

УДК 616.931575.2-576.16

**ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО  
ПОЛИМОРФИЗМА МУЗЕЙНЫХ КУЛЬТУР *S.*  
*DIPHTHERIAE* В ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ  
РЕАКЦИИ С УНИВЕРСАЛЬНЫМИ  
ПРАЙМЕРАМИ**

Мироненко Л.Г.<sup>1</sup>, Савчук А.И.<sup>2</sup>

Институт микробиологии и иммунологии им.  
И.И. Мечникова АМН Украины<sup>1</sup>  
Одесский государственный медицинский универ-  
ситет<sup>2</sup>

Несмотря на массовую иммунопрофилактику, дифтерийная инфекция по-прежнему остается одной из актуальных проблем здравоохранения. Эпидемия 90-х годов прошлого столетия поставила задачи усовершенствования эпидемиологического надзора за этой инфекцией. Одним из способов решения проблемы является использование в эпидемиологической практике молекулярно-генетических методов исследования, отличающихся высокой информированностью [1]. Одним из методов, позволяющим оценить генетическое разнообразие возбудителей при анализе ДНК, является геномная дактилоскопия (DNA fingerprinting) [2], основанная на полимеразной цепной реакции (ПЦР) с универсальными праймерами (УП-ПЦР или RAPD-PCR). В этом случае используются праймеры с произвольной нуклеотидной последовательностью, которые способны гибридизоваться со многими гомологическими сайтами в геномной ДНК. Метод позволяет получить ряд ампликонов с разной молекулярной массой. При регистрации продуктов амплификации с помощью электрофореза в агарозном геле каждый спектр разрешается в виде профилей амплификации или "дактилоскопии" ("fingerprint"). Использование ПЦР с универсальными праймерами позволило дифференцировать близкородственные, фенотипически однородные штаммы *Y. pseudotuberculosis* [3], возбудителя чумы [4], лептоспир [5], дифтерии [6]. Геномная дактилоскопия может быть с успехом использована для контроля микробных коллекций, что позволит генетически маркировать каждую культуру коллекции, выявлять генетические связи и степень генотипического родства среди культур коллекции. При поступлении новых культур на основе исследований геномного полиморфизма объективно решать вопрос об их включении в коллекцию [7]. Особый интерес представляет изучение с помощью молекулярно-генетических методов музейных культур *S. diphtheriae*, выделенных в различных регионах в довакцинальный и вакцинальный периоды, что позволяет осуществлять их полную идентификацию и анализировать микробную популяцию при разной интенсивности эпидемического процесса.

Целью настоящей работы явилось генотипирование и изучение генетического единства методом ПЦР с универсальными праймерами музейных культур *S. diphtheriae*, что позволит дополнить паспортную характеристику части культур коринебактерий дифтерии, которые находятся на хранении в музее

микроорганизмов Института микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины.

#### Материалы и методы

Исследовано 12 культур *S. diphtheriae*, выделенных в разных регионах: 6 культур – в г. Москве в 1954-1959 гг. и 6 культур – в г. Харькове в 1991 г. у военнослужащих в/ч 96735, т.е. во время последней эпидемии. Пробы для ПЦР готовились следующим образом. Одну колонию чистой суточной 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 суспендировали имеющуюся в пробирке колонию. При этом достигалась гибель микроорганизмов и возможность последующей работы с культурой без соблюдения специальных мер предосторожности. Приготовленный таким образом материал сохранялся до 1 недели при комнатной температуре или 6 месяцев – при температуре минус 12°С [8]. В дальнейшем для выделения хромосомной ДНК использовался коммерческий набор "ДНК-экспресс" фирмы "Литех" (Россия). В работе использовался олеонуклеотидный праймер № 45 (5' - GGATCCAAAACGGCCACT - 3') [6].

ПЦР проводили по Saiki et al. [9] в объеме 25 мл на программируемом амплификаторе "Терцик" ("ДНК-технология", Россия). Реакционная смесь имела следующий состав: 10 mM Tris HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP и dTTP), 1ед Tag-полимеразы ("Ампли Сенс", Россия), 30 пМ праймера, 10 мкл ДНК. После начальной денатурации при 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. 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 Hupper Ladder II фирмы "Bio Line" (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, а  $N_x$  и  $N_y$  – общее число фрагментов у образцов  $x$  и  $y$  [10].

#### Результаты и их обсуждение

В таблице 1 представлены размеры ампликонов, наиболее характерных для изучаемых культур *S. diphtheriae*. Следует отметить, что анализ длин амплификационных фрагментов показал, что культуры, циркулировавшие в 50-е и 90-е годы, отличались полиморфизмом. У большинства культур, выделенных в Москве (№№ 14012, 14017, 14029, 14030), присутствовали 5 ампликонов размерами 1600, 1400, 1000, 800, 550 п.н. Профиль

ампликонов культур №№ 14012 и 14017 был полностью идентичным (рис. 1). Кроме указанных выше фрагментов, у этих культур имелись также дополнительные ампликоны размерами 600, 500, 450 и 200

п.н. Культура № 14029 кроме перечисленных 5 ампликонов имела 2 дополнительных ампликона размера 600 и 450 п.н., а культура № 14030 – 500 и 350 п.н.

**Таблица 1** Полиморфизм длин амплификационных фрагментов музейных культур *S. diphtheriae*

№	Биовар	Номер в коллекции	Год выделения	Регион	Размеры ампликонов, п.н.											
					1600	1400	1000	800	700	600	550	500	450	350	250	200
1	mitis	14006	1955	Москва	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–
2	intermedius	14012	1955	Москва	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	–	+
3	mitis	14015	1954	Москва	–	–	+	–	+	–	–	–	+	–	–	–
4	mitis	14017	1956	Москва	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	–	+
5	gravis	14029	1959	Москва	+	+	+	+	–	+	+	–	+	–	–	–
6	gravis	14030	1956	Москва	+	+	+	+	–	–	+	+	–	+	–	–
7	gravis	14042	1991	Харьков	+	–	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–
8	gravis	14043	1991	Харьков	+	+	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–
9	gravis	14065	1991	Харьков	+	+	+	–	+	+	–	+	–	–	+	+
10	gravis	14066	1991	Харьков	+	+	+	–	+	+	–	–	–	–	–	–
11	mitis	14067	1991	Харьков	+	–	+	–	+	+	–	+	–	–	–	–
12	mitis	14068	1991	Харьков	–	–	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–

При попарном сравнении профилей ампликонов степень сходства составляла от 62,5% до 71,4%.

Совершенно иным был профиль ампликонов культур №№ 14006 и 14015: у культуры № 14006 присутствовали 2 ампликона 700 и 350 п.н., а у культуры № 14015 – ампликоны размерами 1000, 700 и 450 п.н. При попарном сравнении профилей ампликонов степень сходства составила 40,0%, а с остальными 4 культурами – от 0% до 40,0%.

Таким образом, в 50-е годы в Москве циркулировали как близкородственные, так и генетически обособленные культуры *S. diphtheriae*. Согласно литературным данным, 50-е годы XX столетия сопровождалась высоким уровнем заболеваемости дифтерией, который достигал в РСФСР 6,1-8,7 на 10 тыс. населения [11]. Следует отметить, что согласно паспортам культур, генетически близкородственные культуры №№ 14012, 14017, 14029 и 14030 были выделены от больных дифтерией, а атипичные культуры №№ 14006 и 14015 – от бактерионосителей, что требует дальнейшего изучения.

У большинства культур, выделенных в Харькове (№№ 14042, 14043, 14065, 14066, 14067), присутствовали 3 ампликона размерами 1600, 700 и 600 п.н. (см. табл. 1, рис. 2). Еще у 3 культур (№№ 14043, 14065, 14066) имели место дополнительные ампликоны молекулярной массой 1400 п.н., а у культур №№ 14065, 14066, 14067 – ампликоны молекулярной массой 1000 п.н. Культуры №№ 14065 и 14067 имели также ампликон 500 п.н., а культуры № 14065 – низкомолекулярные ампликоны 250 и 200 п.н., №№ 14042, 14043 – 450 и 350 п.н. При попарном сравнении профилей ампликонов степень сходства составляла от 46,2% до 90,9%. Культуру № 14068 можно отнести к атипичным амплификатам: в ее профиле отмечалось 2 ампликона размерами 700 и

450 п.н. (рис. 2). При этом степень сходства с другими культурами составила от 20,0% до 28,5%.

Таким образом, культуры, выделенные из одного очага в начале эпидемии 90-х годов, обладали значительным генетическим полиморфизмом и наряду с близкородственными культурами в эпидемический период циркулировали также и генетически обособленные изоляты.

При сравнении профилей ампликонов культур, циркулировавших в 50-е годы в Москве и в 90-е годы в Харькове, степень сходства составила от 33,3% до 70,6% (в среднем  $\approx$  53,0%), а между атипичными амплификатами – от 50,0% до 80,0%. Наибольшим генетическим подобием отличались культуры №№ 14012 и 14065 (степень сходства – 70,6%), №№ 14029 – 14043, 14066 (степень сходства – 61,5% и 66,6% соответственно).

Таким образом, способ ПЦР-генотипирования с универсальным праймером № 45 позволил провести генетическую идентификацию ряда музейных культур *S. diphtheriae* и выявить внутривидовую дифференциацию культур на уровне геномного полиморфизма. Определена также степень генетического сходства, проявляющаяся в совпадении профилей ампликонов ряда культур, циркулировавших в разные временные периоды на различных территориях во время активации эпидемического процесса дифтерии.

Изучение музейных культур *S. diphtheriae* с помощью ПЦР с универсальным праймером № 45 позволило провести их более точную и полную идентификацию, что может быть использовано при составлении паспортов культур и создании банка данных, содержащего информацию о геноме возбудителей, циркулировавших при разной интенсивности эпидемического процесса.

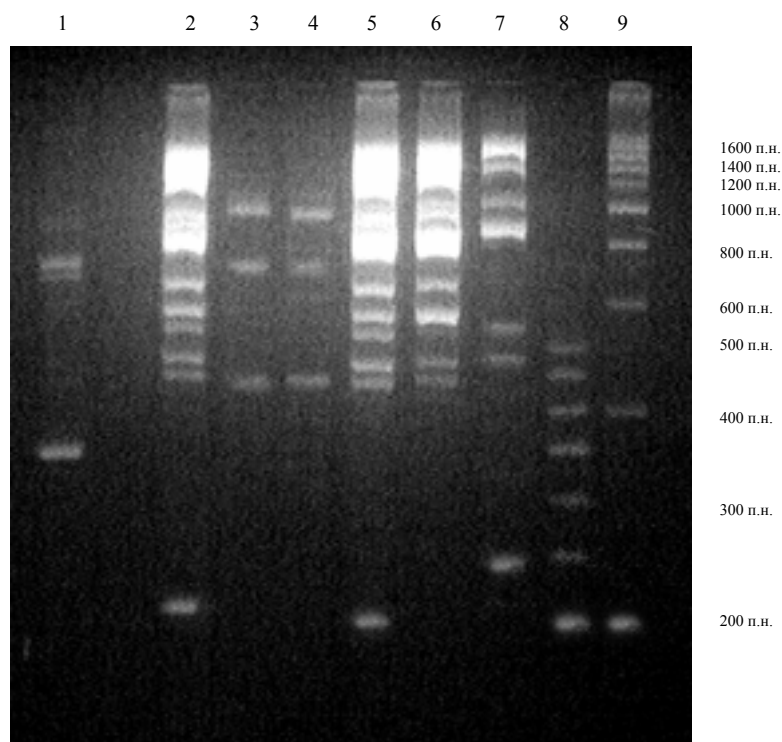


Рис. 1. Профили ампликонов культур *C. diphtheriae*, выделенных в г. Москва в 1954-1959 гг. 1 – № 14006; 2 – № 14012; 3 – № 14015; 4 – № 14015 (субкультура); 5 – 14017; 6 – 14029; 7 – 14030; 8, 9 – маркер молекулярных масс.

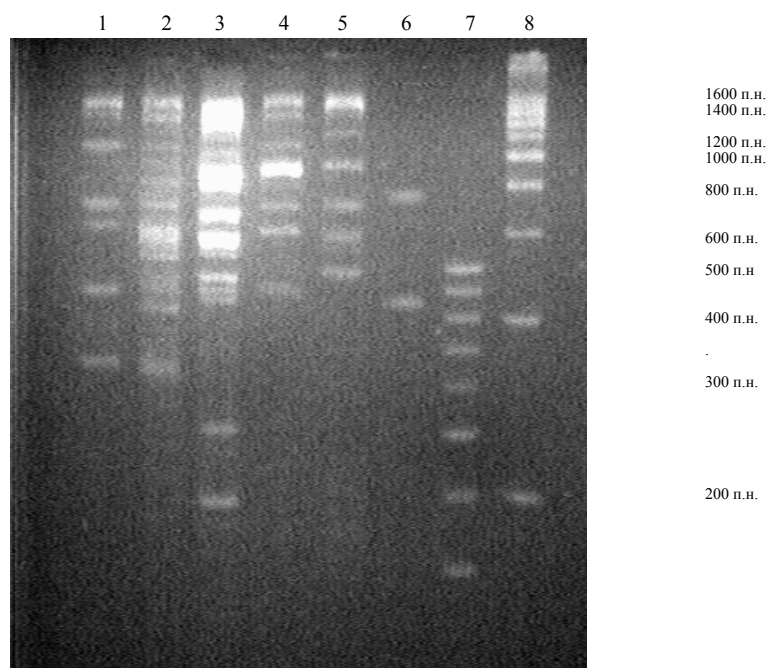


Рис. 2. Профили ампликонов культур *C. diphtheriae*, выделенных в г. Харьков в 1991 г. 1 – № 14042; 2 – № 14043; 3 – № 14065; 4 – № 14066; 5 – 14067; 6 – 14068; 7,8 – маркер молекулярных масс.

### Литература

1. Шагинян И.А., Гинцбург А.Л. Геномный полиморфизм возбудителей бактериальных инфекций // Молекул. Генетик. – 1991. - № 12. – С. 3-9.

2. Шагинян И.А., Гинцбург А.Л. ПЦР-генетическое типирование патогенных микроорганизмов // Генетика. – 1995. – Т. 31, № 5. – С. 600-610.

3. Булат С.А., Михайлов Н.В., Королюк А.М. Геноидентификация видов и серовариантов бактерий методом полимеразной цепной реакции с универсаль-

ными олигонуклеотидами: реидентификация ранее выделенных штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* // Журн. микробиологии. – 1991. - № 12. – С. 2-7.

4. Савостина Е.П., Попов Ю.А., Каштанова Т.Н. Анализ геномного полиморфизма типовых и атипичных штаммов возбудителя чумы с использованием полимеразной реакции с универсальными праймерами // Молекул. генетика. – 2004. - № 1. – С. 22-26.

5. Першина М.Ю., Шагинян И.А., Ананьина Ю.В. Анализ геномного полиморфизма лептоспир в полимеразной цепной реакции с произвольными праймерами // Молекул. генетика. – 1998. - № 2. – С. 29-32.

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

7. Шагинян И.А., Першина М.Ю. Генетические маркеры в эпидемиологии бактериальных инфекций // Журн. микробиологии. – 1997. – № 4. – С. 54-59.

8. Молекулярно-генетические и биофизические методы исследования в медицине / Бажора Ю.И., Кресюн В.И., Запорожан В.Н. и др. – К.: Здоров'я, 1996. – 207 с.

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

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

11. Дифтерия / Михайлова А.М., Руденко А.А., Васильев К.Г., Савчук А.И. – Харьков: Константа, 2003. – 312 с.

#### УДК 616.931575.2-576.16

**Изучение генетического полиморфизма музейных культур *C. diphtheriae* в полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами**  
Мироненко Л.Г.<sup>1</sup>, Савчук А.И.<sup>2</sup>

**Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова**  
**АМН Украины<sup>1</sup>**  
**Одесский государственный медицинский университет<sup>2</sup>**

С помощью полимеразной цепной реакции с универсальным праймером № 45 было исследовано 12 музейных культур *C. diphtheriae*, выделенных от дифтерийных больных и бактерионосителей в 1954-1958 гг. в г. Москве и в 1991г. в г. Харькове. Установлены наиболее типичные профили ампликонов культур, которые были выделены в 50-е и 90-е годы. Выявлен также уровень генетического сходства культур, что проявляется в сопоставлении профилей ампликонов некоторых культур.  
[www.imiamn.org/journal.htm](http://www.imiamn.org/journal.htm)

Полученные данные могут быть использованы при составлении паспорта культуры и создании банка данных, который содержит информацию о геноме возбудителей, циркулирующих на разных территориях при разной интенсивности эпидемического процесса.

**Ключевые слова:** *C. diphtheriae*, полимеразная цепная реакция с универсальными праймерами, паспорт культуры.

#### УДК 616.931:575.2-576.16

**Вивчення генетичного поліморфізму музейних культур *C. diphtheriae* в полімеразній ланцюговій реакції з універсальними праймерами**

**Мироненко Л.Г.<sup>1</sup>, Савчук А.І.<sup>2</sup>**  
**Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України, м. Харків,<sup>1</sup>**  
**Одеський державний медичний університет<sup>2</sup>**

За допомогою полімеразної ланцюгової реакції з універсальним праймером № 45 було досліджено 12 музейних культур *C. diphtheriae*, які були виділені від хворих на дифтерію та бактеріоносців у 1954-1958 рр. у м. Москва, та у 1991 р. у м. Харків. Встановлено найбільш типові профілі ампліконів культур, які були виділені у 50-ті та 90-ті роки. Виявлений також рівень генетичної подібності культур, що проявляється у зіставленні профілів ампліконів деяких культур. Отримані дані можуть бути використані при складанні паспорту культури та створення банку даних, який містить інформацію про геном збудників, що циркулювали на різних територіях при різній інтенсивності епідемічного процесу.

**Ключові слова:** *C. diphtheriae*, полімеразна ланцюгова реакція з універсальними праймерами, паспорт культури.

#### UDC 616.931:575.2-576.16

##### Summary

**Discovery of genetic polymorphism of *C. diphtheriae* museum cultures in polymerase chain reaction with arbitrary primers**

**Myronenko L.G., Sauchuk A.I.<sup>2</sup>**  
**Metchnikovi Institute of microbiology and immunology AMS of Ukrain, Kharcov<sup>1</sup>**  
**Odessa State Medical University<sup>2</sup>**

The 12 *C. diphtheriae* museum cultures were investigated by polymerase chain reaction with arbitrary primer № 45. These cultures were isolated in 1954-1959 in Moscow and in 1991 in Kharkov from the patients with diphtheria and the bacilli carriers. The most typical amplicon profiles the museum cultures were determined. The level of genetic similarity of the museum cultures, which manifests by coincidence of the amplicon profiles, was determined too. This information will allow supplement the certificates of the museum cultures and creation of the data bank, which contains information about of the pathogene genomes circulating in various regions and different epidemic process intensity.

**Key words:** *C. diphtheriae*, polymerase chain reaction with arbitrary primers, certificate of bacterial culture.