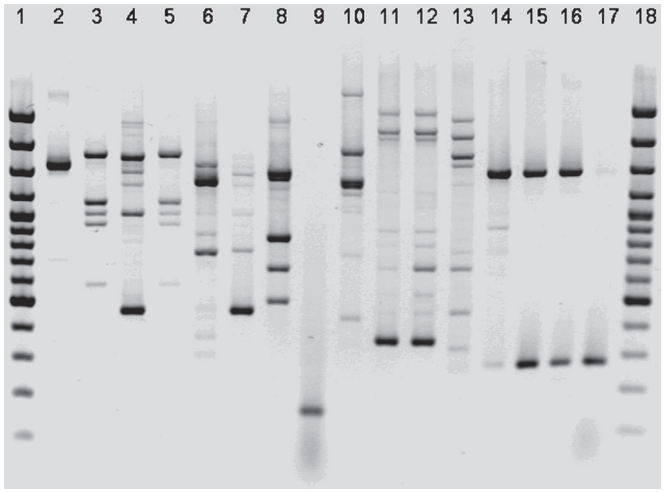

Рис. 2. Электрофореграмма ампликонов, полученных с праймером *ChiBs* и ДНК атипичных и близкородственных штаммов бацилл:

1, 18 – GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, *2* – *B. cereus* ВКМ B-504, 310, *3* – *B. cereus* ATCC 9634, *4* – *B. cereus* ATCC 10702, *5* – *B. cereus* ATCC 1070, *6* – *B. brevis* 1409, *7* – *B. subtilis* 168, *8* – *B. subtilis* var. Niger, *9* – *B. thuringiensis* 1373, *10* – *B. megaterium* 1433, *11* – *B. anthracis* 10 (38 «Калуга»), *12* – *B. anthracis* 32 (603), *13* – *B. anthracis* 193 Куба II, *14* – *B. anthracis* Dakkar, 15 – *B. anthracis* 71/12, 16 – *B. anthracis* СТИ-*1, 17* – *B. anthracis* СТИ Rif4 (дорожки 15–17 – типичные штаммы *B. anthracis*)

Как следует из данных, представленных на рис. 2, все штаммы близкородственных видов бацилл образуют в реакции ПЦР с помощью праймера ChiBs ампликоны, отличные от сибиреязвенного штамма *B. anthracis* 71/12 (Cap+,Tox+). Штаммы, отнесенные к сибиреязвенным – *B. anthracis* 10 (38 «Калуга»), *B. anthracis* 32 (603), *B. anthracis* 193 Куба II, образуют не характерные для сибиреязвенных ДНК ампликоны. У штамма *B. anthracis* 10 (38 «Калуга») и 32 (603) выявляются три ампликона размерами 350, 700 и > 1500 п.о., штамм *B. anthracis* 193 Куба II дает ампликоны размерами 320, 480,700 и > 1500 п.о., штамм *B. anthracis* Dakar – 270,750, 900 и > 1500 п.о. Штамм Dakkar образует ампликоны, сходные с таковыми сибиреязвенного штамма 71/12, но отличающиеся по интенсивности полос.

Таким образом, сравнительный анализ индивидуальных электрофоретических профилей ампликонов, полученных в реакции ПЦР с помощью ChiBs праймера, выявил наличие генетической вариабельности среди исследуемых штаммов бацилл. Семь штаммов – *B. anthracis* 492/497, *B. anthracis* 71/171, *B. anthracis* 747/8, *B. anthracis* 193 Куба II, *B. anthracis* Dakkar*, B. anthracis* 32 (603), *B. anthracis* 10 (38 «Калуга») имеют особенности нуклеотидной последовательности хромосомы, отличающие их от общего генотипа других исследованных в работе сибиреязвенных штаммов.

Поскольку нами выявлены генетические различия в ПЦР с праймером ChiBs у ряда штаммов *B. anthracis*, мы провели оценку действия специфических сибиреязвенных бактериофагов на эти культуры, а также определили ряд характеристик этих штаммов: характер роста в жидкой и на плотной питательных средах и вирулентность культур. Результаты представлены в таблице.

Для более подробного изучения атипичных штаммов *B. anthracis* поставили ПЦР с праймерами на наличие аллели vrrA и проверили их в ПЦР с праймерами к протективному антигену (результаты не представлены). Оказалось, что штаммы, отличающиеся в ПЦР с праймером *ChiBs*, также дают на электрофореграмме картину распределения ампликонов, полученных с праймерами, специфичными для vrrA, не характерную для сибиреязвенного микроба. У этих штаммов не выявляется также нуклеотидная последовательность гена протективного антигена. На основании проведенного анализа можно сказать, что семь штаммов – *B. anthracis* 492/497, *B. anthracis* 71/171, *B. anthracis* 747/8, *B. anthracis* 193 Куба II, *B. anthracis* Dakkar*, B. anthracis* 32 (603) и *B. anthracis* (38 «Калуга»), ранее отнесенные к *B. anthracis*, являются атипичными сибиреязвенными или могут быть отнесены к близкородственным видам бацилл.

Таким образом, проведенные исследования позволяют сделать заключение о том, что сравнительный анализ индивидуальных электрофоретических профилей ампликонов, полученных в реакции ПЦР с помощью праймера, содержащего chi-последовательность *B. subtilis,* позволяет выявлять генетическую внутривидовую вариабельность и проводить дифференциацию штаммов *B. anthracis* от атипичных штаммов и близкородственных видов бацилл.

Работа выполнена по государственному контракту № 33-Д от 08.08.13 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы)».

Биологические свойства атипичных штаммов *B. anthracis*

Штамм	Источник выделения	Бактериофаг			Наличие капсулы	Характер роста в жидкой и на плотной питательных средах	Вирулентность для мышей, LD_{50} спор
		Оболенск R6	Fah-ВНИИВВиМ	Гамма-А26			
B. anthracis 492/497	Шкура КРС	-	-	-	-	Не типичный	$> 10^7$
B. anthracis 71/171	Почва с места забоя	-	-	-	-	Не типичный	250
B. anthracis 747/8	Почва	-	-	-	-	Не типичный	$2 \cdot 10^9$
B. anthracis Dakkar	-	-	-	-	-	Не типичный	$1 \cdot 10^7$
B. anthracis 32 (603)	Вынужденно забитая корова	-	-	-	-	Не типичный	$1 \cdot 10^8$
B. anthracis 193 Куба II	Почва	-	-	-	-	Не типичный	$> 10^8$
B. anthracis 10 (38 «Калуга»)	Труп коровы	-	-	-	-	Не типичный	$> 10^8$
B. anthracis 71/12	2-я вакцина Ценковского	+	+	+	+	Типичный	30

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир; 1984. 479 с.

2. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н., Бахтеева И.В., Белова Е.В., Борзилов А.И., Комбарова Т.И., Кравченко Т.Б., Миронова Р.И., Попова В.М., Сомов А.Н., Титарева Г.М., Тюрин Е.А., Чекан Л.В., Шишкина О.Б., Шишкова Н.А. Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы. Оболенск; 2009. 304 с.

3. Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I–IV групп при работе методом ПЦР. МУ 3.5.5.1034.01. М.: МЗ РФ; 2001. 8 с.

4. Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Цыганкова О.И., Цыганкова Е.А., Куличенко А.Н. Использование методов молекулярного типирования *Bacillus anthracis* в референс-центре по мониторингу за возбудителем сибирской язвы. *Пробл. особо опасных инф*. 2011; 110(4):68–70.

5. Andersen G.L., Simchock J.M., Wilson K.H. Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *J. Bacteriol*. 1996; 178(1):377–84.

6. Biswas I., Maguin E., Ehrlich S.D., Gruss A.A. 7-base-pair sequence protects DNA from exonucleolytic degradation in *Lactococcus lactis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92:2244–8.

7. Chédin F., Kowalczykowski S.C. A novel family of regulated helicases/nucleases from Gram-positive bacteria: insights into the initiation of DNA recombination. *Mol. Microbiol*. 2002; 43:823–34.

8. Chédin F., Noirot P., Biaudet V., Ehrlich S.D. A five-nucleotide sequence protects DNA from exonucleolytic degradation by AddAB, the RecBCD analogue of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 1998; 29:1369–77.

9. Helgason E., Okstad O.A., Caugant D.A., Johansen H.A., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolsto A.B. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol*. 2000; 66:2627–30.

10. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K.L., Schupp J.M., Okinaka R., Jackson P.J., Hugh-Jones M.E. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol*. 2000; 182:2928–36.

11. Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoeud F., Ramisse V., Sylvestre P., Benson G., Ramisse F., Vergnaud G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol*. 2001; 1(2):2180–93.

12. Patra G., Vaissaire J., Weber-Levy M., Le Doujet C., Mock M. Molecular characterization of Bacillus strains involved in outbreaks of anthrax in France in 1997. *J. Clin. Microbiol*. 1998; 36:3412–14.

13. Ramisse V., Patra G., Garringue H., Guesdon J-L., Mock M. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. *FEMS Microbiol. Lett*. 1996; 145:9–16.

14. Roloff H., Glockner P., Mistele K., Bohm R. The taxonomic relationship between *B. anthracis* and *B. cereus* group, investigated by DNA-DNA hybridization and DNA amplification fingerprinting (DAF). Proceedings of the International Workshop on Anthrax. Ed. P. C. B. Turnbull. *Salisbury Medical Bulletin*. 1996; 87, Special Supplement:38–9.

15. Shangkuan Y.H., Chang Y.H., Yang J.F., Lin H.C., Shaio M.F. Molecular characterization of *Bacillus anthracis* using multiplex PCR, ERIC-PCR and RAPD. *Lett. Appl. Microbiol*. 2001; 65(3):139–45.

16. Smith G.R., Roberts C.M., Schultz D.W. Activity of Chi recombinational hot spots in *Salmonella typhimurium. Genetics*. 1986; 112:429–39.

17. Sourice S., Biaudet V., El. Karoui M., Ehrlich S.D., Gruss A. Identification of the Chi site of *Haemophilus influenzae* as several sequences related to the *Escherichia coli* Chi site. *Mol. Microbiol*. 1998; 27(5):1021–9.

References

1. Maniatis T., Frich E., Sambruk G. [Molecular Cloning]. M.: Mir; 1984. 479 p.

2. Marinin L.I., Dyatlov I.A., Mokrievich A.N., Bakhteeva I.V., Belova E.V., Borzilov A.I., Kombarova T.I., Kravchenko T.B., Mironova R.I., Popova V.M., Somov A.N., Titareva G.M., Tyurin E.A., Chekan L.V., Shishkina O.B., Shishkova N.A. [Methods of Studies of Anthrax Agent Biological Properties]. Obolensk; 2009. 304 p.

3. [Decontamination of the test material infected with microorganisms of I-IV groups of pathogenicity when performing PCR. Methodological recommendations]. MR 3.5.5.1034.01. M.: RF Ministry of Health; 2001. 8 p.

4. Ryazanova A.G., Eremenko E.I., Tsygankova O.I., Tsygankova E.A., Kulichenko A.N. [Application of *Bacillus anthracis* molecular typing methods by the reference center for the anthrax agent monitoring]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 110(4):68–70.

5. Andersen G.L., Simchock J.M., Wilson K.H. Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *J. Bacteriol*. 1996; 178(1):377–84.

6. Biswas I., Maguin E., Ehrlich S.D., Gruss A.A. 7-base-pair sequence protects DNA from exonucleolytic degradation in *Lactococcus lactis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92:2244–8.

7. Chédin F., Kowalczykowski S.C. A novel family of regulated helicases/nucleases from Gram-positive bacteria: insights into the initiation of DNA recombination. *Mol. Microbiol*. 2002; 43:823–34.

8. Chédin F., Noirot P., Biaudet V., Ehrlich S.D. A five-nucleotide sequence protects DNA from exonucleolytic degradation by AddAB, the RecBCD analogue of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 1998; 29:1369–77.

9. Helgason E., Okstad O.A., Caugant D.A., Johansen H.A., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolsto A.B. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol*. 2000; 66:2627–30.

10. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K.L., Schupp J.M., Okinaka R., Jackson P.J., Hugh-Jones M.E. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol*. 2000; 182:2928–36.

11. Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoeud F., Ramisse V., Sylvestre P., Benson G., Ramisse F., Vergnaud G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol*. 2001; 1(2):2180–93.

12. Patra G., Vaissaire J., Weber-Levy M., Le Doujet C., Mock M. Molecular characterization of Bacillus strains involved in outbreaks of anthrax in France in 1997. *J. Clin. Microbiol*. 1998; 36:3412–14.

13. Ramisse V., Patra G., Garringue H., Guesdon J-L., Mock M. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. *FEMS Microbiol. Lett*. 1996; 145:9–16.

14. Roloff H., Glockner P., Mistele K., Bohm R. The taxonomic relationship between *B. anthracis* and *B. cereus* group, investigated by DNA-DNA hybridization and DNA amplification fingerprinting (DAF). Proceedings of the International Workshop on Anthrax. Ed. P. C. B. Turnbull. *Salisbury Medical Bulletin*. 1996; 87, Special Supplement:38–9.

15. Shangkuan Y.H., Chang Y.H., Yang J.F., Lin H.C., Shaio M.F. Molecular characterization of *Bacillus anthracis* using multiplex PCR, ERIC-PCR and RAPD. *Lett. Appl. Microbiol*. 2001; 65(3):139–45.

16. Smith G.R., Roberts C.M., Schultz D.W. Activity of Chi recombinational hot spots in *Salmonella typhimurium. Genetics*. 1986; 112:429–39.

17. Sourice S., Biaudet V., El. Karoui M., Ehrlich S.D., Gruss A. Identification of the Chi site of *Haemophilus influenzae* as several sequences related to the *Escherichia coli* Chi site. *Mol. Microbiol*. 1998; 27(5):1021–9.

Authors:

Shishkova N.A., Mokrievich A.N., Pavlov V.M., Marinin L.I., Vakhrameeva G.M., Kudryavtseva T.Yu., Dyatlov I.A. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org

Об авторах:

Шишкова Н.А., Мокриевич А.Н., Павлов В.М., Маринин Л.И., Вахрамеева Г.М., Кудрявцева Т.Ю., Дятлов И.А. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 30.01.14.