

МЕТОД *IN VITRO* ВОССТАНОВЛЕНИЯ ТОКСИНОПРОДУКЦИИ ФЕНОТИПИЧЕСКИ НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ РОДА *CORYNEBACTERIUM*, СОДЕРЖАЩИХ «МОЛЧАЩИЙ» ГЕН ТОКСИГЕННОСТИ

С.А. Габриелян

Национальный институт здравоохранения им. акад. С.Х. Авдалбекяна, МЗ Республики Армения, Ереван, Республика Армения

Резюме. Разработан «метод *in vitro*» для экспрессии токсинопродукции фенотипически нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae*, содержащих «молчащий» ген токсигенности. Метод ускоренный, экономичный, не требующий использования экспериментальных животных, доступный практическим и научным лабораториям. Определены оптимальные условия использования метода: средства, среды, кратность пассажей, обеспечивающих восстановление токсинопродукции испытуемых штаммов. Методом *in vitro* была восстановлена токсинопродукция у 10 из 18 испытуемых штаммов *C. diphtheriae* с «молчащим» геном токсигенности, а также усилено токсинообразование *C. ulcerans* и *C. diphtheriae* var. *intermedius* до уровня, позволяющего выявлять токсин в общепринятых тестах. Фенотип токсигенности определяли в Elek-тесте и ICS (иммунохроматографический тест).

Ключевые слова: дифтерийный токсин, «молчащий» ген токсигенности, восстановление токсинопродукции.

IN VITRO METHOD FOR EXPRESSION OF TOXIN PRODUCTION IN NON-TOXIGENIC *CORYNEBACTERIUM* SPP. WITH “SILENT” TOX-GENE

Gabrielyan S.H.

National Public Health Institute named after S.Kh. Avdalybekian, Ministry of Health, Yerevan, Armenia

Abstract. The «in vitro method» for expression of toxin-production by phenotypically non-toxigenic strains of *C. diphtheriae* containing the “silent” toxin gene has been developed. The method can be characterised as rapid, economical, not demanding use of experimental animals, available to practical and scientific laboratories. Optimal conditions using this method were defined: nutrient mediums, frequency rate of passages, which provided restoration of toxin production. This method allowed to restore toxin-production in 10 out of 18 tested strains of *C. diphtheriae* with the “silent” toxin gene. Moreover, there was an increase of toxin production of by *C. ulcerans* and *C. diphtheriae* var. *intermedius* to the level allowing to detect toxin in the standard tests. The phenotype of a toxin-producing was defined by the Elek-test and ICS (immune-chromatography set).

Key words: diphtheritic toxin, «silent» toxin gene, restoration of toxin-producing.

Адрес для переписки:

Габриелян Сильва Амбарцумовна
0051, Армения, Ереван, ул. Комитаса, 49, кв. 4.
Тел.: (3741) 23-69-01.
E-mail: silva.gabrielyan.53@mail.ru

Contacts:

Silva H. Gabrielyan
0051, Armenia, Yerevan, Komitasa str., 49, 4.
Phone: (3741) 23-69-01.
E-mail: silva.gabrielyan.53@mail.ru

Библиографическое описание:

Габриелян С.А. Метод *in vitro* восстановления токсинопродукции фенотипически нетоксигенных штаммов рода *Corynebacterium*, содержащих «молчащий» ген токсигенности // Инфекция и иммунитет. 2014. Т. 4, № 4. С. 375–380. doi: 10.15789/2220-7619-2014-4-375-380

Citation:

Gabrielyan S.H. In vitro method for expression of toxin production in non-toxigenic *Corynebacterium* spp. with “silent” tox-gene // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2014, vol. 4, no. 4, pp. 375–380. doi: 10.15789/2220-7619-2014-4-375-380

Введение

Развитие дифтерийной инфекции определяется ведущим фактором вирулентности возбудителя — токсинообразованием *C. diphtheriae*. В этой связи решающим этапом в микробиологической диагностике дифтерии является выявление токсигенности изолированных штаммов. В то же время не все штаммы *C. diphtheriae*, способные продуцировать токсин, можно выявить в общепринятом тесте иммунопреципитации. Этим обусловлена различная клиническая и эпидемиологическая значимость токсигенных и нетоксигенных штаммов коринебактерий. В этой связи на этапе идентификации возбудителя чрезвычайно важно получить точные данные о фенотипе токсигенности штаммов, особенно когда клинический диагноз сопровождается выделением нетоксигенных штаммов дифтерийного микроба.

Ранее для восстановления токсигенности коринебактерий в условиях *in vivo* предлагались ряд моделей с использованием различных экспериментальных животных, заражением куриных эмбрионов. Исследования Е.Е. Щедеркиной (2001 г.) о взаимоотношении *C. diphtheriae* с организмом морских свинок, зараженных парентерально, показали их высокую чувствительность и возможность изолировать коринебактерии с восстановленной токсигенностью [4].

С учетом сходства молекулярного строения и механизмов действия экзотоксинов синегнойной палочки и коринебактерий дифтерии, нами была модифицирована разработанная Е.А. Падейской (1983) модель внутримозгового заражения мышей для изучения вирулентности *P. aeruginosa* и адаптирована С.А. Габриелян (1985) для восстановления токсинопродукции *C. diphtheriae* [1, 3]. Применяли интрацеребральный путь заражения, при котором испытуемый материал вводили около средней линии черепа на 2–3 мм выше глазницы. Для заражения использовали штамм *C. diphtheriae* var. *mitis* 70 с «молчащим» геном токсигенности. Гибели мышей в течение срока наблюдения (5 сут.) не отмечали. По истечении этого срока усыпляли мышей хлороформом и в асептических условиях забирали мозговую ткань. Пробы растирали в стерильной ступке в физиологическом растворе, заседали на кровяной агар Колумбия. Чашки с посевами инкубировали в термостате в течение 18–24 ч при температуре 37°C. Выросшие колонии микроскопировали и идентифицировали с использованием основных биохимических тестов, определяли токсигенность в тесте иммунопреципитации (Elek-тесте). После трехкратного пассажа испытуемого штамма на модели менингоэнцефалита мышей при определении токсигеннос-

ти в Elek-тесте были получены четкие линии преципитации.

Целью дальнейших исследований была разработка метода *in vitro* для экспрессии токсинопродукции фенотипически нетоксигенных коринебактерий с «молчащим» геном токсигенности.

Материалы и методы

Метод был отработан с использованием фенотипически нетоксигенного штамма *C. diphtheriae* var. *mitis* 570 с «молчащим» геном токсигенности (из коллекции НИИЭМ им. Пастера (Санкт-Петербург) и опробован на 20 штаммах потенциально токсигенных коринебактерий разных биохимических вариантов и *C. ulcerans*, нетоксигенных, либо слаботоксигенных в общепринятом Elek-тесте. Из них 15 штаммов были охарактеризованы в ПЦР как фенотипически нетоксигенные с «молчащим» геном токсигенности (предоставлены Лабораторией Бактериальных и Системных инфекций, PHLS, London, UK, руководитель лаборатории, доктор А. Efstratiou, где и проводилось испытание метода); 3 штамма *C. diphtheriae* var. *mitis* — нетоксигенные в фенотипических тестах без характеристики в ПЦР, были изолированы в постэпидемический период в Армении в группе высокого риска (военнослужащие) от «здоровых» бактерионосителей, были включены в исследование с целью выяснения их потенциальной патогенности; 2 слаботоксигенных штамма — *C. ulcerans* и *C. diphtheriae* var. *gravis*.

Фенотип токсигенности определяли общепринятым методом иммунопреципитации в Elek-тесте и ICS (иммунохроматографический тест).

Использованы также: Илек-агар для определения токсигенности коринебактерий (PHLS, UK); Илек-агар-0,3%; Илек-бульон (PHLS, UK); агар Колумбия (CM 331, Oxoid); стерильная дефибрированная кровь; сыворотка новорожденных телят (ICN Flow Laboratories) или сыворотка инактивированная коммерческая (Россия); гемодиализный целлофан «искусственная почка» (x-100); высокотоксигенный штамм *C. diphtheriae* var. *gravis*, NCTC 10648; стерильные чашки Петри; стерильная фильтровальная бумага, пипетки, пинцеты, бактериологическая петля.

Постановка метода *in vitro*: испытуемый нетоксигенный штамм коринебактерии дифтерии с «молчащим» геном токсигенности подращивали в сывороточном бульоне (5 объемов бульона и 1 объем сыворотки) в течение 5–6 ч при температуре 37°C в аэробных условиях. Затем расплавляли и остужали до 40°C 15 мл Илек-агара, добавляли в него 3 мл сыворотки ново-

ТАБЛИЦА 1. ЭКСПРЕССИЯ ТОКСИНОПРОДУКЦИИ НЕТОКСИГЕННЫХ *C. DIPHTHERIAE* VAR. *MITIS* С «МОЛЧАЩИМ» ГЕНОМ ТОКСИГЕННОСТИ МЕТОДОМ *IN VITRO*

Вид, биовариант	Число штаммов N = 16	Исходная токсигенность			Токсигенность после пассажа 1		Токсигенность после пассажа 2		Токсигенность после пассажа 3	
		ПЦР	ICS	Elek-тест	ICS	Elek-тест	ICS	Elek-тест	ICS	Elek-тест
<i>C. diphtheriae</i> var. <i>mitis</i>	6/37,5%	+	–	–	±	–	+	+	+	+
	7/43,8%	+	–	–	–	–	–	–	–	–
	2/12,5%	НО	–	–	–	–	+	–	+	+
	1/6,3%	НО	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечания: ПЦР — полимеразная цепная реакция; (+) — тест положительный; (±) — тест слабоположительный; (–) — тест отрицательный; НО — тест не определялся.

рожденных телят и 1 мл взвеси подорошенной культуры, тщательно перемешивали и заливали в стерильную чашку Петри. После застывания Илек-агара с культурой чашки подсушивали в термостате в течение 20–30 мин. С помощью стерильных пинцетов на поверхность подсушенной среды накладывали предварительно стерилизованный кипячением в дистиллированной воде гемодиализный целлофан. Поверхность целлофана высушивали стерильной фильтровальной бумагой, после чего на эту поверхность в виде бляшки наносили 3–5 капель 0,3% Илек-агара с сывороткой. В бляшку засеивали суточную культуру высокотоксигенного штамма *C. diphtheriae*. Закрытые чашки, крышками вверх, инкубировали в течение 18–24 ч при температуре 37°C.

В этих условиях постановки гемодиализный целлофан препятствовал проникновению бактериальных клеток высокотоксигенного штамма в Илек-агар с испытуемым штаммом (нижний слой), пропуская при этом продуцируемый им экзотоксин. Через сутки осторожно удаляли гемодиализный целлофан с высокотоксигенным штаммом.

С зоны подавления роста под каплей (бляшкой) делали высеив в сывороточный бульон для накопления испытуемого штамма и повторяли пассаж. После 1–3 пассажей указанным методом с зоны подавления роста под бляшкой делали высеив на кровяной агар Колумбия, накапывали культуру и проверяли токсинообразование в Elek-тесте и ICS.

Алгоритм постановки метода экспрессии токсинопродукции нетоксигенных коринебактерий с «молчащим» геном токсигенности представлен на рисунке.

Результаты

При разработке метода *in vitro* учитывался факт, что единственным резервуаром для сохранения коринебактерий дифтерии является носоглотка человека. Присутствие у бактерионосителей токсигенных/нетоксигенных *C. diphtheriae*

совместно, а также других условно-патогенных микроорганизмов и продуктов их метаболизма, при определенных условиях в макроорганизме могут стать фактором, способствующим экспрессии токсинопродукции коринебактерий, фенотипически нетоксигенных, но содержащих «молчащий» ген токсигенности.

Принцип метода заключается в воздействии на нетоксигенную дифтерийную палочку с «молчащим» геном токсином высокотоксигенного штамма *C. diphtheriae*, исключая при этом их совместный рост. Для создания таких условий нами был использован гемодиализный целлофан с односторонней проницаемостью, который исключал проникновение токсигенного штамма в среду с испытуемым штаммом, обеспечивая при этом диффузию дифтерийного токсина. В результате исследований отработан оптимальный вариант метода, определены оптимальное количество и концентрация взвеси испытуемого штамма, используемые питательные среды, кратность пассажей, обеспечивающих экспрессию токсинообразования.

Результаты экспрессии токсинопродукции нетоксигенных *C. diphtheriae* var. *mitis* с «молчащим» геном токсигенности представлены в табл. 1.

При контроле токсигенности использованы референтные штаммы: токсигенный, слаботоксигенный и нетоксигенный (NCTC10648 tox+; NCTC3984 tox±; NCTC10356 tox–).

До пассажа все 16 штаммов в фенотипических тестах были охарактеризованы как нетоксигенные. После первого пассажа в тесте ICS (более чувствительный, чем Elek-тест) 6 штаммов проявили слабую токсигенность. После второго пассажа у этих штаммов токсигенность определялась в иммунохроматографическом тесте и образованием четких линий преципитации в Elek-тесте. Два штамма из трех, не охарактеризованных в ПЦР, после 2-го и 3-го пассажей также продуцировали токсин, определяемый в ICS и Elek-тесте. Наряду с этим, после пятикратного пассажа у 8 штаммов не удалось определить токсигенность в фенотипических тестах. Опы-

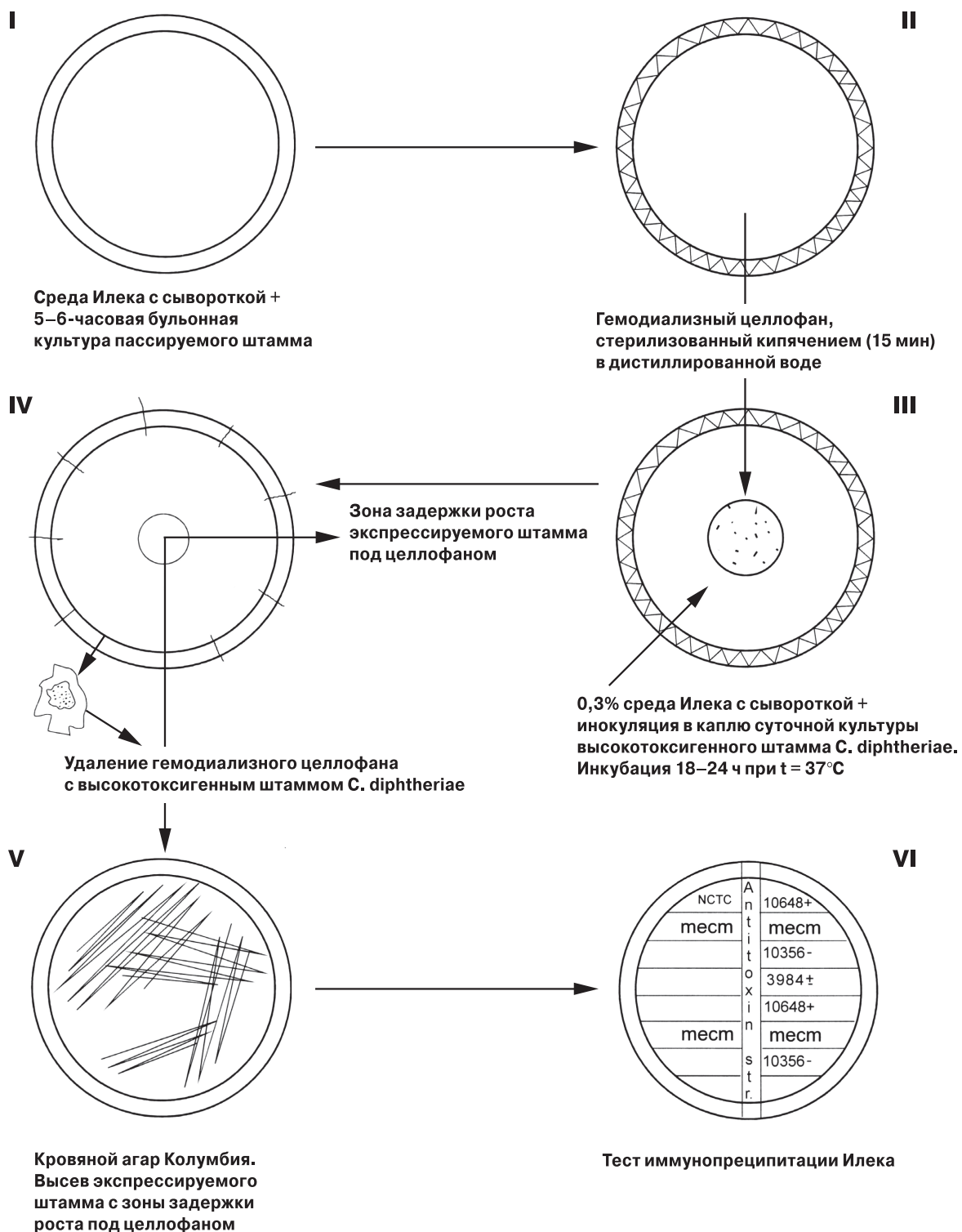


Рисунок. Восстановление токсинопродукции нетоксигенных *C. diphtheriae* с «молчащим» геном токсигенности методом *in vitro*

ТАБЛИЦА 2. ЭКСПРЕССИЯ ТОКСИНОПРОДУКЦИИ ФЕНОТИПИЧЕСКИ НЕТОКСИГЕННЫХ СЛАБОТОКСИГЕННЫХ КОРИНЕБАКТЕРИЙ МЕТОДОМ *IN VITRO*

Вид, биовар штамма	Число штаммов N = 4	Исходная токсигенность			Токсигенность после пассажа 1		Диссоцианты	Токсигенность после пассажа 2		Токсигенность после пассажа 3	
		ПЦР	ICS	Elek-тест	ICS	Elek-тест		ICS	Elek-тест	ICS	Elek-тест
<i>C. ulcerans</i>	1	+	±	-	+	±	К	+	+	+	+
							М	±	±	+	+
<i>C. diphtheriae</i> var. <i>gravis</i>	1	+	-	-	±	-	-	+	±	+	+
	1	+	±	±	+	±	-	+	+	+	+
<i>C. diphtheriae</i> var. <i>intermedius</i>	1	+	-	-	±	-	К	-	-	-	-
							С	+	+	+	+
							М	-	-	-	-

Примечания: (+) — тест положительный; (±) — тест слабоположительный; (-) — тест отрицательный; к — крупные колонии; с — средние колонии; м — мелкие колонии.

ты показали, что, как правило, восстановление токсинопродукции штаммов коринебактерий с «молчащим» геном происходит после второго-третьего пассажей, либо не происходит вообще.

В табл. 2 представлены результаты усиления токсинопродукции слаботоксигенных коринебактерий.

При контроле токсигенности использовали референтные штаммы: токсигенный, слаботоксигенный, нетоксигенный (NCTC 10648 tox+; NCTC 3984 tox±; NCTC 10356 tox-).

Первый пассаж штаммов *C. ulcerans* и *C. diphtheriae* var. *intermedius* привел к образованию диссоциантов по величине колоний: крупных, средних и мелких. Крупные и мелкие колонии *C. ulcerans* после третьего пассажа продуцировали токсин, определяемый в фенотипических тестах. Несколько иначе вели себя диссоцианты *C. diphtheriae* var. *intermedius*: токсигенность крупных и мелких колоний даже после третьего пассажа не восстановилась, в то время как у средних по величине колоний токсигенность определялась в тестах ICS и Elek-тесте уже после второго пассажа. Это свидетельствовало о внутриштаммовой гетерогенности по признаку токсигенности этих микроорганизмов.

Штаммы *C. diphtheriae* var. *gravis* в результате пассажей не диссоциировали по величине колоний: один штамм восстановил токсинопродукцию, а у второго штамма усиление ток-

синопродукции позволило визуализировать токсигенность в фенотипических тестах.

Таким образом, испытания оригинального метода экспрессии токсинопродукции фенотипически нетоксигенных коринебактерий в условиях *in vitro* показали возможность экспрессии токсинообразования дифтерийных возбудителей без дополнительных условий использования экспериментальных животных. Исследования также показали, что метод может быть применен как для восстановления токсинообразования коринебактерий, содержащих «молчащий» ген токсигенности, так и для усиления токсинопродукции слаботоксигенных штаммов до уровня, позволяющего визуализировать определение токсина в общепринятых тестах.

Благодарности

Автор статьи выражает благодарность лаборатории бактериальных инфекций Санкт-Петербургского НИИЭМ имени Пастера (руководитель — д.м.н., проф. Г.Я. Ценева), а также PHLS Respiratory and Systemic Infection Laboratory, London, UK (руководитель — доктор А. Efstratiou) за предоставление охарактеризованных в ПЦР штаммов коринебактерий, а также создание возможности апробации метода в PHLS, London, UK.

Список литературы/References

1. Габриелян С.А. Некоторые биологические характеристики *Ps. aeruginosa* и их значение для лабораторной диагностики: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 1985. 23 с. [Gabrielyan S.H. Several biological characteristics of *Ps. aeruginosa* and their significance for laboratory diagnostics. Autoref. cand. med. sci. diss. Moscow, 1985, 23 p.]
2. Метод *in vitro* восстановления токсинопродукции фенотипически нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae*, содержащих «молчащий» ген токсигенности: патент на изобретение № 1852 А2, 15.12.2006 г. / Габриелян С.А. [In vitro method for expression of toxin production in non-toxigenic *Corynebacterium* spp. with «silent» tox-gene. Patent invention, no. 1852 А2, 15.12.2006 / Gabrielyan S.H.]

3. Падейская Е.Н. Производные хиноксалина и сульфаниламида в химиотерапии бактериальных инфекций: дис. ... д-ра фарм. наук. М., 1983. 41 с. [Padeyskaya E.N. Derivatives of quinoxaline and sulfanilamide in chemotherapy of bacterial infections. Dr. pharm. sci. diss. Moscow, 1983, 41 p.]
4. Щедеркина Е.Е. Основные патогенные свойства *C. diphtheriae* и усовершенствование лабораторной диагностики дифтерийной инфекции: дис. ... канд. мед. наук. СПб., 2001. 20 с. [Shederkina E.E. The main pathogenic properties of *C. diphtheriae* and improvement of diphtheria infection laboratory diagnostic. Cand. med. sci. diss. SPb., 2001, 20 p.]

Автор:

Габриелян С.А., к.м.н., доцент, руководитель Научно-практического центра микробиологических исследований Национального института здравоохранения им. акад. С.Х. Авдалбеяна Министерства здравоохранения Армении, Ереван, Армения.

Author:

Gabrielyan S.H., PhD (Medicine), Associate Professor, Head of the Scientific and Practical Centre of Microbiological Researches, National Institute of Health named after Academician S.Kh. Avdalbekyan, Ministry of Health, Republic of Armenia, Yerevan, Armenia.

Поступила в редакцию 10.06.2014
Отправлена на доработку 16.06.2014
Принята к печати 11.11.2014

Received 10.06.2014
Revision received 16.06.2014
Accepted 11.11.2014