

О.Ю.Борисова<sup>1,2</sup>, А.С.Пименова<sup>1</sup>, А.В.Чаплин<sup>1,2</sup>, Л.И.Кафарская<sup>2</sup>, С.С.Афанасьев<sup>1</sup>,  
В.А.Алешкин<sup>1</sup>, А.В.Алешкин<sup>1</sup>, М.С.Афанасьев<sup>3</sup>, А.В.Караулов<sup>3</sup>

## УСКОРЕННЫЙ СПОСОБ ГЕНОДИАГНОСТИКИ ДИФТЕРИИ НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМАЛЬНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ВОЗБУДИТЕЛЯ

<sup>1</sup>Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского, <sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, <sup>3</sup>Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

*Цель.* Разработка ускоренного способа генодиагностики дифтерии на основе изотермальной амплификации для выявления ДНК возбудителя. *Материалы и методы.* Исследование проводилось на типовых коллекционных штаммах из «ГКПМ-Оболensk», а также на 135 штаммах *S. diphtheriae*, выделенных в бактериологических лабораториях субъектов РФ и присланных в МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Выделение штаммов проводили по МУ 4.2.698-98 и МУК 4.2.3065-13. Хромосомную ДНК выделяли стандартным методом кипячения, а также с помощью трех коммерческих наборов. Детекцию результатов амплификации осуществляли в горизонтальном электрофорезе в 1,5% агарозном геле. *Результаты.* Установлено, что разработанный способ генодиагностики позволяет выявлять ДНК токсигенных штаммов *S. diphtheriae* двух биоваров, а также ДНК нетоксигенных токснесущих штаммов *S. diphtheriae* биовара *mitis* с механизмами отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина, обусловленными наличием делеции или мобильного генетического IS элемента в гене *tox*. Нетоксигенные токснесущие штаммы *S. diphtheriae* с механизмом отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина, обусловленным наличием транспозона в гене *tox*, идентифицируются как нетоксигенные. Оценка аналитической чувствительности в сравнительных исследованиях при использовании трех коммерческих наборов для выделения ДНК показала, что с помощью набора «Рибо-преп» чувствительность достигала  $4,5 \times 10^1$  ГЭ/мл. Показана высокая специфичность разработанного способа, которая оценивалась на 18 штаммах 16 других представителей рода *Corynebacterium* и 20 типовых штаммах микроорганизмов, выделенных из ротоглотки или вызывающих заболевания дыхательных путей. Апробация разработанного способа проведена в модельных экспериментах на иммитантах клинических образцов путем заражения одноразовых стерильных сухих тампонов последовательными разведениями бактериальной культуры (с параллельным высевом на плотные питательные среды) и составила  $10^3$  ГЭ/мл. *Заключение.* Разработанный способ ускоренной генодиагностики дифтерийной инфекции обладает высокой диагностической эффективностью, специфичностью и чувствительностью, позволяет выявлять  $10^3$  —  $4,5 \times 10^1$  ГЭ/мл *S. diphtheriae* в клиническом материале с одновременной верификацией токсигенных и нетоксигенных штаммов.

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 24—32

Ключевые слова: дифтерия, *S. diphtheriae*, изотермальная амплификация, диагностика

О. Ю. Борисова<sup>1,2</sup>, А. С. Пименова<sup>1</sup>, А. В. Чаплин<sup>1,2</sup>, Л. И. Кафарская<sup>2</sup>, С. С. Афанасьев<sup>1</sup>,  
В. А. Алешкин<sup>1</sup>, А. В. Алешкин<sup>1</sup>, М. С. Афанасьев<sup>3</sup>, А. В. Караулов<sup>3</sup>

## AN ACCELERATED METHOD OF DIPHTHERIA GENE DIAGNOSTICS BASED ON ISOTHERMAL AMPLIFICATION TO DETECT DNA OF THE CAUSATIVE AGENT

<sup>1</sup>Gabrichovsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, <sup>2</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, <sup>3</sup>Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

*Aim.* Development of an accelerated method of gene diagnostics of diphtheria based on isothermal amplification for detection of DNA of the causative agent. *Materials and methods.* The study was carried out in typical collection strains from GKPM-Obolensk, as well as in 135 strains

of *C. diphtheriae* isolated from bacteriological laboratories of the regions of Russian Federation and sent to the Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology. Strain isolation was carried out in accordance with MI 4.2.698-98 and 4.2.3065-13. Chromosomal DNA was isolated by standard heating method, as well as using 3 commercial kits. Detection of the amplification results was carried out in horizontal electrophoresis in 1.5% agarose gel. **Results.** The developed method of gene diagnostics was established to allow detection of DNA of toxigenic *C. diphtheriae* strains of 2 biovars, as well as DNA of non-toxigenic tox-gene bearing strains (NTTB) of *C. diphtheriae* mitis biovar with mechanisms of lack of expression of diphtheria toxin gene due to the presence of deletion or mobile genetic IS element in the tox gene. Non-toxigenic tox-gene bearing *C. diphtheriae* strain with the mechanism of lack of diphtheria toxin gene expression due to the presence of transposon in the tox gene are identified as non-toxigenic. Evaluation of the analytical sensitivity in comparative studies using 3 commercial kits for FNA isolation has shown that sensitivity reached  $4.5 \times 10^1$  GE/ml using Ribo-prep kit. High specificity of the developed method is shown, it was evaluated in 18 strains of 16 other members of the *Corynebacterium* genus and 20 typical strains of microorganisms isolated from oropharynx or causing infections of the respiratory tract. Approbation of the developed method was carried out in model experiments in imitators of clinical samples by infection of single-use sterile dry tampons by consecutive dilutions of the bacterial cultures (with parallel seeding into dense nutrient media) and was  $10^3$  GE/ml. **Conclusion.** The developed method of accelerated gene diagnostics of the diphtheria infection has a high diagnostic effectiveness, specificity and sensitivity, allows to detect  $10^3 - 4.5 \times 10$  GE/ml *C. diphtheriae* in clinical material with simultaneous verification of toxigenic and non-toxigenic strains.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 5, P. 24—32

Key words: diphtheria, *C. diphtheriae*, isothermal amplification, diagnostics

## ВВЕДЕНИЕ

Основным методом лабораторной диагностики дифтерийной инфекции в Российской Федерации является бактериологическая диагностика, которая регламентирована двумя нормативно-методическими документами: санитарно-эпидемиологическими правилами СП 3.1.2.3109-13 «Профилактика дифтерии» и методическими указаниями МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

Обследованию на дифтерию подлежат все больные с ангинами, хроническими тонзиллитами, паратонзиллярными и заглоточными абсцессами, а также все контактные лица в очагах дифтерии. Обследования проводятся также с профилактической целью при поступлении в лечебно-профилактические учреждения, санатории, закрытые специализированные учреждения, при переводе из одного закрытого специализированного учреждения в другое. Особую опасность представляют дифтерийные бактерионосители, которые имеют высокий уровень антитоксического иммунитета, но являются источниками инфекции для окружающих. Кроме того, в России существует скрытое дифтерийное бактерионосительство, что является потенциалом для распространения дифтерии, особенно среди непривитых против этой инфекции людей. Поэтому, согласно действующим нормативным документам, во всех этих случаях у пациента забирают патологический материал из зева и носа с помощью двух отдельных сухих тампонов с последующим посевом на одну чашку с плотной питательной средой и идентификацией возбудителя. При наличии другой локализации (кожа, наружный слуховой проход, гениталии, конъюнктивы глаз и др.) взятие патологического материала осуществляют с места локализации одним сухим тампоном, и обязательно материал забирается двумя сухими тампонами из зева и носа. Это объясняется тем, что воз-

будитель дифтерии наиболее часто локализуется на слизистых оболочках носоглотки и ротоглотки с последующим попаданием на кожу.

Система бактериологической диагностики в нашей стране разработана несколькими поколениями ученых и практических бактериологов. Огромный вклад в ее разработку внесли сотрудники МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского. Целью ее является выявление возбудителя дифтерии с помощью минимального количества диагностических тестов, необходимых и достаточных для получения достоверного ответа в максимально сжатые сроки. Разработанная схема бактериологической диагностики является достаточно эффективной и включает постановку пробы на токсигенность, которая позволяет выявить продукцию дифтерийного токсина у возбудителя. Однако самый ранний положительный ответ может быть выдан только на 3 сутки, а самый поздний отрицательный ответ — на пятые сутки. Кроме того, постановка большого числа идентификационных тестов также может иметь ряд недостатков. Так, результаты биохимической идентификации *S.diphtheriae* зависят от качества питательных сред и реагентов, условий их приготовления и хранения, определения рН среды, чистоты посуды, а также квалификации персонала и многое др. Поэтому применение высокочувствительных, специфичных, информативных и ускоренных молекулярно-генетических методов обнаружения возбудителя дифтерии является несомненно актуальным и перспективным в лабораторной диагностике дифтерийной инфекции, так как позволит идентифицировать возбудителя дифтерии в течение одного рабочего дня.

Цель исследования: разработка ускоренного способа генодиагностики дифтерии на основе изотермальной амплификации для выявления ДНК возбудителя.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работу включено 50 токсигенных и 70 нетоксигенных штаммов *S.diphtheriae* биоваров *gravis* и *mitis*, а также 15 нетоксигенных токснесущих штаммов *S.diphtheriae* с тремя механизмами отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина, выделенных с диагностической и профилактической целью в бактериологических лабораториях субъектов Российской Федерации и присланных в Референс-центр по дифтерии и коклюшу МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского. В исследование включены типовые штаммы из «ГКПМ-Оболенск». Выделение штаммов *S.diphtheriae* проводили согласно Методическим указаниям «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» МУ 4.2.698-98 и МУК 4.2.3065-13. Исследуемый материал засевали на кровяно-теллуритовую среду (КТА) на основе 2% СПА («Микроген», Махачкала) с 10% ККРС (НПО «Лейтран», Москва) и 0,02% теллурида калия (ГНЦ ПМБ, Оболенск) и термостатировали 24 — 48 часов при 37°C. Выросшие колонии оценивали по культурально-морфологическим, токсигенным и биохимическим свойствам согласно МУ 4.2.698-98 и МУК 4.2.3065-13, а также с использованием тест-системы «ДС-ДИФ-КОРИНЕ» (НПО «Диагностические системы», Н. Новгород).

Хромосомную ДНК выделяли стандартным методом кипячения согласно Маниатис Т. из 24-часовой культуры *S.diphtheriae*, а также с помощью коммерческих наборов: «ДНК-сорБАМ» («АмплиСенс», Москва), «Рибо-преп» («АмплиСенс», Москва), «К-сорб-100» («Синтол», Москва). Детекцию результатов амплификации осуществляли в горизонтальном электрофорезе в 1,5% агарозном геле. Полученные после изотермальной амплификации ДНК-образцы смешивали с *6x*Mass Loading Dye Solution («Fermentas», Литва) и *Sybr*

Green, помещали в лунки агарозного геля и подключали к источнику электрического тока. Электрофорез проводили в режиме 160 V в течение 20 мин. Результат реакции выявляли с помощью УФ-трансиллюминатора и фотографировали. Для контроля качества электрофореза использовали маркер молекулярных весов DNA Ladder Mix («Fermentas», Литва).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В основу разработанного способа генодиагностики дифтерии была взята молекулярно-генетическая технология изотермальной амплификации (LAMP) [7], позволяющая осуществлять амплификацию ДНК в условиях одной температуры. Важным этапом при разработке способа был подбор мишени для детекции, в качестве которой взят ген *tox*, кодирующий синтез дифтерийного токсина — основного фактора патогенности возбудителя дифтерии. При конструировании праймеров ориентировались на нуклеотидную последовательность, предложенную для изотермальной амплификации *S.diphtheriae* и опубликованную в международной базе данных генотипов NCBI/GenBank группой японских исследователей (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Corynebacterium+diphtheriae+Iwaki+2008>). На основании выбранной последовательности гена *tox* с помощью программ Primer Premier-V5 (Premier Bio Soft International) и алгоритма BLAST были подобраны пять олигонуклеотидных праймеров — ДТ-ВР-F1P, ДТ-ВР-В1P, ДТ-ВР-F3, ДТ-ВР-В3 и Loop. Далее нами экспериментально установлен состав реакционной смеси, достаточной для обеспечения высокой специфичности и эффективности проведения изотермальной амплификации. Изотермальную амплификацию проводили в режиме: 65°C — 60 мин и далее 80°C — 2 мин в программируемом микротермостате типа «Гном». Детекцию результатов осуществляли путем оценки профиля исследуемого ДНК-образца со специфическим профилем ДНК-образца контрольного токсигенного штамма *S.diphtheriae*. Если профиль исследуемого ДНК-образца аналогичен профилю ДНК-образца контрольного токсигенного штамма *S.diphtheriae*, то данные образцы регистрировали как содержащие ДНК токсигенного штамма *S.diphtheriae*, что свидетельствовало о наличии в патологическом материале от больного ДНК возбудителя дифтерии (рис. 1).

Апробацию способа ускоренной лабораторной диагностики дифтерии проведена на типовых коллекционных штаммах *S.diphtheriae*, полученных из «ГКПМ-Оболенск», а также на штаммах *S.diphtheriae*, выделенных с диагностической и профилактической целью в бактериологических лабораториях субъектов Российской Федерации и присланных в Референс-центр по дифтерии и коклюшу МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского. В работу включено 50 токсигенных и 70 нетоксигенных штаммов *S.diphtheriae* биоваров *gravis* и *mitis*, а также 15 нетоксигенных токснесущих штаммов *S.diphtheriae* с тремя механизмами отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина. Оценка

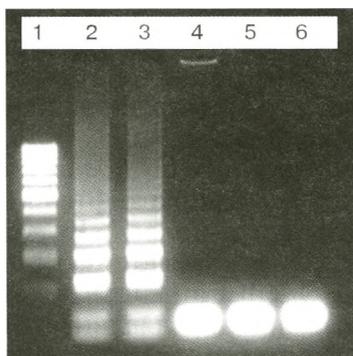
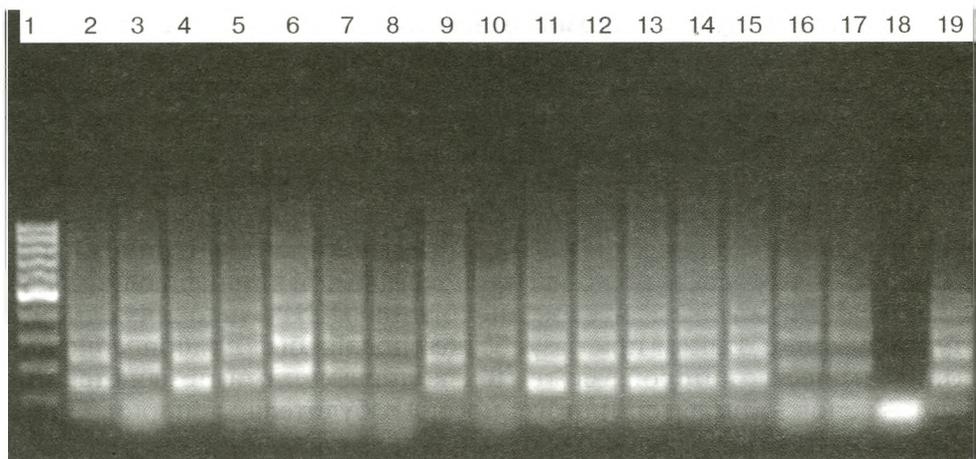


Рис. 1. Типичная электрофореграмма продуктов изотермальной амплификации — ДНК штаммов *S.diphtheriae*.

1 — маркер молекулярных масс 100 bp DNA Ladder Plus; 2 — ДНК токсигенного штамма *S.diphtheriae* биовара *gravis*; 3 — ДНК токсигенного штамма *S.diphtheriae* биовара *mitis*; 4 — ДНК нетоксигенного штамма *S.diphtheriae* биовара *gravis*; 5 — ДНК нетоксигенного штамма *S.diphtheriae* биовара *mitis*; 6 — отрицательный контроль.



**Рис. 2.** Типичная электрофореграмма продуктов изотермальной амплификации — ДНК штаммов *C.diphtheriae*.

1 — маркер молекулярных масс 100 bp DNA Ladder Plus; 2 — 5 — ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *gravis*; 6 — 8 — ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis*; 9 — 11 — ДНК нетоксигенных токснесущих штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis* с механизмом отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина, обусловленным наличием делеции в гене *tox*; 12 — 14 — ДНК нетоксигенных токснесущих штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis* с механизмом отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина, обусловленным наличием мобильного генетического IS элемента в гене *tox*; 15 — 17 — ДНК нетоксигенных токснесущих штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis* с механизмом отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина, обусловленным наличием транспозона в гене *tox*; 18 — отрицательный контроль; 19 — положительный контроль.

эффективности разработанного способа проводилась при параллельных бактериологических исследованиях. Установлено, что положительные сигналы регистрировали во всех образцах, содержащих ДНК токсигенных штаммов *C.diphtheriae* двух биоваров, а также в образцах, содержащих ДНК нетоксигенных токснесущих штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis* с механизмами отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина, обусловленными наличием делеции или мобильного генетического IS элемента в гене *tox*. И положительные сигналы не были обнаружены в образцах, содержащих ДНК нетоксигенных токснесущих штаммов *C.diphtheriae* биовара *mitis* с механизмом отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина, обусловленным наличием транспозона в гене *tox* (рис. 2). Во всех образцах, содержащих ДНК нетоксигенных штаммов *C.diphtheriae* двух биоваров, положительные сигналы отсутствовали.

Оценку аналитической чувствительности разработанного метода проводили при параллельных бактериологических исследованиях. Для этого готовили три линейки последовательных разведений бактериальной культуры контрольного токсигенного штамма *C.diphtheriae* № 665. Далее 100 мкл приготовленной суспензии засеивали на плотную питательную среду КТА и из 100 мкл суспензии выделяли ДНК. Засеянные чашки инкубировали при 37°C. Учет выросших колоний производили через 24 и 48 часов роста. Для выделения ДНК использовали несколько коммерческих наборов: «ДНК-сорбАМ» («АмплиСенс», Москва), «Рибо-преп» («АмплиСенс», Москва), «К-сорб-100» («Синтол», Москва). Исследования показали, что при использовании набора «ДНК-сорбАМ» аналитическая чувствительность составила  $10^4$  ГЭ/мл, набора «К-сорб-100» —  $10^3$  ГЭ/мл и набора «Рибо-преп» —  $10^2$  ГЭ/мл. В связи с чем, для дальнейшей работы использовали набор «Рибо-преп», показавший наибольшую аналитическую чувствительность метода (рис. 3).

Оценка специфичности разработанного ускоренного метода лабораторной

диагностики дифтерийной инфекции проведена на штаммах других представителей рода *Corynebacterium*, которые ранее были выделены из различных микробиоценозов у пациентов и идентифицированы с помощью времяпролетного масс-спектрометра BioMerieux VITEK MS MALDI-TOF («BioMerieux», Франция) и секвенирования 16S rRNA. Список используемых 18 штаммов включал 16 представителей рода *Corynebacterium*: *C. xerosis*, *C. afermentas sub. lipophilum*, *C. tuberculostearicum*, *C. accolens*, *C. coyleae*, *C. amycolatum*, *C. ureicelrivorans*, *C. imitans*, *C. afermentas*, *C. paurometabolum*, *C. urealyticum*, *C. mucifaciens*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. propinquum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. massiliensis*. Исследование показало, что во всех образцах, содержащих ДНК всех изученных представителей рода *Corynebacterium*, положительные сигналы отсутствовали. Специфичность способа оценили на зашифрованных типовых штаммах других микроорганизмов — *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus oligofermentas*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus agalactiae*, *Moraxella catarrhalis*, *Rothia dentocariosa*, *Rothia mucilaginosa*, *Neisseria meningitidis*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella bronchiseptica*. Всего в исследование включено 42 штамма, которые также были идентифицированы с помощью времяпролетного масс-спектрометра BioMerieux VITEK MS MALDI-TOF («bioMerieux», Франция) и секвенирования 16S rRNA. Исследование показало, что во всех образцах, содержащих ДНК других изученных микроорганизмов, положительные сигналы отсутствовали.

Проведена апробация ускоренного метода лабораторной диагностики дифтерийной инфекции в модельных экспериментах на иммитантах клинических образцов. С этой целью готовили три линейки последовательных разведений бактериальной культуры контрольного токсигенного штамма *C. diphtheriae* № 665. Далее 100 мкл приготовленной суспензии заражали одноразовые стерильные тампоны, с которых производили смыв патологического материала в 500 мкл стерильного физиологического раствора и последующее выделение ДНК, и 100 мкл засеивали на плотную питательную среду КТА. Засеянные чашки инкубировали при 37°C, и учет выросших колоний производили через 24 и 48 часов роста. Выделение ДНК с тампонов производили с помощью набора «Рибо-преп». Проведенные исследования показали, что аналитическая чувствительность на иммитантах клинических образцов составила 10<sup>3</sup> ГЭ/мл.

## ОБСУЖДЕНИЕ

За рубежом первые статьи о применении молекулярно-генетических методов при обнаружении возбудителя дифтерии появились в 1990-х годах прошлого века. Pallen M.J. [8] впервые в 1991 году применил метод ПЦР для

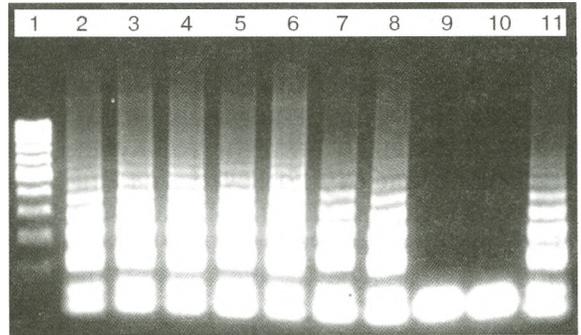


Рис. 3. Типичная электрофореграмма продуктов изотермальной амплификации — ДНК штаммов *C. diphtheriae*.

1 — маркер молекулярных масс 100 bp DNA Ladder Plus; 2 — 10<sup>8</sup> ГЭ/мл; 3 — 10<sup>7</sup> ГЭ/мл; 4 — 10<sup>6</sup> ГЭ/мл; 5 — 10<sup>5</sup> ГЭ/мл; 6 — 10<sup>4</sup> ГЭ/мл; 7 — 10<sup>3</sup> ГЭ/мл; 8 — 10<sup>2</sup> ГЭ/мл; 9 — 10<sup>1</sup> ГЭ/мл; 10 — отрицательный контроль; 11 — положительный контроль.

скрининга токсигенности у коринебактерий дифтерии. В последующие годы ПЦР в классическом варианте стала широко использоваться как отечественными, так и зарубежными исследователями для этих целей [1, 2, 4, 6]. Однако все эти работы были направлены на определение токсигенности у коринебактерий после выделения чистой культуры коринебактерий, что до применения ПЦР занимало от 2 до 4 суток, и не позволяли выявлять возбудителя дифтерии непосредственно в клиническом материале от больного. В 2000-х гг. развитие ПЦР-диагностики при дифтерийной инфекции пошло в направлении разработки ПЦР в режиме реального времени [3, 5, 10, 12]. Вместе с тем, в этих вариантах ПЦР также выявление гена, кодирующего дифтерийный токсин, осуществлялось с чистой культуры коринебактерий. Только в двух работах [9, 10] были предприняты попытки обнаружения гена дифтерийного токсина с помощью ПЦР в режиме реального времени на ограниченном числе иммитантов и клинических образцов. Однако существенным недостатком применения ПЦР в режиме реального времени является высокая стоимость анализа за счет использования дорогостоящего оборудования. Другим направлением развития ПЦР-диагностики стало создание мультиплексных вариантов реакции, которые позволяют выявлять не только ген дифтерийного токсина у коринебактерий дифтерии и коринебактерий ульцеранс, но и дифференцировать эти микроорганизмы между собой [11]. Однако разработка мультиплексных ПЦР-систем имеет ряд трудностей, связанных с качеством проведения реакций и постановкой электрофореза с целью получения характерных паттерных профилей. В 2000 году была разработана амплификация в изотермальных условиях — петлеобразующая амплификация (LAMP) [7], которая в дальнейшем была модифицирована для большого числа возбудителей инфекционных заболеваний. В 2008 г. в международной базе данных NCBI/GenBank была опубликована нуклеотидная последовательность гена дифтерийного токсина размером 300 п.н., которую можно использовать при конструировании праймеров для изотермальной амплификации при выявлении коринебактерий дифтерии.

Учитывая эти данные, нами разработан ускоренный способ лабораторной диагностики дифтерийной инфекции на основе изотермальной амплификации, апробация которого проведена на типовых коллекционных штаммах, полученных из «ГКПМ-Оболensk», а также на 135 штаммах *S.diphtheriae*, выделенных с диагностической и профилактической целью в бактериологических лабораториях субъектов Российской Федерации и присланных в Референс-центр по дифтерии и коклюшу МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского. Все этапы разработки осуществлялись при параллельных бактериологических исследованиях. Установлено, что разработанный способ генодиагностики позволяет выявлять ДНК токсигенных штаммов *S.diphtheriae* двух биоваров, а также ДНК нетоксигенных токснесущих штаммов *S.diphtheriae* биовара *mitis* с механизмами отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина, обусловленными наличием делеции или мобильного генетического IS элемента в гене *tox*. Нетоксигенные токснесущие штаммы *S.diphtheriae* с механизмом отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина, обусловленным наличием транспозона в гене *tox*, идентифицируются как нетоксигенные, а нетоксигенные токснесущие штаммы коринебактерий с механизмами отсутствия экспрессия гена дифтерийного токсина, обусловленными наличием делеции и мобильного генетического элемента IS в гене *tox*, идентифицируются как токсигенные.

Оценку аналитической чувствительности проводили в сравнительных исследованиях при использовании трех коммерческих наборов для выделения

ДНК. При сопоставлении с данными бактериологического исследования аналитическая чувствительность разработанного способа генодиагностики с помощью набора «Рибо-преп» составила  $4,5 \times 10^1$  ГЭ/мл. Специфичность способа оценивалась на 18 штаммах 16 других представителей рода *Corynebacterium* и 20 типовых штаммах микроорганизмов, выделенных из ротоглотки или вызывающих заболевания дыхательных путей. Ни в одном случае не были получены ложноположительные результаты.

Учитывая необходимость выявления возбудителя заболевания непосредственно в клиническом материале с тампона от больных коклюшем без этапа выделения «чистой» культуры с целью сокращения выдачи ответа, нами проведена апробация разработанного способа в модельных экспериментах на иммитантах клинических образцов путем заражения одноразовых стерильных сухих тампонов последовательными разведениями бактериальной культуры. Для этого готовили три линейки последовательных разведений бактериальной культуры контрольного токсигенного штамма *C. diphtheriae* № 665, которые параллельно высевали на чашки с плотной питательной средой. Проведенные исследования показали, что аналитическая чувствительность на иммитантах клинических образцов составила  $10^3$  ГЭ/мл.

Разработанный способ ускоренной генодиагностики дифтерийной инфекции обладает высокой диагностической эффективностью, специфичностью и чувствительностью, позволяющей выявить  $10^3$  —  $4,5 \times 10$  ГЭ/мл коринебактерий дифтерии в клиническом материале с одновременной верификацией токсигенных и нетоксигенных штаммов. На разработанный способ генодиагностики дифтерийной инфекции подана заявка на изобретение (регистрационный № 2016146369 от 25.11.2016 г.).

*Работа выполнена в рамках Гос. НИР МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Aravena-Román M., Bowman R., O'Neill G. Polymerase chain reaction for the detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. *Pathology*. 1995, 27 (1): 71-73. PMID: 7603758.
2. Efstratiou A., Engler K. H., Dawes C. S. et al. Comparison of phenotypic and genotypic methods for detection of diphtheria toxin among isolates of pathogenic *Corynebacteria*. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36: 3173-3177.
3. Mancini F., Monaco M., Pataracchia M. et al. Identification and molecular discrimination of toxigenic and nontoxigenic diphtheria *Corynebacterium* strains by combined real-time polymerase chain reaction assays. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2012, 73 (2): 111-120.
4. Mikhailovich V.M., Melnikov V.G., Mazurova I.K. et al. Application of PCR for detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated during the Russian diphtheria epidemic, 1990 through 1994. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33 (11): 3061-3063.
5. Mothershed E.A., Cassiday P.K., Pierson K. et al. Development of a real-time fluorescence PCR assay for rapid detection of the diphtheria toxin gene. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40 (12): 4713-4719.
6. Nakao H., Popovic T. Development of a direct PCR assay for detection of the diphtheria toxin gene. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35 (7): 1651-1655.
7. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucl. Acids Research*. 2000, 28 (12): 63.
8. Pallen M.J. Rapid screening for toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Pathol.* 1991, 44 (12): 1025-1026.
9. Pimenta F.P., Hirata R., Jr., Rosa A.C. et al. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Corynebacterium diphtheriae* and differentiation between non-toxigenic and toxigenic isolates. *J. Med. Microbiol.* 2008, 57 (11): 1438-1439.
10. Sing A., Berger A., Schneider-Brachert W. et al. Rapid detection and molecular differentiation of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains by LightCycler PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2011, 49 (7): 2485-2489.

11. Torres L. de F., Ribeiro D., Hirata R., Jr. et al. Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium* spp. with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2013, 108 (3). pii: S0074-02762013000300272.
12. Zasada A.A, Formińska K., Wołkowicz T. et al. The utility of the PCR melting profile technique for typing *Corynebacterium diphtheriae* isolates. *Lett Appl. Microbiol.* 2014, 59 (3): 292-298.

Поступила 05.03.17

Контактная информация: Борисова Ольга Юрьевна, д.м.н.,  
125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, р.т. (499)747-64-84

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

А.А.Калошин, А.В.Солдатенкова, Е.М.Зими́на, Н.А.Михайлова

## ПОЛУЧЕНИЕ СЛИТЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ OprF-ΔOprI, ΔOprF-ΔOprI И OprF-aTox-ΔOprI PSEUDOMONAS AERUGINOSA

НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

*Цель.* Получение слитых рекомбинантных белков *Pseudomonas aeruginosa*, обладающих защитными свойствами от экспериментальной синегнойной инфекции. *Материалы и методы.* В плаزمидах, предназначенных для экспрессии в клетках *Escherichia coli*, клонированы слитые последовательности генов oprF, oprI и делеционной формы toxA *P. aeruginosa*. Синтезированные рекомбинантные белки очищали в колонках с никель-сефарозой. При оценке защитных свойств препараты рекомбинантных белков вводили мышам внутривентриально двукратно с двухнедельным интервалом. При экспериментальном заражении живую вирулентную культуру *P. aeruginosa* штамма PA103 инъецировали животным внутривентриально через две недели после курса иммунизаций. *Результаты.* Получены три слитых рекомбинантных белка: 1. OprF-ΔOprI включал полноразмерную последовательность белка OprF и делеционный вариант белка OprI (с отсутствием первых 20 аминокислотных остатков); 2. ΔOprF-ΔOprI состоял из C-концевой области (192 — 342 аминокислотные остатки) OprF и делеционного варианта белка OprI; 3. OprF-aTox-ΔOprI включал полноразмерную последовательность белка OprF, последовательность нетоксичного варианта экзотоксина А (без 106 C-концевых аминокислотных остатков) и делеционный вариант белка OprI. Показано, что наилучшими защитными свойствами обладали слитые рекомбинантные белки OprF-ΔOprI и OprF-aTox-ΔOprI в иммунизирующих дозах 25 мкг и 50 мкг на животное соответственно для первого и второго белков. *Заключение.* Полученные результаты открывают перспективы для дальнейших исследований по созданию специфических иммунобиологических препаратов на основе слитых рекомбинантных белков синегнойной палочки.

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 32—38

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, белок F наружной мембраны (OprF), белок I наружной мембраны (OprI), экзотоксин А, анатоксин, слитые рекомбинационные белки OprF-ΔOprI, ΔOprF-ΔOprI и OprF-aTox-ΔOprI

А.А.Kaloshin, А.В.Soldatenkova, Е.М.Zimina, N.A.Mikhailova

## OBTAINING FUSED RECOMBINANT PROTEINS OprF-ΔOprI, ΔOprF-ΔOprI AND OprF-aTox-ΔOprI OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

*Aim.* Obtaining fused recombinant proteins of *Pseudomonas aeruginosa* that have protective properties against experimental pseudomonas infection. *Materials and methods.* Fused sequences of *P. aeruginosa* genes oprF, oprI and deleted form of toxA were cloned in plasmids for the expres-