

ОДЕСЬКИЙ МЕДИЧНИЙ ЖУРНАЛ

2 (58) 2000



В. Й. Кресюн, Ю. І. Бажора, П. М. Чуєв, М. Ю. Сиволап

ІНТРАМОЛЕКУЛЯРНА ГЕТЕРОГЕННІСТЬ І ВНУТРІШНЬОВИДОВА ВАРІАБЕЛЬНІСТЬ ДНК ЗБУДНИКІВ ГНІЙНО-СЕПТИЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

Одеський державний медичний університет

Останнім часом відмічається значний ріст гнійних захворювань, спричинюваних стафілококами та стрептококами. Здебільшого це обумовлено розповсюдженням мікроорганізмів, стійких до антибактеріальних препаратів [1–4].

Виділення й ідентифікація цих збудників на ранніх термінах захворювання є важливим напрямком медичної мікробіології. Для вирішення цього питання є багатий арсенал методичних розробок, починаючи з класичних методів мікробіологічного тестування і закінчуючи імунохімічними та молекулярно-біологічними методами. В кожному випадку характер і складність діагностичних технологій залежать від властивостей збудника захворювання. Останнім часом традиційні методи не задовольняють потреби клініцистів щодо швидкості їх проведення і точності діагностики. Штами та види мікроорганізмів реєструються на підставі морфологічних, біохімічних, культуральних, серологічних та інших даних.

Звертають на себе увагу нові методи діагностики, що ґрунтуються на детекції специфічних ділянок ДНК мікроорганізму [5, 6]. Однією з переваг цих методів є визначення мікроорганізму у латентному стані до прояву клініки захворювання. Розвиток генної інженерії та біотехнології дає змогу проводити диференціацію збудників й визначати їх мінливі властивості.

З допомогою засобів, що ґрунтуються на застосуванні

полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), можна отримати інформацію за відносно короткий час і з високою вірогідністю. У зв'язку з цим приділяється увага методам детекції збудників гнійних захворювань, що ґрунтуються на ПЛР-аналізі як найдоцільнішим на практиці, де чинники часу та вірогідності визначення відіграють головну роль.

Властивості збудника, що визначають його патогенність, антибіотикорезистентність тощо заковані в ДНК генетичних структур [7]. Патогени одного виду за генетичним набором можуть бути гетерогенними. З допомогою методу ПЛР можна визначити молекулярно-генетичний поліморфізм між різними штамми та властивості цих збудників. Метою дослідження була детекція виду патогенів з допомогою фланкуючих праймерів і підбір вільних праймерів, які допоможуть диференціювати внутрішньовидову варіабельність та інтрамолекулярну гетерогенність *St. aureus*, *St. epidermidis*, *Str. pyogenes*, *Str. pneumoniae*.

Матеріали та методи дослідження

У роботі було використано штами: *Staphylococcus aureus* № 285, Cowan 1 (продуцент протеїну А), АТТС 25923, 209р; *Staphylococcus epidermidis* № 287, № 286, № 284 та ін.; *Streptococcus pneumoniae* тип 6А*, тип 8*, тип 19А*, 49619 -

* — Датська класифікація *Erna Sund*

штам АТТС (American Type Culture Collection, USA); *Streptococcus pyogenes* (стрептококи групи А за Sunfield) типи за Griffith: 5, 9, 10, 11, надані НДІ мікробіології, епідеміології та інфекційних захворювань ім. Л. В. Гармашевського (Київ), з яких було виділено ДНК; маркери молекулярної маси 100 bp DNA ladder й рUC Mix; фланкуючі праймери до цих мікроорганізмів, надані відділом молекулярної діагностики та генної дактилоскопії Державного наукового центру Російської Федерації «ГосНИИ-генетика» (Москва).

Довільні праймери: P-53 5' - GTC TAA GTC G-3'; P-54 5' - GTT AGG AGA C-3'; P-64 5' - CCG GCA GCA AAA TG-3'; були синтезовані на автоматичному ДНК-синтезаторі "Applied Biosystems 380В" ціанофосфорамідитним методом у Південному біотехнологічному центрі УААН.

ПЛР виконували на ампліфікаторі «Терцик» (Росія). Температурний режим для двадцятичленних олігонуклеотидних праймерів був таким: початкова денатурація — 94 °С, 4 хв; один цикл з «м'яким» відпалом 94 °С, 3,5 хв, 65 °С, 0,5 хв, 75 °С, 0,5 хв; наступні чотири цикли — 94 °С, 1 хв, 42 °С, 2 хв, 72 °С, 2 хв; потім 33 цикли — 94 °С, 1 хв, 52 °С, 1,6 хв, 72 °С, 2 хв; остання елонгація — 72 °С, 6 хв. Для десятичленних праймерів: початкова денатурація — 94 °С, 4 хв; один цикл з м'яким відпалом — 93 °С, 3,5 хв, 75 °С, 0,5 хв, 75 °С, 0,5 хв. Наступні чотири цикли — 93 °С, 0,9 хв,

72 °C, 2 хв, 39 °C, 1,6 хв. Основні 33 цикли — 93 °C, 0,9 хв, 72 °C, 2 хв, 47 °C, 1,6 хв.

Продукти ампліфікації фракціонували електрофорезом у 2%-му агарозному гелі в 1 x TBE-буфері на апараті горизонтального електрофорезу (Hofer Scientific Instruments, USA) при 100 V протягом 5 год, візуалізували, забарвлюючи бромистим етидієм, і фотографували в УФ-світлі на фотоплівку "Мікрат 300".

Електрофоретичні профілі ампліфікованої ДНК кожного зразка оцінювали візуально й кодували бінарно; наявність чи відсутність смуги позначали «1» або «0» відповідно.

Дендрограми генетичних співвідношень будували з допомогою програми "TREES" (Календар, 1994), яка містить підпрограму оцінки генетичних дистанцій «D Value» і кластерного розподілу "UPGMA" (Unweighted-Pair-Group Method), (Sneath, Sokal, 1973).

Результати дослідження та їх обговорення

Видову належність детектують із допомогою спрямованих фланкуючих праймерів, що індукують специфічні для цього виду фрагменти ДНК — амплікони. При застосуванні фланкуючих праймерів до видів патогенів, що досліджуються, одержано такі результати.

Фланкуючі праймери до виду *Staphylococcus aureus* генерують (рис. 1, а) три типи ампліконів: 656 пар нуклеотидів (п. н.) у штамів ATCC 25923 (CDC), Cowan 1, ATCC 25923; 823 п. н. у штамі 209; 872 п. н. у штамі 285, що свідчить про значну внутрішньовидову гетерогенність цього мікроорганізму (таблиця).

При детекції чотирьох штамів *Staphylococcus epidermidis* фланкуючими праймерами виявлено один амплікон із молекулярною масою 130 п. н. (див. рис. 1, а)

Вивчаючи чотири штами *Streptococcus pyogenes*, виявили один ДНК-фрагмент з

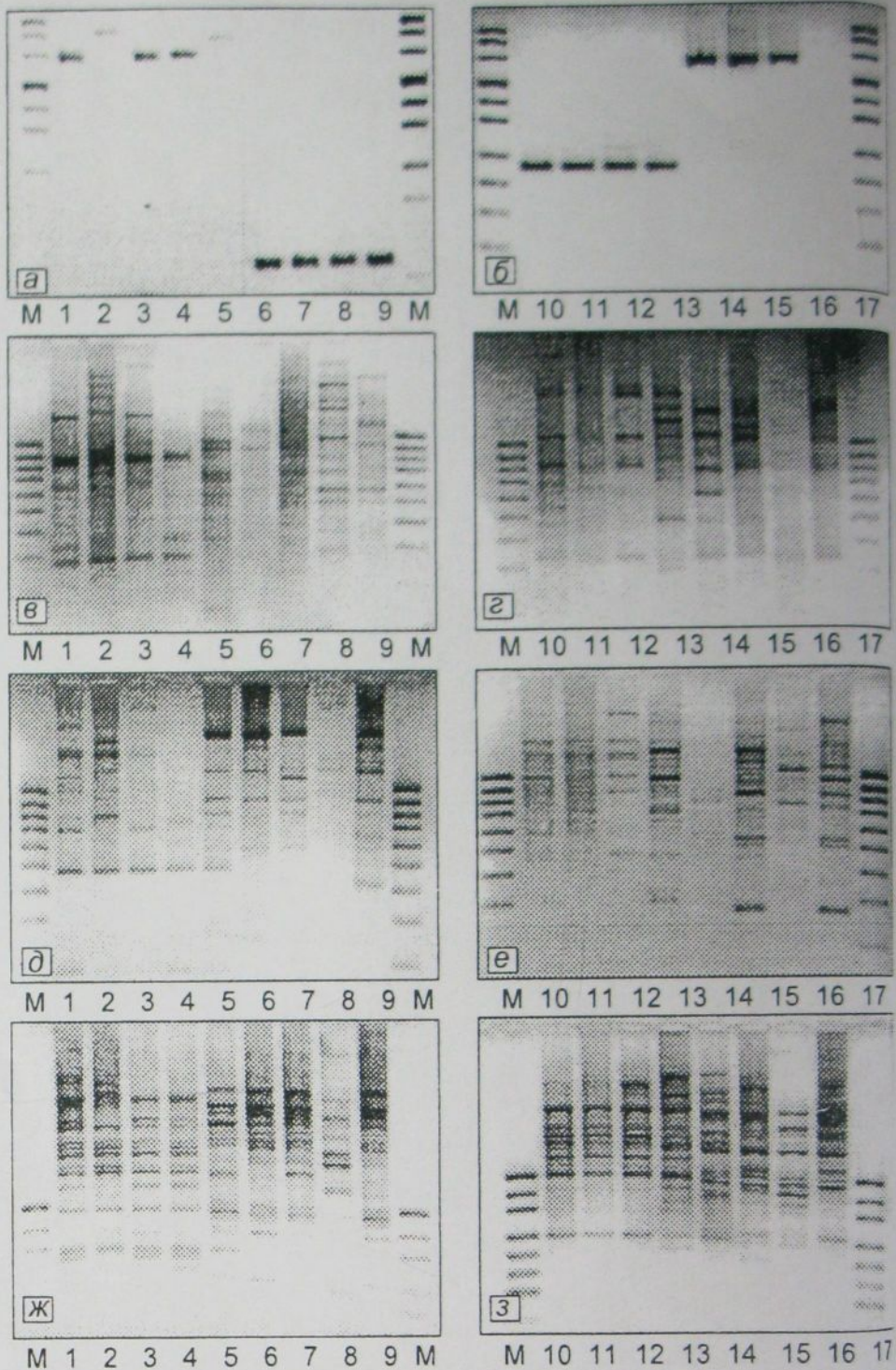


Рис. 1, а — детекція *St. aureus* і *St. epidermidis* ПЛР із фланкуючими праймерами; б — детекція *Str. Pyogenes* і *Str. Pneumoniae* із фланкуючими праймерами в — молекулярно-генетичний поліморфізм між штамами видів *Staphylococcus aureus* і *Staphylococcus epidermidis*, детектований з допомогою RAPD-аналізу з довільним праймером р53; г — молекулярно-генетичний поліморфізм між штамами видів *Streptococcus pyogenes* і *Streptococcus pneumoniae*, детектований з допомогою RAPD-аналізу з довільним праймером р53; д — молекулярно-генетичний поліморфізм між штамами видів *Staphylococcus aureus* і *Staphylococcus epidermidis*, детектований з допомогою RAPD-аналізу з довільним праймером р54; е — молекулярно-генетичний поліморфізм між штамами видів *Streptococcus pyogenes* і *Streptococcus pneumoniae*, детектований з допомогою RAPD-аналізу з довільним праймером р54; ж — молекулярно-генетичний поліморфізм між штамами видів *Staphylococcus aureus* і *Staphylococcus epidermidis*, детектований з допомогою RAPD-аналізу з довільним праймером р64; з — молекулярно-генетичний поліморфізм між штамами видів *Streptococcus pyogenes* і *Streptococcus pneumoniae*, детектований з допомогою RAPD-аналізу з довільним праймером р64. М — маркери молекулярної маси 100bp DNA ladder та pUC Mix: 1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25925 (отриманий від CDC, Атланта). 2. *Staphylococcus aureus* № 285. 3. *Staphylococcus aureus* Cowan 1 (продуцент протеїну А). 4. *Sfaphylococcus aureus* ATCC 25923. 5. *Staphylococcus aureus* 209р. 6. *Staphylococcus epidermidis* № 287. 7. *Staphylococcus epidermidis* № 286. 8. *Staphylococcus epidermidis* № 284. 9. *Staphylococcus epidermidis* *Streptococcus pyogenes* (стрептококи групи А за Sunfield) типи за Griffith: 10. 11. 9; 12. 10; 13. 11; 14. *Streptococcus pneumoniae* тип 6А*; 15. *Streptococcus pneumoniae* тип 8*; 16. *Streptococcus pneumoniae* тип 19А*; 17. *Streptococcus pneumoniae* 49619 — штам ATCC (American Type Culture Collection, USA)

Молекулярно-генетичний поліморфізм між штамами видів *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*

| Штами | Кількість детекторних RAPD-локусів | | | Кількість детектованих поліморфних RAPD-локусів і середній рівень поліморфізму | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----|-----|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|
| | p53 | p54 | p64 | p53 | p54 | p64 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (отриманий з CDC, Атланта) | 8 | 13 | 17 | 5 (63 %) | 7 (54 %) | 12 (71 %) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> № 285 | 12 | 15 | 20 | 7 (58 %) | 11 (73 %) | 7 (35 %) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> Cowan 1 (продуцент протеїну А) | 9 | 13 | 16 | 3 (33 %) | 4 (31 %) | 12 (75 %) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 11 | 6 | 18 | 7 (64 %) | 3 (50 %) | 11 (61 %) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 209p | 11 | 15 | 21 | 9 (82 %) | 11 (73 %) | 12 (57 %) |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> № 287 | 10 | 12 | 19 | 7 (70 %) | 8 (67 %) | 13 (68 %) |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> № 286 | 13 | 10 | 18 | 10 (77 %) | 6 (60 %) | 14 (78 %) |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> № 284 | 19 | 8 | 15 | 18 (95 %) | 2 (25 %) | 10 (67 %) |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> simpl. | 12 | 15 | 16 | 10 (83 %) | 9 (60 %) | 12 (75 %) |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> 5** | 12 | 14 | 14 | 5 (42 %) | 8 (57 %) | 2 (14 %) |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> 9** | 5 | 12 | 11 | 2 (40 %) | 7 (58 %) | 1 (9 %) |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> 10 ** | 6 | 12 | 14 | 3 (50 %) | 6 (50 %) | 3 (21 %) |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> 11** | 13 | 22 | 18 | 9 (69 %) | 18 (82 %) | 7 (39 %) |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> тип 6A* | 11 | 7 | 16 | 7 (64 %) | 5 (7 %) | 9 (56 %) |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> тип 8* | 11 | 18 | 20 | 4 (36 %) | 12 (64 %) | 9 (45 %) |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> тип 19A* | 13 | 12 | 13 | 6 (46 %) | 5 (42 %) | 3 (23 %) |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> 49619 — штам ATCC (American Type Cultura Collection, USA) | 7 | 18 | 20 | 2 (29 %) | 11 (61 %) | 9 (45 %) |

* Датська класифікація (Erna Sund)

** Стрептококи групи А за Sunfield (типи за Griffith)

молекулярною масою 220 п. н. (рис. 1, б). Аналіз продуктів ампліфікації ДНК чотирьох штамів *Streptococcus pneumoniae* (див. рис. 1, б) дав змогу визначити розбіжності між штамми типу 6А і 8 з одного боку, та типом 19А, № 49619 (ATCC) — з другого, що також є показником внутрішньовидової варіабельності цього патогену.

Більш значний внутрішньовидовий поліморфізм визначається з допомогою довільних універсальних одиничних праймерів. На відміну від спрямованих, які відокремлюють один відомий локус, довільні праймери детектують багато неідентифікованих RAPD-локусів.

З допомогою довільного праймера p53 (рис. 1, в, г) детектуються у *Staphylococcus aureus* від 8 до 12 RAPD локусів, середній рівень поліморфізму — 60 %; у *Staphylococcus epidermidis* — від 10 до 19 RAPD локусів, середній рівень поліморфізму — 81 %; у *Streptococcus pyogenes* — від 5 до

13 RAPD локусів, середній рівень поліморфізму — 50 %; у *Streptococcus pneumoniae* — від 7 до 13 RAPD локусів, середній рівень поліморфізму — 44 %.

Довільний праймер p54 (рис. 1, д, е) дає змогу детектувати у *Staphylococcus aureus* від 6 до 15 RAPD локусів, середній рівень поліморфізму — 56 %; у *Staphylococcus epidermidis* — від 8 до 15 RAPD локусів, середній рівень поліморфізму — 53 %; у *Streptococcus pyogenes* — від 12 до 22 RAPD локусів, середній рівень поліморфізму — 62 %; у *Streptococcus pneumoniae* — від 7 до 18 RAPD локусів, середній рівень поліморфізму — 60 %.

Довільний праймер p64 детектує (рис. 1, ж, з) у *Staphylococcus aureus* від 16 до 21 RAPD локусів, середній рівень поліморфізму — 60 %; у *Staphylococcus epidermidis* — від 15 до 19 RAPD локусів, середній рівень поліморфізму — 72 %; у *Streptococcus pyogenes*

— від 11 до 18 RAPD локусів, середній рівень поліморфізму — 21 %; у *Streptococcus pneumoniae* — від 13 до 20 RAPD локусів, середній рівень поліморфізму — 42 %.

Остання обставина сприяє більш повній характеристиці інтрамолекулярної гетерогенності ДНК і визначенню розбіжностей між штамми в різних ділянках геному.

На дендрограмі (рис. 2) штам *St. aureus*, *St. epidermidis*, *Str. pneumoniae*, *Str. pyogenes* розподілено залежно від генетичних дистанцій між ними, що характеризує ступінь подібності та розбіжності досліджуваних патогенів.

При цьому виділяється кілька кластерів. Перший кластер складають штам *St. aureus*, причому найменші генетичні дистанції відмічено між штамми, які характеризуються ампліконами з однаковою молекулярною масою. Другий кластер містить штам *St. epidermidis*. Штам *St. epi-*

dermidis 284 (8) вийшов за межі даного кластера, хоча характеризувався ампліконом з молекулярною масою, характерною для цього виду патогену. Можливо, є розбіжності в інших ділянках геному, що ще належить з'ясувати. До третього кластера входять штами *Streptococcus pyogenes*, а до четвертого — *St. pneumoniae*.

Таким чином, з допомогою ПЛР-аналізу визначено внутрішньовидову специфічність штамів *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, яка є наслідком варіабельності генетичних структур. Остання обставина є підставою для пошуку зв'язку між особливостями генотипів (штамів) мікроорганізмів і такими ознаками, як патогенність, антибіотикорезистентність та іншими біологічними властивостями збудників гнійно-септичних захворювань.

Запропонований метод допомагає підвищити точність і швидкість ідентифікації збудників, дає змогу прогнозувати перебіг захворювання й визначити адекватність запровадженої інтенсивної терапії.

Автори висловлюють сердечну подяку д-ру мед. наук С. В. Шапіро і канд. мед. наук В. В. Ніколаєвському за люб'язно надані штами.

ЛІТЕРАТУРА

1. Brook I., Gober A. E. Microbiologic characteristics of persistent otitis

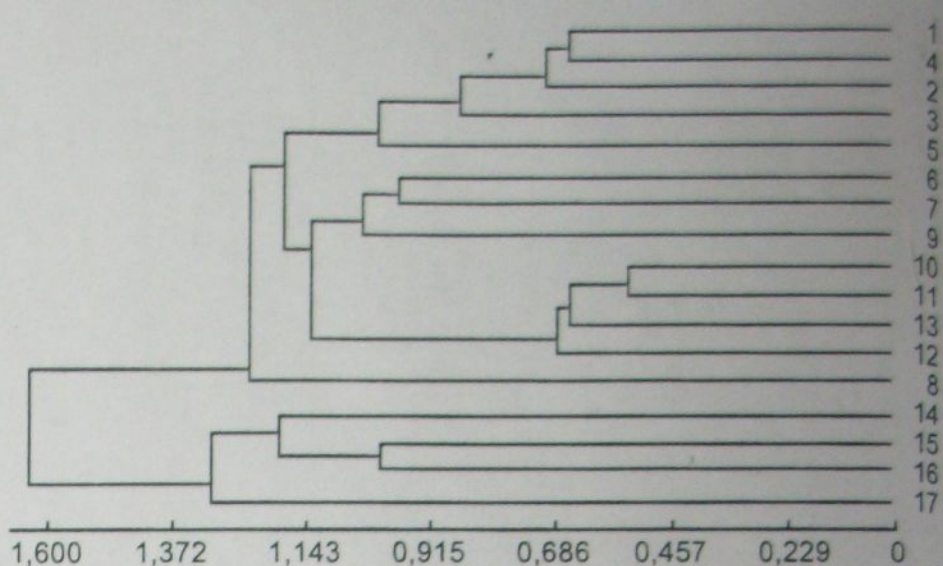


Рис. 2. Дендрограма розподілу штамів *St. aureus*, *St. epidermidis*, *Str. pneumoniae*, *Str. pyogenes* залежно від генетичних дистанцій. 1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (отримано із CDC, Атланта); 2. *Staphylococcus aureus* № 285; 3. *Staphylococcus aureus* Cowan 1 (продуцент протеїну А); 4. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; 5. *Staphylococcus aureus* 209p; 6. *Staphylococcus epidermidis* № 287; 7. *Staphylococcus epidermidis* № 286; 8. *Staphylococcus epidermidis* № 284; 9. *Staphylococcus epidermidis*; *Streptococcus pyogenes* (стрептококи групи А за Sunfield) типи за Griffith; 10. 5; 11. 9; 12. 10; 13. 11; 14. *Streptococcus pneumoniae* тип 6А; 15. *Streptococcus pneumoniae* тип 8; 16. *Streptococcus pneumoniae* тип 19А; 17. *Streptococcus pneumoniae* 49619 — штам ATCC (American Type Culture Collection, USA)

media // Arch Otolaryngol Head Neck Surg. — 1998. — Vol. 124, № 12. — P.1350-1352.

2. Sawmiller C. J., Dudrick S. J., Hamzi M. Postsplenectomy Capnocytophaga canimorsus sepsis presenting as an acute abdomen [In Process Citation] // Arch Surg. — 1998. — Vol. 133, № 12. — P.1362-1365.

3. Flint J. A., Ryan P., Gordon D. L. Prevalence of MRSA in South Australian nursing homes [letter] // Med J. Aust. — 1998. — Vol. 169, № 10. — P. 559-560.

4. Moreira M., Medeiros E.A., Pignatari A.C. et al. The effect of nosocomial bloodstream infection by *Staphylococcus aureus* resistant to oxacillin on the mortality and the length of

hospitalization [In Process Citation] // Rev Assoc Med Bras. — 1998. — Vol. 44, № 4. — P. 263-268.

5. Бажора Ю. І., Носкін Л. О., Ніколаєвський В. В. Полімеразна ланцюгова реакція в експрес-діагностиці токсигенних властивостей збудника дифтерії // Одес. мед. журн. — 1998. — № 3 (47). — С. 34-37.

6. Аксенов М. Ю., Гунцбург А. Л. Диагностика инфекционных заболеваний с помощью метода ПЦР // Молекул. генетика, микробиология и вирусология. — 1993. — № 4. — С. 3-8.

7. Courvalin. P. Evolution of stability to antibiotics // Medecine Sciences. — Sept. 1997. — № 8-9, Vol 13. — P. 925-927.