

## НОВІ ПІДХОДИ ДО ПИТАНЬ ІДЕНТИФІКАЦІЇ УМОВНО-ПАТОГЕННИХ КОРИНЕБАКТЕРІЙ ТА МІКОБАКТЕРІЙ

Одеський державний медичний університет

Останнім часом у літературі часто повідомляється про роль мікроорганізмів у виникненні захворювань, що вважаються на даний час непатогенними або умовно-патогенними. Значною мірою ця проблема стосується збудників інфекцій дихальних шляхів, у тому числі туберкульозу. На думку більшості авторів, однією з головних причин подібних випадків є розповсюдження ВІЛ-інфекції, інших імунодефіцитів, а також нераціональна антибактеріальна терапія [1].

У низці публікацій [2] повідомляється про випадки дифтерії, в тому числі комбінованих і токсичних форм, коли у хворих були виділені умовно-патогенні представники роду *Corynebacterium* (*C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans*, *C. хероіс* та ін.). Токсигенних *C. diphtheriae* у цих випадках виявлено не було, а введення протидифтерійної сироватки було малоефективним. Це обумовлює необхідність пошуку нових схем раціональної етіопатогенетичної терапії, тому що фактори патогенності цих мікроорганізмів практично не вивчені. Не до кінця зрозумілі причини конверсії умовно-патогенних бактерій, а також їх істинна роль в етіології запального процесу [2; 3].

Аналогічну картину спостерігають і фтизіатри. Крім збудників туберкульозу людського та бичачого типів, при легеневої та шкірній патології, лімфаденітах, кон'юнктивітах, запаленнях уrogenітальної системи у хворих виділяються понад 20 різних видів мікобактерій,

серед яких найбільш поширені *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. phlei*, *M. fortuitum*. Повідомлення про відкриття нових видів мікобактерій з'являються практично щорічно, але ідентифікація і встановлення етіологічної ролі мікобактерій у розвитку патологічного процесу пов'язані зі значними труднощами [4; 5]. Наукові дослідження у цьому напрямку мають важливе практичне значення, тому що мікобактеріози нерідко перебігають несприятливо, важко піддаються терапії, характеризуються тривалим бактеріовиділенням, частими рецидивами [5; 6].

Загальною проблемою у клініці та діагностиці мікобактеріозів і захворювань, що викликані умовно-патогенними коринебактеріями, є складність їх видоідентифікації, а також визначення чутливості та резистентності до антибактеріальних препаратів. Бактеріологічні методи досліджень, що широко застосовуються у лабораторіях нашої держави, на жаль, за своєю чутливістю, швидкістю та відтворюваністю не зовсім відповідають вимогам клініки. У зв'язку з цим звертають на себе увагу методи ДНК-діагностики, що ґрунтуються на вивченні та порівнянні досліджуваних геномів об'єктів. Одним з найбільш сучасних, точних, а також доступних, експресивних і надійних методів є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) та її різновиди.

Раніше [7; 8] було доведено можливості специфічної ПЛР у діагностиці дифтерії та туберкульозу. Однак у клініці міко-

бактеріозів і захворювань, спричинених недифтерійними коринебактеріями, ми маємо справу з великою кількістю видів мікроорганізмів. У зв'язку з цим, крім специфічної ПЛР з парою праймерів, звертають на себе увагу методи ПЛР-генотипування, що дозволяють проводити порівняння та ідентифікацію геномів організмів за допомогою так званих універсальних, або випадкових, праймерів. Серед цих методів нами був обраний метод RAPD-аналізу (Random Amplified Polymorphic DNA) із застосуванням одного праймера до довільних сайтів у геномі мікроорганізмів, один або кілька з яких є поліморфними [9]. При цьому продуктом ампліфікації є так званий ПЛР-патерн — низка фрагментів ДНК різної молекулярної маси, що помітні на електрофореграмі у агарозному гелі у вигляді дискретних смуг.

Порядок та яскравість освітлення окремих смуг є критеріями розрізнення патернів. Застосування сучасних комп'ютерних програм дозволяє встановити ступінь спорідненості досліджуваних організмів. На нашу думку, цей метод є досить точним, він не потребує подальшої гібридизації, відносно простий і може бути застосованим у практичній лабораторній діагностиці.

Метою нашої роботи було проведення порівняння та ідентифікації геномів різних видів мікроорганізмів родів *Corynebacterium* і *Mycobacterium* методом ПЛР-генотипування з довільними праймерами.

## Матеріали та методи дослідження

Нами було досліджено 42 чисті культури коринебактерій *C. diphtheriae* var. *Gravis* et *Mitis*, *C. pseudotuberculosis*, *C. xerosis*, *C. ulcerans*, що були виділені у хворих на дифтерію, ангіни і бактеріоносіїв, 10 культур мікобактерій людського виду, що були виділені у хворих на різні форми легеневого туберкульозу, а також референтні штами *C. diphtheriae*, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. intracellulare* (таблиця).

Виділення ДНК із мікроорганізмів проводили шляхом лізису клітин із застосуванням детергента Triton X-100, при цьому фрагмент колонії з агару суспендували у 50 мкл 2%-го водного розчину Triton X-100, інкубували 50 хв при 95 °С в мікротермостаті. Суміш центрифугували при 10 000 хв<sup>-1</sup> протягом 15 хв, надосадову рідину у кількості 2,5 мкл застосовували як матрицю у ПЛР.

Для проведення ПЛР використовували 2 довільних праймери № 19 і № 45, що були надані проф. Л. О. Носкіним (відділ радіаційної біофізики Санкт-Петербурзького НДІ ядерної фізики РАН, м. Гатчина, Росія).

Продукти електрофорезу аналізували у 1,5%-му агарозному гелі, що був забарвлений бромистим етидієм. Фіксування результатів досліджень здійснювали за допомогою відеосистеми “Gel Imager” («ДНК-діагностика», Росія). Математичну обробку з подальшим диференціюванням ПДР-патернів

здійснювали із застосуванням програм “Gel Analysis” і “Trees”.

## Результати дослідження та їх обговорення

На першому етапі досліджень нами було поставлене завдання визначити можливості застосування RAPD-аналізу та ідентифікувати патогенні мікроорганізми — збудники захворювань легень і дихальних шляхів. За об’єкт досліджень були обрані референтні (верифіковані) штами мікобактерій — збудників туберкульозу людського та бичачого типів, а також атипичних, або нетуберкульозних мікобактерій (*M. avium* і *M. intracellulare*).

Результати RAPD-аналізу ДНК референтних штамів мікобактерій різних видів подано на рис. 1. До недавнього часу можливості обробки результатів ДНК-генотипування були обмежені візуальним порівнянням ПЛР-патернів організмів. Щоправда, очевидно, що праймер № 19 дозволив виявити найбільшу кількість низькомолекулярних фрагментів у патернах нетуберкульозних мікобактерій (доріжки 2 і 3), і, навпаки, у мікобактерій бичачого та людського типів спостерігається ампліфікація більш високомолекулярних фрагментів (доріжки 4 і 5). Помітні відмінності між ПЛР-патернами типових (доріжки 6, 9, 10) і атипичних (доріжки 7, 8) мікобактерій і при застосуванні праймера № 45.

Однак при візуальному аналізі електрофореграм немичуче існують елементи суб’єк-

тивізму, які нині усунені за рахунок використання комп’ютерних програм обробки і аналізу зображень. З метою поглибленого вивчення результатів RAPD-аналізу нами був застосований комплекс програм “Gel Analysis” («ДНК-діагностика», Росія), який дозволяє здійснювати оцифрування зображення, побудову профілограм відносної оптичної щільності окремих ДНК-патернів та їх порівняння. На підставі результатів математичної обробки профілів можливим є об’єктивне порівняння ДНК-патернів та подальша ідентифікація мікроорганізмів. Результати такого аналізу подано на рис. 2.

За результатами дослідження, при застосуванні праймера № 19 виявляється, що для збудників туберкульозу (гістограми 4, 5) характерною є наявність піків оптичної щільності (а) у високомолекулярній та велика група близьких за молекулярною масою фрагментів у низькомолекулярній ділянках (б). Для нетуберкульозних мікобактерій більш характерними є піки у середньомолекулярній (в) та більш розріджені низькомолекулярні фрагменти, особливо на гістограмі 3, що відповідає патерну ДНК *M. avium*. Застосування праймера № 45 дозволяє дуже чітко відокремити атипичні туберкульозні мікобактерії (гістограми 7, 8) від типових (гістограми 9, 10), для яких є характерними два піки у високомолекулярній ділянці (г). У цілому представлення результатів у вигляді гістограм оп-

Таблиця

Культури, досліджені із застосуванням ПЛР-аналізу

Матеріал, що досліджувався	<i>C. diphtheriae</i> Gravis	<i>C. diphtheriae</i> Mitis	<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	<i>C. ulcerans</i>	<i>C. xerosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. smegmatis</i>
Культури, що були виділені у хворих, n=52	21	11	5	2	2	10	—	—	—	—	—
Референтні культури, n=10	2	—	—	—	—	2	1	1	1	1	1

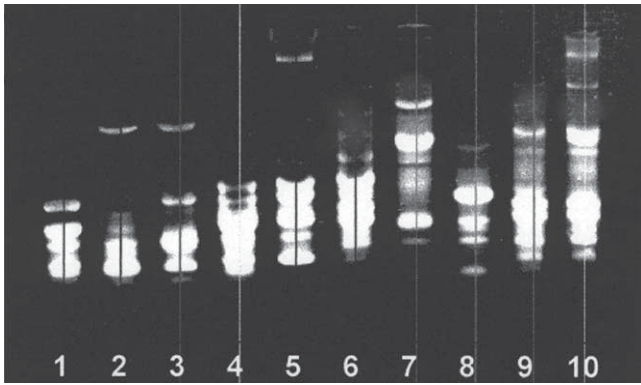


Рис. 1. Электрофореграма продуктів RAPD-ампліфікації ДНК мікобактерій різних видів:

1. *Mycobacterium bovis vaelee*
  2. *Mycobacterium intracellulare*
  3. *Mycobacterium avium*
  4. *Mycobacterium bovis*
  5. *Mycobacterium tuberculosis*
  6. *Mycobacterium bovis vaelee*
  7. *Mycobacterium intracellulare*
  8. *Mycobacterium avium*
  9. *Mycobacterium bovis*
  10. *Mycobacterium tuberculosis*
- Доріжки 1–5 — праймер № 19;  
доріжки 6–10 — праймер № 45

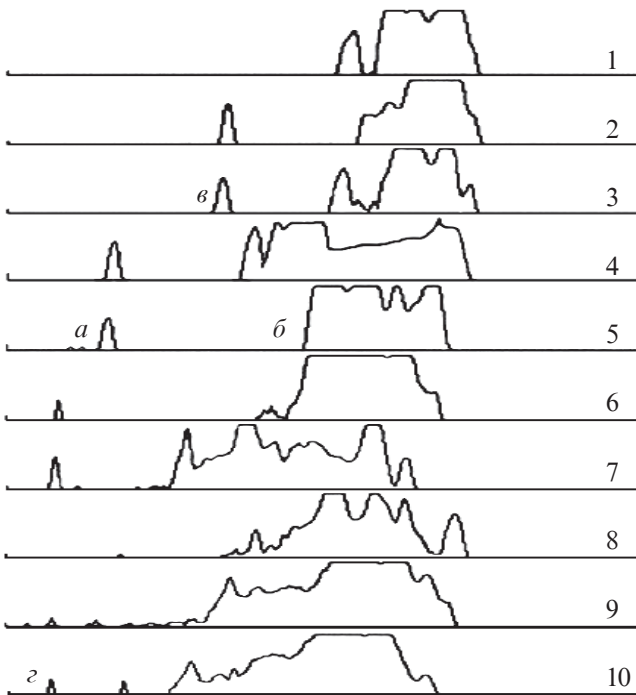


Рис. 2. Гістограми оптичної щільності ДНК-патернів різних видів мікобактерій:

1. *Mycobacterium bovis vaelee*
  2. *Mycobacterium intracellulare*
  3. *Mycobacterium avium*
  4. *Mycobacterium bovis*
  5. *Mycobacterium tuberculosis*
  6. *Mycobacterium bovis vaelee*
  7. *Mycobacterium intracellulare*
  8. *Mycobacterium avium*
  9. *Mycobacterium bovis*
  10. *Mycobacterium tuberculosis*
- Доріжки 1–5 — праймер № 19;  
доріжки 6–10 — праймер № 45

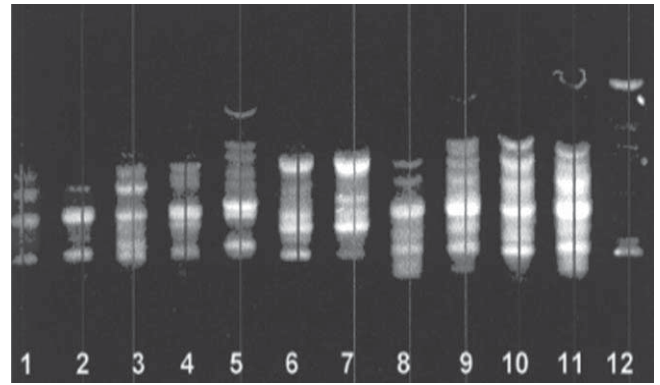


Рис. 3. Электрофореграма продуктів RAPD-ампліфікації ДНК збудників дифтерії та дифтероїдів:

1. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Gravis* tox+
2. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Gravis* tox+
3. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Gravis* tox+
4. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Gravis* tox+
5. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Gravis* tox+
6. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Gravis* tox+
7. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Mitis* tox+
8. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Mitis* tox+
9. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*
10. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*
11. *Corynebacterium ulcerans*
12. *Corynebacterium ulcerans*

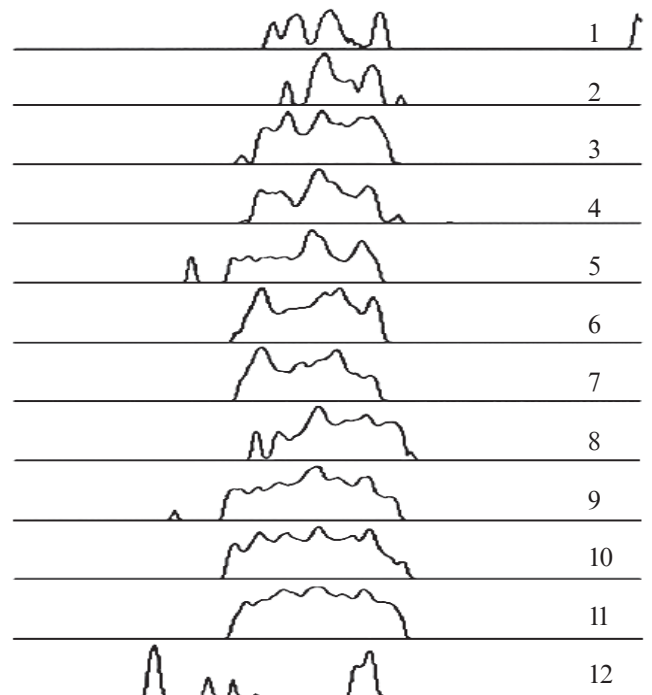


Рис. 4. Гістограми оптичної щільності ДНК-патернів збудників дифтерії та дифтероїдів:

1. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Gravis* tox+
2. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Gravis* tox+
3. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Gravis* tox+
4. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Gravis* tox+
5. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Gravis* tox+
6. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Gravis* tox+
7. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Mitis* tox+
8. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Mitis* tox+
9. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*
10. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*
11. *Corynebacterium ulcerans*
12. *Corynebacterium ulcerans*

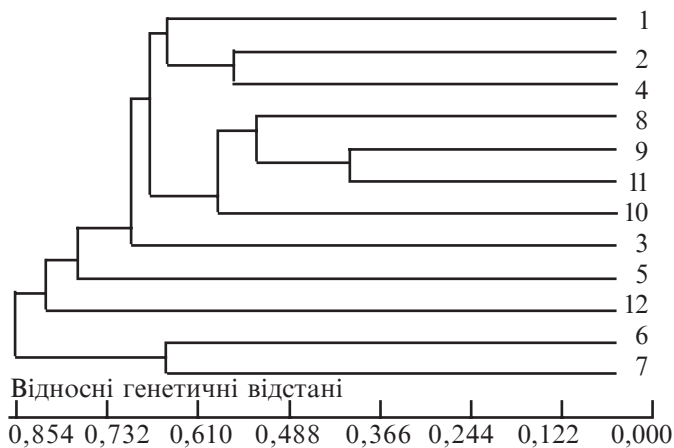


Рис. 5. Кластери та відносні генетичні відстані між штамми і видами коринебактерій за результатами математичної обробки результатів RAPD-аналізу:

1. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Gravis* tox+
2. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Gravis* tox+
3. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Gravis* tox+
4. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Gravis* tox+
5. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Gravis* tox+
6. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Gravis* tox+
7. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Mitis* tox+
8. *Corynebacterium diphtheriae* var. *Mitis* tox+
9. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*
10. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*
11. *Corynebacterium ulcerans*
12. *Corynebacterium ulcerans*

тичної щільності дозволяє точніше оцінити результати RAPD-аналізу ДНК мікобактерій.

На підставі результатів досліджень референтних штамів мікобактерій туберкульозу шляхом ПЛР-генотипування з подальшою комп'ютерною обробкою ми застосували RAPD-аналіз для поглибленої ідентифікації та диференціювання чистих культур коринебактерій дифтерії та умовно-патогенних видів роду *Corynebacterium*, що були виділені у хворих з клінічними проявами дифтерії, ангіни, хронічного тонзиліту та бактеріоносіїв. Приклад електрофореграми продуктів ПЛР-генотипування цих мікроорганізмів подано на рис. 3, а відповідні профілі — на рис. 4.

На перший погляд, у даному випадку відмінності між патернами різних штамів коринебактерій незначні. Наприклад, дуже важко розрізнити патерни 6 і 7, 9 і 11, що відповідають різним видам коринебактерій. Профілі оптичної щільності теж є близькими за структурою. Тому для аналізу результатів генотипування доцільним є застосування програм кластеризації (групування), що базуються на обчислюванні відносних генетичних відстаней між видами та різновидами досліджуваних організмів. Для аналізу результатів RAPD-аналізу коринебактерій нами було застосовано програму "Trees" [9; 10]. Результати дослідження подано на рис. 5.

Перш за все, звертають на себе увагу два достатньо добре відокремлені кластери, що складаються зі зразків №№ 1, 2, 4 і №№ 8–11. Було виявлено, що перший із них цілковито складається з представників варіанта *Corynebacterium diphtheriae Gravis* tox+, а другий — головним чином із дифтероїдів (№№ 9, 10 — *S. hoffmannii* і № 11 — *S. ulcerans*). Крім того, в ньому присутній також представник *S. diphtheriae Mitis* tox+ (№ 8).

Впритул до цих кластерів знаходяться ще два представники *S. diphtheriae Gravis* tox+ (№№ 3, 5). На достатньо великій генетичній відстані від усіх перелічених видів розташовані інші представники коринебактерій дифтерії (№№ 6, 7).

Таким чином, методи обчислювання генетичних відстаней і кластеризації дозволили достатньо чітко віддиференціювати, з одного боку, збудників дифтерії від не дифтерійних коринебактерій, з іншого, — види коринебактерій між собою. Очевидне також і те, що результати генетичного аналізу у деяких випадках (№№ 6, 7, 8) не збігаються з даними бактеріологічної ідентифікації. Це відображає, на нашу думку, як достатню близькість видів і варіантів коринебактерій між собою, так і недосконалість бактеріологічних методів ідентифікації та необхідність застосування з цією метою молекулярно-генетичних методів.

## Висновки

Вищенаведені результати дозволяють зробити висновок про те, що RAPD-аналіз (ПЛР з поодинокими довільними праймерами) дає змогу отримати видо- і варіантоспецифічні ПЛР-патерни, які придатні до подальшого аналізу та ідентифікації збудників хвороб. Одним із шляхів такого аналізу може бути кластеризація, яка ґрунтується на обчислюванні відносних генетичних відстаней. Методи ПЛР-генотипування разом зі специфічною ПЛР та комплексом бактеріологічних та імунологічних методів можуть бути застосовані не тільки для ідентифікації збудників, а й для досліджень клінічно значущих ознак міко- та коринебактерій, наприклад, їхньої чутливості до антибактеріальних препаратів.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Чуканов В. И., Кузьмина Н. В. Состояние иммунитета у больных туберкулезом легких, выделяющих лекарственно-устойчивые микобактерии туберкулеза // Пробл. туберкулеза. — 1996. — № 1. — С. 17–19.
2. Савчук А. І., Михайлова А. М., Ніколаєвський В. В. Дифтероїдні ураження ротоглотки // Інфекц. хвороби. — 2001. — № 3. — С. 39–42.
3. *Cutaneous infections due to nontuberculous mycobacteria: histopathological review of 28 cases* / R. Bartralot, R. M. Pujoi, V. Garcia-Patos et al. // *J. Cutan. Pathol.* — 2000. — Vol. 27, N 3. — P. 124–129
4. *Идентификация нетуберкулезных микобактерий с помощью молекулярно-биологических методов* / В. Н. Степанишина, О. Ю. Манзенюк, И. Г. Шемякин и др. // Журн. микро-

биол., епидемиол. и иммунобиологии. — 2000. — № 6. — С. 61-64.

5. *Dual infection with atypical mycobacteria and Mycobacterium tuberculosis causing cervical lymphadenopathy in a child* / S. Ganesan, A. Thirowall, C. Brewis et al. // *J. Laryngol. Otol.* — 2000. — Vol. 114, N 8. — P. 649-651.

6. *Sakatani M. Nontuberculous mycobacteriosis; the present status of epidemiology and clinical studies* // *Kekkaku.* — 1999. — Vol. 74, N 4. — P. 377-384.

7. *Бажора Ю. І., Кресюн В. Й., Ніколаєвський В. В.* Полімеразна ланцюгова реакція в експрес-діагностиці токсигенних властивостей збудника дифтерії // *Одес. мед. журнал.* — 1998. — № 3. — С. 34-37.

8. *Express identification of Mycobacterium tuberculosis in different biological samples* / V. Nickolaevsky, A. Asmolov, Yu. Bazhora et al. // *Abstr. 22 European Mycobacteriology Congress.* — Berlin, Germany, 1-4 July 2001. — Berlin, 2001. — P. 52-53.

9. *Применение ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях* (Науч.-метод. рук-во) / Под. ред. Ю. М. Сиволапа. — К.: Аграрна наука, 1998. — С. 31-32.

10. *Календарь Р. Н.* Компьютерная программа для построения эволюционных деревьев на основе электрофореграмм ДНК и белков // Тез. докл. конф. «Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений». — К., 1994. — С. 25-26.

УДК 616.9-002-073/.076:615.03

Ю. І. Бажора, В. В. Ніколаєвський, М. М. Чеснокова  
НОВІ ПІДХОДИ ДО ПИТАНЬ ІДЕНТИФІКАЦІЇ  
УМОВНО-ПАТОГЕННИХ КОРИНЕБАКТЕРІЙ ТА  
МІКОБАКТЕРІЙ

На матеріалі референтних і виділених від хворих чистих культур різних видів патогенних та умовно-патогенних мікобактерій і коринебактерій проведені дослідження з метою молекулярно-генетичної видоідентифікації мікроорганізмів. Обґрунтовано застосування з цією метою ПЛР-аналізу з випадковими, або універсальними, праймерами (RAPD-аналізу). Показані переваги молекулярно-генетичних методів видоідентифікації умовно-патогенних мікобактерій та коринебактерій з подальшим застосуванням комп'ютерних програм для обґрунтування даних ПЛР-генотипування, кластеризації даних та виявлення таксономічних зв'язків мікроорганізмів.

**Ключові слова:** умовно-патогенні мікроорганізми, видоідентифікація, ПЛР-аналіз, випадкові праймери.

UDC 616.9-002-073/.076:615.03

Yu. I. Bazhora, V. V. Nickolaevsky, M. M. Chesnokova  
MODERN APPROACHES TO THE PROBLEMS OF  
IDENTIFICATION OF ATYPICAL CORYNEBACTERIA  
AND MYCOBACTERIA

With the purpose of microorganisms' molecular genetic species identification, the researches on the material of cultures of pathogenic and conditionally pathogenic species of Mycobacteria and Corynebacteria (reference and pure cultures from sick persons) were carried out. The application of RAPD-PCR analysis has been grounded. Advantages of molecular-genetic methods' application with the following computer mathematical calculation for PCR pattern comparison and data clusterizing in identification of species of Mycobacteria and Corynebacteria are discussed.

**Key words:** atypical microorganisms, species identification, PCR-analysis, random primers.

УДК 613.12:550.382.7:546.296

Л. Г. Засипка, канд. мед. наук, В. О. Колоденко, д-р мед. наук, проф.

## ДО ПИТАНЬ ВПЛИВУ РАДОНУ НА СТАН ЗДОРОВ'Я НАСЕЛЕННЯ, ЩО ПРОЖИВАЄ В УМОВАХ ФОРМУВАННЯ БІОГЕОХІМІЧНИХ АНОМАЛІЙ

Одеський державний медичний університет

До характерних екологічних особливостей Одеської області, що впливають на стан здоров'я населення, слід зарахувати наявність гідрогеохімічних природно-антропогенних аномалій з підвищеним рівнем радону та деяких хімічних сполук в об'єктах навколишнього середовища.

Щодо дії на організм людини природного радону сьогодні ще немає єдиної думки. Одні науковці стверджують, що дія радону, спираючись на дані про його нестабільність, мало ймовірна. Дослідження інших підтверджують можливість біоло-

гічного ефекту радону, особливо продуктів його розпаду. Прибічники третьої думки вважають, що радон у незначних концентраціях може впливати позитивно. Саме цей феномен використовується в лікувальній практиці [1; 3; 5].

Якщо розглядати характер біологічного ефекту радону через можливість комбінованого впливу на організм у сукупності з хімічними, біологічними чинниками, особливо за умов дії екстремальних природних чи соціально-екологічних факторів, то проблема визначення ризику для населення цього

фактора ще більш ускладнюється.

Саме з цих причин різні фахівці розглядають інформацію про взаємодію радону з організмом людини через призму корпоративних інтересів. Так, лікарі з медичної реабілітації та санаторно-курортного лікування палко підтримують ідею позитивної дії на організм радону при багатьох захворюваннях [3, 4]. Фахівці більш технічного спрямування зацікавленість у радоновій проблемі розглядають через призму впровадження високозатратних в фінансово-економічному сенсі