

ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ ТЕСТ ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *C.ULCERANS* И *C.DIPHThERIAE*

**Ломакин А.А., магистрант факультета ветеринарной
медицины и биотехнологии,**

Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор,

**Масиленко А.В., кандидат биологических наук, доцент,
Барт Н.Г., кандидат биологических наук, доцент, Пронин К.Н.**

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, Ульяновск, Россия

Борисова О. Ю.

**ФБУ «Московский научно-исследовательский институт
микробиологии и биотехнологии им Г.Н. Габричевского»,**

Москва, Россия

Ключевые слова: *Corynebacterium ulcerans*, *C. diphtheria*, ПЦР в режиме «реального времени», β -профаг, дифференциация микроорганизмов.

В данной работе представлена разработка ПЦР-теста для выявления специфических фрагментов гена дифтерийного токсина у вирулентных штаммов *C. ulcerans* и *C. diphtheriae* с использованием разработанной праймерной системы.

Введение. Микробиологическая дифференциация патогенных для человека и животных видов коринебактерий в настоящее время не представляет серьезной проблемы. Тем не менее, существуют определенные ограничения в дифференциации патогенных и непатогенных штаммов. Среди видов *Corynebacterium*, особый интерес представляет *Corynebacterium ulcerans*, патогенные штаммы которого продуцируют дифтерийный токсин. Так D. Taylor et al. (2002) сообщили об изоляции вирулентных штаммов возбудителя от домашних кошек. У человека, чаще всего, наблюдаются клинические симптомами фарингита, однако не редки случаи поражения вирулентными штаммами *C. ulcerans* с развитием характерных симптомов, схожих с классической дифтерией. Это объясняется наличием в хромосоме возбудителя генов, умеренного конвертирующего β -профага, названного коринефагом, и несущим оперон дифтерийного токсина.

Нами была поставлена цель разработать идентификационный тест штаммов *C. ulcerans*, несущих ген дифтерийного токсина и его ре-

гулятор, с применением метода ПЦР в режиме «реального времени».

Материалы и методы. Работа была выполнена в лаборатории молекулярно-генетических исследований кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА им П.А. Столыпина.

В работе были использованы штаммы *C. ulcerans*, *C. ulcerans tox.* (токсигенный), *C. xerosis*, *C. minutissimum*, *C. jeikeium*, *C. diphtheriae*, *C. diphtheriae tox.* (токсигенный) из музея кафедры, олигонуклеотиды DT-f ata-ggg-gcc-cca-cct-tca-g, DT-r tct-tcc-gtt-ccg-act-tgc-tc, toxR-f aga-cga-act-cgg-tgt-ttc-cc, toxR-r gcc-aat-tcg-aat-gtc-tgc-gt. Для амплификации в работе использовали «Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ с интеркалирующим красителем EvaGreen, Taq-ДНК-полимеразой и ингибирующими активность фермента антителами» («Синтол», Москва), а также детектирующий амплификатор ДТ-96 («ДНК-Технология», Москва).

Результаты исследований. При помощи ресурса NCBI Blast нами были разработаны олигонуклеотиды для детекции дифтерийного токсина DT и его регулятора toxR. После подбора, выравнивания и оптимизации олигонуклеотидов была оптимизирована программа амплификации для проведения ПЦР в режиме «реального времени»:

1. 95°C – 5 мин. – 1 цикл
2. 95°C – 10 сек.
60°C – 20 сек. – 35 циклов
3. 72°C – 1 мин. – 1 цикл.

После ряда проведенных экспериментов было определено оптимальное количество праймеров в реакциях: 8 пмоль на реакцию объемом 25 мкл – для детекции участка дифтерийного токсина, 10 пмоль – для детекции участка ДНК гена-регулятора экспрессии дифтерийного токсина.

Результаты амплификации отражены в таблице 1.

Выводы. В результате проведенных экспериментов нами был разработан ПЦР-тест для выявления специфических фрагментов гена дифтерийного токсина у вирулентных штаммов *C. ulcerans* и *C. diphtheriae* с использованием разработанной праймерной системы. Также была разработана система праймеров для детекции участка гена-регулятора экспрессии дифтерийного токсина и оптимизирована программа амплификации для прибора ДТ-96 с детекцией в режиме «реального времени». Совместное использование данных систем при идентификации

Таблица 1 – Cp Fam при RT-PCR проб с содержанием ДНК штаммов коринебактерий

Идентификатор	Cp Fam	Cp Fam
	DT	toxR
<i>C. ulcerans</i> C125	-	-
<i>C. ulcerans</i> tox. 1568	24,3	18,5
<i>C. xerosis</i> 2455	-	-
<i>C. minutissimum</i> Cm36	-	-
<i>C. jeikeium</i> 25/14	-	-
<i>C. diphtheriae</i> 74	-	-
<i>C. diphtheriae</i> tox. 1981	25,2	20,6
<i>C. ulcerans</i> 2415 tox.	28,6	27,3
<i>C. ulcerans</i> 2214 tox.	22,4	19,2
<i>C. diphtheriae</i> 168 tox.	26,1-	24,5
Отрицательный контроль	-	-
Отрицательный контроль	-	-

токсигенных штаммов *C. ulcerans* и *C. diphtheriae* позволяет определить как специфический участок дифтерийного токсина, так и его регулятор. Также в результате экспериментов установлена аналогия участков отжига разработанных систем праймеров на культурах как *C. ulcerans*, так и *C. diphtheriae*, что может свидетельствовать об их гомологичности в структуре оперона дифтерийного токсина.

IDENTIFICATION TEST TOXIGENIC STRAINS OF *C.ULCERANS* И *C.DIPHTHERIAE*

**Lomakin A. A., Vasilyev D. A., Masterenko, A.V., Bart N. G.,
Pronin K. N., Borisova O. Yu.**

Key words: *Corynebacterium ulcerans*, *C. tetanus*, PCR in “real time,” β -prophage, differentiation of microorganisms.

This paper presents the development of a PCR test for the detection of specific gene fragments of diphtheria toxin from virulent strains of C. ulcerans and C. diphtheriae using the developed primerno system.