

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.98:579.841.111-078:547.963.32

Мальцева Н. В.¹, Воробьева О. Н.¹, Тараско А. Д.¹, Пирогов Е. А.²**ДНК-ДИАГНОСТИКА СИНЕГНОЙНОЙ ИНФЕКЦИИ**¹ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» Минздрава России, 654005, Новокузнецк; ²МБЛПУ «Городская клиническая больница № 1», 654057, Новокузнецк

Современная лабораторная диагностика синегнойной инфекции, включающая бактериологическое исследование с последующей идентификацией возбудителя, трудоемка и не всегда результативна в связи с изменчивостью его диагностических признаков. В настоящей работе представлен лабораторный способ идентификации *Pseudomonas aeruginosa*, основанный на электрофоретическом анализе ДНК, выделяемой из раневого материала или микробной массы, выращенной на плотной питательной среде. Материал из раны или чистую культуру помещают в физиологический раствор и прогревают при 99°C, что приводит к выделению в супернатант ДНК, образец которой подвергается стандартному горизонтальному электрофорезу в агарозном геле с бромистым этидием. Присутствие на электрофореграммах трех полос ДНК, флуоресцирующих в ультрафиолете, с размером фрагментов около 10 000, 6000 – 8000 и менее 750 пар нуклеотидов свидетельствует о наличии в исследуемом биоматериале *P. aeruginosa*. Данный способ позволяет идентифицировать как пигментобразующие, так и беспигментные штаммы *P. aeruginosa*, и дифференцировать их от других представителей неферментирующих грамотрицательных бактерий и наиболее значимых родов и видов семейства *Enterobacteriaceae*. Идентификация *P. aeruginosa* в раневом материале предлагаемым способом, осуществляемая без его бактериологического исследования, может служить методом экспресс-диагностики синегнойной инфекции.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*; инфекция; ДНК; диагностика; электрофорез; раны.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2015;60(12): 35–38.

Maltseva N.F.¹, Vorobyeva O.N.¹, Tarasko A.D.¹, Pirogov E.A.²

THE DNA DIAGNOSTIC OF PSEUDOMONAS INFECTION

¹The Novokuznetskii state institute of advanced training of physicians of Minzdrav of Russia, 654005 Moscow, Russia; ²The municipal clinical hospital №1, 654 Novokuznetsk, Russia

The modern laboratory diagnostic of pseudomonas infection, including bacteriologic analysis with subsequent identification of agent, is time-consuming and it is not every time effective because of modifiability of characteristics of the mentioned agent. The article presents the laboratory mode of identification of *Pseudomonas aeruginosa* based on electrophoresis analysis of DNA isolated from wound samples or microbial mass grew on solid nutritional medium. The wound sample or pure growth is placed into physiological solution and is warmed under 99°C. This action results in DNA releasing into supernatant which sample is underwento standard horizontal electrophoresis in agarose gel with ethidium bromide. The presence on electrophoregrams of three bands of DNA fluorescent in ultraviolet with size of fragments about 10 000, 6000-8000a and less than 750 pairs of nucleotides testifies the presence of *P. aeruginosa* in the analyzed biomaterial. The given mode permits to identify both chromogenic and pigment-free strains of *P. aeruginosa* and to differentiate them of other representatives of non-fermentative gram-negative bacteria and most significant genera and species of family of *Enterobacteriaceae*. The identification of *P. aeruginosa* in wound sample using the proposed mode implementing without its bacteriological analysis, can be used as technique of express diagnostic of pseudomonas infection.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; infection; DNA; diagnostic; electrophoresis; wound

Citation: Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. 2015; 60 (12): 35–38. (in Russ.)

Лабораторные методы диагностики раневых инфекций, включающие бактериологическое исследование с последующей морфологической и биохимической идентификацией возбудителей, чрезвычайно трудоемки, длительны и требуют большого количества питательных сред и реактивов. Ранее нами был разработан метод оценки течения раневого процесса и эффективности лечения кожных ран различного генеза [1], заключающийся в электрофоретическом исследовании образцов ДНК, выделяемой из соскобов с поверхности ран. Использование принципа и приемов данного метода для выявления раневой инфекции явилось целью настоящей работы.

Материалы и методы. Исследованы музейные и клинические штаммы возбудителей раневых инфекций: 37 пигментобразующих и беспигментных изолятов *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), 15 – *Acinetobacter* spp., 1 – *Citrobacter freundii*, 5 – *Enterobacter* spp., 7 – *Klebsiella* spp., 4 – *Proteus*

spp., 14 – *Escherichia coli*, 5 – *Enterococcus faecalis*, 6 – *Staphylococcus* spp. Забор и бактериологическое исследование клинического материала проводили общепринятым способом. Полученную чистую культуру микроорганизма, выращенную на плотной питательной среде (мясопептонный агар, среда Эндо) в течение 16–18 ч, брали бактериологической петлей (одна полная петля диаметром 1 мм) и помещали в пластиковую одноразовую пробирку с крышкой и замком, содержащую 300 мкл реагента для выделения ДНК из биопроб («ДНК-ЭКСПРЕСС», НПФ «Литех», Москва) или 300 мкл физиологического раствора. Для выделения микробной ДНК в соответствии с инструкцией к реагенту «ДНК-ЭКСПРЕСС» микробную взвесь встряхивали на вортексе в течение 10–15 с и прогревали в твердотельном термостате в течение 20–25 мин при 99°C. Затем взвесь центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 30 с, добавляли краситель для электрофоретической детекции (НПФ «Литех», Москва) в объеме 0,5 мкл на пробу. 20 мкл супернатанта, содержащего ДНК, заливали в лунку размером 4 × 1 мм 1–2% агарозного геля, приготовленного в 20 мл 0,04 М трис-ацетатного буфера, рН 8,0, с 0,002 М ЭДТА (ТАЕ-буфер) с предварительно добавленными в гель 10 мкл 1% бромистого этидия. Для оценки структуры

Для корреспонденции: Мальцева Нина Васильевна, nina-maltseva2015@mail.ru

For correspondence: Maltseva N.F., ninamaltseva2015@yandex.ru

электрофореграмм ДНК использовали стандарт для определения длины двухцепочечных молекул ДНК – ДНК-маркер с 1 тыс. пар нуклеотидов (п. н.), состоящий из 13 фрагментов ДНК в размерном диапазоне 250–10 000 п. н. (ООО «Лаборатория МЕДИГЕН»). Проводили горизонтальный электрофорез в течение 15–20 мин, контролируя его длительность визуально по движению полосы красителя, которая должна пройти от лунки примерно 1,5 см. После электрофореза гель помещали на стекло УФ-трансиллюминатора и анализировали результат в проходящем УФ-свете длиной волны 310 нм. Исследование занимало около 1 ч.

Результаты и обсуждение. Исследованы музейные штаммы *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *P. aeruginosa*, чистые культуры которых с поверхности мясопептонного агара в объеме одной бактериологической петли каждая были помещены в отдельные пробирки с 300 мкл реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС» и обработаны вышеописанным способом. На электрофореграммах (рис. 1) была выявлена яркая флюоресценция в УФ-свете образца ДНК, выделенной из культуры *P. aeruginosa*, в виде трех светящихся полос в отличие от образцов остальных исследуемых бактерий, которые практически не продемонстрировали свечения. Это указывало на возможность использования реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС» для выделения микробной ДНК *P. aeruginosa* из бактериальных культур или иного биоматериала и последующей ее электрофоретической идентификации.

Установлено, что применение реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС» приводит к выделению ДНК не только из различных штаммов *P. aeruginosa*, но и из представителей других родов и видов, и получаемые электрофореграммы ДНК бактерий бывают визуально сходны, что является препятствием для дифференциальной диагностики *P. aeruginosa* с помощью данного способа. Сделана попытка заменить реагент «ДНК-ЭКСПРЕСС» физиологическим раствором и провести дальнейший анализ как обычно. Из раневого отделяемого пациентов ожогового отделения МБЛПУ ГКБ №1 Новокузнецка были выделены и идентифицированы по культуральным и биохимическим тестам *P. mirabilis*, *E. coli*, *E. coli* лактозоотрицательная и *P. aeruginosa*. По одной бактериологической петле 18-часовых культур данных возбудителей поместили в отдельные пробирки, содержащие либо реагент «ДНК-ЭКСПРЕСС», либо физиологический раствор, прогрели и провели электрофорез, как описано выше. На полученной электрофореграмме (рис. 2, В – верхний ряд) видно, что ис-

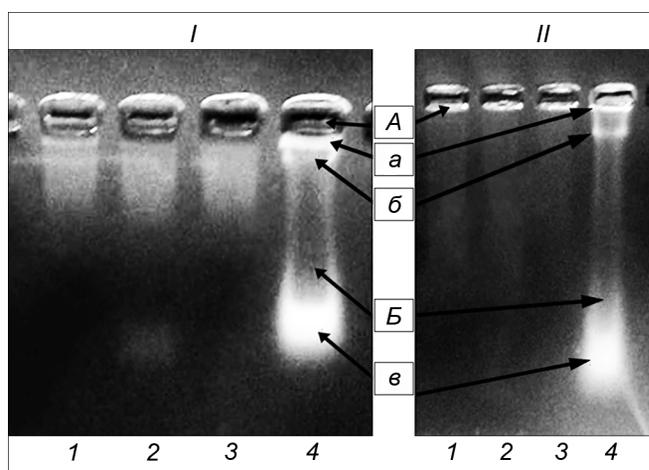


Рис. 1. Электрофореграммы образцов культур бактерий, обработанных предлагаемым способом с использованием реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС». Дорожки: 1 – *S. aureus*, 2 – *E. coli*, 3 – *E. faecalis*, 4 – *P. aeruginosa*. А – лунки для внесения образцов ДНК, Б – треки образцов ДНК; а, б, в – светящиеся полосы ДНК. Электрофорез проведен в 2% агарозном геле в течение 15 мин (I) и 40 мин (II).

пользование реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС» приводит к нечетким различиям в свечении треков ДНК всех исследованных бактерий – *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* и *E. coli*. При параллельном прогревании образцов этих же штаммов в физиологическом растворе была четко выявлена ДНК только *P. aeruginosa*, и ее свечение обнаружилось в виде трех горизонтальных полос (рис. 2, Н – нижний ряд) – в лунке (а), недалеко от лунки (б) и в конце каждого трека (в).

Тестирование предлагаемым способом чистых культур бактерий родов *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Acinetobacter* spp., а также *Escherichia coli* в сравнении со штаммами *P. aeruginosa* подтвердило полученные результаты, т. е. прогревание этих бактерий в физиологическом растворе позволило выявить только ДНК *P. aeruginosa*, как ее пигментообразующих, так и беспигментных штаммов, с однотипным свечением в виде трех полос (рис. 3, а, б, в, дорожки 7 – 10) при полном отсутствии свечения на дорожках у остальных бактерий (рис. 3, дорожки 1 – 6 и 11 – 16). Это позволило заключить, что в отличие от бактерий многих других родов/видов прогревание в физиологическом растворе клеток *P. aeruginosa* ведет к выделению из них ДНК в виде фрагментов различной длины, которые после горизонтального электрофореза легко идентифицируются в УФ-свете по характерной картине свечения. Использование 1–1,2% агарозного геля для электрофореза привело к увеличению расстояния между полосами при 15-минутном электрофорезе и получению таким образом более четкой картины свечения, чем при применении 2% агарозного геля.

Результаты оценки размеров молекул ДНК *P. aeruginosa*, видимых на электрофореграммах в виде отдельных светящихся в УФ-свете полос, представлены на рис. 4. При сопоставлении полученных нами электрофореграмм образца ДНК-маркера (дорожка 1) и образца ДНК, выделенной предлагаемым способом из культуры клинического штамма *P.*

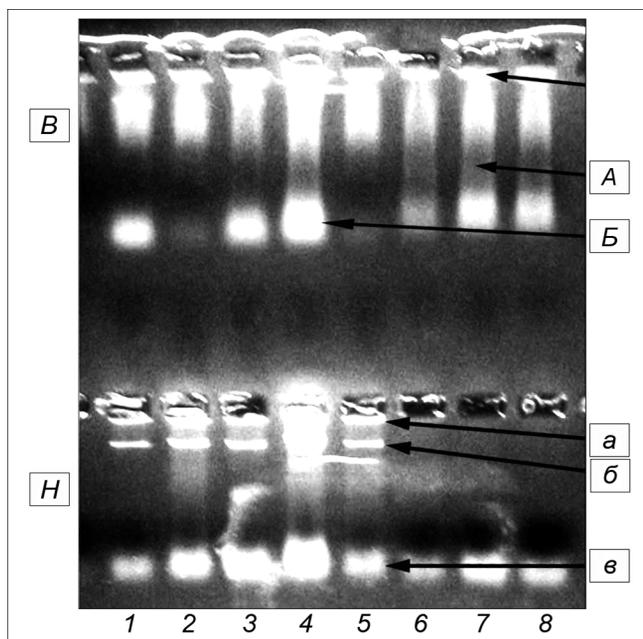


Рис. 2. Электрофореграмма ДНК различных штаммов *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *E. coli*.

В (верхний ряд) – для выделения ДНК использован реагент «ДНК-ЭКСПРЕСС»; Н (нижний ряд) – выделение ДНК провели прогреванием в физиологическом растворе. Дорожки: 1 – беспигментный клинический штамм *P. aeruginosa*; 2–5 – клинические штаммы *P. aeruginosa* с различными пигментами; 6 – *P. mirabilis*; 7 – *E. coli*; 8 – *E. coli* лактозоотрицательная. А – лунки для внесения образцов ДНК; Б – треки образцов ДНК; а, б, в – светящиеся полосы ДНК. Электрофорез проведен в 1% агарозном геле.

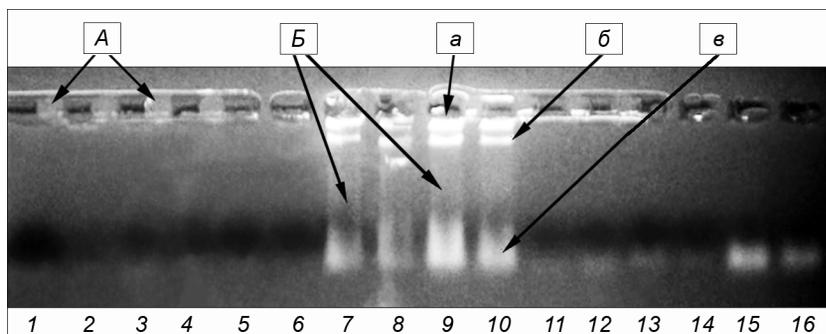


Рис. 3. Электрофореграмма образцов ДНК, выделенной прогреванием в физиологическом растворе, штаммов бактерий.

Штаммы: *Klebsiella* spp. № 11 (дорожка 1); *Enterobacter* spp. № 23 (дорожка 2); *Enterobacter* spp. № 22 (дорожка 3); *A. baumannii* № 18 (дорожка 4); *A. baumannii* № 10 (дорожка 5); *A. baumannii* № 51 (дорожка 6); *P.aeruginosa* № 42 беспигментный штамм (дорожка 7); *P. aeruginosa* № 3 (дорожка 8); *P. aeruginosa* № 2 (дорожка 9); *P. aeruginosa* № 1 беспигментный штамм (дорожка 10); *E. coli* № 5 (дорожка 11); *E. coli* № 6 (дорожка 12); *E. coli* лактозоотрицательная № 7 (дорожка 13); *E. coli* № 4 (дорожка 14); *P. mirabilis* № 17 (дорожка 15); *P. mirabilis* № 16 (дорожка 16). А – лунки для внесения образцов; Б – треки образцов ДНК; а, б, в – светящиеся полосы ДНК *P. aeruginosa*. Электрофорез проведен в 1,2% агарозном геле.

aeruginosa (дорожка 2), со стандартной калибровкой размера молекул ДНК-маркера (дорожка 3) оказалось, что обнаруживаемые на электрофореграмме 3 полосы тестируемого образца ДНК *P. aeruginosa* (а, б, в, дорожка 2) визуальнo соответствуют фрагментам ДНК-маркера размером около 10 000, 6000–8000 и менее 750 п. н. (дорожки 1 и 3).

Прогревание в физиологическом растворе при 99°C 16–18-часовых культур различных штаммов *P. aeruginosa* приводит к выделению трех фракций микробной ДНК, которые легко выявляются после электрофореза в агарозном геле с

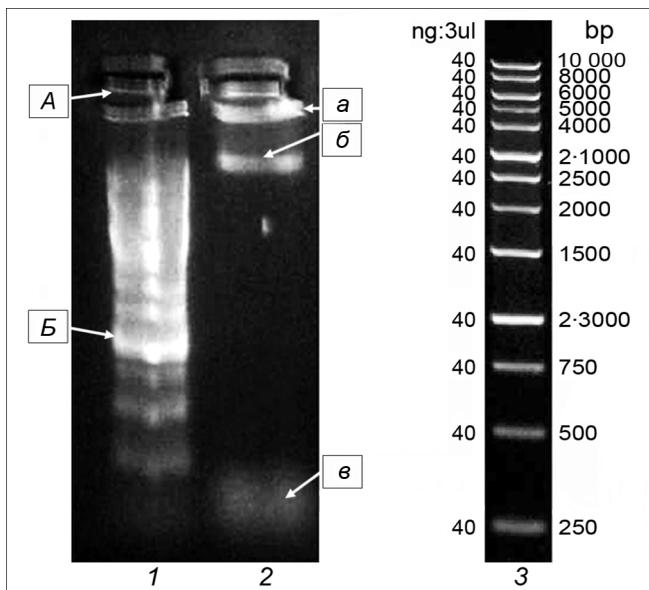


Рис. 4. Электрофореграмма образца ДНК-маркера (дорожка 1) и образца ДНК, выделенной предлагаемым способом из культуры клинического штамма *P. aeruginosa* (дорожка 2), в сравнении с рисунком стандартной калибровки размеров молекул ДНК (дорожка 3).

А – лунки для внесения образцов; Б – треки образцов ДНК; а – полоса ДНК, соответствующая фрагментам ДНК-маркера размером около 10 000 п. н.; б – полоса ДНК, соответствующая фрагментам ДНК-маркера размером около 6000–8000 п.н.; в – полоса ДНК, соответствующая фрагментам ДНК-маркера размером менее 750 п. н. Электрофорез проведен в 1,2% агарозном геле.

бромистым этидием по свечению в ультрафиолете. Способ позволяет за 1 ч идентифицировать как пигментообразующие, так и беспигментные штаммы *P. aeruginosa*.

Предлагаемый способ применен для выявления *P. aeruginosa* в клиническом материале без выделения чистой культуры. Приводим клинический пример.

Б о л ь н а я А., 1961 года рождения, обратилась в хирургический кабинет с жалобами на наличие язвы на правой голени после перенесенной буллезной формы рожи. На момент осмотра: лимфедема правой нижней конечности II степени, имеется язва, занимающая переднюю полуокружность правой голени, 20×19 см, глубиной до 1,5 см, с подрытыми краями, без признаков репаративной регенерации и с обильным сецернированием лимфы. На дне язвы плотно фиксированный белый налет. На повязке отделяемое раны с зеленоватым оттенком и сладковатым запахом. Диагноз: гигантская лимфедематозная трофическая язва голени.

Нами был проведен бактериологический посев раневого отделяемого на традиционные питательные среды: кровяной агар, желточно-солевой агар и среду Эндо. При последующем исследовании выросших колоний обнаружена смешанная культура, состоящая из штаммов *P. aeruginosa* с лимонным пигментом и *E. coli*. Чистые культуры возбудителей, а также (для сравнения) изолят музейного штамма *P. mirabilis* № 5 в объеме одной бактериологической петли были помещены в отдельные пробирки с 300 мкл физиологического раствора и обработаны, как описано выше. Результаты представлены на электрофореграмме (рис. 5). Видно, что в отличие от *P. mirabilis* № 5 и *E. coli* (дорожки 2 и 3 соответственно) из культуры *P. aeruginosa* с лимонным пигментом (дорожка 4) выделена ДНК, которая ярко флюоресцирует, образуя 3 полосы – у лунки (а, соответств-

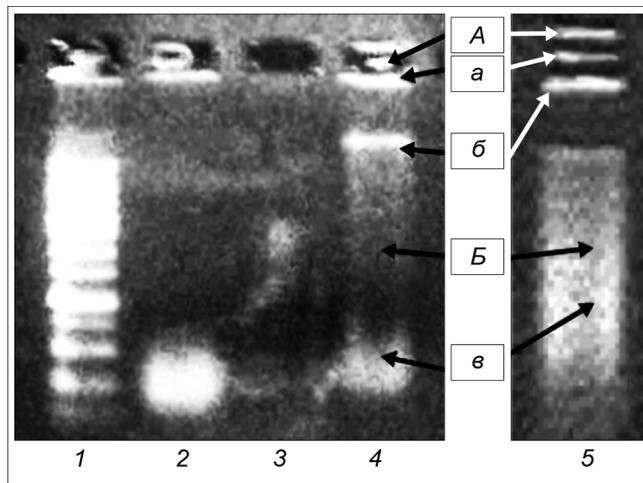


Рис. 5. Электрофореграммы образцов ДНК бактерий, выделенных из лимфедемы правой нижней конечности II степени больной А., 1961 года рождения.

На дорожках: 1 – ДНК-маркер; 2 – *P. mirabilis* № 5 (музейный штамм); 3 – *E. coli* (высеяна из раны); 4 – пигментообразующий штамм *P.aeruginosa* (высеян из раны); 5 – соскоб с трофической язвы; А – лунки для внесения образцов; Б – треки образцов ДНК; а – полоса ДНК, соответствующая фрагментам ДНК-маркера размером около 10 000 п. н.; б – полоса ДНК, соответствующая фрагментам ДНК-маркера размером около 6000–8000 п.н.; в – полоса ДНК, соответствующая фрагментам ДНК-маркера размером менее 750 п. н. Электрофорез проведен в 1,2% агарозном геле.

ет фрагментам ДНК-маркера размером около 10 000 п.н.), рядом с лункой (б, соответствует фрагментам ДНК-маркера размером 6000–8000 п.н.) и на конце трека (в, соответствует фрагментам ДНК-маркера размером менее 750 п.н.). Таким образом, из штамма *P. aeruginosa* большой А. были получены молекулы ДНК различного размера, которые после горизонтального электрофореза легко идентифицировались в УФ-свете, образуя 3 светящиеся фракции. Параллельно соскоб из раны большой А. был отдельно помещен в пробирку с 300 мкл физиологического раствора (без этапа культурального посева) и обработан в соответствии с предлагаемым способом. Результаты электрофореза полученного образца представлены на рис. 5, дорожка 5: на электрофореграмме видно характерное свечение ДНК *P. aeruginosa* в виде трех полос (а, б, в).

Следовательно, идентификация *P. aeruginosa* в раневом материале предлагаемым способом, осуществляемая без предварительного бактериологического посева клинического материала, может служить методом экспресс-диагностики синегнойной инфекции.

P. aeruginosa является одним из наиболее распространенных возбудителей нозокомиальных инфекций, которые характеризуются тяжелым течением и ассоциируются с высокой летальностью. Современная лабораторная диагностика *P. aeruginosa* включает бактериологическое исследование с последующей идентификацией возбудителя, при которой учитывают способность микроба к образованию пигментов и его биохимические свойства [2, 3]. Частота правильной идентификации *P. aeruginosa* в клинических лабораториях не превышает 30–60%, так как диагностические признаки *P. aeruginosa* нестабильны, а образование пигментов *P. aeruginosa*, которое рассматривается рядом авторов [4, 5] как ключевой и видообразующий признак при внутривидовой дифференциации, не является достаточным диагностическим критерием ввиду существования беспигментных штаммов *P. aeruginosa*. Для диагностики последних предлагается ставить тесты на барийчувствительность, цитохромоксидазу и другие ферменты, индукцию продукции пиоцианина на среде Кинга А и пиовердина на среде Кинга В [6]. Однако эти и другие дополнительные тесты имеют весомые ограничения, поскольку, кроме трудоемкости и длительности использования большого количества разнообразных питательных сред и реактивов [7], эти методы дают возможность определить только те штаммы, которые обладают тестируемыми свойствами. Таким образом, несмотря на очевидную актуальность диагностики синегнойной инфекции, существующие бактериологические параметры схем, методов выделения, идентификации и индикации *P. aeruginosa* несовершенны.

Разработанный нами новый способ диагностики *P. aeruginosa* при культуральном исследовании [8] имеет явные преимущества перед стандартной методикой, так как позволяет за 1 ч идентифицировать как пигментообразующие, так и беспигментные штаммы *P. aeruginosa*, выращенные на плотной питательной среде в течение 16–18 ч, и дифференцировать их от других представителей неферментирующих грамотрицательных бактерий (например, *Acinetobacter* spp.) и наиболее значимых родов и видов семейства Enterobacteriaceae. Предлагаемый способ может быть использован для выявления *P. aeruginosa* в клиническом материале без культивирования его микрофлоры, что является бесспорным методическим достоинством, и может служить методом экспресс-диагностики синегнойной ин-

фекции в ранах. Конечно, данный метод нуждается в апробации на более представительном биоматериале инфицированных ран различной этиологии.

Заключение. Предложен способ, позволяющий быстро идентифицировать как пигментообразующие, так и беспигментные штаммы *P. aeruginosa* в бактериальных культурах или раневом материале по электрофоретическому анализу ДНК, выделяемой из исследуемого биоматериала, а именно по выявлению свечения в ультрафиолете трех фракций ДНК *P. aeruginosa* размером около 10 000, 6000–8000 и менее 750 п. н., что свидетельствует о присутствии в данном биоматериале синегнойной палочки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мальцева Н.В., Тараско А.Д. ДНК-диагностика раневого процесса. *Молекулярная медицина*. 2012; 3: 29–33.
2. Мороз А.Ф., Анциферова Н.Г., Баскакова Н.В., Глатман Л.И., Броднинова Н.С. *Синегнойная инфекция*. М.: Медицина; 1988.
3. *Manual of Clinical Microbiology*. 7-th ed. Washington: Am. Soc. Microbiol.; 1999.
4. Рубан Е.Л. *Физиология и биохимия представителей рода Pseudomonas*. М.: Наука; 1986.
5. Беляков В.Д., Ряпис Л.А., Илюхин В.И. *Псевдомонады и псевдомонозы*. М.: Медицина; 1990.
6. Зубков М.Н. Неферментирующие бактерии: классификация, общая характеристика, роль в патологии человека. Идентификация *Pseudomonas* spp. и сходных микроорганизмов. *Инфекции и антимикробная терапия*. 2003; 5 (1): 24–30.
7. Шестаков А. Г. *Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий Pseudomonas aeruginosa*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Саратов; 2010.
8. Мальцева Н.В., Старцева В.А., Панченко В.А., Алексеев А.М., Воробьева О.Н., Тараско А.Д. Способ идентификации синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa*. Патент РФ № 2540501; 2015.

Поступила 27.05.15

REFERENCES

1. Mal'tseva N.V., Tarasko A.D. DNA-Diagnostics of wound process. *Moleculyarnaya meditsina*. 2012; 3: 29–33. (in Russian)
2. Moroz A.F., Antsiferova N.G., Baskakova N.V., Glatman L.I., Brodninova N.S. *Pseudomonas Aeruginosa Infection [Sinegnoynaya infektsiya]*. Moscow: Meditsina; 1988. (in Russian)
3. *Manual of Clinical Microbiology*. 7-th ed. Washington: Am. Soc. Microbiol.; 1999.
4. Ruban E.L. *Physiology and Biochemistry of Representatives of Pseudomonas Genus [Fiziologiya i biokhimiya predstaviteley roda Pseudomonas]*. Moscow: Nauka; 1986. (in Russian)
5. Belyakov V.D., Ryapis L.A., Ilyukhin V.I. *Pseudomonads and Pseudomonozes [Psevdomonady i psevdomonozy]*. Moscow: Meditsina; 1990. (in Russian)
6. Zubkov M.N. Nonfermentative bacteria: classification, general characteristic, the role in a human pathology. Identification of *Pseudomonas* spp. and similar microorganisms. *Infektsii i antimikrobnaya terapiya*. 2003; 5 (1): 24–30. (in Russian)
7. Shestakov A.G. *Improvement of Methods of Isolation, Identification and Indication of Pseudomonas Aeruginosa Bacteria*: Diss. Saratov; 2010. (in Russian)
8. Mal'tseva N.V., Startseva V.A., Panchenko V.A., Alekseev A.M., Vorob'eva O.N., Tarasko A.D. The method of identification of *Pseudomonas aeruginosa*. Patent RF № 2540501; 2015. (in Russian)

Received 27.05.15