

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 579.841.11:579.2531.083.18:577.21.08

М. В. Кузнецова<sup>1,2</sup>, Ю. А. Павлова<sup>2</sup>, Т. И. Карпунина<sup>1</sup>, В. А. Демаков<sup>2</sup>**ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ ПРИ ИДЕНТИФИКАЦИИ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ PSEUDOMONAS AERUGINOSA**<sup>1</sup>ГБОУ ВПО Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е. А. Вагнера Минздравсоцразвития России, <sup>2</sup>ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь

*В работе представлен сравнительный анализ использования традиционных бактериологических и молекулярных методов для идентификации P. aeruginosa. Для генетической детекции применяли полимеразную цепную реакцию с родо- и видоспецифичными праймерами, а также амплификацию консервативных участков генов 16S рРНК с последующей идентификацией бактерий путем секвенирования. Установлено, что 95% (151) штаммов соответствуют виду P. aeruginosa, определенному в первичных бактериологических лабораториях и только 8 штаммов не являлись синегнойной палочкой. Большую часть из них составили близкородственные виды: 2 изолята принадлежали к роду Comamonas, 1 изолят – к виду Stenotrophomonas maltophilia. Показана эффективность культурального метода лабораторной диагностики инфекций, обусловленных P. aeruginosa, что не исключает использование молекулярно-генетических технологий в сложных, арбитражных случаях бактериологического анализа при мониторинге нозокомиальных инфекций.*

**Ключевые слова:** Pseudomonas aeruginosa, идентификация, ПЦР-диагностика, секвенирование

*M.V. Kuznetsova, Yu.A. Pavlova, T.I. Karpunina, V.A. Demakov*

THE EXPERIENCE OF APPLYING TECHNIQUES OF MOLECULAR GENETICS IN IDENTIFICATION OF CLINICAL STRAINS PSEUDOMONAS AERUGINOSA

*The article presents comparative analysis of application of common bacteriologic and molecular techniques to identify P.aeruginosa. The genetic detection was applied using polymerase chain reaction with genus-specific and species-specific primers and amplification of conservative sites of gens 16S рRNA with successive identification of bacteria by sequenation. It is established that 95% (151) of strains correspond to species of P.aeruginosa detected inprimary bacteriologic laboratories and only 8 strains were not blue pus bacillus. Most of strains were closely congenial species: 2 isolates belonged to Pseudomonas aeruginosa group, 3 isolates to Pseudomonas putida group, 2 strains to Comamonas species and 1 isolate to Stenotrophomonas maltophilia species. The effectiveness of cultural technique of laboratory diagnostic was demonstrated concerning infections conditioned by P.aeruginosa. This conclusion does not eliminate application of molecular genetic trechnologies in complicated arbitral cases of bacteriologic analysis during monitoring of nosocomial infections.*

**Key words:** Pseudomonas aeruginosa, identification, polymerase chain reaction diagnostic, sequenation

*Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка) относится к одному из самых распространенных возбудителей внутрибольничных инфекций, создающих серьезные проблемы в медицинской практике, и в первую очередь в отделениях реанимации и интенсивной терапии [4, 5, 12]. Синегнойная палочка может поражать различные органы и ткани, а инфицирование легких и сердца при попадании возбудителя в кровоток приводит к смертельному исходу в 25% случаев [20].

Идентификация синегнойной палочки в практических бактериологических лабораториях осуществляется культуральным методом, согласно приказу Минздрава СССР от 22.04.85 № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» и «Методическим рекомендациям по определению грамотрицательных бактерий потенциально-патогенных бактерий – возбудителей внутрибольничных инфекций» Минздрава РСФСР от 03.06.86. У бактериологов не вызы-

вает затруднений верификация пиоцианин-положительных штаммов, дающих при росте сине-зеленое окрашивание среды, тогда как беспиоцианиновые варианты *P. aeruginosa* не всегда могут быть определены. Для видовой идентификации *P. aeruginosa* и других неферментирующих бактерий используют различные неинструментальные и автоматизированные диагностические системы. Оценка эффективности идентификации бактерий группы неферментирующих с помощью тест-систем, проведенная в различных лабораториях, дала долю правильной идентификации 77–90% и выше для разных видов бактерий. Проведение дополнительных биохимических тестов повышает ее до 95–96% [1].

Идентификацию бактерий с помощью молекулярно-генетических методов чаще всего осуществляют с помощью полимеразной цепной реакции. Для выявления *P. aeruginosa* предложены специфические праймеры детекции *algD*-гена, кодирующего GDP-дегидрогеназу, участвующую в продукции альгината у этого вида бактерий, *toxA*-гена, кодирующего экзотоксин А, *guyB*-гена и *ecfX*-гена [10, 13, 14, 16]. Возможна одновременная амплификация («multiplex-PCR») генов *oprI* и *oprL*, экспрессирующих синтез двух липопротеинов наружной мембраны, маркирующих флюоресцентную группу псевдомонад и *P. aeruginosa* соответственно [11]. Молекулярной мишенью могут служить нуклеотидные последовательности, кодирующие участки генов 16S рРНК [8, 18, 19]. Показана эффективность использо-

Для корреспонденции:

Кузнецова Марина Валентиновна, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. хим. мутагенеза, доц. каф. микробиологии и вирусологии  
Адрес: 614081, Пермь, ул. Голева, 13  
Телефон: (342)212-44-76  
E-mail: mar@iegm.ru

вания нескольких пар праймеров для выявления синегнойной палочки [6]. В настоящий момент нет единого мнения и регламентирующих документов, определяющих обязательные ДНК-мишени и соответствующие праймеры для идентификации *P. aeruginosa*. Опыт ряда исследователей показывает, что молекулярные методы могут быть как единственным, так и дополнительным быстрым и надежным тестом для идентификации *P. aeruginosa* [3].

Цель данной работы – оценить клиническую целесообразность использования молекулярных методов диагностики для идентификации нозокомиальных штаммов *P. aeruginosa*.

**Материалы и методы.** В работе использовали 159 штаммов *P. aeruginosa*, выделенных в 2008–2011 гг. от больных и из больничной среды крупных хирургических стационаров. В качестве положительного контроля использовали штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853, отрицательного – лабораторный штамм *Pseudomonas fluorescens* C32. Первичная идентификация проведена в бактериологических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. Реидентификацию осуществляли с помощью Неферм-Теста24 («Lachema», Чехия) в соответствии с инструкцией производителя. Пигментообразование определяли визуально при росте культур на плотной агаризованной среде Луриа–Бертани и Кинга («Sigma-Aldrich Co», США).

Молекулярно-генетические исследования проводили методом ПЦР с использованием родо- (*Ps-for/Ps-rev*) и видоспецифичных (*PA-SS-F/PA-SS-R*) праймеров, а также универсальных праймеров к 16S рПНК (515F/1391R) (табл. 1). Отдельную колонию каждого штамма ресуспендировали в 500 мкл сверхчистой воды, инкубировали в твердотельном термостате «Термит» (Россия) в течение 10 мин при 95°C и центрифугировали 5 мин при 13 000 об/мин. Надосадочную жидкость использовали для генетических исследований. Протоколы амплификации соответствовали рекомендациям авторов, предложивших используемые праймеры [8, 18, 19]. Температура отжига для праймеров *Ps-for/Ps-rev*: 65°C – 60 с; для *PA-SS-F/PA-SS-R*: 58°C – 20 с; для универсальных праймеров 515F/1391R: 56°C – 40 с. Электрофоретическое разделение продуктов реакции проводили в 1,2% агарозном геле в трис-боратном буфере при напряже-

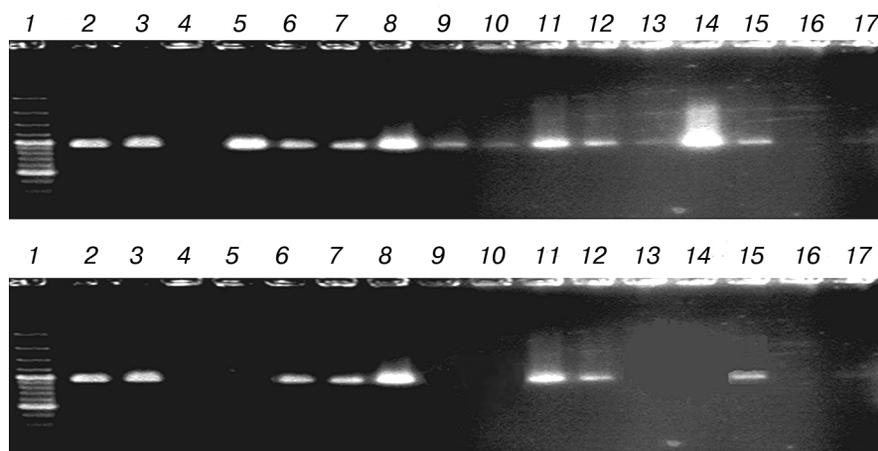


Рис. 1. Пример электрофореграммы продуктов амплификации 16S рДНК с праймерами *Ps-for/Ps-rev* (верх) и *PA-SS-F/PA-SS-R* (низ): 1 – маркер молекулярных масс O'GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder ("Fermentas", Литва); 2–17 – клинические изоляты.

нии электрического поля 6 В/см. Визуализацию полос и документирование данных осуществляли с использованием системы гель-документации BioDocAnalyze («Biometra», Германия).

Секвенирование гена 16S рПНК проводили с праймерами, используемыми в ПЦР, с применением набора реактивов SEQ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit на автоматическом секвенаторе 3500xL Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США). Температурный режим секвенирующей реакции: 95°C – 1 мин; 95°C – 10 с; 50°C – 10 с; 60°C – 4 мин, 25 циклов. Полученные последовательности идентифицировали с помощью программы BLAST и базы данных GenBank/EMBL/DDBJ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Далее нуклеотидные последовательности 16S рДНК изучаемых изолятов сравнивали с последовательностями типовых штаммов близкородственных видов с помощью пакета программ TREECON, version 1.3b.

**Результаты и обсуждение.** Реидентификация с использованием НефермТеста24 выявила, что 17 штаммов не принадлежали к *P. aeruginosa* и по его результатам были отнесены к видам *Pseudomonas putida*, *Ochromobacter anthropi*, *Burkholderia pseudomallei*.

В результате генетической идентификации с помощью родо- и видоспецифичных праймеров было установлено, что 145 (91,2%) штаммов соответствуют виду *P. aeruginosa*, определенному в первичных бактериологических лабораториях. По результатам ПЦР-анализа 11 (6,9%) культур являются псевдомонадами, но не синегнойной палочкой и только 3 (1,9%) – не принадлежали к роду *Pseudomonas* (рис. 1). ДНК штаммов ( $n = 14$ ), с матрицы которых не прошла специфическая амплификация с видоспецифичными праймерами, была использована в ПЦР с универсальными праймерами к гену 16S рПНК (515F/1391R). Проведено определение полученных нуклеотидных последовательностей.

BLAST-анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рПНК подтвердил, что 11 штаммов являются представителями рода *Pseudomonas*

**Праймеры, использованные в ПЦР-анализе**

Выявляемый вид, последовательность	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Размер фрагмента, п.н.	Источник литературы
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Ps-for</i>	5'-GGTCTGAGAGGATGATCAGT	969	[19]
	<i>Ps-rev</i>	5'-TTAGCTCCACCTCGCGGC		
<i>P. aeruginosa</i>	<i>PA-SS-F</i>	5'-GGGGGATCTTCGGACCTCA	956	[18]
	<i>PA-SS-R</i>	5'-TCCTTAGAGTGCCACCCG		
16S рПНК универсальная	515F	5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	876	[8]
	1391R	5'-GACGGGCGGTGWGTRCA		

Таблица 1

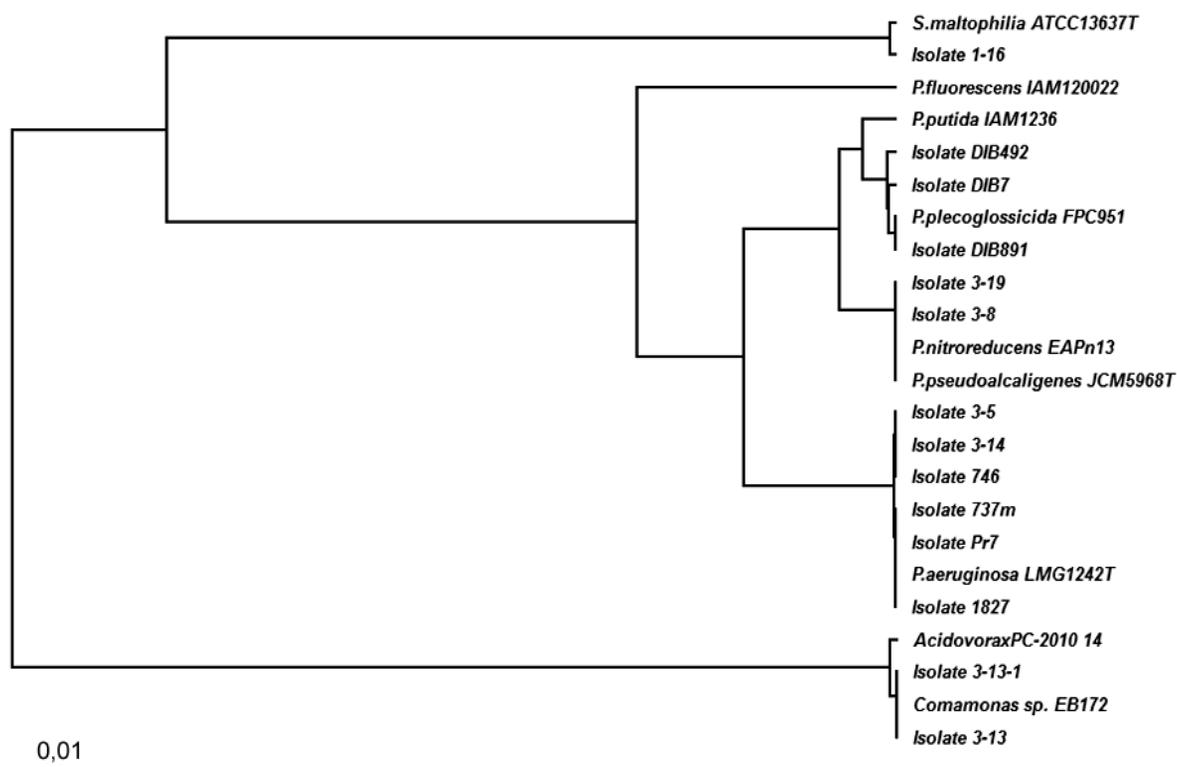


Рис. 2. Филогенетическое древо, построенное с помощью пакета программ TREECON, основанное на сравнении нуклеотидных последовательностей 16S рДНК видов рода *Pseudomonas* и некоторых видов  $\beta$ - и  $\gamma$ - $\beta$ -субклассов Proteobacteria. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на каждые 100 нуклеотидов.

(рРНК группы I) [7]. На филогенетическом древе изоляты попали в разные подгруппы псевдомонад: 6 штаммов имели максимальный уровень сходства с *P. aeruginosa*, 2 штамма принадлежали к этой же *P. aeruginosa* group и определены как *Pseudomonas pseudoalcaligenes*/*Pseudomonas nitroreducens* (табл. 2, рис. 2). Точная видовая идентификация была невозможна из-за малой длины секвенированного фрагмента. У трех изолятов исследуемые участки ДНК были на 99,9% схожи с геном 16S рРНК штамма *Pseudomonas plecoglossicida* FPC951 (GenBank AB009457.1) из *Pseudomonas putida* group. Таким образом, 6 штаммов оказались *P. aeruginosa*, как они и были определены в первичных бактериологических лабораториях, а остальные принадлежали к близкородственным группам наиболее клинически значимых псевдомонад. Один изолят принадлежал к виду *Stenotrophomonas maltophilia* (рРНК группы V), выделенному (реклассифицированному) ранее N. Palleroni и J. Bradbury [17] в самостоятельный род. У 2 штаммов анализируемые нуклеотидные фрагменты имели максимальное сходство с геном 16S рРНК штамма *Comamonas* sp. EB172 LMG 5323 (GenBank AJ430348.1, семейство Comamonadaceae, рРНК группы III).

Таким образом, наши результаты показали высокую достоверность видовой идентификации *P. aeruginosa* при использовании культурального метода исследования и с учетом ложноотрицательных данных ПЦР-анализа она составила 95%. Следует также подчеркнуть, что почти все штаммы, отнесенные нами по 16S рРНК к другим видам, являясь близкородственными и подобные лабораторные «ошибки» при использовании бактериологического метода исследования существенного клинического значения не имеют. Исключение представляет единственный случай «недодиагностики» инфекции,

вызванной *S. maltophilia*, значимость которых в качестве возбудителя нозокомиальных инфекций выросла в последнее время. Известно, что инфекции, вызванные *S. maltophilia*, очень трудно контролировать, так как клинические изоляты часто резистентны ко многим антимикробным препаратам [1]. Выбор антибиотиков в подобных случаях представляет большую проблему и для бактериологов, и для клиницистов, а дополнительные сложности связаны с методологией проведения тестов чувствительности. Быстрая видовая идентификация природно-устойчивого к карбапенемам микроорганизма может быть залогом успешного исхода для больного.

**Заключение.** Внедрение в практику метода ПЦР существенно расширило возможности современной клинической микробиологии, основу которой в России до сих пор составляют методы выделения и культивирования микроорганизмов на искусственных питательных средах.

Молекулярные технологии позволяют не только выявлять детерминанты антибиотикорезистентности и специфичные факторы патогенности, проводить внутривидовое типирование штаммов, но и точно идентифицировать изоляты. Опыт использования в подобных случаях амплификации консервативных участков генов 16S рРНК и последующей идентификации бактерий путем секвенирования продуктов реакции описан в зарубежной практике. В России современный уровень развития клинической лабораторной диагностики не позволяет использовать все возможности ПЦР в одном конкретном лечебном учреждении. Более того, актуальным является вопрос о клинической целесообразности такого подхода.

Наши экспериментальные исследования показали эффективность методов «классической бактериологии»,

Таблица 2

## Анализ нуклеотидной последовательности фрагментов генов 16S рДНК

Обозначение штамма	Размер секвенированного фрагмента, п.н.	Сходство с наиболее близким гомологичным геном 16S рДНК из GenBank	%
Pr7	784	<i>P. aeruginosa</i> LMG 1242 <sup>†</sup> , Z76651.1	100
737m	791	<i>P. aeruginosa</i> P-5, JN969044.1	
746	760		
1827	791		
3–5	811		
3–14*	746		
DIB7*	629	<i>P. plecoglossicida</i> FPC951, AB009457.1	99,9–100
DIB492*	627		
DIB891*	711		
3–8	775	<i>P. pseudoalcaligenes</i> JCM 5968 <sup>†</sup> , AB021379.1	100
3–19*	759	<i>P. nitroreducens</i> EAPr13, JF911369.1	
1–16	819	<i>S. maltophilia</i> NBRC 12690, AB680319.1 <i>S. maltophilia</i> ATCC 13637 <sup>†</sup> , AB008509.1	99,9
3–13*	820	<i>Comamonas</i> sp. EB172 EU847238.1	100
3–13–1*	804		

Примечание. Полу жирным шрифтом выделены штаммы, не принадлежащие к роду *Pseudomonas* по результатам ПЦР, звездочкой отмечены штаммы, которые совпали по отрицательному результату в ПЦР и Неферментесте24.

которые совершенно правомерно используются в рутинной лабораторной диагностике при идентификации *P. aeruginosa*. Диагностическая чувствительность и специфичность культурального метода практически сопоставимы с ПЦР и на сегодняшний день остаются золотым стандартом в диагностике инфекционных заболеваний, вызванных *P. aeruginosa*. В то же время тесты, основанные на биохимических признаках, не всегда эффективны при идентификации *P. aeruginosa* у пациентов с мукковисцидозом, когда изоляты часто теряют способность к пигментообразованию, продукции экзополисахарида и рамнолипида. Идентификацию затрудняет присутствие в мокроте и других неферментирующих грамотрицательных палочек, в том числе рода *Pseudomonas* [9, 10, 15]. Нельзя исключать и тот факт, что сессильные формы бактерий не будут выявляться культуральным методом, более того, циркуляция госпитальных штаммов может сопровождаться формированием некультивируемых

форм бактерий в окружающей среде стационара.

Ранее нами продемонстрирована возможность использования ПЦР с родо- и видоспецифическими праймерами для контроля обсемененности объектов внешней среды грамотрицательными неферментирующими бактериями, включая синегнойную палочку [2]. Необходимость экспресс-диагностики для прямой детекции *P. aeruginosa* в крови больного, когда временной фактор играет решающую роль в исходе инфекционного процесса, значение молекулярных технологий также трудно переоценить [20]. “Привлекательность” молекулярно-генетических технологий очевидна в таких сложных, арбитражных случаях, в том числе при фенотипической разнородности штаммов, циркулирующих в ЛПУ при вспышках нозокомиальных инфекций.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Белокрысенко С. С., Дадха Теграни А. Клиническая лабораторная диагностика. 2004; 6: 37–8.
2. Карпунина Т. И., Кузнецова М. В., Маркович Н. И. Патент РФ № 2372406 от 10.11.2009. Бюллетень изобретений полезной модели; 31: 829.
3. Лопухов Л. В., Эйдельштейн М. В. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000; 3: 96–100.
4. Решедеко Г. К., Рябкова Е. Л., Фаращук А. Н., Страчунский Л. С. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2006; 8 (3): 243–59.
5. Руднов В. А. Российский медицинский журнал. 2005; 13 (7): 485–90.
6. Anuj S. N., Whiley D. M., Kidd T. J. et al. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2009; 63: 127–31.
7. Anzai Y., Kim H., Park J.-Y. et al. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000; 50: 1563–89.
8. Baker G. C., Smith J. J., Cowan D. A. Microbiol. Methods. 2003; 55 (3): 541–55.
9. Coenye T., Goris J., Spilker T. et al. J. Clin. Microbiol. 2002; 40: 2062–9.
10. Da Silva Filho L. V., Levi J. E., Bentof C. N. O. et al. J. Med. Microbiol. 1999; 48: 357–61.
11. De Vos D., Lim A., Pirnay J.-P. et al. J. Clin. Microbiol. 1997; 35 (6): 1295–9.
12. Driscoll J. A., Brody S. L., Kollef M. H. Drugs. 2007; 67: 351–68.
13. Khan A. A., Cerniglia C. E. Appl. Environ. Microbiol. 1994; 60: 3739–45.
14. Lavenir R., Jocktane D., Laurent F., Nazaret S., Cournoyer B. J. Microbiol. Methods. 2007; 70: 20–9.
15. Lyczak J. B., Cannon C. L., Pier G. B. Clin. Microbiol. Rev. 2002; 15: 194–222.
16. Motoshima M., Yanagihara K., Fukushima K. et al. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2007; 58: 53–8.
17. Palleroni N. J., Bradbury J. F. Int. J. Syst. Bacteriol. 1993; 43: 606–9.
18. Spilker T., Coenye T., Vandamme P., LiPuma J. J. J. Clin. Microbiol. 2004; 42 (5): 2074–9.
19. Widmer F., Seidler R. J., Gillevet P. M. et al. Appl. Environ. Microbiol. 1998; 64 (7): 2545–53.
20. Wisplinghoff H., Bischoff T., Tallent S. M. et al. Clin. Infect. Dis. 2004; 39: 309–17.

Поступила 28.04.12