

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭПИДЕМИОЛОГИИ ДИФТЕРИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

<sup>1</sup>Доан С.И., <sup>1</sup>Савчук А.И., <sup>2</sup>Гладкая Е.А.,  
<sup>3</sup>Мироненко Л.Г., <sup>2</sup>Мотыка Е.И.

<sup>1</sup>ГУ “Институт эпидемиологии и инфекционных болезней  
им. Л.В. Громашевского” НАМН Украины

<sup>2</sup>ГУ “Львовский научно-исследовательский институт  
эпидемиологии и гигиены МЗ Украины”

<sup>3</sup>ГУ “Харьковский научно-исследовательский институт  
микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова”  
НАМН Украины

**Резюме.** Приведены результаты исследования 265 штаммов *S. diphtheria* в ПЦР с парой специфических праймеров на ген дифтерийного токсина и результаты генотипирования 177 штаммов возбудителя в ПЦР с универсальным праймером. Исследуемые штаммы были выделены в разных регионах Украины с 1961 до 2009 гг., а также в г. Москва в 1954–1959 гг. Установлено, что частота регистрации неэкспрессирующегося гена токсигенности зависит от характера инфекционного процесса (52,4 % у больных дифтерией против 24,2 % у бактерионосителей) и интенсивности эпидемического процесса (52,4 % в период эпидемии против 20,5 % в межэпидемический период) и может служить критерием стабильности эпидемической ситуации. Популяцию *S. diphtheria* составили семь генетически обособленных ПЦР-типов. Их удельный вес зависел от интенсивности эпидемического процесса и территории.

**Ключевые слова:** *Corynebacterium diphtheriae*, ПЦР со специфическими и универсальными праймерами.

**Вступление.** Многолетняя массовая вакцинопрофилактика дифтерии привела к значительному снижению заболеваемости и смертности. Однако, в настоящее время эпидемический процесс

дифтерийной инфекции характеризуется преобладанием скрытой его части в виде бактерионосительства и легких атипичных форм заболевания. Высокая пластичность генома *Corynebacterium diphtheriae*, эволюционная трансформация в сторону доминирования персистирующих вариантов возбудителя определяют трудность борьбы с дифтерией на современном этапе и ликвидацию ее возбудителя с помощью существующих средств вакцинопрофилактики. Поэтому, одной из задач усовершенствования эпидемиологического надзора является мониторинг за популяцией возбудителя. Современные молекулярно-генетические методы позволяют наблюдать за эволюционными изменениями биологических свойств *Corynebacterium diphtheriae*, а также оценивать и прогнозировать тяжесть эпидемического и инфекционного процессов [1, 2, 7].

**Цель исследования:** разработка способов усовершенствования микробиологического мониторинга дифтерийной инфекции на основании изучения генетического полиморфизма штаммов коринебактерий дифтерии, циркулировавших на территории Украины при разной интенсивности эпидемического процесса.

**Материалы и методы.** Анализ динамики выделения *C. diphtheriae* проведен по данным конъюнктурных отчетов Одесской областной СЭС (1986–2010 г.г.). Выделение и идентификация штаммов возбудителя проводилась в соответствии с Приказом МЗ СССР № 450 от 2.04.1986 г. и Приказа МЗ Украины № 192 от 03.08.1999 г. Изучение внутриштаммовой гетерогенности по признаку токсинообразования проведено на 22 штаммах. Функцию токсинообразования и наличие *tox*-гена в ПЦР определяли у 50 колоний каждого штамма.

Объектом молекулярно-генетических исследований были 258 штаммов *C. diphtheriae*, выделенные от больных и бактерионосителей на протяжении 1961–2009 г.г. в разных регионах Украины (восточном – Харьковская и Донецкая области – 50 штаммов; западном – Ивано-Франковская и Львовская области – 56 штаммов; южном – Одесская и Николаевская области – 152 штамма). С целью сравнения исследовали 7 штаммов *C. diphtheriae*, выделенные в 1954–1956 г.г. в г. Москва. Среди исследованных шта-

ммов 162 принадлежали к варианту *gravis*, 100 – к варианту *mitis*, 2 штамма – к варианту *belfanti* и 1 штамм – к варианту *intermedius*. Для выделения хромосомной ДНК использовали коммерческий набор “ДНК-экспресс” фирмы “Литех” (Россия). ПЦР с парой специфических праймеров на ген дифтерийного токсина проводили при помощи коммерческой тест-системы “Ампли-Сенс” (Россия). Амплифицировался фрагмент ДНК молекулярной массой 360 п.н. Генотипирование проводили при помощи ПЦР с универсальным праймером № 45 (5'-GGATCCAAAACGACGGCCAGT-3') [3], которое заключалось в амплификации нескольких фрагментов ДНК из разных частей генома микроорганизма. ПЦР проводили в модификации Saiki et al. [8] в объеме 25 мкл на амплификаторе “Терцик” (“ДНК-технология”, Россия). Использовались коммерческий ПЦР-буфер и раствор dNTP фирмы “Ампли-Сенс” (Россия). После начальной денатурации при 92°C на протяжении 3 мин, проводили 35 циклов амплификации согласно следующим параметрам: 92°C – 50с, 54°C – 60с, 70°C – 60 с; заключительный синтез на протяжении 3 мин при температуре 70°C. Продукты амплификации фракционировали при помощи электрофореза в 2 % агарозном геле с добавлением 1 % раствора бромистого этидия при постоянном напряжении 180 V на протяжении 3–3,5 часов в аппарате для горизонтального гель-электрофореза “Helicon” (Россия) с последующим просмотром в ультрафиолетовом свете и фотографированием. Для оценки размеров амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярного веса “Bioline” (США). Степень сходства между набором фрагментов у разных штаммов оценивали согласно рекомендациям Потапова С.Г. с соавт. [4]. Штаммы с подобным набором фрагментов объединяли в группы – ПЦР-типы.

**Результаты и их обсуждение.** Интенсивность циркуляции возбудителя зависела от периода эпидемического процесса. Доэпидемический период характеризовался низкой циркуляцией токсигенных вариантов *S. diphtheriae* при широком распространении нетоксигенных. Интенсивность циркуляции нетоксигенных штаммов имела тенденцию к повышению за 3 года до начала

эпидемии, особенно среди лиц, обследованных с диагностической целью, которые имели воспалительный процесс в глотке. В период эпидемии циркуляция нетоксигенных штаммов коринебактерий дифтерии также была более интенсивной в сравнении с токсигенными. Динамика распространения токсигенных и нетоксигенных штаммов у лиц, обследованных с диагностической целью, находилась в прямой корреляционной зависимости ( $r=0,69$ ;  $p<0,05$ ) и соответствовала динамике заболеваемости дифтерией ( $r=0,67$ ;  $p<0,05$  для токсигенных штаммов и  $r=0,79$ ;  $p<0,05$  для нетоксигенных) (рис. 1).

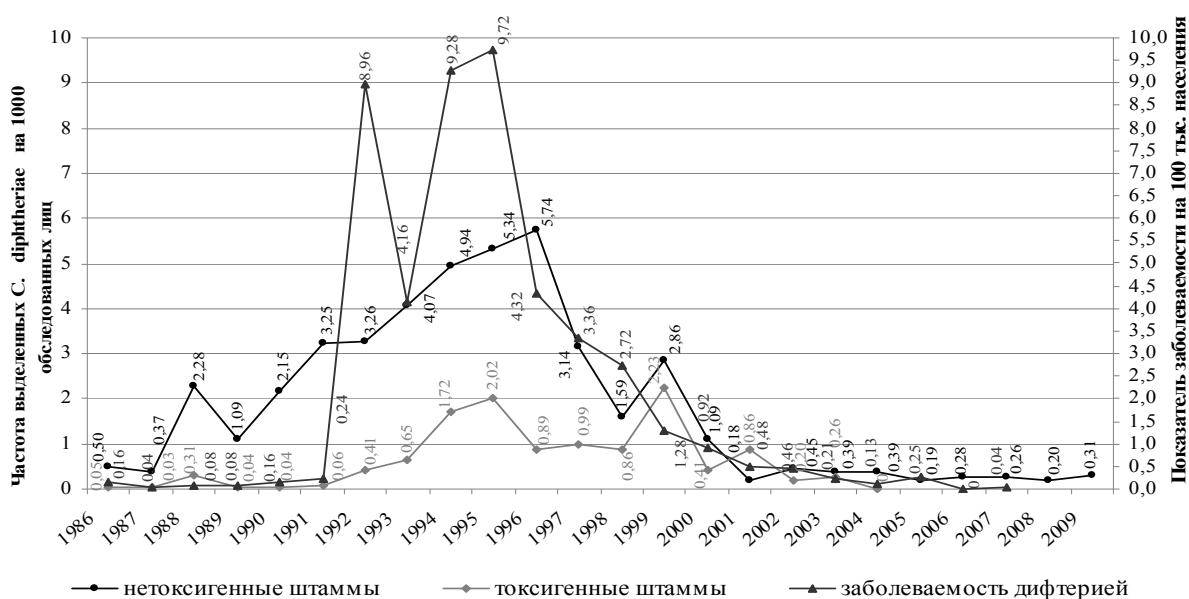


Рис.1 Динамика заболеваемости дифтерией и циркуляция *C. diphtheriae* среди лиц, обследованных с диагностической целью

Изучение внутриштаммовой гетерогенности *C. diphtheriae* по признаку токсинообразования показало, что только 54,5 % токсигенных штаммов были однородными. У остальных токсигенных штаммов при пассажах на элективных питательных средах отмечалась утрата функции токсинообразования. При исследовании таких штаммов в ПЦР с парой специфических праймеров на ген дифтерийного токсина был получен положительный результат. В то же время 36,6% штаммов, нетоксигенных в реакции иммунопреципитации, но имевших в геноме неэкспрессирующийся *tox*-ген, при пассажах на элективных питательных средах восстанавливали функцию токсинообразования. То есть

штаммы имевшие генетически обусловленную способность к токсинообразованию, фенотипически были неоднородными по этому признаку. Это объясняет выделение нетоксигенных в реакции иммунопреципитации штаммов возбудителя от больных дифтерией [5].

В постэпидемическом периоде наряду со снижением заболеваемости уменьшалась циркуляция токсигенных штаммов возбудителя, а циркуляция нетоксигенных сохранялась, хотя и уменьшалась в десятки раз в сравнении с периодом эпидемии. На наш взгляд утрата функции токсинообразования и элиминация токсигенных штаммов являются приспособительными механизмами, которые позволяют возбудителю сохраняться в межэпидемический период [6].

Согласно результатам реакции иммунопреципитации из 265 штаммов *C. diphtheriae*, выделенных от больных с воспалительным процессом в глотке (дифтерия, ангины) и от бактерионосителей, 137 штаммов были нетоксигенными. Из них 45 (32,8 %) имели в геноме участок А-фрагмента *tox*-гена. Эти штаммы не продуцировали токсин или уровень его продукции был слишком низким и не определялся традиционными методами. Однако, эти штаммы имели потенциальную, генетически обусловленную способность к токсинообразованию и расценивались как эпидемически опасные. Наибольший удельный вес штаммов с потенциальной способностью к токсинообразованию был выделен от лиц, имевших воспалительный процесс в глотке ( $52,38 \pm 7,70$  %). Штаммы, выделенные от бактерионосителей, содержали неэкспрессирующийся ген реже – в  $24,21 \pm 4,39$  % ( $P < 0,01$ ). То есть нетоксигенные штаммы, выделенные от больных, представляли большую эпидемическую опасность, чем штаммы, выделенные от бактерионосителей.

Сопоставление частоты регистрации неэкспрессирующегося *tox*-гена с показателем заболеваемости дифтерией на 100 тыс. населения в разных регионах выявило наличие прямой корреляционной связи ( $r=0,82$ ;  $p < 0,05$ ). То есть частота его регистрации зависела от интенсивности эпидемического процесса и была

выше во время эпидемии, чем в межэпидемический период (52,4 % против 20,5 %).

Согласно распределению фрагментов амплификации, штаммы *S. diphtheriae* были сгруппированы в 7 ПЦР-типов (рис. 2).

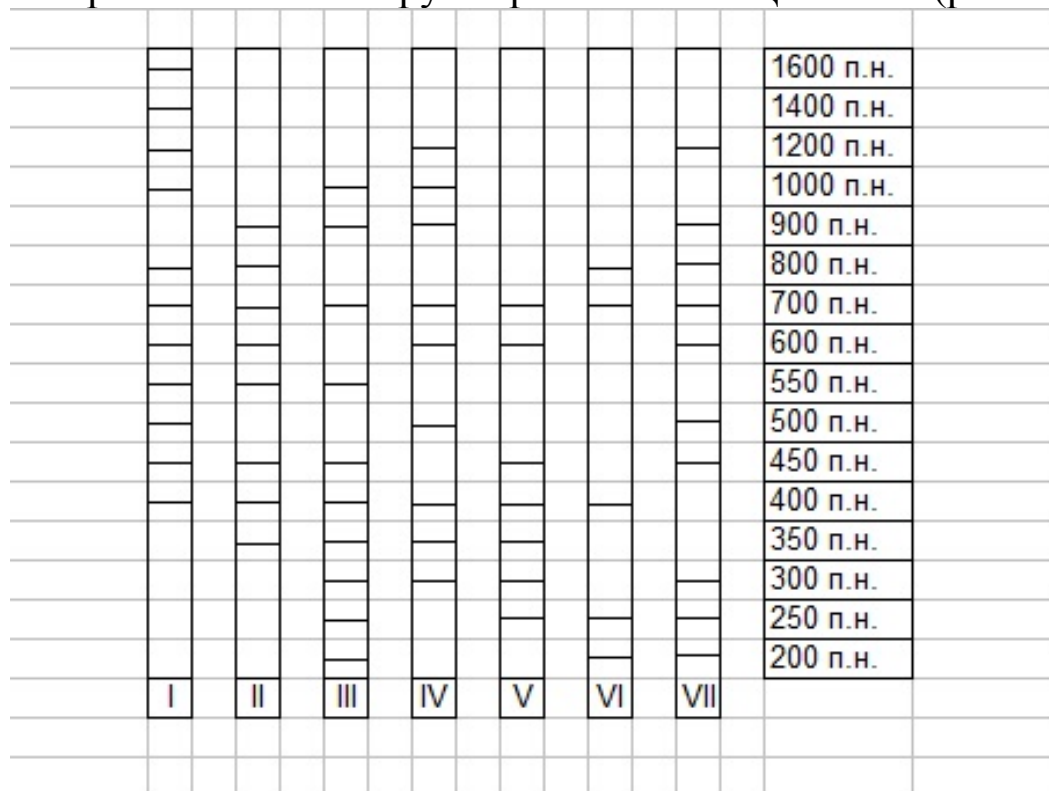


Рис. 2. Схематичное распределение фрагментов амплификации штаммов *S. diphtheriae*

Особое внимание в работе уделялось характеристике штаммов, которые циркулировали во время последней эпидемии дифтерии (1986–1999 гг) и снижения заболеваемости на фоне массовой иммунизации детей и взрослых по эпидемическим показаниям (2000–2009 гг). Дана также сравнительная характеристика периода снижения заболеваемости на фоне начала массовой иммунизации детей дифтерийным анатоксином (1961–1963 гг) и периода высокой заболеваемости до введения вакцинопрофилактики (1954–1959 гг).

В постэпидемическом периоде на территории Украины циркулировало 6 генетически обособленных ПЦР-типов *S. diphtheriae* и еще 3 штамма (4,0 %) принадлежали к атипичным, которые не встречались в другие периоды. В этом периоде удельный

вес первого ПЦР-типа составил 68,4 % всех исследованных штаммов. Возбудители второго и третьего ПЦР-типов составили 6,6 % и 11,8 % всех изученных образцов, а четвертый, пятый и шестой – соответственно 5,3; 2,6; и 1,3 % (рис. 3).

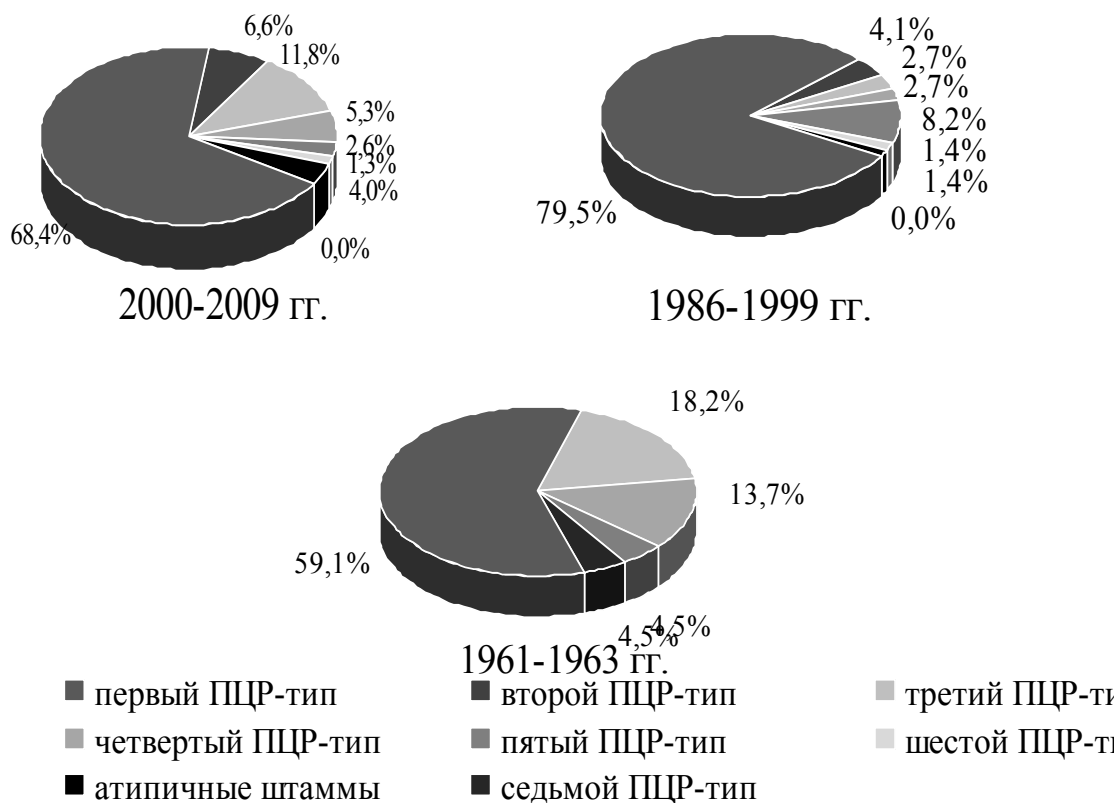


Рис. 3. Частота ПЦР-типов *C. diphtheriae*, которые циркулировали на территории Украины в 1961–2009 гг.

Во время эпидемии 90-х годов, также, как и в постэпидемическом периоде, доминировали возбудители, принадлежавшие по генетическим признакам к первому ПЦР-типу. В общей структуре всех изученных образцов удельный вес указанного типа составил 79,5 %. *C. diphtheriae*, принадлежавшие к первому ПЦР-типу, циркулировали во всех регионах Украины, что позволило отнести этот ПЦР-тип к эпидемическому. Частота других ПЦР-типов колебалась и составляла для второго типа – 4,1 %, для третьего и четвертого – по 2,7 %, пятого – 5,2 %, для шестого и атипичных штаммов – по 1,4 %. Варианты возбудителей, которые циркулировали в восточном регионе Украины в 1961–1963 гг, принадлежали к пяти ПЦР-типам. Удельный вес первого

ПЦР-типа в этот период составил 59,1 %, третьего – 18,2 %, четвертого – 13,7 %, пятого – 4,5 %. Второй и шестой типы в этом периоде вообще не определялись. Еще 4,5 % штаммов были генетически близкими к коринебактериям, выделенным в г. Москва в 1954–1959 гг., и составили седьмой ПЦР-тип. Следует отметить, что штаммы этого типа не встречались во время эпидемии и в постэпидемическом периоде.

Преобладание отдельных ПЦР-типов, вероятно, связано с интенсивностью эпидемического процесса и состоянием антибактериального иммунитета населения. По мере снижения заболеваемости популяция возбудителя становилась более гетерогенной. Удельный вес отдельных ПЦР-типов находился в корреляционной связи средней силы с уровнем заболеваемости дифтерией ( $r=0,52$ ;  $p<0,05$ ). Отдельные ПЦР-типы циркулировали на всей территории Украины, другие – в отдельных территориях. Кроме первого типа во всех регионах регистрировались второй и третий ПЦР-типы, четвертый тип определялся в восточном регионе и не регистрировался в западном. В южном регионе этот тип определялся только во время эпидемии. Пятый тип также определялся только в юго-восточном регионе. Атипичные штаммы, не имевшие аналогов в другие периоды, отмечались в разных регионах и при разной интенсивности эпидемического процесса. Структура популяции *S. diphtheriae* по мере снижения интенсивности эпидемического процесса становилась более гетерогенной и удельный вес доминирующего ПЦР-типа постепенно снижался.

### **Выводы:**

1. Популяция возбудителя дифтерии гетерогенна по признаку токсинообразования. Наряду с токсигенными и нетоксигенными штаммами циркулируют штаммы, несущие неэкспрессирующийся ген токсигенности. Циркуляция нетоксигенных штаммов более интенсивна в сравнении с токсигенными и соответствует динамике заболеваемости дифтерией ( $r=0,79$ ;  $p<0,05$  и  $r=0,67$ ;  $p<0,05$  соответственно).

2. Частота регистрации неэкспрессирующегося гена токсигенности зависит от характера инфекционного процесса (52,4 %



у больных против 24,2 % у бактерионосителей) и интенсивности эпидемического процесса (52,4 % в период эпидемии против 20,5 % в постэпидемический период) и может служить критерием стабильности эпидемической ситуации.

3. Популяция коринебактерий дифтерии, циркулирующих на территории Украины генетически гетерогенна и состоит из семи ПЦР-типов. Они циркулируют на протяжении длительного времени и их удельный вес зависит от интенсивности эпидемического процесса ( $r=0,52$ ;  $p<0,05$ ) и региона.

4. Эпидемический период характеризовался перестройкой популяции в сторону ее однородности и появлением доминирующего “эпидемического” ПЦР-типа, который регистрировался во всех регионах Украины. Его циркуляция продолжалась длительное время после снижения заболеваемости с постепенным уменьшением удельного веса в общей структуре возбудителей дифтерии (79,5 % в период эпидемии против 68,4 % в межэпидемический период).

### **Литература:**

1. Борисова О.Ю. Молекулярно-генетические особенности структуры генов патогенности возбудителей коклюша и дифтерии; совершенствование лабораторной диагностики при этих инфекциях: автореф. дис. ...докт. мед. наук 03.00.07/ Борисова Ольга Юрьевна – М., 2009. – 35 с.

2. Комбарова С.Ю. Микробиологический и молекулярно-генетический мониторинг возбудителя дифтерийной инфекции: автореф. дис. ... докт. мед. наук 03.00.07/ Комбарова Светлана Юрьевна – М., 2007. – 36 с.

3. Генетическое типирование штаммов *Corynebacterium diphtheriae* методом полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами / И.В. Мокроусов, О.В. Нарвская, Г.Я. Ценева // Журн. микробиологии. – 1996. – № 5. – С. 73–75.

4. Молекулярно-генетическое маркирование геномов представителей рода *Rhodopus* / С.Г. Потапов, В.А. Васильев, О.П. Самарина, А.П. Рысков // Генетика. – 1994. – Т. 30, № 5. – С. 615–621.

5. Печінка А.М. Токсигенність коринебактерій дифтерії та клінічні прояви дифтерійної інфекції: автореф. дис. ...канд.мед.наук:14.01.12 / Печінка Анатолій Михайлович – К., 1999. – 23 с.

6. Фильчаков И.В. Персистенция бактерий и формирование доминантных популяций возбудителя / И.В. Фильчаков, А.М. Зарицкий//Сучасні інфекції – 2005 – № 2 – С. 20–27.

7. Molecular epidemiology of *C. diphtheriae* strains during different phases of the diphtheria epidemic in Belarus [Електронний ресурс]/2006 Kolodkina V. et al. Режим доступу <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/6/129>

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

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ ЕПІДЕМІОЛОГІЇ ДИФТЕРІЙНОЇ ІНФЕКЦІЇ

Доан С.І., Савчук А.І., Гладкая Е.А.,  
Міроненко Л.Г., Мотика Є.І.

*Резюме. Наведено результати дослідження 265 штамів *C. diphtheria* в ПЛР з парою специфічних праймерів на ген дифтерійного токсину та результати генотипування 177 штамів збудника в ПЛР з універсальним праймером. Досліджувані штами були виділені в різних регіонах України з 1961 по 2009 рр., а також у Москві в 1954-1959 рр. Встановлено, що частота реєстрації неекспресуючого гену токсигенності залежить від характеру інфекційного процесу (52,4% у хворих на дифтерію проти 24,2% у бактеріоносіїв) і інтенсивності епідемічного процесу (52,4% в період епідемії проти 20,5% у межепідемічний період) і може бути критерієм стабільності епідемічної ситуації. Популяцію *C. diphtheria* склали сім генетично відокремлених ПЛР-типів. Їх питома вага залежав від інтенсивності епідемічного процесу і території.*

*Ключові слова: *Corynebacterium diphtheriae*, ПЛР з специфічними та універсальними праймерами.*

## MOLECULAR AND GENETIC ASPECTS OF DIPHTHERITIC INFECTION EPIDEMIOLOGY

**S.Doan, A.Savchuk, O.Gladka, L.Mironenko, O.Motyka**

**Summary.** *The results of 265 C. diphtheria strains research by PCR with the pair of specific primers for tox-gene were shown. The results of 177 C. diphtheria strains genotyping with the arbitrary primers (random amplification of polymorphic DNA PCR) were shown too. The strains were isolated in the Ukraine in 1961–2009 and in Moscow in 1954–1959. It was determined that non-expressed tox-gene frequency depended on the infectious process nature (52,4 % in the patients with diphtheria against 24,2 % in the bacillicarriers) and the epidemic process intensity (52,4 % in the epidemic period against 20,5 % in the post-epidemic period). It was shown on epidemic process stability. C. diphtheria population consists of the seven genetic isolated types. Their frequency depended on the epidemic process intensity and the region.*

**Keywords:** *Corynebacterium diphtheriae, PCR with specific and arbitrary primers.*