

- ние качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа. М.: Стандартинформ; 2009.
8. Тест *cobas*[®] *TaqScreen MPX Test*, версия 2.0 для использования с системой *cobas s 201*: инструкция, Roche Molecular Systems, Inc., Швейцария.
 9. Fernandes H., Morosyuk S., Abravaya K. et al. Parameters for plasma preparation tubes on viral load measurements obtained by using the Abbott RealTime HIV-1 load assay. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48: 2464–8.
 10. Вакуумные пробирки *VACUETTE*[®] с K2 ЭДТА и гелем для получения плазмы: инструкция по использованию. Greiner Bio-One GmbH, Австрия.
 11. Кишкун А.А., Гильманов А.Ж., Долгих Т.И., Грищенко Д.А., Скороходова Т.Г. Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований. Методические рекомендации. 2013. Available at: http://www.labmedicina.ru/files/K%20nac.dni%202012/Methodich_rekomend.pdf.
-
- REFERENCES
1. Zhiburt E.B. Centralization of blood service in improving the quality and safety of blood transfusion therapy. *Menedzher zdravookhraneniya.* 2005; 4: 57–62. (in Russian)
 2. Zangerova E.Yu., Gamova E.E. Centralization of blood service is the main aspect of the rational use of the resources and donor contingent (by the example of the Republic of Mari El). *Menedzher zdravookhraneniya.* 2012; 12: 30–4. (in Russian)
 3. Zhiburt E.B. Modernization of laboratory diagnostics in blood service. *Zdravookhranenie.* 2005; 9: 27–30. (in Russian)
 4. Filina N.G., Otto V.S., Grishchenko D.A. Reorganization of the laboratory supplying blood service of the Krasnoyarsk region in terms of centralization. *Spravochnik zaveduyushchego KDL.* 2008; 4: 6–10. (in Russian)
 5. Moshkin A.V., Dolgov V.V. Quality assurance in clinical laboratory diagnostics. Moscow: Medizdat; 2004. (in Russian)
 6. Dolgikh T.I. Preparatory analytical stage of laboratory research in terms of standardization and centralization. *Spravochnik zaveduyushchego KDL.* 2013; 11: 62–70. (in Russian)
 7. State Standard 53079.4-2008. National standard of the Russian Federation. *Technologies clinical laboratory. Quality assurance of clinical laboratory studies.* Pt 4. Rules of conducting of preparatory analytical stage. Moscow: Standartinform Publ.; 2009. (in Russian)
 8. Тест *cobas*[®] *TaqScreen MPX Test*, версия 2.0 for use with the system *cobas s 201*: instructions, Roche Molecular Systems, Inc., Shveysariya. (in Russian)
 9. Fernandes H., Morosyuk S., Abravaya K. et al. Parameters for plasma preparation tubes on viral load measurements obtained by using the Abbott RealTime HIV-1 load assay. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48: 2464–8. (in English)
 10. *Vakuumnye probirki VACUETTE*[®] s K2 EDTA and gel for plasma: instructions for use. Greiner Bio-One GmbH, Avstriya. (in Russian)
 11. Kishkun A.A., Gil'manov A.Zh., Dolgikh T.I., Grishchenko D.A., Skorokhodova T.G. Organization of preparatory analytical stage when centralization of laboratory tests. *Methodical recommendations.* 2013. Available at: http://www.labmedicina.ru/files/K%20nac.dni%202012/Methodich_rekomend.pdf. (in Russian)

Поступила 14.04.14

Received 14.04.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 579.841.11:579.2531.083.18-074:543.42.062

Сиволодский Е.П.¹, Зуева Е.В.², Кунилова Е.С.², Богумильчик Е.А.², Домакова Т.В.³

ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS FULVA* МЕТОДАМИ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ И ТРАДИЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

¹ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ, 194044, Санкт-Петербург; ²ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Минздрава РФ, 197101, Санкт-Петербург; ³ЗАО «Ситилаб», 192289, Санкт-Петербург

Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с применением прибора Microflex с базой данных MALDI Biotyper ("Bruker Daltonics Inc.") идентифицировали с высоким уровнем достоверности 8 штаммов *P.fulva* из коллекции псевдомонад, выделенных из клинического материала в Санкт-Петербурге. При изучении тех же штаммов методом MALDI-TOF масс-спектрометрии прибором Vitek MS ("bioMerieux") они были ошибочно идентифицированы как *P.putida*. Для контрольной дифференциации *P.fulva* и *P.putida* апробирован и предложен комплекс тестов традиционных исследований. Подтверждена медицинская значимость *P.fulva*.

Ключевые слова: MALDI-TOF масс-спектрометрия; *Pseudomonas fulva*; *Pseudomonas putida*; медицинское значение; синтетическая среда King BS; оксидаза; пигменты псевдомонад.

Sivolodskii E.P., Zueva E.V., Kunilova E.S., Bogumiltchik E.A., Domakova T.V.

THE IDENTIFICATION OF CLINICAL STRAINS *PSEUDOMONAS FULVA* USING TECHNIQUES OF MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY AND COMMON ANALYSIS

The technique MALDI-TOF mass spectrometry was applied using device Microflex with database MALDI Biotyper (Bruker Daltonics Inc.) to identify with high level of reliability 8 strains *P. fulva* from collection of pseudo monads isolated from clinical material in St. Petersburg. When analyzing the same strains applying technique MALDI TOF mass spectrometry using device Vitek MS (bioMerieux) these strains were wrongly identifies as *P.putida*. The complex of tests of common analysis was approved and proposed for control differentiation of *P.fulva* and *P.putida*. The medical significance of *P.fulva* was approved.

Key words: MALDI-TOF mass spectrometry; synthetic medium king BS; *Pseudomonas fulva*; *Pseudomonas putida*; oxidase; pigment of pseudo monads

Для корреспонденции:

Сиволодский Евгений Петрович, д-р мед. наук, проф.
Адрес: 194044, Санкт-Петербург, ул. акад. Лебедева, 6
E-mail: es279@yandex.ru

Бактерии *P.fulva* (греч. fulva – желто-коричневый) впервые выделены в Японии из семян риса с рисовых полей и описаны в 1963 г. [1]. Сообщение о первом случае клинического изолята *P.fulva* опубликовано в 2010 г. [2]. Штамм выделен в Аргентине из ликвора девочки с опухолью мозга, осложненной инфекцией. Первоначально штамм был определен микробиологическим анализатором Vitek 2 как *P.putida*, однако методами секвенирования ПЦР-продукта гена 16S рРНК и ДНК-ДНК-гибридизации окончательно идентифицирован как *P.fulva*. В том же году появилось сообщение о случае выделения *P.fulva* из крови больного после тяжелой травмы [3]. Идентификация *P.fulva* проведена по результатам секвенирования гена 16S рРНК и генов *gug B*, *gro D*. В 2011 г. в опубликованной работе [4] сообщалось об идентификации методом MALDI-TOF масс-спектрометрии бактерий *P.fulva* непосредственно в культуральной среде с посевом пробы крови. Эти сведения указывают на медицинскую значимость *P.fulva* и сложность идентификации этих бактерий ввиду фенотипического сходства с *P.putida* и необходимости использования генетических методов. Представляет интерес изучение пригодности для идентификации *P.fulva* нового, быстрого метода MALDI-TOF масс-спектрометрии. Сообщений о выделении *P.fulva* из клинического материала в России нет.

Цель данного исследования – оценить диагностическую чувствительность идентификации *P.fulva* методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и выявить наиболее значимые тесты для их идентификации традиционными методами.

Материалы и методы. Исследовали 8 штаммов *Pseudomonas fulva* из рабочей коллекции культур Е.П. Сиволодского (№ 22–27, 30, 31), типовые штаммы *P.putida* CIP 52191T (ATCC 12633), *P.luteola* CIP 102995T (JCM 3352), *P.oryzihabitans* CIP 102996T (JCM 2952), полученные из коллекции бактерий Института Пастера (Париж). Штаммы *P.fulva* выделены в 1995–2005 гг. из мочи беременных женщин и урологических больных в лечебных учреждениях Санкт-Петербурга. Они хранились в коллекции культур как псевдомонады неустановленной видовой принадлежности. Их принадлежность к виду *P.fulva* установлена в ходе данного исследования методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и дополнительных фенотипическими тестами. Для культивирования исследуемых бактерий применяли “питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар)” производства ФБУН “Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии” (Оболensk). Для идентификации видов бактерий методом MALDI-TOF масс-спектрометрии использовали приборы: настольный MALDI-TOF масс-спектрометр Microflex с базой данных MALDI Biotyper (“Bruker Daltonics Inc.”, Германия) и Vitek MS с базой данных V2.0 (“bioMérieux”, Франция). Подготовку к исследованию чистых культур штаммов бактерий и исследования проводили в соответствии с инструкцией к прибору. Чувствительность грамотрицательных бактерий к ионам бария как маркера их принадлежности к роду *Pseudomonas* оценивали по методике, описанной в работе [5]. Для определения оксидазы применяли культуру бактерий, выросших на агаре Мюллера–Хинтона при 26°C в течение 24 ч. Культуру изучали параллельно с двумя реактивами: тетраметил-парафенилендиамином на полоске OXItest (“Erba Lachema”) и 1% водным раствором диметил-пара-фенилендиамин в капле на стекле чашки Петри [6]. Продукцию флуоресцеина выявляли путем посева бактерий на питательную среду King B (“bioMérieux”) и синтетическую среду King BS, разработанную нами [7]. Посевы выращивали при 26 и 35°C в течение 24 и 48 ч. Результат учитывали при ультрафиолетовом освещении. Для обнаружения продуцирования бактериями желтого водонерастворимого пигмента колоний засеивали суточные культуры секторами на ГРМ-агар и инкубировали при 26°C в течение 48 ч. Продукцию коричневого водонерастворимого пигмента выявляли путем посева тех же суточных культур бактерий секторами на ГРМ-агар, но инкубацию проводили при

35°C в течение 48 ч. При учете результатов обращали внимание на образование темно-коричневой окраски питательной среды вокруг газонов бактерий. Для усиления продукции коричневого пигмента целесообразно дополнительно вносить в ГРМ-агар перед его стерилизацией 0,05% L-тирозина. Окисление и ферментацию глюкозы изучали в О/Ф-тесте на среде Хью–Лейфсона [6]. Утилизацию бактериями аминокислот L-лизина и L-лейцина в качестве единственного источника азота и углерода исследовали по разработанному нами методу [8]. Наличие у бактерий нитратредуктазы, аргининди-гидролазы, гидролиза эскулина определяли микрообъемным методом с использованием тест-системы “Рapid-Энтер” производства НИИЭМ им. Пастера.

Результаты и обсуждение. В исследовании методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с использованием прибора Microflex с базой данных MALDI Biotyper 8 штаммов нашей коллекции, продуцирующих желтый и коричневый пигменты, установлена принадлежность всех штаммов к виду *P.fulva* (табл. 1). При этом получены максимальные показатели достоверности идентификации – у всех штаммов в диапазоне от 2,302 до 2,455, что соответствует высоковероятной идентификации вида ($\geq 2,300$ –3,000). Следует отметить корректность четкого исключения идентификации тех же штаммов как *P.putida* по показателям от 1,797 до 1,938, что соответствует критерию вероятной идентификации рода (1,700–1,999). Высокий уровень достоверности и диагностической чувствительности идентификации *P.fulva* этим прибором обеспечен его обширной базой данных, содержащей информацию о большинстве известных видов псевдомонад, включая *P.fulva*.

Исследование тех же штаммов псевдомонад методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с помощью прибора Vitek MS с базой данных V2.0 (“bioMérieux”) выявило ошибочную

Таблица 1

Результаты идентификации *P.fulva* методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с помощью приборов различных фирм

Штаммы <i>P.fulva</i>	Microflex (“Bruker Daltonics Inc.”)		Vitek MS (“bioMérieux”)	
	установлен вид	уровень достоверности*	установлен вид	уровень достоверности, %
22	<i>P.fulva</i>	2,302	0**	0
	<i>P.putida</i>	1,915	<i>P.putida</i>	99,9
23	<i>P.fulva</i>	2,384	0	0
	<i>P.putida</i>	1,938	<i>P.putida</i>	99,9
24	<i>P.fulva</i>	2,441	0	0
	<i>P.putida</i>	1,908	<i>P.putida</i>	99,9
25	<i>P.fulva</i>	2,409	0	0
	<i>P.putida</i>	1,848	<i>P.putida</i>	99,9
26	<i>P.fulva</i>	2,455	0	0
	<i>P.putida</i>	1,889	<i>P.putida</i>	99,9
27	<i>P.fulva</i>	2,379	0	0
	<i>P.putida</i>	1,797	<i>P.putida</i>	99,9
30	<i>P.fulva</i>	2,401	0	0
	<i>P.putida</i>	1,818	<i>P.putida</i>	99,9
31	<i>P.fulva</i>	2,409	0	0
	<i>P.putida</i>	1,853	<i>P.putida</i>	99,9

Примечание. * – критерии уровней достоверности: $\geq 2,300$ –3,000 – высоковероятная идентификация вида, 2,000–2,299 – надежная идентификация рода, вероятная идентификация вида, 1,700–1,999 – вероятная идентификация рода, 0,000–1,699 – ненадежная идентификация; ** – нет в базе.

Фенотипическая характеристика *P.fulva* и других видов псевдомонад, продуцирующих желтый и коричневый пигменты

Таксономические признаки	Штаммы						
	1 (n = 8)	2 (n = 3)	3 (n = 1)	4 (n = 1)	5 (n = 1)	6 (n = 1)	7 (n = 1)
Чувствительность к ионам							
бария	+	+	+	+	+	+	+
Оксидаза	+	+	-	-	+	-	-
Продукция флуоресцеина:							
среда King B при 26 и 35°C	-	-	-	-	-	-	-
среда King BS при 26 и 35°C	+	0	0	0	+	-	-
Продукция желтого пигмента колоний в течение 48 ч:							
при 26°C	+	0	0	0	-	+	+
при 35°C	±	+	+	+	-	+	+
Продукция коричневого пигмента вокруг колоний за 48 ч:							
при 26°C	±	0	0	0	-	-	-
при 35°C	+	0	0	0	+	-	-
О/Ф-тест с глюкозой	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Утилизация гиппурата натрия	-	-	0	0	+	-	-
Утилизация источника N и C:							
L-лизина	-	0	0	0	+	-	-
L-лейцина	-	0	0	0	+	-	-
Аргининдигидролаза	+	+	+	+	+	+	-
Нитратредуктаза	-	-	-	-	-	+	-
Гидролиз эскулина	-	-	-	-	-	+	-
Рост при 41°C	-	-	-	-	-	+	-

Примечание. * – *P.fulva* наши данные; 2 – *P.fulva* [9]; 3 – *p.fulva* [3]; 4 – *P.fulva* [2]; 5 – *P.putida* (типовой); 6 – *Pluteola* (типовой); 7 – *Poryzihabitans* (типовой); 0 – не изучался; ± – отрицательный результат у большинства штаммов.

идентификацию всех 8 штаммов как *P.putida* (см. табл. 1). При этом прибор показывал уровень достоверности идентификации всех штаммов 99,9%. Вероятно, ошибочная идентификация *P.fulva* как *P.putida* прибором Vitek MS обусловлена недостаточным объемом информации его базы данных, которая содержит сведения только о 11 видах псевдомонад без *P.fulva*.

Все 8 штаммов нашей коллекции выделены из клинического материала: 4 штамма из мочи беременных женщин в родильном доме, остальные из мочи женщин и мужчин – пациентов лечебных учреждений Санкт-Петербурга. Концентрация *P.fulva* в моче составляла 104–107 КОЕ/мл, что указывает на их этиологическую значимость. До сих пор известны только 3 сообщения (по 1 случаю) о выделении *P.fulva* из клинического материала [1–3]. Полученные нами результаты подтверждают медицинскую значимость *P.fulva* и представляют собой первый случай выделения этих бактерий из клинического материала в России.

Информация о *P.fulva* отсутствует в базе данных автоматизированных микробиологических анализаторов Vitek 2, Phoenix, которые не идентифицируют эти бактерии или ошибочно определяют их как *P.putida* [1, 3]. Сведения о фенотипической характеристике *P.fulva* противоречивы и получены на малом количестве штаммов [2, 3, 9], что указывает на необходимость их уточнения.

Наиболее характерным признаком *P.fulva* является продукция желтого водонерастворимого пигмента колоний и коричневого водорастворимого пигмента, окрашивающего

питательную среду вокруг колоний. Однако бактерии, выращенные при одной температуре, редко имеют оба пигмента. Нами установлено, что температурный оптимум для синтеза желтого и коричневого пигментов различен. Желтый пигмент образуют все штаммы *P.fulva* на среде ГРМ-агар при 26°C в течение 48 ч, при этом большинство штаммов не образует коричневого пигмента. Коричневый пигмент дают все штаммы *P.fulva* на среде ГРМ-агар при 35°C в течение не менее 48 ч, при этом большинство штаммов не образует желтый пигмент (табл. 2). Такой же коричневого пигмент образует большинство штаммов *P.putida*, однако они не продуцируют желтый пигмент. Продукцию указанных пигментов следует определять на ГРМ-агаре (или ГРМ-агаре с 0,05% L-тирозина) на отдельных чашках при 26°C (продукция желтого пигмента) и 35°C (продукция коричневого пигмента) в течение 48 ч. Сочетание продукции этих двух пигментов характерно только для *P.fulva*.

Сведения о наличии оксидазы у *P.fulva* противоречивы: отмечают наличие оксидазы [9] и ее отсутствие [2, 3]. По нашим данным, все 8 изученных штаммов имеют оксидазу слабой активности, которая выявляется любым реактивом (тетраметил-пара-фенилендиамин или диметил-пара-фенилендиамин). Все авторы отмечают отсутствие образования флуоресцеина бактериями *P.fulva* на среде King B [2, 3, 9].

Наши результаты подтверждают отсутствие продукции флуоресцеина всеми штаммами *P.fulva* на среде King B (“bioMerieux”) при 26 и 35°C в течение 48 ч. На синтетической среде King BS, разработанной нами [7], все штаммы

P. fulva продуцировали флуоресцеин при 26°C, однако не продуцировали его при 35°C в течение 48 ч.

Бактерии *P. fulva* можно отличить от *P. putida* по отсутствию утилизации L-лизина и L-лейцина в качестве единственного источника азота и углерода [8], а также по отсутствию утилизации гиппурата натрия в качестве единственного источника углерода (см. табл. 2). Тесты на аргининдигидролазу, нитратредуктазу, гидролиз эскулина, рост при 41°C позволяют отличить *P. fulva* от других видов псевдомонад, продуцирующих желтый пигмент.

Заключение. Метод MALDI-TOF масс-спектрометрии, выполняемый с помощью прибора Microflex с базой данных MALDI Biotyper, позволяет идентифицировать с высоким уровнем достоверности и диагностической чувствительности все исследуемые штаммы *P. fulva*. Его эффективность обусловлена обширной базой данных, включающей большинство известных видов псевдомонад. Исследование тех же штаммов *P. fulva* методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с прибором Vitek MS с базой данных V2.0 выявило ошибочную идентификацию всех штаммов как *P. putida* в связи с малым набором видов псевдомонад (11) в базе данных, что определяет необходимость применения контрольных тестов традиционных исследований. На основании экспериментального изучения *P. fulva* предложены оптимальные методики тестов определения оксидазы, продукции флуоресцеина, выявления желтого и коричневого пигментов, утилизации аминокислот, позволяющие различать *P. fulva* и *P. putida*. Выявление 8 штаммов *P. fulva* среди клинических изолятов, выделенных в этиологически значимых концентрациях, подтверждает медицинское значение этих бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

- Iizuka H., Komagata K. New species of *Pseudomonas* belonged to fluorescent group (Studies on the microorganisms of cereal grains. Part V). *J. Agricul. Che. Soc. Japan*. 1963; 37: 137–41.
- Almuzara M.N., Vazquez M., Tanaka N., Turko M., Ramires M.S., Lopez E.L. et al. First case of human infection due to *Pseudomonas fulva*, an environmental bacterium isolated from cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(2): 660–4.
- Seok Y., Shin H., Lee Y., Cho I., Na S., Yong D. et al. First report of blood stream infection caused by *Pseudomonas fulva*. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(7): 2656–7.
- Kok J., Thomas L.C., Olma T., Chen S.C.A., Iredell J.R. Identification of bacteria in blood culture broths using Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization sepsityper and Time of Flight Mass Spectrometry. *PLoS One*. 2011; 6(8): e23285.
- Sivolodskii E.P. Determination of the sensitivity of bacteria to barium ions, a taxonomic marker of the genus *Pseudomonas*. *Mikrobiologiya*. 2012; 81(1): 120–5 [Microbiology (Engl. Transl.). 2012; 81(1): 112–7].
- Gerhardt F., ed. *Manual of methods for general bacteriology*. T. 3. М.: Мир; 1983. (in Russian)
- Sivolodskii E.P. The synthetic growth medium Kings BS for detection of fluorescein synthesis by *Pseudomonas* bacteria. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 10: 60–2. (in Russian)
- Sivolodskii E.P. Application of the profiles of amino acid utilization as the sole carbon and nitrogen sources for pseudomonad taxonomy. *Mikrobiologiya*. 2009; 78(6): 766–72 [Microbiology (Engl. Transl.). 2009; 78 (6): 711–6].
- Uchino M., Shida O., Uchimura T., Komagata K. Recharacterization of *Pseudomonas fulva* Iizuka and Komagata 1963, and proposals of *Pseudomonas parafulva* sp. nov. and *Pseudomonas cremoricolorata* sp. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2001; 47 (5): 247–61.

Поступила 17.04.14
Received 17.04.14