

//Терапевт. арх. — 1976. — 18, № 1. — С. 55-63.

8. Александров В.В., Шнейдеров В.С. Обработка медико-биологических данных на ЭВМ. — Л.: Медицина, 1984. — 158 с.

9. Зинченко В.П., Вергилес Н.Ю. Формирование зрительного образа. — М.: Изд-во МГУ, 1969. — 160 с.

10. Ванда В. Предисловие к русскому изданию книги У. Боумена "Графическое представление информации". — М.: Мир, 1971. — С. 5-14.

11. Гешвинд Н. Специализация человеческого мозга //— М.: Мир, 1982. — С. 218-239.

12. Selfridge O.G. Pattern recognition and learning //E.C. Cherry (Editor), Information Theory, Butterworth. — London, 1956. — P. 162-186.

13. Каллен Д. Дж., Теплик Р. Перспективы использования ЭВМ в интенсивной терапии // ТИИЭР. — 1979. — 67, № 9. — С. 153-155.

14. Кассирский И.А. О врачевании. Проблемы и раздумья. — М.: Медицина, 1970. — 271 с.

15. Эльштейн Н.В. Диалог о медицине. — Таллин: Валгус, 1983. — 224 с.

16. Тарасов К.Е., Великов В.К., Фролова А.И. Логика и семиотика диагноза. — М.: Медицина, 1989. — 272 с.

17. Боумен У. Графическое представление информации. — М.: Мир, 1971. — 228 с.

18. Arnheim R. Education of vision. — London: Studio, 1965. — 160 p.

19. Hara F., Yamashita T., Kitazawa S. A fundamental study on face grace graph for its application to plant opetation surveillance. — Tokyo, 1978. — 240 p.

Львів. окружний
військовий госпіталь

Одержано 27.09.94

Л. Носкин, О. Кабоев, В. Николаевский,
Е. Буйко, Ю. Бажора, Е. Никитин,
В. Соколовский, Д. Андронов

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В ДИАГНОСТИКЕ ДИФТЕРИИ

Описано метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), яка застосовується для ранньої діагностики дифтерії. Показано його переваги перед іншими методами, наведено експериментальні дані, що свідчать про доцільність клінічного впровадження ПЛР.

A method of the polymerase chain reaction (PCR) used for early diagnostication of diphtheria is described. Its advantages in comparison with other methods are shown. Experimental findings confirming expediency of clinical application of the PCR are presented.

Одной из основных проблем инфектологии в последние годы является рост заболеваемости дифтерией и ее ранняя диагностика. Существующие традиционные методы лабораторной диагностики не соответствуют современным требованиям в связи с трудоемкостью, невысокой чувствительностью, сложностью дифференцирования и длительностью проведения исследований.

Для ранней диагностики дифтерии перспективным, на наш взгляд, является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), заключающейся в многократном реплицировании специфического участка исследуемой нуклеотидной последовательности, катализируемом ДНК-полимеразой. С целью выявления дифтерийно-

го токсина мы использовали метод геноспецифической диагностики, основанный на амплификации фрагмента токсигенного гена коринебактерии дифтерии, а в качестве ДНК-полимеразы — термостабильную полимеразу Tth из *Thermus thermophilus* производства Санкт-Петербургского Института ядерной физики. Материалом для исследования служили смывы из ротоглотки больных с диагнозом дифтерия, ангина и бактерионосителей, поступивших в Одесскую городскую инфекционную больницу в 1993 г. Материал получали с помощью стерильных сухих ватных тампонов.

Для получения препаратов ДНК из ротоглоточных смывов применяли метод щелочного лизиса с последующей нейт-

© Л. Носкин, О. Кабоев, В. Николаевский и др., 1994

рализацией 1М раствором трио-НС1 (рН 7,5). Осаждение фрагментов клеточной стенки проводили центрифугированием в течение 15 мин при 8000 об/мин. Супернатант, являющийся грубым препаратом ДНК, отбирали и использовали в качестве матрицы для ПЦР.

Результаты геноспецифической ПЦР регистрировали в виде фореграмм в агарозном геле. Для визуализации выделенных фрагментов ДНК в ультрафиолетовом свете гель окрашивали в течение 15 мин в растворе бромистого этидия. При позитивной реакции результат детектировали в виде дискретной флюоресцирующей полосы в области фрагмента ДНК 250 пар оснований. Размер фрагмента устанавливали на основе сопоставления с подвижностью рестрикционных фрагментов ДНК фага λ известной массы, полученных с помощью рестриктазы Pst 1.

Нами получена фореграмма, идентифицирующая результаты одиннадцати определений (дорожек). На дорожку 8 нанесен лизат токсигенного штамма *Corynebacterium diphtheriae* из коллекции бактериологической лаборатории. Дорожкам 10 и 11 отвечают данные амплификации заведомого положительного контроля в 10- и 100-кратном разведении. Результаты клинических наблюдений соответствуют 1-7 и 9 дорожкам. Схема оценки результатов амплификации такова. Слабо выраженная диффузная флюоресценция на уровне финиша фореграмм не оценивалась, так как на этом уровне визуализированы сами праймеры. В случае присутствия в образце интересующей нас генетической последовательности (комплементарно праймируемой прямым и обратным праймерами) на фореграмме после обработки бромистым этидием четко выявлена флюоресцирующая полоса на уровне фрагмента ДНК-гена токсигенности контроля.

Согласно полученным фореграммам ген токсигенности дифтерийной палочки выявлен в шести из восьми клинических наблюдений, верификация которых бактериологическим и клиническим методами исследований приведена в табл. 1.

При бактериологическом исследовании в 7 и 9 выявлена токсигенная форма возбудителя дифтерии, а ПЦР дала отрицательный результат. Это можно объяснить тем, что бактериологический посев сделан в первый день госпитализации больного, а материал для ПЦР взят лишь спустя две недели после введения противодифтерийной сыворотки (ПДС). Кли-

Таблица 1. Верификация наблюдений бактериологическим и клиническим методами исследований

Номер дорожки	Предполагаемый вид возбудителя	Клиническая форма дифтерии
1	Gravis toxigenic	Островчатая
2	Gravis toxigenic	Бактерионосительство
3	Gravis toxigenic	Токсическая
4	Gravis toxigenic	Дифтерия зева (токсическая 2-й степени)
5	Gravis toxigenic	Островчатая
6	Gravis toxigenic	Дифтерия ротоглотки (распространенная)
7	Gravis toxigenic	Субтоксическая
8	Контроль	
9	Gravis toxigenic	Субтоксическая
10	Контроль	
11	Контроль	

Примечание. Согласно результатам бактериологического анализа токсигенность для всех дорожек положительна.

нически у обоих больных проявлялась дифтерия зева субтоксической формы. Лихорадка сохранялась три-четыре дня после введения ПДС, изменения в зеве исчезали к четвертому-пятому дню. При взятии смывов из зева состояние больных было удовлетворительным и поэтому отрицательные результаты ПЦР вполне объяснимы. К этому времени токсигенная палочка в смывах отсутствовала, что подтверждено повторным бактериологическим посевом, давшим отрицательный результат. В остальных случаях результаты бактериологических, клинических и геноспецифических исследований совпали. Следует отметить, что в наших наблюдениях материалом для анализа являлся исходный смыв, а не первично выделенные культуры. В плане клинической адаптации геноспецифической методики именно подобные подходы имеют особое значение. Представляется возможным анализировать исходный биологический материал на предмет идентификации в нем искомой генетической последовательности практически без всякой предварительной обработки.

Мы наблюдали 56 больных с диагнозами дифтерия, ангина и бактерионосительство дифтерийной палочки. При постановке диагноза учитывали прежде всего клинические проявления и их динамику, бактериологические исследования (выделение дифтерийной палочки), уровень исходных антител в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) и эпидемиоло-

рализацией 1М раствором трио-НС1 (рН 7,5). Осаждение фрагментов клеточной стенки проводили центрифугированием в течение 15 мин при 8000 об/мин. Супернатант, являющийся грубым препаратом ДНК, отбирали и использовали в качестве матрицы для ПЦР.

Результаты геноспецифической ПЦР регистрировали в виде фореграмм в агарозном геле. Для визуализации выделенных фрагментов ДНК в ультрафиолетовом свете гель окрашивали в течение 15 мин в растворе бромистого этидия. При позитивной реакции результат детектировали в виде дискретной флюоресцирующей полосы в области фрагмента ДНК 250 пар оснований. Размер фрагмента устанавливали на основе сопоставления с подвижностью рестрикционных фрагментов ДНК фага λ известной массы, полученных с помощью рестриктазы Pst I.

Нами получена фореграмма, идентифицирующая результаты одиннадцати определений (дорожек). На дорожку 8 нанесен лизат токсигенного штамма *Corynebacterium diphtheriae* из коллекции бактериологической лаборатории. Дорожкам 10 и 11 отвечают данные амплификации заведомого положительного контроля в 10- и 100-кратном разведении. Результаты клинических наблюдений соответствуют 1-7 и 9 дорожкам. Схема оценки результатов амплификации такова. Слабо выраженная диффузная флюоресценция на уровне финиша фореграмм не оценивалась, так как на этом уровне визуализированы сами праймеры. В случае присутствия в образце интересующей нас генетической последовательности (комплементарно праймируемой прямым и обратным праймерами) на фореграмме после обработки бромистым этидием четко выявлена флюоресцирующая полоса на уровне фрагмента ДНК-гена токсигенности контроля.

Согласно полученным фореграммам ген токсигенности дифтерийной палочки выявлен в шести из восьми клинических наблюдений, верификация которых бактериологическим и клиническим методами исследований приведена в табл. 1.

При бактериологическом исследовании в 7 и 9 выявлена токсигенная форма возбудителя дифтерии, а ПЦР дала отрицательный результат. Это можно объяснить тем, что бактериологический посев сделан в первый день госпитализации больного, а материал для ПЦР взят лишь спустя две недели после введения противодифтерийной сыворотки (ПДС). Кли-

Таблица 1. Верификация наблюдений бактериологическим и клиническим методами исследований

Номер дорожки	Предполагаемый вид возбудителя	Клиническая форма дифтерии
1	Gravis toxigenic	Островчатая
2	Gravis toxigenic	Бактерионосительство
3	Gravis toxigenic	Токсическая
4	Gravis toxigenic	Дифтерия зева (токсическая 2-й степени)
5	Gravis toxigenic	Островчатая
6	Gravis toxigenic	Дифтерия ротоглотки (распространенная)
7	Gravis toxigenic	Субтоксическая
8	Контроль	
9	Gravis toxigenic	Субтоксическая
10	Контроль	
11	Контроль	

Примечание. Согласно результатам бактериологического анализа токсигенность для всех дорожек положительна.

нически у обоих больных проявлялась дифтерия зева субтоксической формы. Лихорадка сохранялась три-четыре дня после введения ПДС, изменения в зеве исчезали к четвертому-пятому дню. При взятии смывов из зева состояние больных было удовлетворительным и поэтому отрицательные результаты ПЦР вполне объяснимы. К этому времени токсигенная палочка в смывах отсутствовала, что подтверждено повторным бактериологическим посевом, давшим отрицательный результат. В остальных случаях результаты бактериологических, клинических и геноспецифических исследований совпали. Следует отметить, что в наших наблюдениях материалом для анализа являлся исходный смыв, а не первично выделенные культуры. В плане клинической адаптации геноспецифической методики именно подобные подходы имеют особое значение. Представляется возможным анализировать исходный биологический материал на предмет идентификации в нем искомой генетической последовательности практически без всякой предварительной обработки.

Мы наблюдали 56 больных с диагнозами дифтерия, ангина и бактерионосительство дифтерийной палочки. При постановке диагноза учитывали прежде всего клинические проявления и их динамику, бактериологические исследования (выделение дифтерийной палочки), уровень исходных антител в реакции пассивной геммагглютинации (РПГА) и эпидемиоло-

гическую обстановку. У 37 больных поставлен диагноз дифтерия, из них у 21 — клинически, у 16 он подтвержден выделением дифтерийной палочки, причем в семи случаях палочка нетоксигенна. Бактерионосительство дифтерийной палочки наблюдали в восьми случаях, ангину — в десяти (табл. 2).

Таблица 2. Результаты обследования наблюдаемых больных

Диагноз	Количество наблюдаемых	Результаты	
		бактериологической диагностики	геноспецифической ПЦР-диагностики
Дифтерия	11	—	+
Дифтерия	17	—	—
Дифтерия	3	+	+
Дифтерия	6	+	—
Лакунарная ангина	8	—	—
Лакунарная ангина	2	—	+
Бактерионосительство	6	—	—
Бактерионосительство	1	—	+
Бактерионосительство	1	+	—
Инфекционный мононуклеоз	1	—	—

Примечание. В группу бактериологически отрицательных результатов вошли случаи обнаружения нетоксигенных штаммов.

Корреляционный анализ результатов бактериологического и геноспецифического исследования на ген токсигенности дифтерийной палочки у больных с клиническими проявлениями дифтерии различной степени тяжести приведен ниже:

Бактериологичность	—	—	+	+
Геноспецифичность	—	+	—	+
Количество больных	33 (59 %)	14 (25 %)	6 (10 %)	3 (6 %)

Очевидно, что клинический диагноз дифтерии не подтвержден в 59% случаев ни одним из двух использованных методов, что вызвано множеством причин. Вероятно, основная из них состоит в сложности клинической оценки поражения зева прежде всего при локализованных формах дифтерии зева и неспеци-

фических ангинах. Кроме того, в условиях вспышки дифтерии вполне понятна тенденция к гипердиагностике. Выбрав из клинических наблюдений только те, где клиническая симптоматика соответствует более строгой дифференциации дифтерийного процесса, постараемся оценить вклад этого фактора. Таких больных в наших исследованиях 33 (60%), у остальных 40% отмечены плохо дифференцируемые ангинозные состояния легкого течения (без дополнительной дифтерийной симптоматики). Далее приведем корреляционный анализ совпадений и несовпадений по бактериологическим и геноспецифическим исследованиям при строгих клинических формах дифтерии:

Бактериологичность	—	—	+	+
Геноспецифичность	—	+	—	+
Количество больных	11 (33 %)	13 (40 %)	6 (18 %)	3 (9 %)

Как видно, исключение клинически спорных случаев приводит почти к двукратному снижению лабораторно неподтвержденных диагнозов. Наиболее доступный бактериологический анализ на данном этапе даже в относительно бесспорных случаях дает положительный результат, а на уровне всех наблюдений — 16%. Совершенно очевидно, что геноспецифическая идентификация методом ПЦР даже на начальном этапе поисковых исследований совпадает с бесспорной клинической симптоматикой более чем в половине случаев, а на уровне всех наблюдений — более чем в 30%. Однако приведенные количественные характеристики могут быть достаточно надежно увеличены при разработке более совершенной методологии исследования, в частности правильном выборе сроков обследования.

Как следует из сказанного выше, при положительном результате бактериологических исследований из-за несвоевременного взятия материала регистрировался отрицательный результат геноспецифической амплификации. Отрицательные результаты ПЦР при положительных результатах бактериологических исследований отмечены в шести случаях (см. выводы). При этом в пяти из них смывы у больных для постановки геноспецифической ПЦР брали на 6-12 дни после введения ПДС. С учетом данных ложноотрицательных результатов доля совпадений клинических наблюдений с данными ПЦР-

диагностики возрастает до 70 %, что существенно превышает специфичность общепринятой бактериологической диагностики.

Особый интерес представляют также следующие наблюдения. В девяти случаях клинической дифтерии (бактериологически неподтвержденной) геноспецифический анализ дал положительный результат, у двух больных с выделенными нетоксигенными штаммами метод ПЦР также дал положительный результат, а у двух больных с тяжелой ангиной — показал наличие в смывах токсигенного возбудителя дифтерии, что позволило поставить диагноз дифтерии.

Интересен также случай обнаружения токсигенного штамма коринебактерии дифтерии у пациента с бактерионосительством нетоксигенной дифтерийной палочки. Учитывая, что до госпитализации больной перенес ангину, а также рост титра противодифтерийных антител в РПГА, ретроспективно поставлен диагноз дифтерии.

На основе приведенных результатов можно сделать вывод, что геноспецифическая идентификация Тох-генов коринебактерии дифтерии методом ПЦР с парой праймеров в большинстве случаев может быть весьма полезной и оказывать существенную помощь клиницистам в вопросе

своевременной постановки диагноза дифтерии.

Дальнейшее методическое совершенствование целесообразно как в направлении повышения чувствительности метода (использование двухпраймерных систем, дифференцирующих различные фрагменты Тох-гена), так и регламента его использования (сроки забора клинического материала, его консервация, выделение ДНК). На данном этапе с учетом простоты, автоматизации и унифицированности метода, сроков получения ответа (4–5 ч) и безопасности его применения (образцы надежно дезинфицируются в ходе фенол-хлороформной обработки) метод геноспецифической видоидентификации заслуживает широкого клинического внедрения.

1. *Возианова Ж.П. и др.* Клиника, диагностика дифтерийных миокардитов и принципы их лечения: Метод. рекомендации. — Киев, 1993. — 26 с.

2. *Saiki R.K., Bugavan C.V.* Nature. — 1986. — 342. — P. 163-166.

*С.-Петербург. ин-т ядерной физики,
Одес. гос. мед. ун-т им. Н.И. Пирогова*

Получено 27.09.94

Р. Луцьк, Н. Пимоненко, Э. Малкин

МАССОБМЕННЫЕ СВОЙСТВА И ПОРИСТЫЕ СТРУКТУРЫ УГЛЕВОЛОКНИСТЫХ СОРБЕНТОВ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ МЕТОДОМ ТЕРМОГРАММ СУШКИ

Розроблена методика дослідження масообмінних властивостей і характеристик мікропористої структури капілярно-пористих тіл, яка оснований на використанні методу термограм сушіння матеріалів, зволжених рідинами з різними фізико-хімічними властивостями і розміром молекул. Методика апробована на зразках вуглеволокнистих сорбентів медичного призначення.

The technique for investigation of mass-exchange properties and characteristics of the microporous structure of capillary-porous bodies has been developed. It is based on usage of a method of thermograms showing drying of materials moistened by liquids with different physico-chemical properties and different sizes of molecules. The technique was tested on samples of carbon-fibrous sorbents of medical purpose.

Проблема получения высокоэффективных энтеросорбентов — новых лекарственных препаратов на основе активированных

углеродных волокон — является в настоящее время чрезвычайно актуальной ввиду значительного увеличения среди

© Р. Луцьк, Н. Пимоненко, Э. Малкин, 1994