

9. Ouchi Y., Akashita M., De Souza A.C. et al. Age-related loss of bone mass and aortic/aortic valve calcification-reevaluation of recommended dietary allowance of calcium in the elderly. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1993; 676: 297–307.

## REFERENCES

- Vitkovskij Ju.A., Kuznik B.I., Govorin A.V., Zherebcova S.V., Porushnichak E.B., Rodnina O.S. Haemostasis, leucocyte-platelet relation, proteins of acute inflammatory phase and cytokines in patient with different coronary heart disease. *Tromboz, gemostaz i reologija.* 2009; 1(37): 49–63. (in Russian)
- Aderka D., Engelmann H., Hornic V., Skornick Y., Levo Y., Wallach D., Kushtai G. Increased serum levels of soluble receptors to TNF in cancer patients. *Cancer Res.* 1991; 51: 5602–7.
- Barengolts E.U., Berman M., Kukreja S.C. et al. Osteoporosis and coronary atherosclerosis in asymptomatic postmenopausal women. *Calcify Tissue Int.* 1998; 62: 209–13.
- Heinisch R.H., Zanetti C.R., Comin F. et al. Inflammatory cytokines predict one-year outcome of patient with acute coronary syndromes but not in stable angina. *Eur. Heart. J.* 2001; 22: Suppl: 518.
- Jorgensen L., Joakimsen O., Bersten R. et al. Low bone mineral density is related to echogenic carotid artery plaques: a population-based study. *Am. J. Epidemiol.* 2004; 160 (6): 549–53.
- Jorgensen N.R. Cytokines and osteoporosis. *Ugeskr Laeger.* 1997; 160(1): 24–8.
- Lee Y.M., Fujicado N., Manaka H., Yashuda H., Iwakura Y. IL-1 plays an important role in the bone metabolism under physiological conditions. *Immunol.* 2010; 22(10): 805–16.
- McLean R.R. Proinflammatory cytokines and osteoporosis. *Curr. Osteoporos Rep.* 2009; 7(4): 134–9.
- Ouchi Y., Akashita M., De Souza A.C. et al. Age-related loss of bone mass and aortic/aortic valve calcification-reevaluation of recommended dietary allowance of calcium in the elderly. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1993; 676: 297–307.

Поступила 05.06.14  
Received 05.06.14

## МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 579.841.11.083.18

Кузнецова М.В.<sup>1,2</sup>, Максимова А.В.<sup>1</sup>, Карпунина Т.И.<sup>2</sup>

### ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ REP- И RAPD-ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ НОЗОКОМИАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, Пермь; <sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России

В работе представлена сравнительная оценка диагностической значимости методов Rep- и RAPD-полимеразной цепной реакции (ПЦР) при генотипировании клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa*. Штаммы выделены из стационаров различных лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ) взрослой (8 ЛПУ; n = 145) и педиатрической (5 ЛПУ; n = 151) сети. Результаты исследования показали различную разграничивающую способность трех реакций: индекс дискриминации Симпсона составил 0,993, 0,875 и 0,639 для RAPD-, ERIC- и BOX-ПЦР соответственно. RAPD-ПЦР позволяет выявлять индивидуальные особенности штаммов. Из двух вариантов Rep-ПЦР показано преимущество ERIC-ПЦР, причем только с одним праймером ERIC2. BOX-ПЦР имеет наименьшую дискриминирующую способность при типировании изолятов *P. aeruginosa*, устанавливая только видовые особенности. Клинические штаммы *P. aeruginosa* распределились на 24 геномные группы, 52 изолята имели индивидуальные генотипы. Оценивая результаты генотипирования, можно говорить о сходстве тенденций распространенности штаммов *P. aeruginosa* среди госпитализированных взрослых и подростков и своеобразии выявления в неонатальной клинике. Очевидно, что стационары разного профиля, включая отделения реанимации и интенсивной терапии, представляют специфическую экологическую среду, существенно различающуюся по уровню эндо- и экзогенного инфицирования.

Ключевые слова: *P. aeruginosa*; Rep-ПЦР; RAPD-ПЦР; индекс дискриминации Симпсона.

Kuznetsova M.V.<sup>1,2</sup>, Maksimova A.V.<sup>1</sup>, Karpunina T.I.<sup>2</sup>

THE EXPERIENCE OF IMPLEMENTATION OF REP- AND RAPD-POLYMERASE CHAIN REACTION IN EPIDEMIOLOGIC CHARACTERISTIC OF NOSOCOMIAL ISOLATES *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

<sup>1</sup>The institute of ecology and genetics of microorganisms of the Ural Branch of the Russian academy of sciences, Perm, Russia; <sup>2</sup>The E.A. Wagner Perm state medical academy of Minzdrav of Russia, Perm, Russia

Для корреспонденции:

Кузнецова Марина Валентиновна, науч. сотр.  
Адрес: 614081, Пермь, ул. Голева, 13.  
E-mail: mar@iegm.ru

*The article presents comparative evaluation of diagnostic value of technique REP- u RAPD-polymerase chain reaction applied under genetic typing of clinical isolates of Pseudomonas Aeruginosa. The strains are isolated in different hospital departments of medical institutions in adult (8 medical institutions; n=145) and children (5 medical institutions; n=151) medical networks. The results of study demonstrated different boundary capacity of three reactions. The Simpson discrimination index made up to 0.993, 0.875 and 0.639 for RAPD-, ERIC- and BOX-polymerase chain reaction correspondingly. The RAPD-polymerase chain reaction makes it possible to detect individual characteristics of strains. Out of two alternatives the REP-polymerase chain reaction demonstrated its advantage, besides only with one primer ERIC2. The BOX-polymerase chain reaction has a least discriminating capacity under typing of isolates P. aeruginosa, detecting only species' characteristics. The clinical strains P. aeruginosa are distributed on 24 genome groups and 52 isolates had individual genotypes. The evaluation of results of genetic typing permitted to point out both similarity of tendencies in propagation of strains of P. aeruginosa among hospitalized adults and adolescents and specificity of detection in neonatal clinics. It is obvious that hospitals of different profiles, including departments of reanimation and intensive therapy represent specific ecological environment significantly different in its level of endogenous and exogenous infection.*

**Key words:** *P. aeruginosa; Rep-polymerase chain reaction; RAPD-polymerase chain reaction; Simpson discrimination index.*

Микробиологический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП), призван повысить уровень их эпидемиологической диагностики; при этом основополагающее значение придается установлению родства циркулирующих в лечебно-профилактических учреждениях (ЛПУ) штаммов, т. е. их внутривидовому типированию [4, 5]. Это особенно важно, если изолированные бактерии являются компонентом нормальной микрофлоры человека или часто обнаруживаются в окружающей среде.

Инфекции, обусловленные *Pseudomonas aeruginosa*, возникают чаще всего у госпитализированных больных, и ее доля в структуре нозокомиальных возбудителей составляет 9—20% [2]. Возможности фенотипических методов — серо-, фаго- и пиоцинтипирования — ограничены не только вследствие узкого набора стандартных сывороток, пиоцинов и диагностических бактериофагов, но и в связи со способностью микроорганизмов изменять экспрессию соответствующих генов, что может происходить спонтанно или в ответ на влияние различных факторов окружающей среды [4]. Возможны изменения в O-серотипах у лизогенных культур *in vitro* и *in vivo* [11]. До 70% изолятов могут быть нетипируемыми, что связано с особенностью строения липополисахаридного слоя у *P. aeruginosa* [1].

Молекулярные технологии, различающиеся по уровню и сложности исследования структуры ДНК, давно и широко используются для типирования клинических и природных штаммов *P. aeruginosa*. Основные методы включают: гель-электрофорез в пульсирующем поле [19], Саузерн-блот-типирование с использованием ген-специфических зондов (ПДРФ-Саузерн-блоттинг) [15], риботипирование — вариант Саузерн-блот-анализа, в котором в качестве зонда используются последовательности генов 16S и 23S рРНК [17], мультилокусный анализ числа tandemных повторов (MLVA-типирование) [14], мультилокусное секвенирование-типирование (MLST-типирование) [6], а также ряд методов полимеразной цепной реакции (ПЦР), основанных на амплификации повторяющихся последовательностей (RAPD-ПЦР, Rep-ПЦР). При RAPD-ПЦР (Random Amplified Polymorphic DNA) используются короткие произвольные праймеры, которые гибридизуются с ДНК-мишенью при низкой температуре отжига, для стандартизации процедуры чаще всего используют консенсусный праймер M13 [9]. Rep-ПЦР позволяет амплифицировать 2 основные группы элементов: повторяющиеся экстрагенные палиндромные элементы (REP) и повторяющиеся внутригенные последовательности, впервые описанные у представителей семейства *Enterobacteriaceae* (ERIC) [20]. Еще одной межгенной последовательностью являются BOX-элементы, которые могут формировать структуры типа стебель—петля благодаря их двойной симметрии [13].

Целью настоящего исследования является сравнительная оценка диагностической значимости методов Rep- и RAPD-ПЦР при генотипировании клинических изолятов *P. aeruginosa*.

**Материалы и методы.** В работе использовали клинические изоляты *P. aeruginosa*, выделенные в 2008—2012 гг. из стационаров различных ЛПУ взрослой (8 ЛПУ;  $n = 145$ ) и педиатрической (5 ЛПУ;  $n = 151$ ) сети, включая акушерский стационар и неонатальные отделения детской клиники (3 ЛПУ;  $n = 129$ ).

Бактериальную ДНК выделяли по методике, описанной G.G. Stone и соавт. [16]: отдельную колонию каждого штамма ресуспендировали в 0,5 мл сверхчистой воды в пробирках типа Эппендорф, инкубировали в твердотельном термостате «Термит» (Россия) в течение 10 мин при 98°C, охлаждали и центрифугировали в течение 5 мин при 13 000 об/мин. Надосадочную жидкость использовали для генетических исследований немедленно или после хранения при -18°C [16]. Генетическое типирование штаммов осуществляли на термоциклере DNA Engine Dyad Thermal Cycler («Bio-Rad», США) посредством ПЦР с праймерами M13 5'-GAGGGTGGCGGTTCT (RAPD-ПЦР), ERIC1 5'-CACTTAGGGGTCTCGAATGTA, ERIC2 5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG и BOXA1R 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG (Rep-ПЦР). Праймеры синтезированы ООО «Синтол» (Москва). Режим амплификации для RAPD-ПЦР включал начальный цикл денатурации — 1 мин при 94°C; 35 циклов по схеме: денатурация 94°C — 20 с, отжиг 45°C — 60 с, синтез 72°C — 60 с, завершающий цикл — 5 мин при 72°C; для Rep-ПЦР начальный цикл денатурации — 5 мин при 94°C; 35 циклов по схеме: денатурация 94°C — 1 мин, отжиг 48°C — 2 мин, синтез 72°C — 2 мин, завершающий цикл — 5 мин. При подборе оптимальной температуры отжига для всех типов праймеров температурный градиент составил 45—60°C, шаг — 1°C. Электрофоретическое разделение продуктов реакции проводили в 1,2% агарозном геле при напряженности электрического поля 6 В/см и комнатной температуре. Визуализацию полос и документирование данных осуществляли с помощью системы гель-документации Gel-Doc XR («Bio-Rad», США). Дендрограммы филогенетического родства штаммов построены с применением компьютерного обеспечения Quantity One (версия 4.6.1, «Bio-Rad Laboratories», США).

Для численной оценки дискриминирующей способности методов типирования использовали индекс разнообразия Симпсона  $D$  согласно P. Hunter и M. Gaston [10]:

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

где  $N$  — количество штаммов (выборка);  $s$  — количество геномогрупп,  $n_j$  — количество штаммов, отнесенных к  $j$ -й геномогруппе (0). Индекс Симпсона (коэффициент дискриминации) основан на вероятности того, что 2 неродственных штамма из выборки будут относиться к разным геномогруппам.

**Результаты и обсуждение.** На первом этапе исследования с целью отработки режимов реакции были использованы референтный штамм *P. aeruginosa* ATCC®27853 и клиниче-

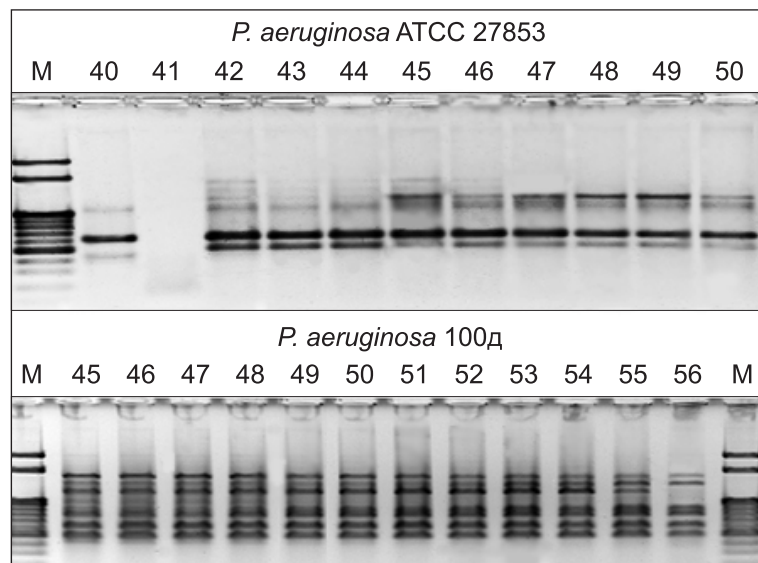


Рис. 1. Электрофореграммы продуктов амплификации с праймером M13 штаммов *P. aeruginosa* при разной температуре отжига. М — маркер молекулярных масс 100 bp + 1,5 Kb + 2,0 Kb; 40—56 — температура отжига (°C).

ский изолят *P. aeruginosa* 100д, что связано с отсутствием общепринятых стандартных режимов амплификации при использовании указанных праймеров. Протокол амплификации одной из фирм-производителей праймера M13 определяет температуру отжига в реакции 50°C, тогда как авторы, предложившие эти праймеры, — 40°C (0). При использовании ERIC-последовательностей для типирования штаммов *P. aeruginosa* также существуют различные варианты. По данным К. Wolska и Р. Szweда [22], необходимо применять 2 праймера, а температура отжига в реакции — 53°C. К. Lim и соавт. [12] использовали только один праймер ERIC2 и выявили, что в указанной реакции разделение штаммов более четкое, чем при Rep-ПЦР и ПЭ. Хорошую дискриминирующую способность при типировании клинических и природных изолятов *P. aeruginosa* с ERIC2-праймером показали Н. Feltman и соавт. [8], но при более низкой температуре отжига — 45°C.

По результатам исследования диапазон оптимальной температуры отжига для праймера M13 составил 42—49°C (рис. 1), ERIC2 — 48—57°C и BOXA1 — 45—50°C.

Использование праймеров ERIC2 или ERIC1/ERIC2 в параллельных ПЦР для типирования клинических изолятов *P. aeruginosa* показало, что ERIC-профили существенно различались (рис. 2). Сопоставимое и даже большее количество амплифицированных фрагментов ДНК в первом случае указывает на целесообразность применения праймера ERIC2 в качестве единственной затравки для полимеразы при определении родства изолятов *P. aeruginosa*.

Следующий этап исследования заключался в оценке информативности методов ПЦР при генотипировании штаммов *P. aeruginosa*. В анализ взято 17 эпидемически не связанных клинических изолятов. Наибольшее количество амплифицированных фрагментов у всей группы получено в RAPD-ПЦР: на электрофореграммах выявлен 21 фрагмент разной длины. В то же время максимальное и среднее число фрагментов для одного штамма сопоставимо при ис-

пользовании праймеров M13 и ERIC2 (см. таблицу).

ДНК-профили после ВОХ-амплификации оказались наименее разнообразными (рис. 3).

Общепризнано, что сравнительный анализ данных RAPD-ПЦР, полученных в разных лабораториях, затруднителен из-за чувствительности метода к изменениям условий реакции, тем не менее он позволяет выявлять индивидуальные особенности каждого отдельно взятого штамма. ВОХ-ПЦР, по-видимому, имеет наименьшую дискриминирующую способность при типировании изолятов *P. aeruginosa*, устанавливая только видовые особенности. Это предположение подтверждено при вычислении коэффициента дискриминации, который составил 0,993, 0,875 и 0,639 для RAPD-ПЦР, ERIC-ПЦР и ВОХ-ПЦР соответственно.

Полученные результаты дополняют накопленный опыт подобных исследований и показывают неравнозначную информативность использованных методик. Первоначально примененный для дифференциации *Streptococcus pneumoniae* метод ВОХ-ПЦР (похожие ВОХ-элементы, в частности boxA, найдены в геноме и других видов) стали использовать для типирования штаммов рода *Pseudomonas*, включая *P. aeruginosa*. В отличие от исследований S.L. Dawson и соавт. [7], которые показали значительную гомологию изолятов *P. aeruginosa* при использовании этого метода, К.

Wolska и соавт. [21], наоборот, дифференцировали разнообразные паттерны штаммов, изолированных от пациентов с гнойно-септическими инфекциями. При использовании метода ERIC-ПЦР для типирования изолятов *P. aeruginosa* К. Wolska и Р. Jzweda [22] получили 11 главных клональных групп и 25 уникальных генотипов. М. W. Sygmis и соавт. [18] показали, что методы с использованием повторяющихся ERIC- и ВОХ-элементов в ПЦР для типирования штаммов *P. aeruginosa*, изолированных от пациентов с муковисцидозом, имеют одинаковую разграничивающую силу и сопоставимы с ПЭ. По нашим данным, применение ВОХ-ПЦР в определении родства *P. aeruginosa* оказалось не столь эффективным — в среднем 4 полосы на паттерн. Показана различная дискриминирующая способность двух вариантов Rep-ПЦР с преимуществом использования ERIC-ПЦР, причем только с одним праймером ERIC2.

Несмотря на относительно невысокую чувствительность рассмотренных методов (среднее число амплифицированных фрагментов не превышало 5, тогда как в ПЭ — 12—15) и воспроизводимость RAPD-ПЦР (заложена в самом мето-

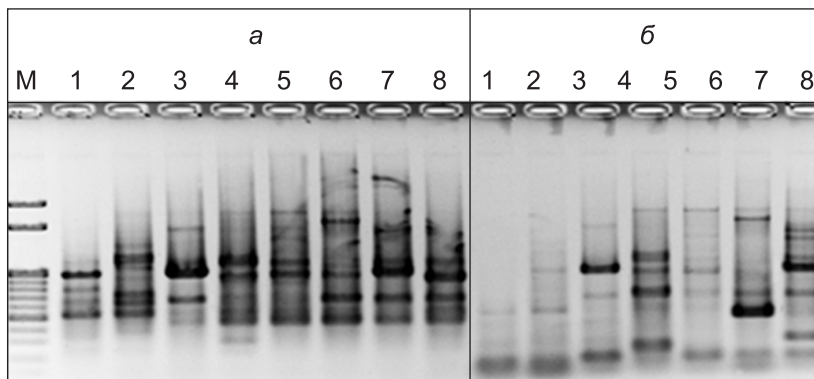


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов амплификации с праймерами ERIC2 (а) и ERIC1/ERIC2 (б) нозокомиальных штаммов *P. aeruginosa*.

М — маркер молекулярных масс 100 bp + 1,5 Kb + 2 Kb; 1—8 — клинические изоляты.

**Количество и размер фрагментов ДНК, полученных в RAPD- и Rep-ПЦР**

Праймер	Количество фрагментов (всего/макс. у одного штамма/среднее) и ≈ размер фрагмента, п.н.
M13	21/9/4,75 ± 2,2 150, 350, 380, 400, <b>450</b> , 480, 500, 510, 550, <b>600</b> , 700, <b>800</b> , 850, 900, 950, <b>1000</b> , 1100, 1200, 1400, 1500, 1700
ERIC2	13/9/4,25 ± 1,6 200, <b>300</b> , 350, 480, 500, 600, <b>700</b> , 800, 900, <b>1000</b> , <b>1100</b> , 1500, 3000
BOXA1R	13/6/3,65 ± 0,9 <b>200</b> , 300, <b>420</b> , 500, 550, <b>600</b> , 700, 800, 900, 1100, 1300, 1500, 1600

Примечание. Жирным шрифтом выделены фрагменты, встречающиеся в генетическом профиле пяти и более штаммов.

де), использование указанных реакций целесообразно для генотипирования штаммов *P. aeruginosa*. При кратковременных и/или одномоментных исследованиях предпочтительнее применять RAPD-ПЦР, при длительном мониторинге — ERIC-ПЦР или обе реакции одновременно. Учитывая перекрестные диапазоны оптимальной температуры отжига, можно использовать единый протокол амплификации. BOX-ПЦР, ориентированная на внутривидовую дифференцировку бактерий, при эпидемиологических исследованиях самостоятельного значения не имеет и может служить лишь дополнительным диагностическим средством.

Основной этап исследования заключался в определении родства изолятов, выделенных от больных в разных ЛПУ взрослой и педиатрической сети. Штаммы *P. aeruginosa*, по данным RAPD-ПЦР, распределились на 24 геномогруппы, а 52 изолята имели индивидуальные генотипы (рис. 4). Практически в каждом ЛПУ взрослой сети зафиксированы близ-

кородственные штаммы, чаще их изолировали от больных в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). Приемлемыми считаются методы типирования (или их комбинации), имеющие значение индекса Симпсона D 0,9 и более. Для выборки из 296 штаммов *P. aeruginosa* этот показатель составил 0,865. Он оказался несколько ниже скорее всего из-за того, что мы учитывали большое число близкородственных штаммов, выделенных при вспышке синегнойной инфекции в акушерском стационаре и детской клинике.

Оценивая встречаемость (0) и результаты генотипирования изолятов *P. aeruginosa*, циркулирующих в стационарах разного профиля ЛПУ взрослой и педиатрической сети в Перми, можно говорить о сходстве тенденций их распространенности среди госпитализированных взрослых и подростков и своеобразии выявления в неонатальной клинике. С микробиологической точки зрения мы объясняем прослеженные особенности в том числе и тем, что микроби-

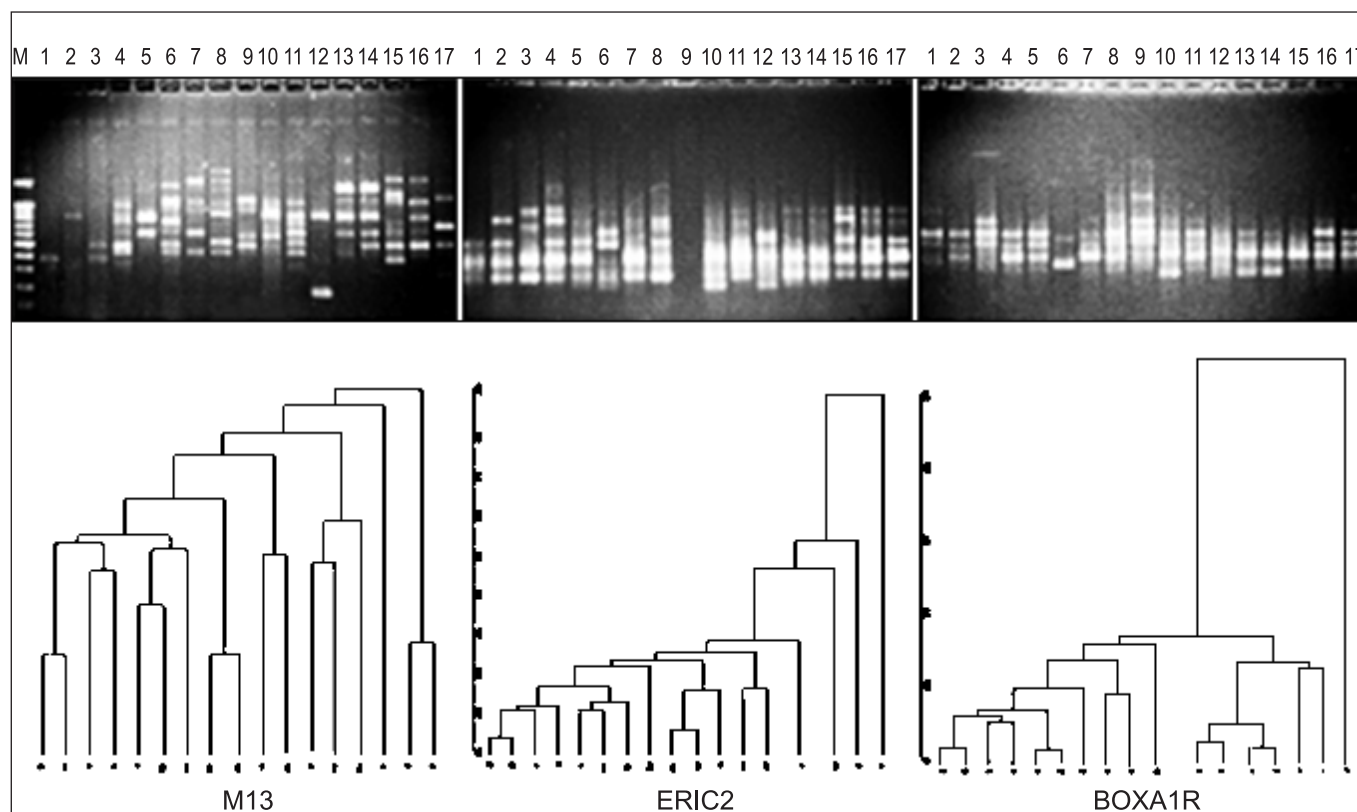


Рис. 3. Электрофореграммы продуктов RAPD-ПЦР и Rep-ПЦР.

М — маркер молекулярных масс 100 bp + 1,5 Kb; 1—17 — клинические изоляты *P. aeruginosa*. Дендрограммы филогенетического родства построены на основе метода невзвешенного попарного арифметического среднего — UPGMA (Unweighted pair group method) с применением компьютерного обеспечения Quantity One (версия 4.6.1; «Bio-Rad Laboratories», США).

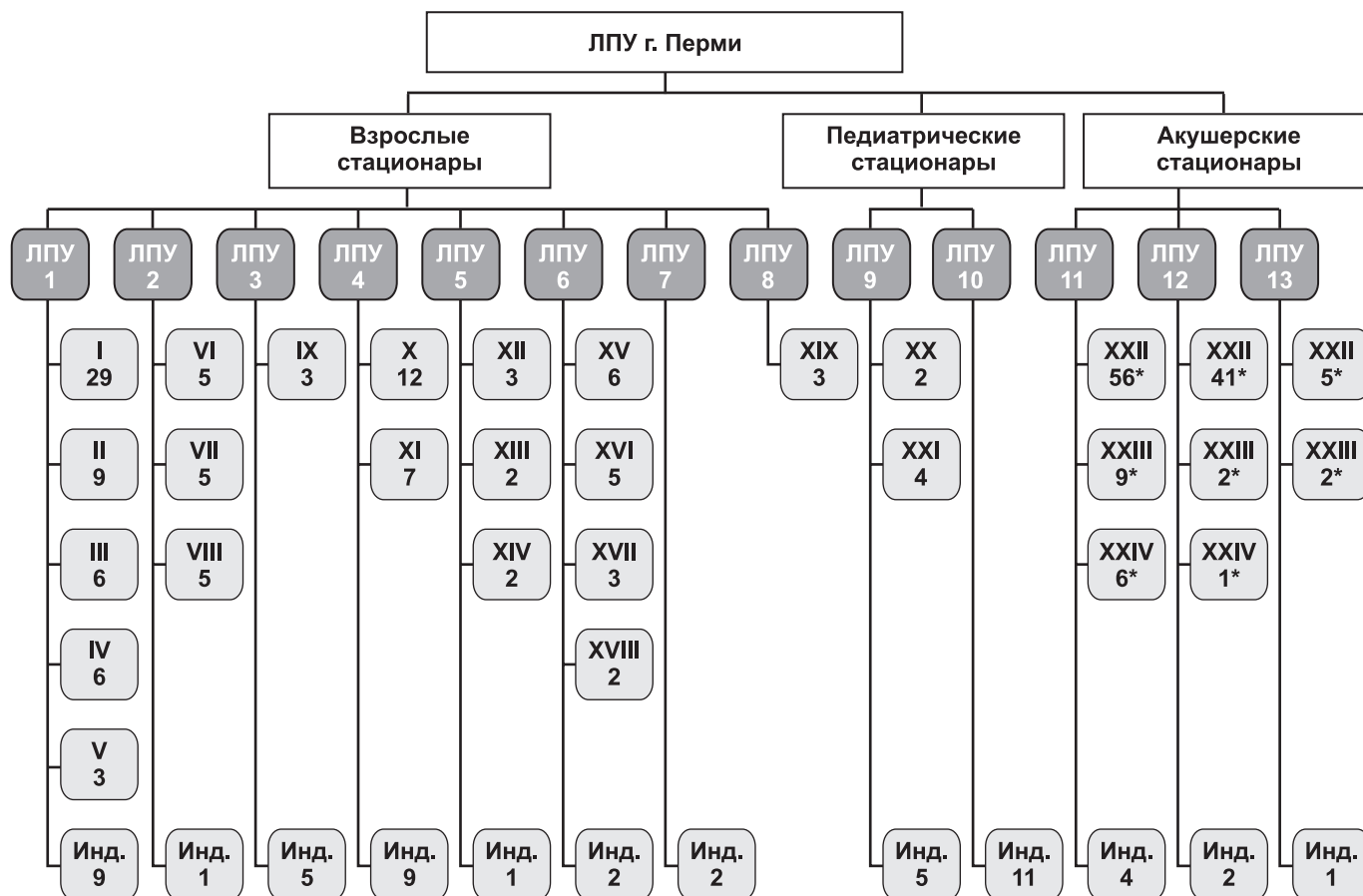
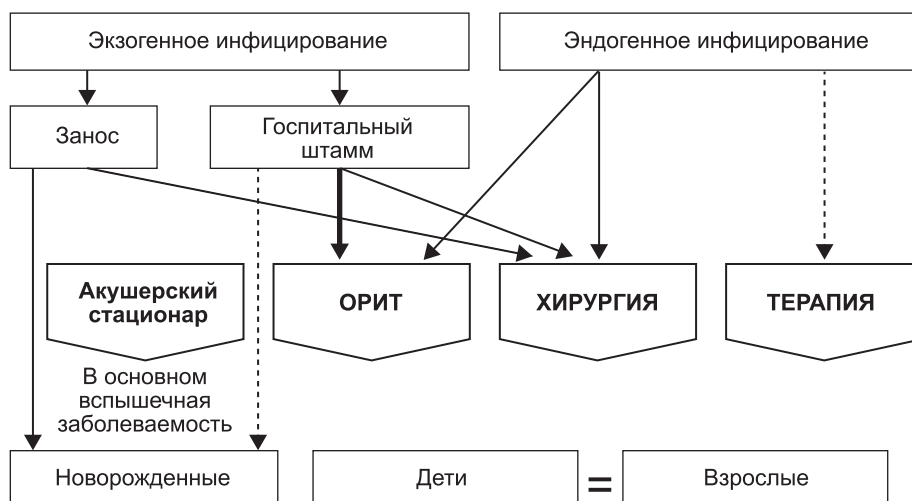


Рис. 4. Распределение штаммов по трем группам стационаров ЛПУ 1—13.

Римскими цифрами обозначены геномгруппы (инд. — индивидуальные генотипы), арабскими — количество изолятов; \* — изоляты, полученные во время вспышки 2008 г.

ом, формирующийся у новорожденных при благоприятных условиях, не содержит *P. aeruginosa*. Инфекция возникает в подавляющем большинстве случаев как экзогенная, обусловленная заносом чувствительных штаммов, но формирования госпитального варианта, по-видимому, не происходит. С учетом уязвимости контингента она имеет вспышечный характер, но благодаря жесткости требований к санитарно-эпидемическому режиму в акушерских стационарах ликвидируется в короткие сроки. С возрастом, когда синегнойная палочка становится тривиальным представителем прежде всего кишечной микрофлоры, риск эндогенного инфицирования значительно возрастает. В хирургических стационарах инфицирование пациентов *P. aeruginosa* происходит чаще всего госпитальными экovarями и обусловлено их пребыванием в ОРИТ ЛПУ с последующим распространением по другим отделениям, реже источником гнойно-септических осложнений может быть собственная микрофлора пациента. Стационары разного профиля, включая ОРИТ, представляют собой специфическую экологическую среду, существенно различающуюся по уровню эндо- и экзогенного инфицирования. Выводы могут быть схематично представлены следующим образом (см. схему).

**Заключение.** В связи с медицинской и социально-экономической значимостью ИСМП в медицинскую практику широко внедряются молекулярно-генетические методы исследований для эпидемиологического маркирования бактерий, вызывающих указанные осложнения [5]. Важную роль при этом придают стандартизации внутривидового типирования изолятов. Несмотря на то что на сегодняшний день самым точным и воспроизводимым методом (золотой стандарт) дискриминации *P. aeruginosa* остается пульс-электрофорез, его трудоемкость и достаточно высокая стои-



мость не позволяют использовать эту технологию в практическом здравоохранении повсеместно. В клинических лабораториях необходим быстрый, простой и адекватный метод оценки родства изолятов. Опыт использования RAPD-ПЦР и Rep-ПЦР показал, что эти методы обладают достаточной разграничивающей способностью при типировании клинических штаммов *P. aeruginosa*. Применение указанных реакций не является очень затратным, поскольку современные лаборатории уже оснащены оборудованием, необходимым для постановки ПЦР. Для России с учетом современных возможностей клинико-лабораторной службы именно такой подход сможет обеспечить адекватный микробиологический мониторинг ИСМП, обусловленных *P. aeruginosa*.

## ЛИТЕРАТУРА

- Быстрова О.В., Линднер Б., Моль Х., Кочарова Н.А., Шашков А.С., Книрель Ю.А. и др. Полное строение липополисахарида *Pseudomonas aeruginosa* иммунотипа 5. *Биохимия*. 2004; 69: 211—7.
- Козлов Р.С. Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, профилактика, контроль. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2000; 2 (1): 16—30.
- Кузнецова М.В., Карпунина Т.И., Николаева Н.В., Чепурная И.М., Авдеева Н.С., Проворова С.В. *Pseudomonas aeruginosa* в спектре микробных культур, изолируемых от пациентов различных стационаров. *Альманах клинической медицины*. 2012; 27: 50—7.
- Шагинян И.А. Роль и место молекулярно-генетических методов в эпидемиологическом анализе внутрибольничной инфекции. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2000; 2 (3): 82—95.
- Щербо С.Н., Тогузов Р.Т. Современные генетические технологии в лабораторной медицине. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008; 9: 41.
- Curran B., Jonas D., Grundmann H., Pitt T., Dowson C.G. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic patho-gen *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42 (12): 5644—9.
- Dawson S.L., Fry J.C., Dancer B.N. A comparative evaluation of five typing techniques for determining the diversity of fluorescent pseudomonads. *J. Microbiol. Methods*. 2002; 50: 9—22.
- Feltman H., Schultert G., Khan S., Jain M., Peterson L., Hauser A. R. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 2001; 147: 2659—69.
- Huey B., Hall J. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13. *J. Bacteriol.* 1989; 171 (5): 2528—32.
- Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of index of diversity typing systems: an application of Simpson's. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26 (11): 2465.
- Lanyi B., Lantos J. Antigenic changes in *Pseudomonas aeruginosa* in vivo and after lysogenization in vitro. *Acta Microbiol. Hung.* 1976; 23: 337—51.
- Lim K.-T., Yasin R.M., Yeo C.C., Puthuchearry S.D., Balan G., Maning N. et al. Genetic fingerprinting and antimicrobial susceptibility profiles of *Pseudomonas aeruginosa* hospital isolates in Malaysia. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2009; 42 (3): 197—209.
- Martin B., Humbert O., Camara M., Guenzi E., Walker J., Mitchell T. et al. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20: 3479—83.
- Onteniente L., Brisse S., Tassios P.T., Vergnaud G. Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for *Pseudomonas aeruginosa* strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41 (11): 4991—7.
- Southern E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 1975; 98 (3): 503—17.
- Stone G.G., Oberst R.D., Hays S., McVey S., Chengappa M.M. De-tection of Salmonella serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32: 1742—9.
- Stull T.L., LiPuma J.J., Edlind T.D. A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. *J. Infect. Dis.* 1988; 157 (2): 280—6.
- Syrmis M.W., O'Carroll M.R., Sloots T.P., Coulter C., Wainwright C.E., Bell S.C. et al. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-elementbased PCR assays. *J. Med. Microbiol.* 2004; 53: 1089—96.
- Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33 (9): 2233—9.
- Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19: 6823—31.
- Wolska K., Kot B., Jakubczak A., Rymuza K. BOX-PCR is an adequate tool for typing of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2011; 49 (4): 734—8.
- Wolska K., Szweida P.A. A comparative evaluation of PCR ribotyping and ERIC-PCR for determining the diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Pol. J. Microbiol.* 2008; 57: 157—63.

## REFERENCES

- Bystrova O.V., Lindner B., Mol' Kh., Kocharova N.A., Shashkov A.S., Knirel' Yu.A. et al. Complete structure of the lipopolysaccharide of immunotype 5 *Pseudomonas aeruginosa*. *Biokhimiya*. 2004; 69: 211—7. (in Russian)
- Kozlov R.S. Nosocomial infections: epidemiology, pathogenesis, prevention, control. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2000; 2 (1): 16—30. (in Russian)
- Kuznetsova M.V., Karpunina T.I., Nikolaeva N.V., Chepurnaya I.M., Avdeeva N.S., Provorova S.V. *Pseudomonas aeruginosa* in the spectrum of microbial cultures isolated from different hospital patients. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. 2012; 27: 50—7. (in Russian)
- Shaginyan I.A. The role and place of molecular genetic methods in the epidemiological analysis of nosocomial infection. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2000; 2 (3): 82—95. (in Russian)
- Shcherbo S.N., Toguzov R.T. Modern genetic technology in laboratory medicine. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2008; 9: 41. (in Russian)
- Curran B., Jonas D., Grundmann H., Pitt T., Dowson C.G. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42 (12): 5644—9.
- Dawson S.L., Fry J.C., Dancer B.N. A comparative evaluation of five typing techniques for determining the diversity of fluorescent pseudomonads. *J. Microbiol. Methods*. 2002; 50: 9—22.
- Feltman H., Schultert G., Khan S., Jain M., Peterson L., Hauser A. R. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 2001; 147: 2659—69.
- Huey B., Hall J. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13. *J. Bacteriol.* 1989; 171 (5): 2528—32.
- Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of index of diversity typing systems: an application of Simpson's. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26 (11): 2465.
- Lanyi B., Lantos J. Antigenic changes in *Pseudomonas aeruginosa* in vivo and after lysogenization in vitro. *Acta Microbiol. Hung.* 1976; 23: 337—51.
- Lim K.-T., Yasin R.M., Yeo C.C., Puthuchearry S.D., Balan G., Maning N. et al. Genetic fingerprinting and antimicrobial susceptibility profiles of *Pseudomonas aeruginosa* hospital isolates in Malaysia. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2009; 42 (3): 197—209.
- Martin B., Humbert O., Camara M., Guenzi E., Walker J., Mitchell T. et al. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20: 3479—83.

14. Onteniente L., Brisse S., Tassios P.T., Vergnaud G. Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for *Pseudomonas aeruginosa* strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41 (11): 4991—7.
15. Southern E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 1975; 98 (3): 503—17.
16. Stone G.G., Oberst R.D., Hays S., McVey S., Chengappa M.M. Detection of Salmonella serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32: 1742—9.
17. Stull T.L., LiPuma J.J., Edlind T.D. A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. *J. Infect. Dis.* 1988; 157 (2): 280—6.
18. Syrmis M.W., O'Carroll M.R., Sloots T.P., Coulter C., Wainwright C.E., Bell S.C. et al. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. *J. Med. Microbiol.* 2004; 53: 1089—96.
19. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33 (9): 2233—9.
20. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19: 6823—31.
21. Wolska K., Kot B., Jakubczak A., Rymuza K. BOX-PCR is an adequate tool for typing of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2011; 49 (4): 734—8.
22. Wolska K., Szweida P.A. A comparative evaluation of PCR ribotyping and ERIC-PCR for determining the diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Pol. J. Microbiol.* 2008; 57: 157—63.

Поступила 09.01.14  
Received 09.01.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.24-002-06:616.155-006.04+616.9-022:578.825.1]-078

Гаранжа Т.А., Тихомиров Д.С., Туполева Т.А., Троицкая В.В., Паровичникова Е.Н., Галстян Г.М., Филатов Ф.П.

## ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕРПЕС-ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ПРИ НОЗОКОМИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ У ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Москва

*Цель исследования – выявление диагностически значимого клинического материала для определения этиологического агента пневмонии у онкогематологических больных, определение частоты ассоциации нозокомиальной пневмонии с герпес-вирусами (ГВ) и оценка вирусной нагрузки у пациентов со сниженным иммунитетом. Половина всех нозокомиальных пневмоний у онкогематологических больных ассоциирована с ГВ. Чаще (у каждого третьего больного) выявляли ДНК вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) и ДНК вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1, ВПГ-2). Наиболее информативным материалом в данном случае является бронхоальвеолярная лаважная жидкость (БАЛ), а наиболее удобным диагностическим методом – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени. Для ВЭБ, цитомегаловируса (ЦМВ) и вируса герпеса человека 6-го типа (ВГЧ-6) характерна низкая вирусная нагрузка в БАЛ. Концентрация ДНК ВПГ-1 и ВПГ-2 с равной частотой находится в области как высоких, так и низких значений. Выявлен парадоксальный феномен более благоприятного течения нозокомиальной пневмонии, ассоциированной с ВПГ-1, ВПГ-2, у больных с более высокой вирусной нагрузкой в БАЛ. Требуется дальнейшие исследования в данном направлении.*

**Ключевые слова:** нозокомиальная пневмония; герпес-вирусы; полимеразная цепная реакция; вирус Эпштейна–Барр; вирус простого герпеса; цитомегаловирус.

*Garanja T.A., Tikhomirov D.S., Tupoleva T.A., Troitskaia V.V., Parovichnikova E.N., Galstian G.M., Filatov F.P.*

THE LABORATORY DIAGNOSTIC OF HERPES VIRAL INFECTIONS UNDER NOSOCOMIAL PNEUMONIA IN ONCOLOGIC HEMATOLOGIC PATIENTS

The hematologic research center of Minzdrav of Russia, Moscow, Russia

*The study was organized to discover diagnostically valuable clinical material for detection of etiologic agent of pneumonia in oncological hematological patients, rate of association of nosocomial pneumonia with herpes viruses and evaluation of viral load in patients with depressed immunity. In oncological hematological patients, half of nosocomial pneumonia cases is associated with herpes virus. In every third patient DNA of Epstein-Barr virus and DNA of type I and II are detected. The most informative material in this case is broncho-alveolar lavage fluid and the most convenient diagnostic technique is polymerase chain reaction in real-time. The low viral load in broncho-alveolar lavage fluid is specific for Epstein-Barr virus, cytomegalovirus and human herpes virus type VI. The concentration of DNA of simple herpes virus type I and type II is located in both high and low values. The paradox phenomena is established concerning more benevolent course of nosocomial pneumonia associated with simple herpes virus type I and II in patients with higher viral load in broncho-alveolar lavage fluid. The further research in this direction is needed.*

**Key words:** nosocomial pneumonia; herpes virus; polymerase chain reaction; Epstein-Barr virus; simple herpes virus; cytomegalovirus.

Для корреспонденции:

Гаранжа Татьяна Анатольевна, канд. биол. наук, зав. научной лаб. вирусной безопасности трансфузий крови и ее компонентов  
Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский пр., 4  
E-mail: viridiag@yandex.ru