

УДК 616.931575.2 – 576.16

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ПРИ ИЗУЧЕНИИ
МУЗЕЙНЫХ ШТАММОВ *CORYNEBACTERIUM
DIPHThERIAE*, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ НА
ТЕРРИТОРИИ УКРАИНЫ В 60-Е ГОДЫ ХХ
ВЕКА**

**Мироненко Л.Г., Доан С.И., Савчук А.И.
ГУ «Институт микробиологии и иммунологии
им. И.И. Мечникова НАМН Украины»
ГУ «Институт эпидемиологии и инфекционных
болезней
им. Л.В. Громашевского НАМН Украины»
Одесский национальный медицинский
университет**

Одним из перспективных направлений усовершенствования методов эпидемиологического надзора является изучение генетического полиморфизма возбудителей (геномная дактилоскопия, или DNA fingerprinting), что позволяет оценивать генетические отличия культур микроорганизмов, циркулирующих на разных территориях при разной интенсивности эпидемического процесса [1, 2]. Постоянная циркуляция *Corynebacterium diphtheriae* в межэпидемический период за счет бактерионосительства, а также существования атипичных форм заболевания у привитых лиц определяет актуальность постоянного мониторинга за популяцией возбудителя дифтерийной инфекции [3, 4]. Особый интерес представляет изучение музейных культур *C. diphtheriae*, что дает возможность проанализировать микробную популяцию в разные периоды эпидемического процесса и прогнозировать изменение эпидемической ситуации в дальнейшем. Целью настоящей работы явилось изучение геномного полиморфизма музейных культур *C. diphtheriae*, выделенных на территории Украины в 60-е годы ХХ века, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими и универсальными праймерами.

Материалы и методы

Для достижения цели были отобраны 22 штамма *C. diphtheriae*, выделенные в разных регионах, из них 11 культур (*C. d. gravis* – 10, *C. d. mitis* – 1) выделены в 1961 г. от бактерионосителей в г. Горловка Донецкой области и 11 культур (*C. d. gravis* – 9, *C. d. mitis* – 2) изолированы в 1963 г. от бактерионосителей, находившихся в закрытом коллективе г. Харькова. Коринебактерии для исследования были получены в лиофилизированном состоянии из Музея микроорганизмов ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова НАМН Украины».

Перед проведением ПЦР проведена реидентификация штаммов с изучением функции токсинообразования методом иммунопреципитации в геле. Пробы для проведения ПЦР готовили следующим образом: одну колонию суточной культуры исследуемого микроорганизма помещали в пластиковую пробирку емкостью 1,5 мл, заполненную 50° этиловым спиртом, и многократным встряхиванием тщательно ее суспензировали. Приготовленный таким способом материал сохранялся до 1 недели при комнатной температуре или 6 месяцев – при температуре минус 12 °С [5]. Хромосомную ДНК выделяли при помощи коммерческого набора "ДНК-экспресс" фирмы "Литех" (Россия). Детекцию гена токсигенности проводили с использованием коммерческого набора фирмы «Ампли Сенс» (Россия) с парой специфических праймеров на ген дифтерийного токсина. Амплифицировался фрагмент ДНК молекулярной массой 360 п.н.

Для генотипирования использовался олигонуклеотидный праймер № 45 (5'-GGATCCAAAACGACGGCCAGT-3') [6]. ПЦР проводилась по Saiki et al. в объеме 25 мкл на программируемом амплификаторе "Терцик" ("ДНК-технология", Россия) [7, 8]. Реакционная смесь имела следующий состав: 10 mM Tris HCl (pH 8,3), 10 mM KCl, 1,5 mM Mg₄Cl₂, 0,2 mM dNTP, 1ед Tag-полимеразы ("Ампли Сенс", Россия), 30 пмоль праймера, 10 мкл ДНК. После начальной денатурации 92 °С 3 мин проводили 35 циклов ПЦР при следующих условиях: 92 °С – 50 с, 54 °С – 60 с, 70 °С – 60 с; завершающий синтез в течение 3 мин при температуре 70 °С. Разделение ПЦР-продуктов осуществляли путем электрофореза в 2 % агарозном геле, окрашенном 1 % раствором бромистого этидия с последующим просмотром в проходящем ультрафиолетовом свете трансиллюминатора. Для оценки молекулярной массы продуктов амплификации использовался маркер молекулярного веса фирмы "Bioline" (США). Степень сходства между профилями ампликонов оценивали по формуле:

$$2 N_{xy} / (N_x + N_y),$$

где N_{xy} – число совпадающих полос на спектрах обоих образцов;

N_x и N_y – общее число фрагментов образцов x и y [9].

Культуры относились к одному генотипу при уровне гомологии геномов 70-100%.

При оценке профиля ампликонов каждого штамма и определении генотипа придерживались схемы, изложенной ранее [10].

Результаты и обсуждение

Результаты фенотипического изучения функции токсинообразования у токсигенных *C.*

diphtheriae совпали с результатами ПЦР-анализа: у всех штаммов был обнаружен фрагмент *tox*-гена. Из 11 нетоксигенных в реакции иммунопреципитации культур, неэкспрессирующий *tox*-ген был обнаружен у одного штамма (№ 14082) (табл. 1).

В таблице 2 представлены размеры ампликонов коринебактерий, выделенных в г. Горловка. У большинства штаммов выявлены

ампликоны размерами 1600, 1400, 1000, 900, 700, 600, 550, 500, 450 и 400 п.н., при этом профили *C.diphtheriae* №№ 14071, 14072, 14076 были идентичными (рис 1). У штаммов №№ 14079, 14081, 14083, 14084 присутствовал дополнительный ампликон размером 800 п.н., их профили также были идентичными, что указывает на общий источник инфекции.

Таблица 1.- Результаты изучения токсигенности музейных культур *C. diphtheriae*

№	Инвентарный номер в коллекции	Год выделения	Регион	Наличие токсигенности в Елс-тесте	Наличие токсигенности в ПЦР
1	14071	1961	Горловка	<i>tox+</i>	<i>tox+</i>
2	14072	1961	Горловка	<i>tox+</i>	<i>tox+</i>
3	14076	1961	Горловка	<i>tox-</i>	<i>tox-</i>
4	14077	1961	Горловка	<i>tox-</i>	<i>tox-</i>
5	14078	1961	Горловка	<i>tox-</i>	<i>tox-</i>
6	14079	1961	Горловка	<i>tox-</i>	<i>tox-</i>
7	14080	1961	Горловка	<i>tox-</i>	<i>tox-</i>
8	14081	1961	Горловка	<i>tox-</i>	<i>tox-</i>
9	14082	1961	Горловка	<i>tox-</i>	<i>tox+</i>
10	14083	1961	Горловка	<i>tox-</i>	<i>tox-</i>
11	14084	1961	Горловка	<i>tox-</i>	<i>tox-</i>
12	14086	1963	Харьков	<i>tox+</i>	<i>tox+</i>
13	14087	1963	Харьков	<i>tox+</i>	<i>tox+</i>
14	14088	1963	Харьков	<i>tox-</i>	<i>tox-</i>
15	14089	1963	Харьков	<i>tox+</i>	<i>tox+</i>
16	14090	1963	Харьков	<i>tox+</i>	<i>tox+</i>
17	14091	1963	Харьков	<i>tox+</i>	<i>tox+</i>
18	14092	1963	Харьков	<i>tox+</i>	<i>tox+</i>
19	14093	1963	Харьков	<i>tox+</i>	<i>tox+</i>
20	14094	1963	Харьков	<i>tox+</i>	<i>tox+</i>
21	14095	1963	Харьков	<i>tox+</i>	<i>tox+</i>
22	14097	1963	Харьков	<i>tox-</i>	<i>tox-</i>

Следует отметить, что профили *C. diphtheriae* №№ 14078, 14080 и 14082 имели иную структуру, выявлены ампликоны размером 1200, 1000, 800, 600, 550 п.н. Профили штаммов № №14080 и 14082 были идентичными, а степень сходства с *C. diphtheriae* № 14078 составила 58,8 %. В профиле штамма № 14077 присутствовали фрагменты размерами 1000, 900, 700, 600, 550, 450, 400 п.н., а также низкомолекулярные ампликоны 350, 250 и 200 п.н. Установлено, что степень сходства профилей этого штамма с *C. diphtheriae* №14082 составила 55,5 %, с *C. diphtheriae* № 14078 – 57,1 %, с остальными взятыми в опыт штаммами – менее 63,2 %.

Таким образом, на одной территории циркулировали коринебактерии дифтерии,

принадлежавшие к трем генетически обособленным клонам, однако, преобладали близкородственные штаммы, составившие 63,6 % от всех изученных, со степенью сходства от 90,0 % до 100,0 %.

В таблице 3 представлены размеры ампликонов штаммов коринебактерий дифтерии, выделенных от бактерионосителей закрытого коллектива г. Харькова. Полное сходство профилей отмечалось у *C. diphtheriae* №№ 14087, 14089, 14095, а также у штаммов №№ 14090 и 14093. В геномах этих штаммов преобладали высоко- и среднемoleкулярные ампликоны размерами 1600, 1400, 1000, 900, 700, 600, 550, 500, 450 и 400 п.н. (рис. 2). Установлено, что степень сходства между вышеописанными группами коринебактерий составила 88,9 %.

Таблица 2. Распределение длины фрагментов амплификации культур *C. diphtheriae*, выделенных в г. Горловка Донецкой области

№	№ в коллекции	биовар	Год выделения	Размеры ампликонов, п.н.															
				1600	1400	1200	1000	900	800	700	600	550	500	450	400	350	300	250	200
1	14071	<i>gravis</i>	1961	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
2	14072	<i>gravis</i>	1961	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
3	14076	<i>gravis</i>	1961	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
4	14078	<i>gravis</i>	1961	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
5	14079	<i>gravis</i>	1961	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
6	14080	<i>gravis</i>	1961	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
7	14081	<i>gravis</i>	1961	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
8	14082	<i>gravis</i>	1961	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
9	14083	<i>gravis</i>	1961	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
10	14084	<i>gravis</i>	1961	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
11	14071	<i>mitis</i>	1961	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

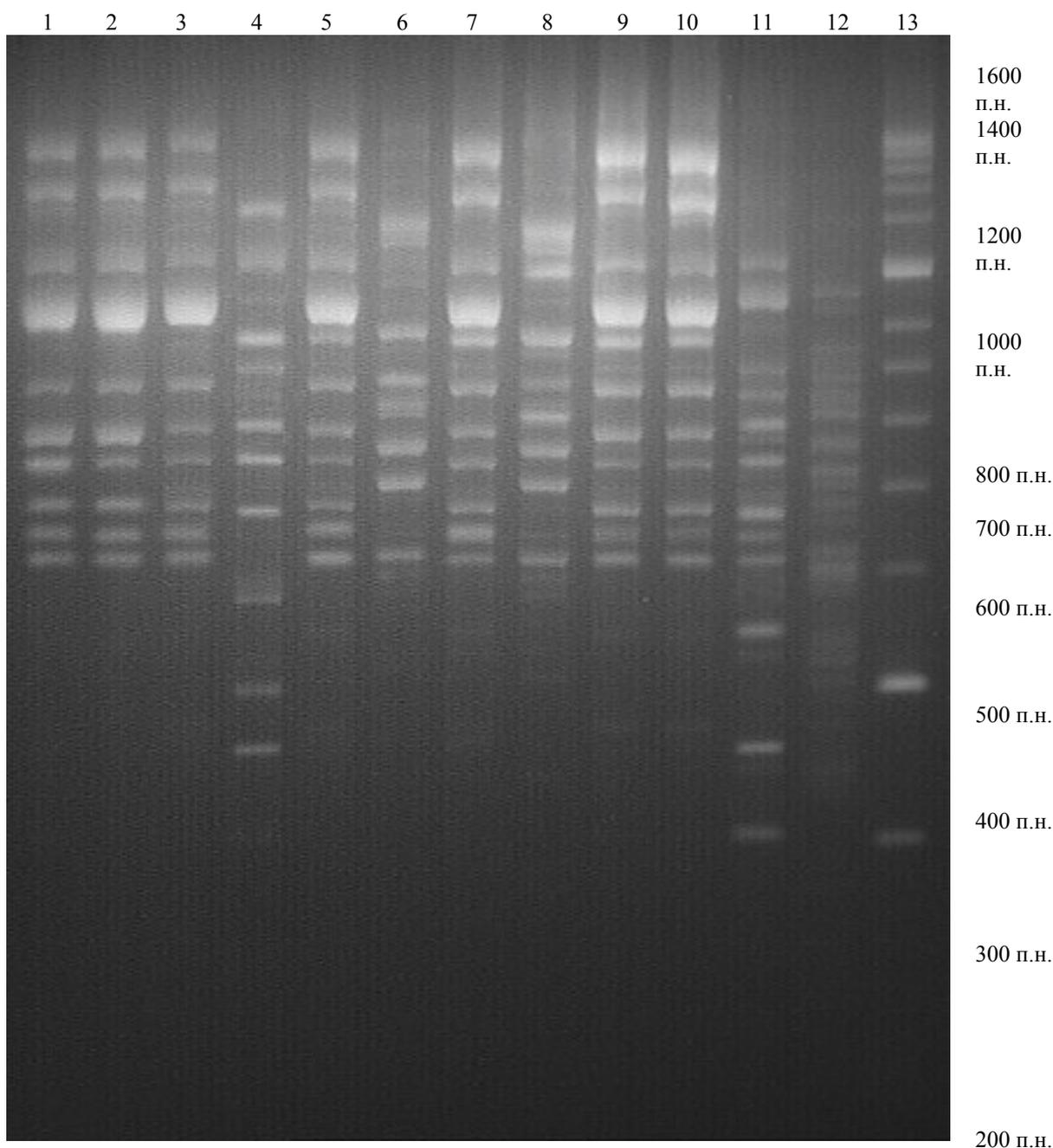


Рисунок 1. Амплификационные профили ДНК *C. diphtheriae*, выделенных в г. Горловка

Дорожка 13 – маркер молекулярного веса	Дорожка 7 – <i>C.d. gravis tox-</i> № 14081
Дорожка 1 – <i>C.d. gravis tox+</i> № 14071	Дорожка 8 – <i>C.d. gravis tox-</i> № 14082
Дорожка 2 – <i>C.d. gravis tox+</i> № 14072	Дорожка 9 – <i>C.d. gravis tox-</i> № 14083
Дорожка 3 – <i>C.d. gravis tox-</i> № 14076	Дорожка 10 – <i>C.d. gravis tox-</i> № 14084
Дорожка 4 – <i>C.d. gravis tox-</i> № 14078	Дорожка 11 – <i>C.d. mitis tox-</i> № 14077
Дорожка 5 – <i>C.d. gravis tox-</i> № 14079	Дорожка 12 – <i>C. xerosis</i> № 14085
Дорожка 6 – <i>C.d. gravis tox-</i> № 14080	

Следует отметить, что в геноме *C. diphtheriae* № 14086 отсутствовал фрагмент массой менее 600 п.н. При этом установлено, что степень сходства между профилями ампликонов этого штамма с *C. diphtheriae* №№ 14090 и 14093 составила 92,3 %, а с остальными тремя (*C. diphtheriae* №№ 14087, 14089, 14095) – 75,0 %. В профилях *C. diphtheriae* № 14088, 14091, 14092, 14094 и 14097 отсутствовали высокомолекулярные фрагменты с размерами ампликонов 1600 и 1400 п.н. Штаммы №№ 14088,

14091 и 14094 характеризовались полным совпадением профилей ампликонов. Степень сходства этих штаммов с *C. diphtheriae* №№ 14090 и 14093 и с *C. diphtheriae* №№ 14089, 14087, 14095 находилась в пределах 40,0 % до 66,7 %. Степень сходства штаммов №№ 14092 и 14097 между собой и с остальными составила менее 70,0 %, что свидетельствует об их генетической гетерогенности.

Таким образом, среди коринебактерий дифтерии, циркулирующих в закрытом коллективе г. Харькова, количество генетически близкородственных штаммов составило 54,5 %. При сравнительном анализе штаммов, выделенных на разных территориях (г. Горловка и г. Харьков), установлено, что генетически подобными со степенью сходства от 80,0 % до 94,7 % были почти половина из них.

Нашими предыдущими исследованиями было установлено, что штаммы коринебактерий дифтерии, выделенные в 1954-1959 г.г. от бактерионосителей в г. Москва, также, как и описанные в настоящей работе, характеризовались наличием в профилях высокомолекулярных фрагментов размерами 1600, 1400, и 1000 п.н. [11]. При этом степень сходства подавляющего большинства штаммов составляла от 70,0 % до 76,2 %.

Таким образом, нашими исследованиями установлено, что половина из изученных штаммов коринебактерий дифтерии, циркулировавших в восточном регионе Украины в 60-е годы XX века, являлись генетически подобными и принадлежали к одному ПЦР-типу. Остальные штаммы принадлежали к 3 генетически обособленным клонам, которые согласно полученным нами ранее данным циркулировали на территории Украины во время последней эпидемии дифтерии и в постэпидемическом периоде. Исключением явился штамм *C. diphtheriae* № 14078, ПЦР-тип которого нами не был зарегистрирован в более поздние сроки [10, 12].

Выводы

Изучение музейных штаммов *C. diphtheriae* в ПЦР с парой специфических праймеров на *tox*-ген позволило уточнить и дополнить их паспортную характеристику.

Проведенное генотипирование методом ПЦР с универсальным праймером № 45 музейных штаммов *C. diphtheriae*, циркулировавших в 60-е годы XX века в восточном регионе Украины, позволило установить их геномный полиморфизм и принадлежность изученных коринебактерий к 4 обособленным ПЦР-клонам.

Установлено, что половина штаммов *C. diphtheriae*, выделенных на разных территориях (г. Горловка и г. Харьков), были генетически подобными со степенью сходства от 80,0 % до 94,7 %.

References

1. Zhebrun, A. B. Genotyping and Subtyping Patogenic Microorganisms in the Development of Surveillance Technology [Text] / A. B. Zhebrun, O. V. Narvskaya, S. L. Mukomolov // Medical Academic Journal – 2009 – № 4. – P. 59 – 67.
2. Shaginyan, I. A. Role and Significance of Molecular Methods in Epidemiological Analysis of Nosocomial Infections [Text] / I.A. Shaginyan // Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy – 2000 – v. 2, № 3. – P. 82 – 95.
3. Borisova, O. Y. Molecular genetic features of the genes structure of pathogenic agents of pertussis and diphtheria: improvement of laboratory diagnosis in these infections [Text]: Dissertation of the Doctor Medical 03.00.07 / Borisova Olga Yur'evna – Moscow, 2009. – 293 p.
4. Kombarova, S.Y. Microbiological and molecular genetic monitoring agent of diphtheria infection [Text]: Dissertation of the Doctor Medical 03.00.07 / Kombarova Svetlana Yur'evna – Moscow, 2007. – 226 p.
5. Bazhora, Yu. I. Molecular Genetic and Biophysical Methods in Medicine [Text] / Yu.I. Bazhora, V.I. Kresyun, V.N. Zaporozhan. – Kiev.: Health, 1996. – 210 p.
6. Genetic Typing of *Corynebacterium diphtheriae* Strains by Polymerase Chain Reaction with Universal Primers [Text] / I.V. Mokrousov, O.V. Narvskaya, G.Ya. Tseneva, N.V. Michailov [et al] // Journal Microbiology, Epidemiology and Infectious Diseases. – 1996. – № 5. – P. 73 – 75.
7. Nakao H. Use of random amplified polymorphic DNA for rapid molecular subtyping of *Corynebacterium diphtheriae* / H. Nakao, T. Popovic // Diagn. microb. and inf. Dis. – 1998. – V. 30 (3), – P. 167–172.
8. Primer-detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase [Text] / R.K. Saiki, D.N. Gelfend, S. Stoffel [et al.] // Science. – 1988. – Vol. 239. – P. 487-491.
9. Potapov, S. G. Molecular Genetic Fingerprinting of Phodopus Genus Representatives [Text] / S. G. Potapov, V. A. Vasil'ev, O. P. Samarina, A. P. Ryskov // Genetics. – 1994. – v. 30, № 5. – P. 615 – 621.
10. RAPD-PCR in investigation of *Corynebacterium diphtheriae* strains genetic heterogeneity [Text] / S.I. Doan, A. I. Sauchuk, O.A. Hladka, O.I. Motyka [et al.] // Preventive Medicine. – 2011. – № 2. – P. 4 – 8.
11. Myronenko L. G. Discovery of Genetic Polymorphism of *C. diphtheriae* Museum Cultures in Polymerase Chain Reaction with Arbitrary Primers [Electronic resource] / L.G. Myronenko, A.I. Savchuk // Annals of Mechnikov Institute – 2007 – № 2 – P. 25 – 28. – Access mode: <http://www.imiamn.org/journal.htm>
12. Investigation of *Corynebacterium diphtheriae* strains, which was isolated in the Ukraine at the time of the last epidemic [Text] / S.I. Doan, A. I. Sauchuk, L.G. Myronenko, O.A. Hladka [et al.] // Laboratory Diagnostics. – 2011. – № 3. – P. 20 – 23.

Таблица 3.- Распределение длины фрагментов амплификации культур *C. diphtheriae*, выделенных в г. Харькове

№	№ в коллекции	биовар	год выделения	Размеры ампликонов, п.н.																
				1600	1400	1200	1000	900	800	700	600	550	500	450	400	350	300	250	200	
1	14086	<i>gravis</i>	1963	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	14088	<i>gravis</i>	1963	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
3	14090	<i>gravis</i>	1963	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	14092	<i>gravis</i>	1963	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
5	14091	<i>gravis</i>	1963	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
6	14093	<i>gravis</i>	1963	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7	14094	<i>gravis</i>	1963	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
8	14097	<i>gravis</i>	1963	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
9	14089	<i>gravis</i>	1963	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
10	14087	<i>mitis</i>	1963	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
11	14095	<i>mitis</i>	1963	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

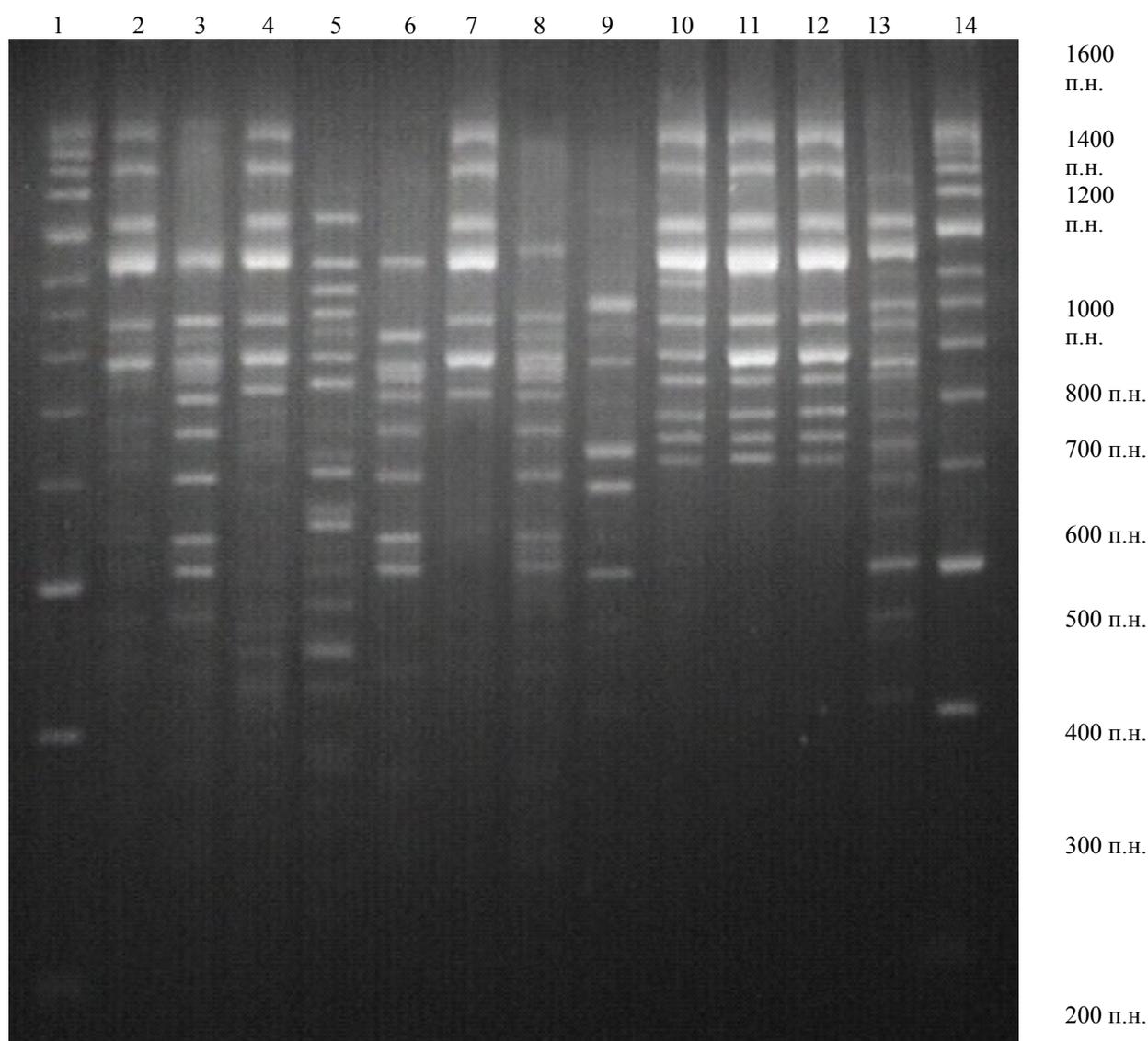


Рисунок 2 Амплификационные профили ДНК культур *C. diphtheriae*, выделенные в г. Харькове
 Дорожки 1, 14 – маркер молекулярного веса
 Дорожка 2 – *C.d. gravis tox +* № 14086
 Дорожка 3 – *C.d. gravis tox +* № 14088
 Дорожка 4 – *C.d. gravis tox +* № 14090
 Дорожка 5 – *C.d. gravis tox +* № 14092
 Дорожка 6 – *C.d. gravis tox +* № 14091
 Дорожка 7 – *C.d. gravis tox +* № 14093
 Дорожка 8 – *C.d. gravis tox +* № 14094
 Дорожка 9 – *C.d. gravis tox -* № 14097
 Дорожка 10 – *C.d. gravis tox -* № 14089
 Дорожка 11 – *C.d. mitis tox +* № 14087
 Дорожка 12 – *C.d. mitis tox +* № 14095
 Дорожка 13 – *C.xerosis* № 14096

УДК 616. 931575.2 – 576.16
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ПРИ ИЗУЧЕНИИ
МУЗЕЙНЫХ ШТАММОВ *CORYNEBACTERIUM*
***DIPHThERIAE*, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ НА**
ТЕРРИТОРИИ УКРАИНЫ В 60-Е ГОДЫ XX
ВЕКА

Мироненко Л.Г., Доан С.И., Савчук А.И.

Используя полимеразную цепную реакцию с парой специфических праймеров на *tox*-ген и универсальным праймером № 45 исследовано 22 музейных штамма *C. diphtheriae*, выделенных от

бактерионосителей в г. Горловка Донецкой области в 1961 г. и в г. Харькове в 1963 г. Проведенные исследования позволили уточнить и дополнить паспортную характеристику музейных штаммов. Установлено, что половина из изученных культур являются генетически подобными и принадлежат к одному ПЦР-типу. Кроме того, в восточном регионе Украины в 60-е годы циркулировало еще три генетически обособленных клона, встречавшихся и в более поздние периоды.

Ключевые слова: *C. diphtheriae*, полимеразная цепная реакция со специфическими и универсальными праймерами.

УДК 616. 931575.2 – 576.16

ВИКОРИСТАННЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ У ВИВЧЕННІ МУЗЕЙНИХ ШТАМІВ *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*, ЩО ЦИРКУЛЮВАЛИ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ У 60-ТІ РОКИ ХХ СТОРІЧЧЯ

Мироненко Л.Г., Доан С.І., Савчук А.І.

За допомогою полімеразної ланцюгової реакції з парою специфічних праймерів на *tox*-ген та універсальним праймером № 45 вивчено 22 музейні штами *C. diphtheriae*, що були ізольовані від бактеріоносіїв в м. Горлівка Донецької області в 1961 р. та в м. Харків в 1963 р. Проведені дослідження дозволили уточнити та доповнити паспортну характеристику музейних штамів. Встановлено, що половина з досліджених штамів є генетично подібними та належать до одного ПЛР-типу. Крім того, у східному регіоні України у 60-ті роки циркулювало ще три генетично відокремлені

клони коринебактерій дифтерії, що зустрічалися і пізніше.

Ключові слова: *C. diphtheriae*, полімеразна ланцюгова реакція із специфічними та універсальними праймерами

UDC 616. 931575.2 – 576.16

POLYMERASE CHAIN REACTION USAGE IN STUDYING OF *C. DIPHTHERIAE* MUSEUM STRAINS, WHICH WERE ISOLATED IN UKRAINE IN 60 YEARS OF XX CENTURY

Myronenko L.G., Doan S.I., Savchuk A.I.

The 22 *C. diphtheriae* museum strains were studied by polymerase chain reaction with specific primers on *tox*-gene and arbitrary primer № 45. These strains were isolated in 1961 in Gorlovka of Donetsk region and in 1963 in Kharkov. The certificates of these museum strains were specified and supplemented due to this investigation. The half of these studied strains were genetic similar and belong to single PCR-type. Besides that, three genetic isolated types were circulating in the East region of Ukraine in this and latest periods.

Key words: *C. diphtheriae*, polymerase chain reaction with specific and arbitrary primers.