

УДК 616.931:575.2–576.16

С.И. Доан¹, А.И. Савчук², Л.Г. Мироненко³,
Е.А. Гладкая⁴, Е.И. Мотыка⁴, В.Р. Гайдей²

ХАРАКТЕРИСТИКА *CORYNEBACTERIUM DIPHThERIAE*, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ НА ТЕРРИТОРИИ УКРАИНЫ ВО ВРЕМЯ ПОСЛЕДНЕЙ ЭПИДЕМИИ

¹ Институт эпидемиологии и инфекционных болезней АМН Украины

² Одесский государственный медицинский университет

³ Институт микробиологии и иммунологии АМН Украины

⁴ Львовский научно-исследовательский институт эпидемиологии и гигиены МЗ Украины

Несмотря на значительное снижение заболеваемости в последние годы, дифтерийная инфекция остается важной медико-социальной проблемой. Это связано с сохраняющейся циркуляцией возбудителя, вследствие существования бактерионосительства, а также возможностью инфицирования при напряженном антитоксическом иммунитете [2]. Эпидемия дифтерии, охватившая в 1990-е годы ряд государств бывшего СССР, продемонстрировала недостаточность существующих знаний о темпах и характере изменчивости структуры популяции возбудителя, формировании вирулентного генотипа и его эволюции в меняющихся условиях окружающей среды [4].

Исследование культур *C. diphtheriae*, циркулировавших во время последней эпидемии, представляет интерес с точки зрения изучения формирования эпидемического клона возбудителя, что в дальнейшем позволит прогнозировать эпидемиологическую ситуацию и усовершенствовать эпидемиологический надзор [3, 5]. Среди существующих методов генетического типирования (рестрикционный анализ, риботипирование, пульс-электрофорез, сполиготипирование, RAPD, SSCP-типирование) применяющихся для изучения коринебактерий дифтерии, ПЦР с универсальными праймерами (RAPD) имеет ряд преимуществ: простота и быстрота выполнения, относительная дешевизна исследований, результаты, сопоставимые с “золотым стандартом” — риботипированием [10–13].

Целью настоящей работы явился молекулярно-генетический анализ структуры популяции *C. diphtheriae* в период последней эпидемии дифтерии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовано 73 культуры *C. diphtheriae*, выделенных в западном (Львовская и Ивано-Франковская области 14 культур: 7 — *gravis*, 7 — *mitis*), восточном (Харьковская область, 6 культур: 4 — *gravis*, 2 — *mitis*) и южном (Одесская область, 53 культуры: 39 — *gravis*, 14 — *mitis*) регионах Украины в 1985–1995 гг. от больных дифтерией и бактерионосителей. Культуры из западного и восточного регионов получены из коллекций Львовского НИИ эпидемиологии и гигиены и Харьковского института микробиологии и иммунологии. Культуры из южного региона выделялись в рамках выполнения научно-исследовательской работы Одесского государственного медицинского университета “Состояние иммунного статуса в диагностике и прогнозирования клинического течения и исходов дифтерии” (№ госрегистрации НИР 0193U039615). В качестве контроля использовались эталонный штамм NCTC 10648 *gravis tox+*, NCTC 10356 *mitis tox-* и NCTC 3984 *mitis tox+*.

Пробы для ПЦР готовили следующим образом. Одну колонию суточной чистой культуры исследуемого микроорганизма снимали с агара стерильной петлей и помещали в пластиковую пробирку емкостью 1,5 мл, заполненную 50° этиловым спиртом. Крышку пробирки закрывали и многократным встряхиванием тщательно суспензировали имеющуюся в пробирке колонию. Таким образом достигалась гибель микроорганизмов и возможность последующей работы с культурой без соблюдения специальных мер предосторожности. Приготовленный таким способом материал сохранялся до 1 недели при комнатной температуре или 6 месяцев — при температуре минус 12°С [7]. В дальнейшем для выделения хромосомной ДНК использовался коммерческий набор “ДНК-экспресс” фирмы “Литех” (Россия). В работе использовался олигонуклеотидный праймер № 45 (5'-GGATCCAAAACGACGGCCAGT-3') [6].

ПЦР проводилась по Saiki et al. [14] в объеме 25 мкл на программируемом амплификаторе

“Терцик” (“ДНК-технология”, Россия). Реакционная смесь имела следующий состав: 10 mM Tris HCl (pH 8,3), 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 1ед Tag-полимеразы (“Ампли Сенс”, Россия), 30 пмоль праймера, 10 мкл ДНК. После начальной денатурации 92°C 3 мин проводили 35 циклов ПЦР при следующих условиях: 92°C — 50 с, 54°C — 60 с, 70°C — 60 с, завершающий синтез в течение 3 мин. при температуре 70°C. Анализ ПЦР-продуктов проводили 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:

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

где N_{xy} — число совпадающих полос на спектрах обоих образцов; N_x и N_y — общее число фрагментов образцов x и y [8].

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

При оценке профиля ампликонов каждой культуры и определении генотипа придерживались схемы, изложенной ранее [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа спектров ампликонов изучаемых культур, было выделено 5 основных генотипов, подробно описанных ранее [9]. Наибольшее распространение во время эпидемии получили культуры первого генотипа, характеризовавшегося высоко- и средномолекулярных фрагментов и единичными низкомолекулярными фрагментами (меньше 400 п.н.) или их отсутствием. Идентичность или высокая степень подобия культур ($\approx 90,0\%$) отмечалась у культур варианта *gravis*, выделенных из разных очагов в западном регионе (рис. 1, №№ 6–7 и 9–11). Такая же высокая степень подобия отмечалась и у культур варианта *mitis*. Это указывает на интенсивную циркуляцию возбудителя в регионе, что ведет к однородности популяции [1]. Культуры, выделенные в Харьковской области в 1989 (рис. 2 №№ 2,3) и 1991 гг. (рис. 2, №№ 4–7) из двух разных очагов инфекции (от бактерионосителей в закрытых коллективах) наоборот, отличаются большей гетерогенностью, хотя 5 из них принадлежат к первому генотипу (рис. 2, №№ 2–6), а последняя культура — к третьему (рис. 2, № 7).

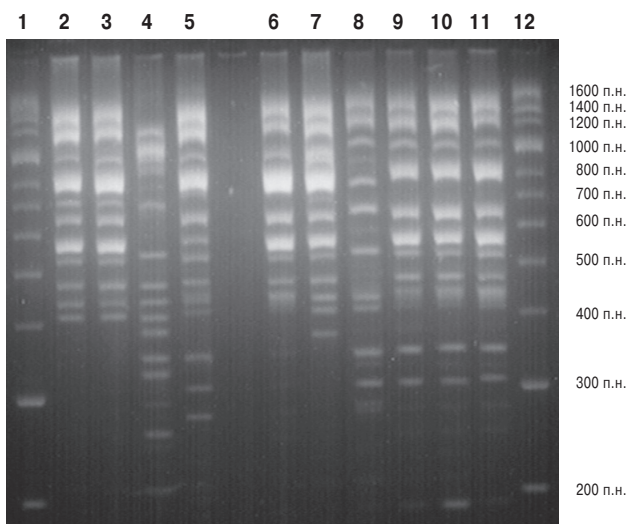


Рис. 1. Амплификационные профили ДНК культур *C. diphtheriae* вариантов *gravis*, выделенные в западном регионе Украины: дорожки 1, 12 — маркер молекулярного веса; дорожка 2 — профиль эталонного штамма *C. diphtheriae* NCTC 10648 *gravis tox+*; дорожка 3 — профиль эталонного штамма *C. diphtheriae* NCTC 10356 *mitis tox-*; дорожка 4 — профиль эталонного штамма *C. diphtheriae* NCTC 3984 *mitis tox+*; дорожки 5–11 — профили культур *C. diphtheriae* варианта *gravis*

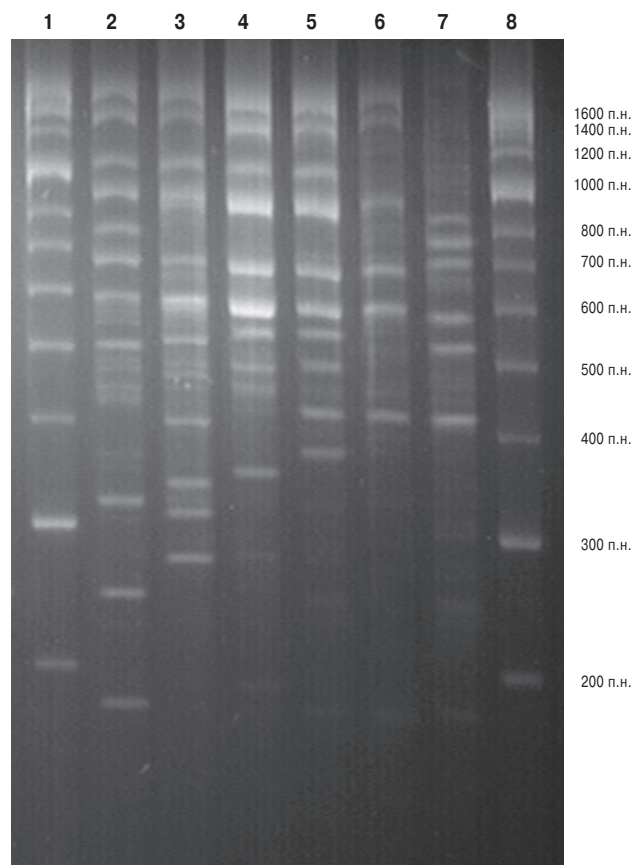


Рис. 2. Амплификационные профили ДНК культур *C. diphtheriae* вариантов *gravis* и *mitis*, выделенные в восточном регионе Украины: дорожки 1,8 — маркер молекулярного веса; дорожки 2–5 — профили культур *C. diphtheriae* варианта *gravis*; дорожки 6–7 — профили культур *C. diphtheriae* варианта *mitis*

Как видно на рис. 2, полной идентичности RAPD-спектров не отмечалось ни в одном случае. Степень подобия RAPD-спектров из первого очага составляла 80%, из второго — 70,5–95%, то есть занос инфекции, вероятно происходил из разных источников. Степень подобия RAPD-спектров культур, выделенных в Одесской области колебалась в пределах от 73,7% до 100%. Профили эталонных штаммов полностью не совпадали ни с одним из профилей исследованных культур. Отмечалось определенное подобие штаммов NCTC 10648 *gravis tox+*, NCTC 10356 *mitis tox-* с культурами первого генотипа.

Первый генотип охватывал 79,5% всех изученных культур (84,0% культур биовара *gravis* и 65,5% культур биовара *mitis*). Несколько реже встречался второй генотип — 4,1% всех изученных культур. Как и в постэпидемическом периоде, этот генотип включал только культуры варианта *gravis* — 6,0%. Третий генотип отмечался только у 13,0% культур варианта *mitis* (4,1% всех изученных культур). Четвертый и пятый генотипы регистрировались у 2,7% и 8,2% изученных культур соответственно.

Еще 1 культура варианта *gravis*, выделенная в Одесской области, по характеру профиля ампликонов не относилась ни к одному из 5 генотипов.

В профиле этой культуры отмечались средние и низкомолекулярные фрагменты. При сравнении с уже проанализированными профилями, степень подобия составляла менее 60%, а при сравнении с “атипичными” изолятами, выделенными в постэпидемическом периоде, генетическое родство было обнаружено у культуры варианта *mitis*, выделенной в г. Львов в 2003 г. Степень подобия при этом составила 85,7%, что позволило объединить эти культуры в отдельный шестой генотип, составлявший 1,4% всех изученных культур.

ВЫВОД

Во время эпидемии 1990-х годов доминировали культуры *C. diphtheriae* первого генотипа, удельный вес которых составил 79,5% всех изученных культур. Культуры этого генотипа выделялись во всех регионах Украины, что позволило отнести данный генотип к эпидемическому. Циркуляция данного генотипа продолжается и в настоящее время, однако, удельный вес этого генотипа среди выделенных культур несколько уменьшился. Вероятно, его циркуляция будет

продолжаться до тех пор, пока у населения не сформируется антибактериальный иммунитет, который будет способствовать ограничению циркуляции данного генотипа [3, 5]. Наряду с увеличением удельного веса “эпидемического” генотипа, доля других генотипов уменьшалась, то есть популяция *C. diphtheriae* становилась более однородной. Исключение составили лишь культуры пятого генотипа, удельный вес которых во время эпидемии несколько увеличился.

Для составления прогноза развития эпидемического процесса дифтерии планируется провести изучение культур, циркулировавших в 1950–1960-е годы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляков В.Д., Яфаев Я.Х. Эпидемиология. — М.: Медицина, 1989 — 455 с.
2. Дифтерия / Л.А. Фаворова, Н.В. Астафьева, М.П. Корженкова и др. — М.: Медицина, 1988 — 208 с.
3. Жебрун А.Б., Нарвская О.В., Мукомолов С.Л. Генотипирование и субтипирование патогенных микроорганизмов в развитии технологий эпидемического надзора / А.Б. Жебрун, О.В. Нарвская, С.Л. Мукомолов // Мед. академ. журнал. — 2009. — № 4. — С. 59–67.
4. Изменения в популяции *Corynebacterium diphtheriae* на этапе снижения заболеваемости в Беларуси / В.Л. Колодкина, Т.П. Шарана, Л.П. Титов и др. // Здоровоохранение. — 2004. — № 10. — С. 18–20.
5. Комбарова С.Ю. Микробиологический и молекулярно-генетический мониторинг возбудителя дифтерийной инфекции / Автореф. дис. ... докт. мед. наук. — 2007. — 36 с.
6. Мокроусов И.В., Нарвская О.В., Ценева Г.Я. Генетическое типирование штаммов *Corynebacterium diphtheriae* методом полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами / И.В. Мокроусов, О.В. Нарвская, Г.Я. Ценева // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиологии — 1996. — № 5. — С. 73–75.
7. Молекулярно-генетические и биофизические методы исследования в медицине / Ю.И. Бажора, В.И. Кресюн, В.Н. Запорожан и др. — К.: Здоров'я, 1996. — 207 с.
8. Молекулярно-генетическое маркирование геномов представителей рода *Rhodospirillum* / С.Г. Потапов, В.А. Васильев, О.П. Самарина, А.П. Рысков // Генетика. — 1994. — Т. 30, № 5. — С. 615–621.
9. RAPD-анализ в изучении генетической гетерогенности *Corynebacterium diphtheriae* / С.И. Доан, А.И. Савчук, Е.А. Гладкая и др. // Профилактична медицина. — 2011. — № 2. — С. 4–8.
10. Шагинян И.А., Першина М.Ю. Генетические маркеры в эпидемиологии бактериальных инфекций / И.А. Шагинян, М.Ю. Першина // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиологии — 1997. — № 4. — С. 54–59.
11. Шагинян И.А. Роль и место молекулярно-генетических методов в эпидемиологическом анализе внутрибольничных инфекций // Клин. микробиол. и антимикробн. химиотерапия. — 2000. — Т. 2, № 3. — С. 82–95.
12. Nakao H. Use of random amplified polymorphic DNA for rapid molecular subtyping of *Corynebacterium diphtheriae* / H. Nakao, T. Popovic // J. Clin. Microbiol. — 1998. — Vol. 30 (3). — P. 167–172.
13. Rapid identification of *Corynebacterium diphtheriae* clonal group associated with diphtheria epidemic Russian

Federation / S. Kombarova, C. Kim, V. Melnikov et al. // *Emerging Infectious Diseases*. — 2001. — Vol. 7, № 3. — P. 143–148.

14. Saiki R.K. Primer-detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase / R.K. Saiki, D.N. Gelfand, S. Stoffel et al. // *Science*. — 1988. — Vol. 239. — P. 487–491.

ХАРАКТЕРИСТИКА *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*, ЩО ЦИРКУЛЮВАЛИ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ ПІД ЧАС ОСТАННЬОЇ ЕПІДЕМІЇ

С.І. Доан, А.І. Савчук, Л.Г. Мироненко,
О.А. Гладка, О.І. Мотика, В.Р. Гайдей

Проведено молекулярно-генетичне типування в полімеразній ланцюговій реакції з універсальним праймером № 45 (RAPD-ПЛР) 73 культур *C. diphtheriae*, які були виділені у західному, східному та південному регіонах України у 1985–1995 рр. від хворих на дифтерію та бактеріоносіїв. Встановлено, що досліджувані культури належали до 6 генетично відокремлених типів. Питома

вага першого генотипу складала 79,5% серед всіх досліджуваних культур, що дозволило віднести даний генотип до епідемічного. Інші генотипи (2–6) рееструвалися з частотою 4,1%, 4,1%, 2,7%, 8,2% та 1,4% відповідно.

INVESTIGATION OF *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE* STRAINS, WHICH WERE ISOLATED IN THE UKRAINE AT THE TIME OF THE LAST EPIDEMIC

S.I. Doan, A.I. Sauchuk, L.G. Mironenko,
O.A. Gladka, O.I. Motyka, V.R. Gaidei

Genetic polymorphism of 73 bacterial cultures of *Corynebacterium diphtheriae* was conducted by polymerase chain reaction with arbitrary primers (random amplification of polymorphic DNA PCR). The bacterial cultures were isolated in west, east and south region of Ukraine in 1985–1995. It was determined that these cultures belong to 6 genetic isolated types. The first genotypes was registered with frequency 79,5%. It was isolated on all area of the Ukraine. It was determined as epidemic. Other genotypes which was found with frequency 4,1%, 4,1%, 2,7%, 8,2% and 1,4% accordingly.



jus ISO 9001

Дочірнє підприємство
“СПЕКТАР-Україна”

З 2010 року ДП «Спектар-Україна» представляє одно- та 8-канальні лабораторні дозатори варіабельного об'єму виробництва ANH Biotechnologie GmbH (Німеччина), які вигідно вирізняються оптимальним поєднанням прийнятної ціни та високої якості.

Вся продукція має сертифікати якості CE, ISO та зареєстрована в МОЗ України.

ДП «СПЕКТАР-Україна»

03680, Київ, вул. Боженко, 31, офіс 352. Тел./факс: 522-95-69, 502-68-10, 529-41-61.

ЗАПРОШУЄМО ДО СПІВРОБІТНИЦТВА ДИЛЕРІВ !!!