

УДК 579.234:871.1

Михальський Л. О., Фуртат І. М., Ногіна Т. М., Веденеєва О. А.

## ВИКОРИСТАННЯ КОМП'ЮТЕРНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ОЦІНКИ АНТИГЕННИХ ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКІВ РІЗНИХ ВИДІВ КОРИНЕБАКТЕРІЙ

*Для дослідження антигенних властивостей методом імуноферментного аналізу та встановлення взаємозв'язків між представниками різних видів *Corynebacterium*, створено комп'ютерну програму розрахунку коефіцієнта  $R$ , який дозволяє формалізувати оцінку ступеня антигенної спорідненості видів у межах роду та розподіляти штами на групи із певним ступенем антигенної подібності. Встановлено узгодженість проведеного групування колекційних штамів коринебактерій за антигенними властивостями з їх групуванням за традиційними діагностичними ознаками та доведено можливість використання цієї програми для диференціації та ідентифікації даних бактерій.*

Важливе значення актинобактерій, зокрема представників роду *Corynebacterium*, у природі, господарській діяльності людини та медицині обумовлює необхідність розробки нових підходів для удосконалення їх систематики, пошук інформативних і відносно простих за виконанням та надійних тестів для їх діагностики. Визначення таксономічної належності актинобактерій за запропонованими авторами "Определителя бактерий Берги" [1] та Stackebrandt із співавт. [2] класифікаційними системами, які основані на сукупності генетичних, хемотаксономічних і фенотипічних ознак, тривале, трудомістке та непридатне для масового аналізу значної кількості бактеріальних культур. Перспективними у цьому плані є імунологічні методи, які дозволяють проводити диференціацію не тільки окремих штамів і видів, але й виявити у них антигенні взаємозв'язки, які визначають ступінь їх спорідненості [3,4]. Для об'єктивної оцінки даних, отриманих при дослідженні як серологічних, так і інших фенотипічних властивостей бактерій, останнім часом усе ширше використовуються методи нумеричного аналізу, які базуються на застосуванні спеціальних комп'ютерних програм [4, 5]. За допомогою цих програм можна групувати штами на основі їх подібності за комплексом біологічних ознак, зокрема, антигенних властивостей; визначати серед значної кількості штамів найбільш типових представників у межах певних груп та виявляти взаємозв'язки між окремими штамами при поступовому зменшенні їх спорідненості.

У зв'язку із сказаним вище, метою даної роботи було створення комп'ютерної програми для аналізу антигенних властивостей представників різних видів роду *Corynebacterium*, досліджених методом імуноферментного аналізу (ELISA).

Об'єктами досліджень були штами *C. glutamicum* (УКМ Ас-733, УКМ Ас-714 і УКМ Ас-715),

*C. ammoniagenes* УКМ Ас-732<sup>Тип</sup>, *C. vitaeuruminis* УКМ Ас-718<sup>Тип</sup>, *C. variabilis* (УКМ Ас-716 і УКМ Ас-717<sup>Тип</sup>), *Corynebacterium sp. (Brevibacterium stationis)* УКМ Ас-719, отримані з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України, а також виробничі штами *C. glutamicum* 22Л та *Corynebacterium sp. E531* і ВНИИгенетика 90, одержані із посівної лабораторії Трипільського біохімічного заводу. У роботі використовували охарактеризовані нами раніше [6] імунні сироватки, специфічні до *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732, *C. vitaeuruminis* УКМ Ас-718, *C. variabilis* УКМ Ас-717, *C. glutamicum* УКМ Ас-733 та *Corynebacterium sp. УКМ Ас-719*, які відповідно позначали як: анти-732, анти-718, анти-717, анти-733 і анти-719. Імуноферментний аналіз (ELISA) проводили з інтактними (термолабільні — ТЛ-АГ) та прогрітими (термостабільні — ТС-АГ) клітинами коринебактерій [7]. Для аналізу результатів ELISA взаємодії досліджених штамів з різними імунними сироватками застосовували спеціально створену нами комп'ютерну програму, блок-схема якої представлена на рис. 1. За допомогою цієї програми будували графіки залежності інтенсивності імуноферментної реакції (величина екстинкції  $E$  при  $\lambda = 492$ ) від 2 кратних розведень антисироваток (1:1000 — 1:128000) та розраховували умовний коефіцієнт  $R$ . Цей коефіцієнт, визначений на основі показників  $E_{492}$  при взаємодії штамів із різними імунними сироватками, характеризує ступінь їх подібності до імуногену. Для двох кривих екстинкції коефіцієнт  $R$  визначався за формулою:

$$R = \sum_{i=1}^n \frac{a_i - b_i}{nb_i},$$

де  $a^i$  — інтенсивність ELISA у гомологічній системі антиген—антитіло,  $b^i$  — інтенсивність ELISA у гетерологічній системі антиген—антитіло,

$n$  — кількість розведень антисироватки, при яких визначали  $E_{492}$ . Коефіцієнт  $R$  дорівнює "0" для гомологічної системи антиген — імунна сироватка і досягає значення "1" для найбільш віддалених один від одного антигенів. При перевищенні інтенсивності реакції гетерологічних антигенів над гомологічними він набуває від'ємного значення. Середньоквадратичну похибку  $S$  розраховували за формулою:

$$S = \frac{\sum_{i=1}^n \left( R - \frac{a_i - b_i}{a_i} \right)^2}{n-1},$$

позначення в якій аналогічні вказанім вище.

Відомо, що серологічні властивості є одними з важливих біологічних ознак, що широко застосовуються у таксономії різних груп мікроорганізмів. Однак використання методів нумеричного аналізу для визначення антигенних взаємозв'язків між дослідженими штамми описано тільки для представників деяких родів актинобактерій, зокрема для видів *Rhodococcus* та *Arthrobacter* [3, 4]; непатогенні коринебактерії у цьому плані практично не досліджені. На основі вивчення серологічних властивостей типових штамів родококів та їх природних ізолятів методом імунодифузії встановлено, що групування штамів, представлене у вигляді дендрограми, і яке ілюструє антигенні взаємозв'язки окремих видів, узгоджується з даними по секвенуванню 16S рРНК [3]. Методи аглютинації, імунофлуоресценції та імуноферментного аналізу з подальшим кластерним аналізом отриманих даних успішно використовувалися в таксономічних дослідженнях представників роду *Arthrobacter* (колекційних штамів та природних ізолятів) [4]. Авторами встановлено, що групування штамів артробактерій за даними, отриманими із застосуванням різних серологічних методів, узгоджувалось з їх розподілом, здійсненим на основі нумеричного аналізу за комплексом традиційних діагностичних ознак.

У проведених раніше дослідженнях з використанням методу ELISA нами було вивчено антигенну спорідненість представників різних видів непатогенних *Corynebacterium* [6, 7]. Одержані дані були представлені у вигляді графіків залежності показників інтенсивності ELISA від розведення сироваток. Результати цих досліджень показали, що порівняльний аналіз кривих екстинкції є досить суб'єктивною характеристикою і не приводить до однозначної інтерпретації експериментального матеріалу. Крім того, інколи візуальне визначення ступеня антигенної подібності за характером розміщення кривих екстинкції при взаємодії кількох штамів з різними імунними сироватками одночасно в одній системі буває практично неможливим (рис. 2, а, б). У зв'язку з цим для об'єктивної оцінки ступеня подібності антигенів за показниками імунофермент-

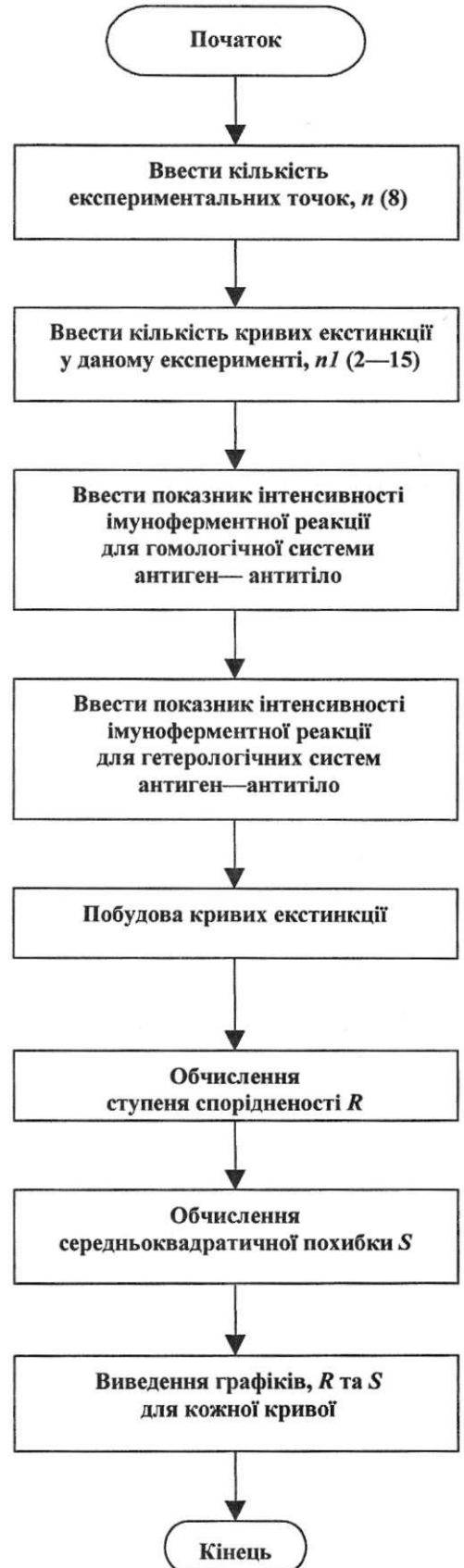


Рис. 1. Блок-схема комп'ютерної програми для розрахунку коефіцієнта  $R$  за результатами імуноферментного аналізу (ELISA).

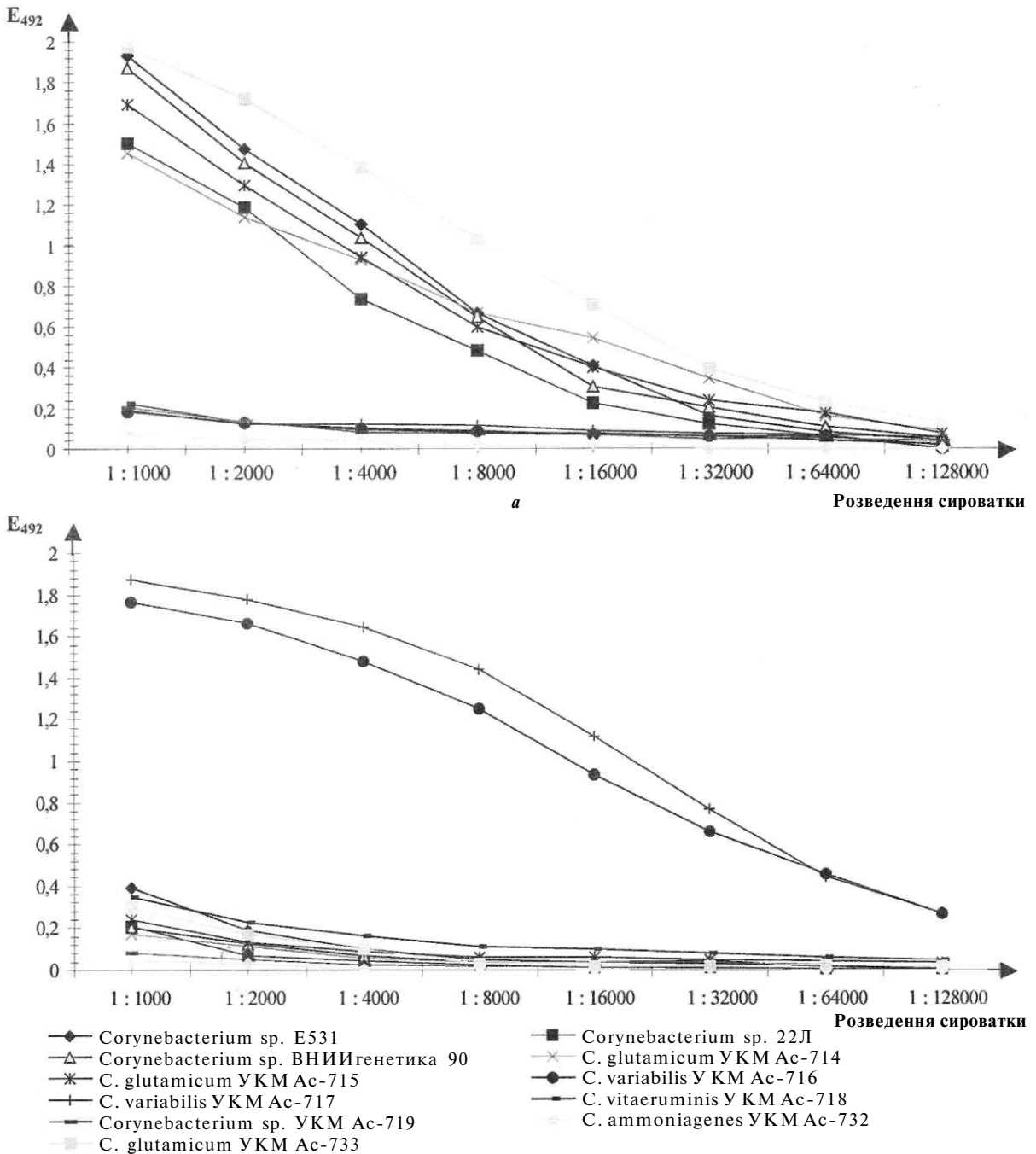


Рис. 2. Інтенсивність імуоферментної реакції ELISA при взаємодії інтактних клітин непатогенних коринебактерій різних штамів з імунними сироватками, специфічними до *C. glutamicum* UKM Ac-733 (а) та *C. variabilis* UKM Ac-717 (б).

ної реакції нами була створена спеціальна комп'ютерна програма, за допомогою якої визначали умовно прийнятий коефіцієнт *R*. Розраховані значення *R* використовували для побудови гістограм, які наочно ілюструють одержані результати (рис. 3, а, б). На нашу думку, такий підхід є оптимальним, бо дає можливість швидкого й комплексного аналізу результатів реакції ELISA для значної кількості штамів та їх порівняння з типовими представниками певного виду.

Можливості застосування створеної програми оцінювали на прикладі колекційних штамів непатогенних коринебактерій з метою їх диференціації та розподілу на групи. Дослідженнями встановлено, що групування штамів за антигенними властивостями, проведене із застосуванням цієї програми, збігалось з їх таксономічною належністю, встановленою раніше за допомогою традиційних біологічних ознак.

Таким чином, у результаті проведених дослід-

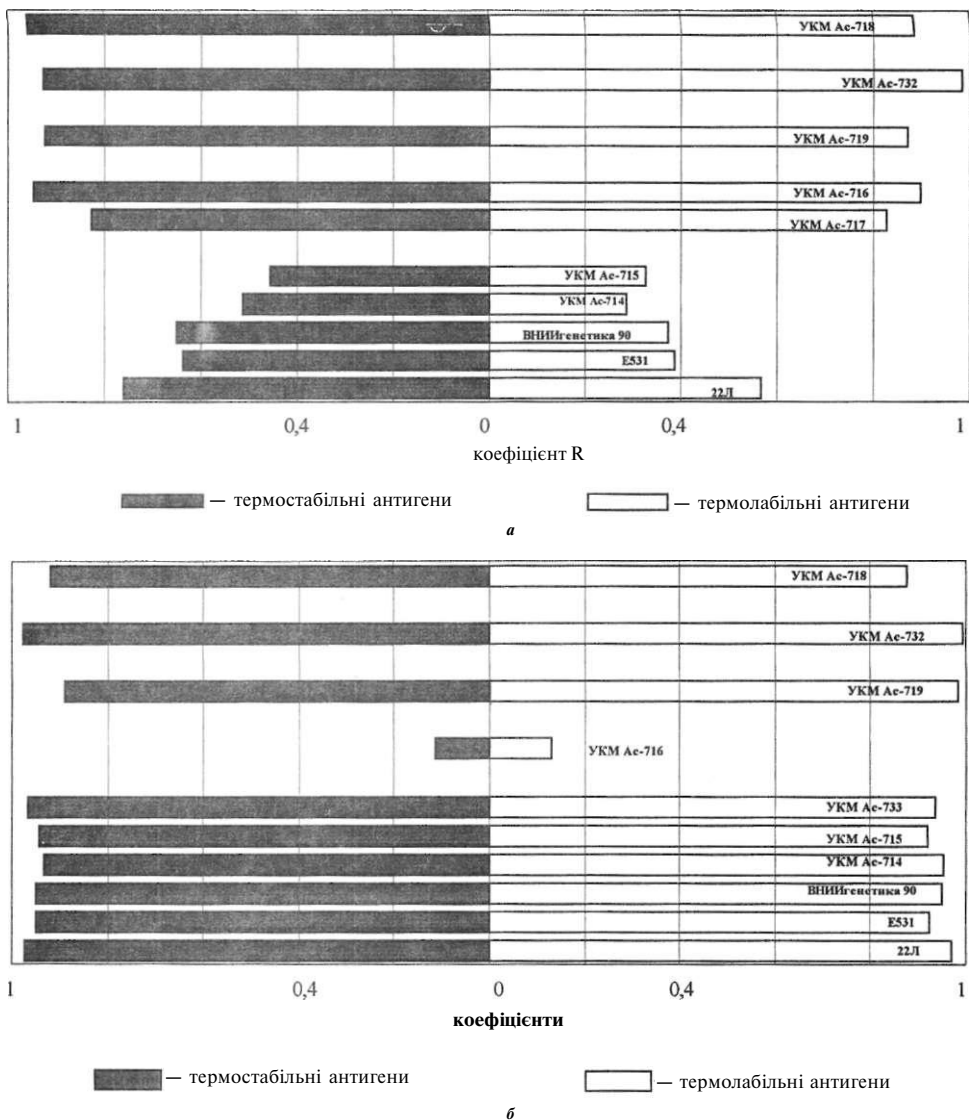


Рис. 3. Коefіцієнти  $R$ , що відображають антигенну спорідненість коринебактерій при взаємодії різних штамів з імунними сироватками, специфічними до *C. glutamicum* UKM Ac-733 (а) та *C. variabilis* UKM Ac-717 (б).

джен було доведено правомірність та доцільність використання створеної комп'ютерної програми для визначення ступеня серологічної спорідненості різних видів непатогенних коринебактерій та використання отриманих даних для діагностики цих мікроорганізмів. Подальші дослідження будуть

спрямовані на вивчення антигенних властивостей ізольованих з різних еконіш штамів коринеподібних бактерій та визначення їх систематичного положення шляхом встановлення антигенних взаємозв'язків з типовими представниками описаних видів коринебактерій.

1. Определитель бактерий Берги: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта и др.— М: Мир, 1997.— Т. 2,— 368 с.
2. Stackebrandt E., Rainey F. A., Ward-Rainey N. L. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. // Int. J. Syst. Bacteriol.— 1997.— Vol. 47.— № 2.— P. 479—491.
3. Ившина И. Б. Бактерии рода Rhodococcus (иммунодиагностика, детекция, биоразнообразие): Автореф. дис... д-ра биол. наук.— Пермь, 1997.— 98 с.
4. Gray T. R., Mansoor Y. The application of serological techniques to the taxonomy of Arthrobacter and related organisms // Microbiology.— 1996.—Vol. 142 — № 3.—p. 561—573.
5. Vauterin L., Swings J., Kersters K. Protein electrophoresis and classification // Handbook of new bacterial systematics / Ed. by M. Goodfellow, A. G. O'Donnell.— London: Acad. Press, 1993.—P. 251—280.
6. Фуртам J. М., Ногина Т. М., Михальський Л. О. Антигенні властивості деяких видів непатогенних коринебактерій // Бюл. Ін-ту сільськогосп. мікробіол.— 2000.— № 7.— С. 17.
7. Михальський Л.А., Ногина Т. М., Фуртам И. М. Исследование серологических свойств сапрофитных коринебактерий с помощью иммуноферментного анализа // Микробиол. журн.— 1997,— Т. 59,— № 5.— С. 22—27.

*Mykhalsky L. O., Furtat I. M., Nogina T. M., Vedeneeva E. A.*

**USING OF COMPUTER'S ANALYSIS FOR EVALUATION  
OF ANTIGENIC INTERRELATION BETWEEN DIFFERENT  
CORYNEBACTERIUM SPECIES**

*For the study of antigenic features (using immunosorbent assay ELISA) and evaluation of interrelation between different species of Corynebacterium genus, special computer's program was made to count coefficient R. This coefficient allows evaluating the degree of antigenic similarity among species, belonging to one genus and divide strains into the groups with certain degrees of antigenic similarity. The clustering of Corynebacterium collection strains, which was performed on base of antigenic features correlated with those performed on base of conventional features. Also was proved the ability of use our program for differentiation and identification this bacteria.*