

В. В. Ніколаєвський

ОПТИМІЗАЦІЯ СТРАТЕГІЇ ГЕНОТИПУВАННЯ ШТАМІВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* В ОДЕСЬКІЙ ОБЛАСТІ УКРАЇНИ: ПОРІВНЯННЯ МЕТОДІВ СПОЛІГОТИПУВАННЯ ТА VNTR

Одеський державний медичний університет

Вступ

Відкриття і застосування методів молекулярного генотипування мікроорганізмів значно змінило й розширило наші уявлення про патогенез та епідеміологію інфекційних хвороб. Надзвичайно важливим слід визнати використання методів генотипування в епідеміології такої клінічно та соціально небезпечної інфекції, як туберкульоз. Сьогодні з метою запобігання подальшому розповсюдженню захворювання молекулярно-епідеміологічні методи широко застосовуються у вивченні вогнищ туберкульозу для визначення джерела зараження та шляхів трансмісії інфекції [1]. Генотипування також дозволяє розрізнити випадки активізації первинної інфекції та реінфікування, простежити можливість внутрішньолабораторної перехресної контамінації, ідентифікувати чисті й змішані культури мікобактерій. Аналіз кореляцій між генотипом штаму, наявністю молекулярних детермінант вірулентності та клінічними проявами хвороби і показниками виживання є перспективним напрямком вивчення механізмів патогенезу туберкульозної інфекції [1; 2].

Порівняно з іншими мікроорганізмами *Mycobacterium tuberculosis* притаманний значно менший ступінь геномного поліморфізму, що потребує розробки чутливих методів генотипування [3]. Нині більшість із

них базується на вивченні кількості та розташування у геномі мікобактерій окремих ДНК-послідовностей, які здебільшого є некодуючими [1]. «Золотим стандартом» у молекулярній епідеміології туберкульозу є метод поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ) із зондом IS6110, якому притаманна дуже висока роздільна здатність [2; 4]. Метод ПДРФ є методом «класичної» молекулярної генетики, при якому не використовується полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Тому він потребує великої кількості очищеної ДНК і є технологічно та економічно складним, що значно обмежує можливості його використання у масштабних скринінгових дослідженнях [5]. Зпоміж інших недоліків цього методу є його недостатня роздільна здатність для штамів, які містять п'ять і менше послідовностей IS6110 у геномі, а також необхідність «перекладу» графічної інформації, яка є результатом аналізу ПДРФ, у цифрову, що є необхідним для подальшої комп'ютерної обробки даних генотипування [4; 5].

Методи генотипування, що базуються на використанні ПЛР з подальшою гібридизацією ПЛР-продуктів з ДНК-зондами, є технічно набагато простішими і дозволяють отримати результат генотипування у вигляді цифрового коду, що значно полегшує статистичну обробку й уведення резуль-

татів аналізу в міжнародні бази даних [4; 6]. Найбільш широко у сучасній молекулярній епідеміології туберкульозу застосовуються споліготипування (spacer-oligonucleotide typing) і типування на основі поліморфізму довжин тандемних повторів (VNTR — variable number tandem repeats).

Споліготипування, запропоноване у 1997 р. Kamerbeek et al. [6], базується на ідентифікації наявності спейсерів у регіоні прямих повторів геному *M. tuberculosis*, воно виявилось надійним і ефективним методом проспективного дослідження штамів мікобактерій у вогнищах туберкульозу, диференціювання між видами *M. tuberculosis* і *M. bovis*, а також для ідентифікації штамів родини *Beijing*. Міжнародні бази даних містять сьогодні тисячі споліготипів з майже усіх регіонів Земної кулі [7]. Проте чутливість цього методу виявилася недостатньою, особливо у регіонах з більш гомогенними популяціями штамів *M. tuberculosis* [8; 9].

Альтернативним методом генотипування мікобактерій є VNTR-типування, яке базується на визначенні розмірів регіонів тандемних повторів у геномі *M. tuberculosis*. Розмір фрагмента, у свою чергу, залежить від наявності та кількості повторів однакових ДНК-послідовностей, що є критерієм диференціювання штамів. На підставі аналізу нещодавно повністю розшифрова-



ного геному *M. tuberculosis* (штам H37Rv) було ідентифіковано більш ніж 1000 ділянок, у яких можуть міститися тандемні повтори [10]. У вихідному варіанті технології VNTR-типування мікобактерій було використано 5 локусів (ETR-A, -B, -C, -D та -E) [11]. Останніми роками було запропоновано інші системи VNTR-типування з використанням 12, 15 і більше локусів [9; 12; 13]. Генотипування за більшою кількістю локусів набагато збільшує чутливість і роздільну здатність методу й наближає його до методу ПДРФ, але призводить до прогресивного збільшення витрат праці, часу та коштів. Оптимізація типування за 12 локусами була досягнута за рахунок автоматизованого обліку розмірів фрагментів ДНК і кількості повторів у них за допомогою ДНК-секвенаторів [12].

Важливим завданням підвищення ефективності VNTR-типування мікобактерій є відбір обмеженої кількості найбільш інформативних, тобто високополіморфних локусів для створення міжнародно визнаного стандартизованого протоколу. Єдиної думки щодо цього питання досі немає. Досить високий ступінь поліморфізму був зареєстрований для 12 локусів, які становлять панель MIRU (*Mycobacterium Interspersed Repetitive Units*) [12] у сполученні з трьома локусами панелі ETR (ETR-A, ETR-B, ETR-C). Проте дослідження штамів *M. tuberculosis*, що були виділені від хворих Центру (Самарська область) та Півночі Росії (Ленінградська й Архангельська області), тобто у регіонах з домінуванням штамів *Beijing*, продемонструвало необхідність застосування інших локусів (VNTR3232, VNTR1982) для підвищення чутливості методу [8; 14; 15]. Таким чином, створення оптимальної стратегії у генотипуванні мікобактерій на підставі порівняння чутливості та

роздільної здатності різних методів, залежно від генетичних особливостей популяції штамів, що циркулюють на певній території, є актуальним.

Мета дослідження — визначення оптимальної стратегії генотипування мікобактерій туберкульозу, що циркулюють в Одеській області України, на підставі порівняння даних споліготипування та VNTR-типування різних генетичних груп *M. tuberculosis*.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводилося на матеріалі 182 штамів *M. tuberculosis*, які були виділені від хворих на різні форми легеневого туберкульозу у 2003–2004 рр. в Одеському протитуберкульозному диспансері. Епідеміологічна інформація (вік, стать, місце постійного мешкання, історія хвороби та лікування) була отримана від хворих шляхом опитування.

Культивування та ідентифікацію ізолятів *M. tuberculosis* проведено у бактеріологічній лабораторії Одеського протитуберкульозного диспансеру та Одеської обласної протитуберкульозної лікарні з використанням щільних живильних середовищ Льювенштайна — Єнсена згідно з Наказом МОЗ України № 45 [16]. Ідентифікація штамів проводилася на підставі комплексу мікроскопічних, бактеріологічних і біохімічних досліджень (морфологія колоній та мікроорганізмів, ніациновий тест і визначення нітратредуктазної активності). Генотипування штамів проводилося у молекулярно-генетичному відділі Національної референс-лабораторії з діагностики туберкульозу Великої Британії (Королівський коледж, Лондон).

Препарати ДНК для молекулярно-генетичних досліджень були отримані шляхом нагрівання водної суспензії бактеріальних клітин з подаль-

шою депротейнізацією хлороформом. Споліготипування штамів мікобактерій здійснювалося відповідно до міжнародних стандартних протоколів [6]. Ампліфікацію фрагмента регіону прямих повторів геному *M. tuberculosis* проводили за допомогою праймерів DRa та DRb, помічених біотином (Isogen, Нідерланди). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл складалася з 1 мкл препарату ДНК, по 2 мкл праймерів DRa та DRb, 2 мкл суміші dNTPs (2,5 мМ); 2,5 мкл ПЛП-буфера; 0,5 мкл Taq-полімерази (BioLine, Велика Британія) та 15 мкл очищеної води.

Гібридизацію починали з денатурації продуктів ПЛП у розчині 2x SSPE/0,1% SDS у киплячій водянній бані протягом 10 хв. Денатуровані продукти ПЛП гібридизували зі спейсерними ДНК-пробами, іммобілізованими на нейлоновій мембрані (Isogen, Нідерланди) у мініблотері протягом 90 хв при температурі +60 °С. Після промивання мембрану обробляли розчином кон'югату (стрептавідин — пероксидаза хрому, Amersham, США) протягом 1 год, після чого знову двічі промивали у розчині 2x SSPE/0,5% SDS при температурі +42 °С. Останнє промивання мембрани здійснювали у розчині 2x SSPE при кімнатній температурі. Для візуалізації результатів аналізу використовували хемілюмінесцентне детектування за технологією ECL (Amersham, США), після чого здійснювали експозицію рентгенівської плівки на мембрані. Для подальшої комп'ютерної обробки зображення на плівці сканували і зберігали у вигляді цифрового коду.

VNTR-типування мікобактерій здійснювали шляхом ампліфікації відповідних локусів з використанням праймерів, помічених флуоресцентними фарбами. Аналіз розмірів фрагментів, що були ампліфіковані, та обчислювання кількостей тандемних повторів здій-



снювали за допомогою автоматичного секвенатора генів за P. Supply [12] зі змінами. У роботі були використані 15 локусів VNTR: дванадцять локусів MIRU [12] і три локуси ETR [11], яким, за даними деяких авторів, притаманний високий ступінь поліморфізму. Праймерні системи були підібрані таким чином, щоб забезпечити можливість автоматичного аналізу та добре відтворення результатів. Послідовності праймерів, які були використані у дослідженні, наведені у попередніх публікаціях [14].

Ампліфікація більшості локусів, крім 20, 26 та ETR-C, здійснювалася в умовах мультиплексної ПЛР з двома парами праймерів. Реакційна суміш загальним об'ємом 10 мкл містила 1 мкл ДНК-матриці, 1 мкл ПЛР-буфера (BioLine, Велика Британія); 0,1 од. Таq-полімерази (BioLine); 0,25 мкл суміші dNTPs (BioLine); 0,5 мкл суміші прямого та зворотного праймерів (Invitrogen, Велика Британія) та 7 мкл очищеної води. Ампліфікацію проводили у термоциклері Applied Biosystems 9700 за такою програмою: 3 хв 95 °C; 30 циклів (30 с — 95 °C, 1 хв — 60 °C, 1 хв — 72 °C), 5 хв при 72 °C.

Аналізування довжин ПЛР-продуктів та обчислювання кількості тандемних повторів здійснювали за допомогою автоматичного секвенатора генів Beckman Coulter CEQ8000 (США) з використанням власного програмного забезпечення. Результати аналізу довжин фрагментів відображалися графічно з подальшим збереженням і конвертуванням у формат баз даних Excel. Приклад аналізу однієї суміші ПЛР-продуктів наведений на рисунку. Результат VNTR-типуювання записувався у вигляді 15-значного цифрового коду, в якому кожна цифра відповідала кількості повторів фрагмента у відповідному локусі.

Статистична обробка даних молекулярного генотипу-

вання ізолятів *M. tuberculosis* здійснювалася за допомогою програмного пакета BioNumerics (Бельгія). Аналіз відносних генетичних відстаней, кластеризація та побудова дендрограм були проведені з використанням коефіцієнтів подібності Jaccard (для даних споліготипування) або Categorical (для даних VNTR-аналізу) на базі алгоритму UPGMA. Порівняльний аналіз роздільних здатностей методів був проведений на підставі обчислювання індексу Хантера — Гастона [17] за формулою:

$$HGDI = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1),$$

де N — загальна кількість штамів у популяції, що досліджується; S — кількість генотипів; n_j — кількість штамів, які належать до j -ї групи. Індекс HGDI дозволяє підрахувати ймовірність входження досліджуваного генотипу до різних генетичних груп. При цьому вищому значенню індексу відповідає вища роздільна здатність методу. За C. Sola [9], значення індексу в діапазоні від 0,3 до 0,6 відповідають помірній, більше 0,6 — високій, менше 0,3 — слабкій чутливості методу генотипування.

Результати дослідження та їх обговорення

Усі досліджувані штами на підставі даних бактеріологічних і біохімічних тестів були ідентифіковані як *M. tuberculosis*. Належність усіх штамів до виду мікобактерій людини була додатково підтверджена даними споліготипування. При цьому в усіх ізолятах спейсери 33 та 34 у ділянці регіону прямих повторів мікобактеріального геному були відсутні, що є характерним для *M. tuberculosis*.

На підставі результатів споліготипування усі штами були розподілені на дві групи. До першої увійшли 72 штами, які

були ідентифіковані як такі, що належать до родини Beijing (39,6 % (32,4–47,1 %) при 95%-му довірчому інтервалі). Другу групу (110 штамів) становили ізоляти інших генетичних родин і неклаسیфіковані генотипи.

Генотипування штамів обох груп було здійснено за допомогою двох молекулярно-генетичних методів: споліготипування та VNTR-MIRU. Результати кластерного аналізу даних генотипування та обчислювання роздільної здатності використаних методів подано у табл. 1. Кластером вважалися два і більше ізолятів з повністю ідентичними генотипами.

Застосування споліготипування дозволило виявити 58 окремих генотипів *M. tuberculosis*, 18 з яких були представлені кластерами штамів розміром від 2 до 65 штамів, а інші 40 — індивідуальними патернами. Таким чином, частка кластеризованих штамів становила 78,0 %.

Чутливість методу споліготипування виявилася неоднаковою при дослідженні штамів двох груп. Всередині першої групи (родина Beijing) застосування дозволило виявити лише 5 різних генотипів, а 65 штамів (90,3 %), які склали найбільший кластер, залишилися недиференційованими. Індекс Хантера — Гастона виявився досить низьким (0,173), що відповідає слабкій роздільній здатності методу.

Результати споліготипування штамів з другої групи (не-Beijing) значно відрізнялися від результатів аналізу ізолятів Beijing. До складу кластерів увійшли 72 штами (65,5 %). При цьому максимальна кількість штамів в одному кластері становила 13. Споліготипування виявилось досить чутливим методом диференціації штамів, які не належать до родини Beijing, що підтверджується високим значенням індексу Хантера — Гастона (0,972).



Результати кластерного аналізу штамів *M. tuberculosis* та роздільна здатність методів споліготипування і VNTR-MIRU

Показник	Споліготипування		VNTR-MIRU	
	Група <i>Beijing</i>	Інші	Група <i>Beijing</i>	Інші
Кількість кластерів	3	15	8	15
Максимальний розмір кластера	65	13	33	10
Кількість унікальних ізолятів	2	38	11	61
Індекс Хантера — Гастона (HGDI)	0,173	0,972	0,723	0,989

Генотипування штамів *M. tuberculosis* з використанням методу VNTR за п'ятнадцятьма локусами MIRU та ETR дозволило зробити детальніше диференціювання зазначених ізолятів. Кількість дискретних генотипів серед усіх штамів становила 95, що в 1,6 разу перевищує кількість генотипів, яка була виявлена за допомогою методу споліготипування. Загальна кількість кластерів склала 23, при цьому розмір кластерів коливався у межах від 2 до 33 ізолятів. Частка кластеризованих штамів становила 60,4 %.

Генотипування за 15 локусами MIRU та ETR дозволило значно поліпшити якість диференціювання штамів родини *Beijing*. У цій групі було виявлено 19 дискретних генотипів, з яких 11 були представлені унікальними патернами. Індекс Хантера — Гастона становив у цьому випадку 0,723, що значно перевищує чутливість методу споліготипування. Для штамів, що не належать до родини *Beijing*, обидва методи продемонстрували майже однакову роздільну здатність (індекси Хантера — Гастона 0,972 та 0,989 для методів спо-

ліготипування та VNTR відповідно). Треба зазначити, що 2 ізоляти родини *Beijing* за результатами VNTR-типуювання були зараховані до „не-*Beijing*”-кластерів. Тим же часом, 4 ізоляти, які були визначені як „не-*Beijing*” за результатами споліготипування, були кластеризовані з ізолятами родини *Beijing* при проведенні VNTR-типуювання. Такі факти, за даними літератури, можуть свідчити про те, що ці «ізоляти» насправді є змішаними культурами, що й обумовлює утруднення в інтерпретації результатів [18].

З метою детального аналізу ефективності застосування методу VNTR-типуювання нами був проведений порівняльний

аналіз поліморфізму та роздільної здатності кожного з 15 локусів (12 локусів MIRU і 3 локусів ETR) при дослідженні штамів обох груп. Результати аналізу подані у табл. 2 і 3.

Дослідження штамів першої групи (*Beijing*) продемонструвало незначний ступінь поліморфізму більшості локусів, а локуси MIRU4, MIRU20, MIRU23, MIRU24 та ETR-B виявилися мономорфними, тобто непридатними для диференціювання штамів родини *Beijing* у вибраній панелі ізолятів з Одеської популяції (див. табл. 2). Відносно вищий ступінь поліморфізму був зареєстрований для локусів MIRU 26 (HGDI=0,475), MIRU31 (HGDI=0,255), MIRU40 (HGDI=0,251) та ETR-A

Таблиця 2

Поліморфізм локусів VNTR-MIRU при дослідженні штамів родини *Beijing*

Локус	Кількість повторів у локусі											Індекс HGDI	Кількість алейних варіантів
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
MIRU2	0	1	71	0	0	0	0	0	0	0	0	0,028	2
MIRU4	0	0	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
MIRU10	0	1	3	67	1	0	0	0	0	0	0	0,134	4
MIRU16	0	0	3	69	0	0	0	0	0	0	0	0,081	2
MIRU20	0	0	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
MIRU23	0	0	0	0	0	72	0	0	0	0	0	0	1
MIRU24	0	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
MIRU26	0	0	0	0	3	48	21	0	0	0	0	0,475	3
MIRU27	0	0	1	71	0	0	0	0	0	0	0	0,028	2
MIRU31	0	0	4	0	4	62	2	0	0	0	0	0,255	4
MIRU39	0	1	3	68	0	0	0	0	0	0	0	0,108	3
MIRU40	0	0	3	62	7	0	0	0	0	0	0	0,251	3
ETR-A	0	1	4	3	64	0	0	0	0	0	0	0,208	4
ETR-B	0	0	72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ETR-C	0	4	1	67	0	0	0	0	0	0	0	0,133	3



(HGDI=0,208). Однак, згідно з класифікацією Sola [9], лише локус MIRU26 може вважатися помірно поліморфним. Інші локуси, індекс Хантера — Гастона для яких не перевищує 0,3, вважаються низько поліморфними і не забезпечують необхідну чутливість для диференціювання штамів родини *Beijing*. Це підтверджується також відносно невеликою кількістю (3 або 4) алельних варіантів у зазначених вище локусах. Слід підкреслити, що хоча локусу MIRU10 притаманне певне різноманіття алельних варіантів (1, 2, 3 або 4 повтори у локусі), він мав незадовільну дискримінаційну здатність завдяки нерівномірному розподілу цих алельних варіантів серед досліджуваних штамів. Близько трьох чвертей (72,2 %) штамів з цієї групи мали профілі 223325153733423 та 223325153533423, які є типовими для родини *Beijing* [9; 12].

Інша картина спостерігалася під час аналізу результатів VNTR-генотипування ізолятів *M. tuberculosis* з групи 2 (див. табл. 3). Більшості локусам (за винятком MIRU4, MIRU20,

MIRU23, MIRU24, MIRU27 та ETR-B) притаманний помірний або високий рівень поліморфізму. Мономорфних локусів не було виявлено. Найбільш поліморфним виявився локус MIRU10, який характеризувався як найвищою кількістю алельних варіантів (кількість копій у локусі від 1 до 8 та 10 копій, загальна кількість варіантів 9), так і найвищим значенням індексу Хантера — Гастона (0,746). Інші локуси з високим ступенем поліморфізму (HGDI>0,6) налічували від чотирьох до восьми алельних варіантів. Локус MIRU26, який виявився найбільш поліморфним при дослідженні штамів *Beijing*, продемонстрував помірну чутливість (HGDI=0,595). Слід знову підкреслити, що безпосередній зв'язок між кількістю алельних варіантів і величиною HGDI відсутній: наприклад, до групи помірно чутливих локусів увійшли локуси MIRU2 (HGDI=0,409) та MIRU26 (HGDI=0,595) з різними кількостями алельних варіантів: 2 та 7 відповідно. З іншого боку, локус MIRU23, для якого було зареєстровано 4 різних алельних варіанти, харак-

теризується слабкою роздільною здатністю (HGDI=0,234) у зв'язку з нерівномірним розподілом штамів з різною кількістю повторів. Взагалі застосування VNTR-типуювання для диференціювання штамів групи 2 дозволило досягти високої чутливості (HGDI=0,989, див. табл. 1). Цікаво відмітити, що серед штамів цієї групи 16 ізолятів (14,5 %) мали нещодавно ідентифікований генотип ASU (African-Siberian-Ural) з наявністю однієї копії у локусі MIRU26 та 5-10 копій у локусі MIRU10 [19].

У даному дослідженні вперше на матеріалі штамів, які циркулюють на території Півдня України, було проведено порівняння двох сучасних методів генотипування *M. tuberculosis*: споліготипування та VNTR-генотипування. За даними літератури, ці методи є досить ефективними і специфічними для диференціювання ізолятів мікобактерій та дослідження вогнищ туберкульозу, але їхня чутливість може бути недостатньою при дослідженні популяцій *M. tuberculosis* з вираженою клональністю та домінуванням

Таблиця 3

Поліморфізм локусів VNTR-MIRU при дослідженні штамів, які не належать до родини *Beijing*

Локус	Кількість повторів у локусі											Індекс HGDI	Кількість алельних варіантів
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
MIRU2	0	31	79	0	0	0	0	0	0	0	0	0,409	2
MIRU4	1	2	105	0	2	0	0	0	0	0	0	0,089	4
MIRU10	0	1	6	42	34	11	4	7	2	0	3	0,746	9
MIRU16	0	20	28	59	3	0	0	0	0	0	0	0,619	4
MIRU20	0	2	108	0	0	0	0	0	0	0	0	0,036	2
MIRU23	0	0	0	4	0	96	7	3	0	0	0	0,234	4
MIRU24	2	108	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,036	2
MIRU26	0	18	1	1	20	65	3	2	0	0	0	0,595	7
MIRU27	0	0	2	108	0	0	0	0	0	0	0	0,036	2
MIRU31	0	0	50	42	4	14	0	0	0	0	0	0,636	4
MIRU39	0	5	91	13	1	0	0	0	0	0	0	0,302	4
MIRU40	0	4	14	42	32	15	1	1	1	0	0	0,740	8
ETR-A	0	4	43	33	27	3	0	0	0	0	0	0,701	5
ETR-B	0	1	109	0	0	0	0	0	0	0	0	0,018	2
ETR-C	0	31	14	54	11	0	0	0	0	0	0	0,659	4



окремих генетичних родин [15]. За нашими даними, розповсюдженість штамів родини *Beijing* у Південному регіоні України становить близько 40 % [20], що потребує застосування методів із високою роздільною здатністю. З метою об'єктивізації аналізу ефективність двох методів оцінювалася нами окремо для двох груп ізолятів: групи *Beijing* (72 ізоляти) та усі інші генотипи (110 ізолятів). Чутливість і дискримінаційна здатність методів виявилися неоднаковими для різних груп.

Обидва методи продемонстрували високу роздільну здатність при аналізі штамів з групи 2, до складу якої увійшли різні генетичні родини мікобактерій, крім групи *Beijing*. Значення індексу Хантера — Гастона при диференціюванні ізолятів з цієї гетерогенної групи як для споліготикування, так і для VNTR-типування виявилось високим і досить близьким до встановлених ра-

ніше для інших популяцій мікобактерій [9; 14].

Порівняно з даними деяких закордонних дослідників [9; 21], нами було відмічено дещо інший ступінь поліморфізму окремих локусів, а також знайдені нові алельні варіанти що, поза сумнівом, обумовлено генетичною гетерогенністю популяцій мікобактерій у різних географічних зонах, а також особливостями відбору ізолятів для дослідження. Так, менш поліморфними у нашому дослідженні виявилися локуси MIRU26 і MIRU23, а локуси MIRU16 і ETR-C, навпаки, продемонстрували високий ступінь поліморфізму. У локусі MIRU24 у двох ізолятів нами було виявлено рідкісний алель «0» копій, про який було повідомлено лише одноразово для ізоляту, виділеного у США [21]. Проте результати нашого дослідження з генотипування ізолятів, які не належали до групи *Beijing*, добре збігаються з результатами попередніх

досліджень у інших країнах світу і підтверджують ефективність застосування обох методів для диференціювання достатньо генетично гетерогенних популяцій мікроорганізмів. Вищий ступінь поліморфізму більшості локусів, який був зареєстрований у нашому дослідженні, порівняно з даними по деяких регіонах Росії (Самарська, Ленінградська області) [14; 15; 19], обумовлений, на нашу думку, включенням у дослідження російськими вченими ізолятів мікобактерій, що були виділені від хворих у в'язницях. Перебування у місцях позбавлення волі є важливим фактором швидкої трансмісії генетично близьких високовірulentних штамів.

Інші результати були отримані нами при генотипуванні штамів групи 1, тобто штамів родини *Beijing*. Споліготикування виявилось неефективним для диференціювання штамів родини *Beijing* внаслі-

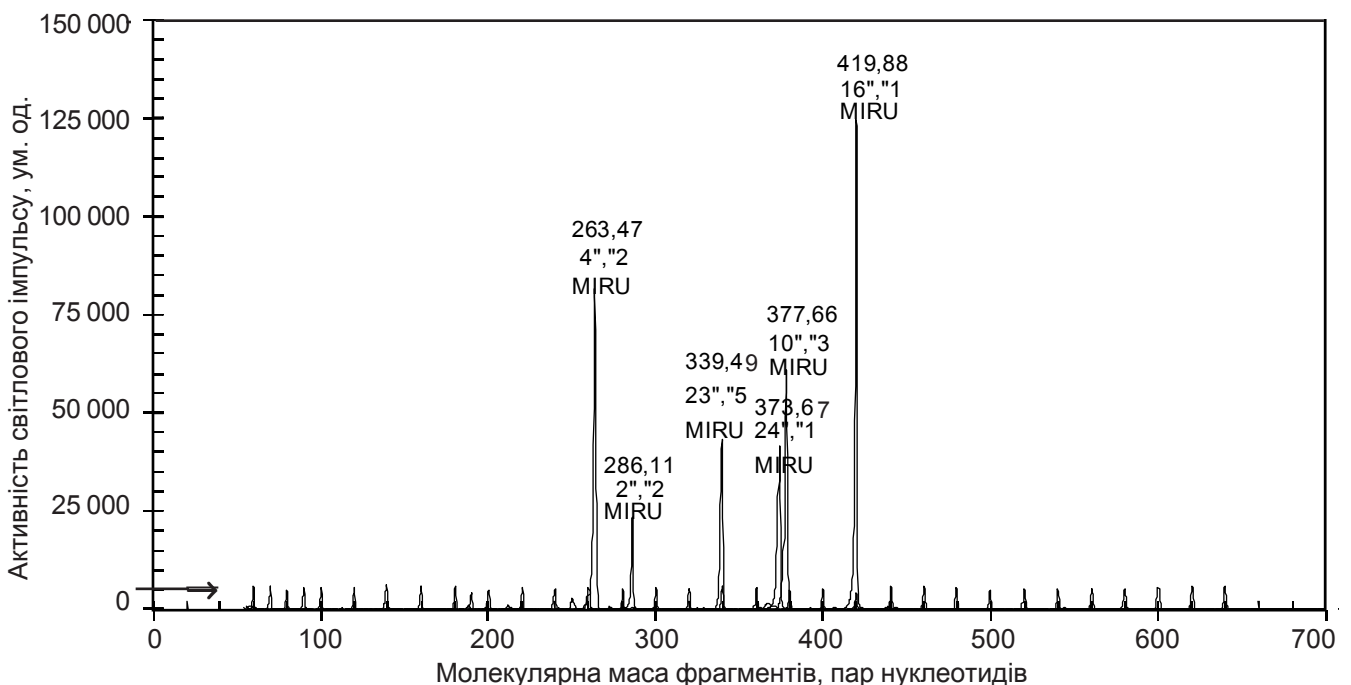


Рисунок. Приклад результату аналізу молекулярних мас ПЛП-продуктів та розрахунку кількостей тандемних повторів у локусах MIRU2, MIRU4, MIRU10, MIRU16, MIRU23, MIRU 24

Стрілкою позначений стандарт молекулярної маси (50–640 п. н.).

Наявність шести піків свідчить про наявність шести різних за розміром фрагментів ДНК у суміші, що аналізується. Програмне забезпечення секвенатора автоматично підраховує кількість тандемних повторів у кожному фрагменті. Кожний пік позначений молекулярною масою фрагмента, назвою локусу MIRU та кількістю повторів у ньому.



док недостатньої роздільної здатності (індекс Хантера — Гастона 0,173). При цьому 65 (90,3 % усіх штамів родини *Beijing*) увійшли до складу великого кластера, який виявився несправжнім і був у подальшому розподілений на кілька дрібніших груп за допомогою методу VNTR.

Значно ефективнішим для диференціювання штамів всередині родини *Beijing* був метод VNTR-типування з використанням дванадцяти локусів MIRU [12] і трьох локусів ETR [11]. Застосування усіх 15 локусів у сукупності дозволило досягти досить високого рівня диференціювання штамів і виявити 19 різних генотипів всередині групи *Beijing*. При цьому величина індексу Хантера — Гастона (0,723) була дещо вищою, ніж при дослідженні ізолятів *Beijing* з Росії (0,650), але нижчою, ніж при дослідженні панелі ізолятів з інших країн світу [15]. Збільшення кількості локусів порівняно з вихідною панеллю з п'яти локусів VNTR дозволило значно підвищити чутливість методу [22].

Роздільна здатність різних локусів VNTR була неоднаковою, що збігається з даними попередніх досліджень [12; 15; 22]. Найбільша чутливість була продемонстрована для локусів MIRU26, MIRU31, MIRU40 ETR-A, що дозволяє рекомендувати їх для подальшого використання. Два найбільших кластери всередині групи *Beijing* були утворені ізолятами з профілями 223325153733423 (19 ізолятів) та 223325153533423 (33 ізоляти), які притаманні групі *Beijing* [9; 12]. Навпаки, локуси MIRU4, MIRU20, MIRU23, MIRU24 та ETR-B виявилися мономорфними і можуть бути, на нашу думку, виключені з набору локусів VNTR при дослідженні штамів *Beijing*.

Слід підкреслити, що відносно вища дискримінаційна здатність методу VNTR (порівняно зі споліготипуванням) у вивченні штамів *Beijing*, яка

була продемонстрована у нашому дослідженні, може бути недостатньою для перспективних досліджень та ідентифікації джерел зараження туберкульозом. За даними I. Mougousov [15], кластери, утворені VNTR-типуванням за 12 локусами MIRU, можуть бути додатково розділені за допомогою методу ПДРФ. З іншого боку, деякі недоліки й особливості цього методу (вимогливість до обладнання, тривалість виконання, необхідність напрацювання значної біомаси мікобактерій та утруднення при комп'ютерній обробці результатів) значно обмежують перспективи його реального застосування у клінічній мікробіології [4; 5].

Таким чином, на підставі порівняння результатів генотипування штамів *M. tuberculosis*, що були виділені від хворих в Одеській області України, можна зробити висновок про необхідність застосування поетапної стратегії генотипування у зв'язку зі значним розповсюдженням штамів родини *Beijing*, яка, з одного боку, забезпечить досить оптимальну чутливість, з іншого, буде досить економічною. На нашу думку, на першому етапі як метод вибору може бути застосоване споліготипування, яке дозволить, по-перше, здійснити ідентифікацію штамів родини *Beijing*, по-друге, провести достатньо ефективне диференціювання усіх інших штамів. Диференціювання всередині групи *Beijing* доцільно проводити з використанням обмеженої кількості відносно поліморфних локусів VNTR, до яких, за нашими результатами, належать локуси MIRU26, MIRU31, MIRU40 ETR-A. З метою підвищення дискримінаційної здатності методу VNTR доцільним є вивчення поліморфізму інших локусів VNTR зі збільшенням кількості локусів до 6–8, що є предметом наших подальших досліджень.

Це дослідження фінансувалося грантом Chevening Fellowship, що був наданий Британською Радою (контракт № UKE0100129).

ЛІТЕРАТУРА

1. Barnes P., Cave D. Molecular epidemiology of tuberculosis // N. Engl. J. Med. — 2003. — Vol. 349, N 12. — P. 1149-1156.
2. Murray M., Nardell E. Molecular epidemiology of tuberculosis: achievements and challenges to current knowledge // Bulletin of the World Health Organization. — 2002. — Vol. 80. — P. 477-482.
3. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global transmission / S. Sreevatsan, X. Pan, K. Stockbauer et al. // Proc Nat Acad Sci USA. — 1997. — Vol. 94. — P. 9869-9874.
4. Van Sooligen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements // J. Int. Med. — 2001. — Vol. 249. — P. 1-26.
5. Murray M., Alland D. Methodological problems in the molecular epidemiology of tuberculosis // Am. J. Epidemiol. — 2002. — Vol. 155. — P. 565-571.
6. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology / J. Kamerbeek, L. Schouls, A. Kolk et al. // J. Clin. Microbiol. — 1997. — Vol. 35. — P. 907-914.
7. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study / I. Filliol, J. Driscoll, D. Van Soolingen // J. Clin Microbiol. — 2003. — Vol. 41. — P. 1963-1970.
8. Генетическое разнообразие *Mycobacterium tuberculosis* и оценка факторов риска распространения заболевания туберкулезом в Сибирском регионе России методами молекулярной эпидемиологии / О. В. Норкина, В. Н. Киншт, И. В. Мокроусов и др. // Молекул. генетика, микробиол. и вирусология. — 2003. — № 3. — С. 9-18.
9. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics / C. Sola, I. Filliol, E. Legrand et al. // Infection, Genetic and Evolution. — 2003. — Vol. 3. — P. 125-133.
10. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence / S. T.



Cole, R. Brosch, J. Parkhill et al. // Nature. — 1998. — Vol. 393. — P. 537-544.

11. Frothingham R., Meeker-O'Connell W. A. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem repeats // Microbiology. — 1998. — Vol. 144. — P. 1189-1196.

12. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units / P. Supply, S. Lesjean, E. Savine et al. // J. Clin. Microbiol. — 2001. — Vol. 39. — P. 3563-3571.

13. High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing / P. Le Fleche, M. Fabre, F. Denoeud et al. // BMC Microbiol. — 2002. — Vol. 2. — P. 37-48.

14. Development and evaluation of an expanded set of VNTR-MIRU loci for the differentiation of tuberculosis in a population with a high-incidence of Beijing-family strains / V. Nikolaevskyy, K. Gopaul, T. Brown et al.

// Abstr. 15th European Clinical Microbiology Congress. — Copenhagen, 2005. — P. 314.

15. Analysis of the allelic diversity of the Mycobacteria interspersed repetitive units in *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing family: practical implications and evolutionary considerations / I. Mokrousov, O. Narvskaya, E. Limeschenko et al. // J. Clin. Microbiol. — 2004. — Vol. 42. — P. 2438-2444.

16. Наказ МОЗ України № 45 від 06.02.2002 «Про затвердження Інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції» (складена під керівництвом Ю. І. Феценко, О. А. Журило, М. Т. Клименко та ін.) // Зб. нормативно-директивних документів з охорони здоров'я. — 2002. — № 2. — С. 63-111.

17. Hunter P., Gaston M. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity // J. Clin. Microbiol. — 1988. — Vol. 26. — P. 2465-2466.

18. Genotypic and phenotypic heterogeneity among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pulmonary

tuberculosis patients / I. C. Shamputa, L. Rigouts, L. A. Eyongeta et al. // J. Clin. Microbiol. — 2004. — Vol. 42. — P. 5528-5536.

19. MIRU-VNTR-генотипирование штаммов *Mycobacterium tuberculosis* в Восточной Сибири: генотипы Beijing и Kilimanjaro // Молекуляр. генет., микробиол. и вирусология. — 2004. — № 4. — С.33-38.

20. Николаевский В. В., Дробневски Ф. А., Бажора Ю. И. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов микобактерий, выделенных в Южном регионе Украины // Цитология и генетика. — 2004. — № 4. — С. 29-33.

21. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using MIRU / L. Cowan, L. Mosher, L. Diem et al. // J. Clin. Microbiol. — 2002. — Vol. 40. — P. 1592-1602.

22. Типирование *Mycobacterium tuberculosis* в Самарском регионе с помощью VNTR / Е. Желткова, М. Радди, Н. Маломанова и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунологии. — 2004. — № 1. — С.35-37.

УДК 615.32-092.9

О. П. Сотникова, Г. С. Фесюнова, Т. Д. Лотош

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИКОАГУЛЯНТНИХ І ФІБРИНОЛІТИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ВОДНОГО ЕКСТРАКТУ З ТРАВИ БУРКУНУ ЛІКАРСЬКОГО

Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова АМН України, Одеса

У лабораторії фармакології і тканинної терапії Інституту ім. В. П. Філатова розроблена технологія одержання екстракту з трави буркуну лікарського (Патент № 3544, 15.11.2004. Бюл. № 11). Препарат містить комплекс біологічно активних речовин (амінокислоти, пептиди, полісахариди, оксикумарини, біофлавоноїди з Р-вітамінною залежністю тощо). Особливий інтерес мають дані, що свідчать про високий рівень вмісту в препараті суми кумаринів. Встановлено високий рівень

біологічної активності препарату на дріжджовому і парабіотичному тестах. Виявлено антитоксичну дію на стрихніновому тесті. Екстракт буркуну має антигіпоксичні властивості при моделюванні у щурів гістотоксичної гіпоксії. У досліджах *in vitro* встановлено високу антиагрегаційну активність екстракту буркуну, що практично в 3 рази вище, ніж у препараті ФІБС [4].

Метою дослідження є вивчення впливу екстракту буркуну (ЕБ) у різних дозах на ге-

мостаз експериментальних тварин при курсовому введенні.

Матеріали та методи дослідження

Експериментальні дослідження були проведені на 30 кролях породи шиншила, масою 3,0–4,7 кг, розподілених на 6 груп: 3 контрольних (по 3 кролі) і 3 піддослідних (по 7 кролів). Показники гемостазу у тварин вивчали до початку дослідження (вихідний рівень), на 7, 14, 21-й день введення ЕБ,

