

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ У БЕЛЫХ КРЫС

Т.В.Комаров, Д.Е.Аманова, Д.Б.Бабенко, П.А.Ивачёв, Ж.М.Койшибаев*, Е.М.Тургунов

MODIFICATION OF MOLECULAR GENETIC DIAGNOSTICS TECHNIQUE FOR DETECTING BACTERIAL TRANSLOCATION IN RATS

T.V.Komarov, D.E.Amanova, D.B.Babenko, P.A.Ivachev, J.M.Koishibaev*, E.M.Turgunov

Медицинский университет Караганды, Республика Казахстан, tkomarov1202@gmail.com

*Медицинский университет Астаны, Республика Казахстан, koishibaevz@gmail.com

Проблема детекции микробной транслокации при острой кишечной непроходимости актуальна ввиду высокой летальности, одной из причин которой являются септические осложнения, поздняя и низкоинформативная диагностика. Предложена модифицированная методика детекции бактериальной транслокации в кровь в режиме real-time PCR. У 65 белых крыс-самцов произведен забор крови с последующей экстракцией ДНК и амплификацией с использованием универсального праймера 16Sp-РНК с последующей идентификацией методом электрофореза. Разработанная методика обладает высокой чувствительностью и является прямым методом выявления феномена микробной транслокации в системный кровоток.

Ключевые слова: *бактериальная транслокация, полимеразная цепная реакция, мезентериальная ишемия*

The problem of detecting microbial translocation in AIO is relevant due to the high mortality rate, one of the reasons for which is septic complications, late and low-information diagnostics. We have proposed the new modification of the method for detecting bacterial translocation in blood in real-time PCR mode. Blood sampling was performed in 65 white male rats, followed by DNA extraction and amplification using a universal 16S r-RNA primer, followed by identification by electrophoresis. The developed technique has a high sensitivity and is a direct method for detecting the phenomenon of microbial translocation in the systemic bloodstream.

Keywords: *bacterial translocation, polymerase chain reaction, mesenteric ischemia*

Острая мезентериальная непроходимость, или острая мезентериальная ишемия (ОМИ) — комплекс симптомов, который характеризуется нарушением кровоснабжения тонкой кишки. Это приводит к ишемии и последующим вторичным изменениям стенки кишки [1-3].

Смертность при данной патологии колеблется от 50 до 70%, а в некоторых случаях достигает 90% [2-4]. Высокая летальность при данной патологии обусловлена развитием фатальных осложнений, таких как перитонит, сепсис, септический шок и трудностями диагностики данного заболевания, ввиду отсутствия специфической клинической картины и симптоматики [5-7].

В точности определения и постановке диагноза ОМИ наибольшее значение имеют методы визуальной диагностики. Американская гастроэнтерологическая ассоциация рекомендует ангиографию как золотой стандарт в диагностике мезентериальной ишемии [8].

Однако на сегодняшний день КТА заменила ангиографию в качестве «золотого стандарта» в диагностике мезентериальной ишемии с чувствительностью и специфичностью 0,96 и 0,94 соответственно [9].

Одним из ключевых звеньев патогенеза жизнеугрожающих осложнений ОМИ является бактериальная транслокация, которая на поздних стадиях ишемии кишки приводит к развитию перитонита, сепсиса и, как следствие, — к смерти пациента.

Бактериальная транслокация (БТ) — это феномен миграции жизнеспособных бактерий из желудоч-

но-кишечного тракта (ЖКТ) к внекишечным участкам, таким как печень, селезенка, почки, комплекс мезентериальных лимфатических узлов и системный кровоток [10,11].

В норме кишечная стенка отличается большей динамичностью и эффективной защитой, с внешней стороны она обсеменена большим спектром микробной флоры, изнутри же остается фактически стерильной [8]. Несмотря на это, при определенных, чаще патологических, условиях (воспалительных процессах стенки кишки, действии токсинов, лекарственных препаратов) возможно ослабление или дестабилизация целостности эпителиальной стенки кишечника [8]. Молекулярная биология в наши дни является довольно активно развивающейся дисциплиной, однако молекулярно-генетические методы идентификации бактерий распространены нешироко. Между тем, несмотря на ограничения, молекулярные методы имеют значительное преимущество по сравнению с методами фенотипирования. Одной из главных причин этого является высокая чувствительность данной методики.

Известна методика детекции бактериальной 16S рРНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Праймер, разработанный с выравниванием 962,279 бактериальных 16S генных последовательностей рРНК, которые будут амплифицировать продукт из 16S гена рРНК в 93,6% всех бактериальных генов 16S рРНК. Сочетание детекции гена 16S рРНК с видоспецифичными праймерами может значительно снизить усилия, необходимые для скрининга больших бактериальных

популяций с отрицательными образцами [12]. Главным преимуществом данной методики детекции результатов ПЦР является возможность количественного исследования полученных результатов [13]. При количественном анализе каждая серия экспериментов сопровождается амплификацией с контрольными образцами, в которых заранее известно количество копий ДНК (калибровочные образцы). Сравнивая динамику накопления продуктов амплификации в экспериментальных и контрольных образцах, можно достоверно оценить концентрацию ДНК в диапазоне разведений контрольных препаратов ДНК. Чтобы количественно оценить результаты ПЦР-анализа, рекомендуется максимально очистить образцы ДНК от примесей, так как это может послужить причиной выбраковки результатов, а также возникновения ложно-положительных или ложно-отрицательных результатов.

Цель исследования: разработка модификации метода ПЦР в режиме реального времени для детекции транслокации микробной флоры в системный кровоток при острой кишечной непроходимости с оценкой его диагностической ценности.

Материалы и методы исследования

Экспериментальная работа с животными проводилась в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Республики Казахстан от 02.04.18 г. №142 «Об утверждении Правил проведения медико-биологических экспериментов, доклинических (неклинических) и клинических исследований, а также требований к доклиническим и клиническим базам» с соблюдением международных принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных целей».

Оперативные вмешательства выполнялись под общей анестезией с соблюдением этических правил проведения эксперимента на животных, согласно Европейской конвенции о защите позвоночных животных. Забор крови и тем самым выведение животных из эксперимента осуществлялось путем обескровливания под общей анестезией, в соответствии с рекомендациями «AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition» [14].

Все экспериментальные животные списаны и утилизированы в соответствии с приказом Министра сельского хозяйства РК от 30.04.2015 г. №7-1/393 «Правила отбора проб перемещаемых (перевозимых) объектов и биологического материала».

Для проведения молекулярно-генетического исследования 65 лабораторных белых крыс обоих полов массой 150-220 г были разделены на 3 группы по способу вмешательства. 1 группа — контроля (SHAM), $n = 20$. В группе производится лапаротомия без моделирования ОМИ. 2 группа — интактная, $n = 5$, в целях определения чистоты выполнения эксперимента. 3 группа — опытная. Данная группа разделена на 2 подгруппы в зависимости от срока создания ишемии: 30 минут и 60 минут, $n = 20$ в каждой группе. У крыс под общим обезболиванием раствором кетамина в дозировке 0,15 мг/г массы тела животного внутримышечно производился забор крови (рис.1).

Нами была предложена новая модификация метода детекции транслокации кишечной микрофлоры путем выявления бактериальной ДНК в крови с помощью полимеразной цепной реакции при острой кишечной непроходимости [15]. Молекулярно-генетическое исследование проводилось согласно разработанной стандартной операционной процедуре.



Рис.1. Забор крови пункционным методом из сердца

Для апробации и определения чувствительности метода к полученным образцам крови добавлялось различное количество взвеси лабораторного авирулентного штамма *Escherichia coli* GFP 6 серотипа биотипа 1 (ATCC® 25922GFP™) с числом колониеобразующих единицы (КОЕ) от 10^8 до 10^2 .

Для проведения этапа экстракции ДНК бактерий из образцов крови использовали набор для экстракции геномной ДНК с помощью ПЦР («DNAzol™ BD Reagent, for isolation of genomic DNA from whole blood»).

На данном этапе молекулярно-генетического исследования образцы крови с добавленной взвесью бактерий с КОЕ от 10^8 до 10^2 центрифугируют со скоростью 800 об/мин в течение 5 мин. Полученный супернатант помещается в микропробирки, центрифугируется для дальнейшего осаждения бактерий со скоростью 10000 оборотов в мин в течение 60 сек, после чего полученный супернатант удаляется.

Далее добавляется 300 мкл лизирующего раствора и 20 мкл сорбента, образец и реагенты для экстракции тщательно перемешиваются на вортексе.

Полученная смесь подвергается выдержке в термостате при температуре 56°C в течение 30 мин. Для дальнейшей отмывки фрагментов ДНК полученная смесь центрифугируется со скоростью 10000 об/мин в течение 60 сек, супернатант удаляется. Далее добавляется 1000 мкл отмывочного раствора, смесь центрифугируют в режиме 10000 об/мин в течение 60 сек и снова удаляется супернатант.

Полученный осадок ресуспендируется в 40 мкл буферного раствора, тщательно перемешивается вортексом. Далее полученный осадок нагревается в термостате при температуре 56°C в течение 10 мин.

Затем проводится подготовка выделенной ДНК к исследованию в амплификаторе. Для этого необходимо приготовление специальной реакционной смеси, количество и наименование компонентов которой указаны в таблице.

Компоненты для приготовления реакционной смеси для ПЦР

Компонент	Необходимый объём
Вода	15 мкл
Реагенты	9 мкл
Тестируемый образец	1 мкл

Для контроля исследования также необходимо приготовление контрольных проб, не содержащих бактериальной ДНК. Контрольные и содержащие экстрагированную ДНК микропробирки загружаются

в планшет амплификатора. Детекция бактериальной ДНК проводится на амплификаторе BIO-RAD CFX96.

Амплификация проводится с использованием следующих параметров:

- этап денатурации при 95°C — 5 минут;
- этап «отжига» и элонгации — 40 циклов амплификации 10 сек при 56°C, 10 сек при 95°C.

Фрагменты ДНК амплифицировали с использованием набора универсальных праймеров 16SRNA U16SRT-FACTCCTACGGGAGGCAGCAGT и 16SRNAU16SRT-R TATTACCGCGGCTGCTGGC.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты представлены на графике амплификации (рис.2) и кривой плавления по данным термоциклера (рис.3).

Как видно из рис.2, во всех образцах, кроме отрицательного контроля, наблюдается увеличение продукта реакции с 24-го цикла.

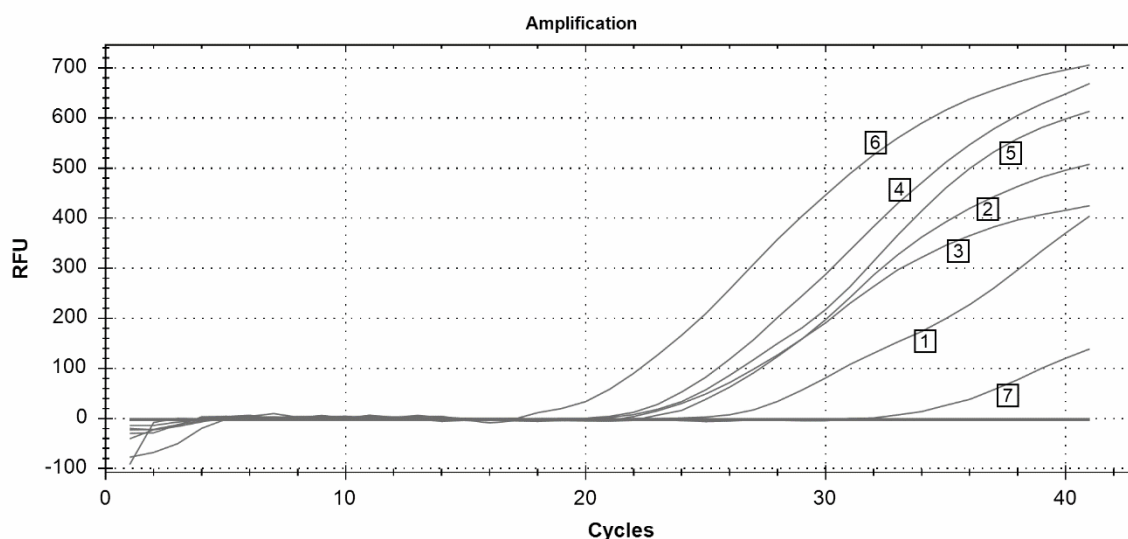


Рис.2. График амплификации: 1 — цельная кровь с *E.coli* (10^2 КОЕ/мл); 2 — цельная кровь с *E.coli* (10^3 КОЕ/мл); 3 — цельная кровь с *E.coli* (10^4 КОЕ/мл); 4 — цельная кровь с *E.coli* (10^5 КОЕ/мл); 5 — цельная кровь с *E.coli* (10^6 КОЕ/мл); 6 — чистая культура *E.coli* (10^8 КОЕ/мл); 7 — отрицательный контроль

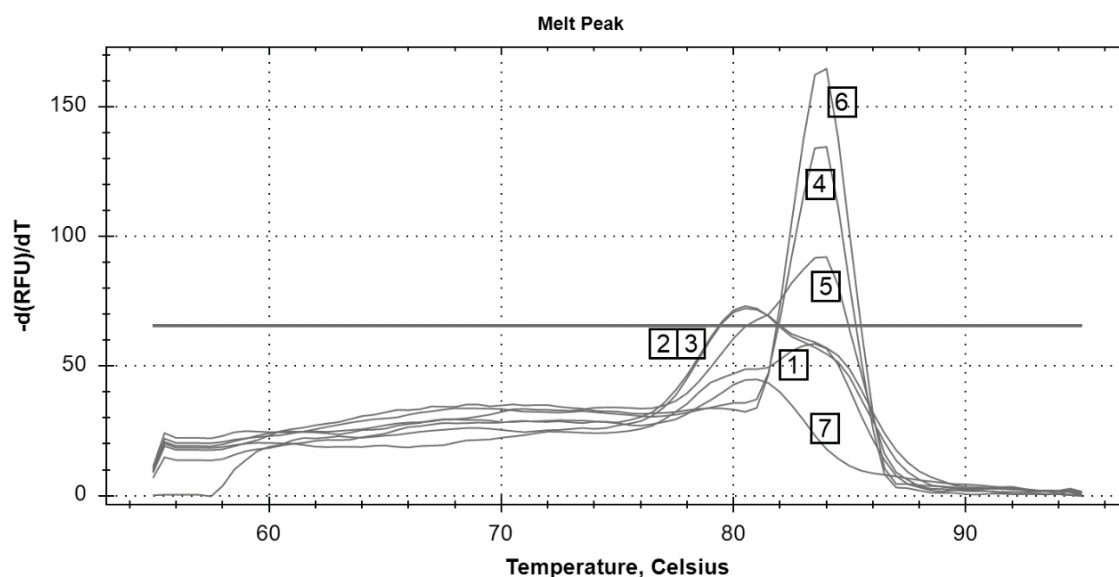


Рис.3. Кривые плавления в тестируемых образцах: 1 — цельная кровь с *E.coli* (10^2 КОЕ/мл); 2 — цельная кровь с *E.coli* (10^3 КОЕ/мл); 3 — цельная кровь с *E.coli* (10^4 КОЕ/мл); 4 — цельная кровь с *E.coli* (10^5 КОЕ/мл); 5 — цельная кровь с *E.coli* (10^6 КОЕ/мл); 6 — чистая культура *E.coli* (10^8 КОЕ/мл); 7 — отрицательный контроль

Кривые образцов "4", "5", "6" с пиками при температуре 82-85°C свидетельствуют о высокой специфичности продукта реакции в данных образцах. При этом подъема кривых в контрольном образце не наблюдается. Высота кривых плавления соответствует количеству КОЕ бактерий в образцах, увеличиваясь прямо пропорционально (рис.3). Установлено, что предлагаемый метод обладает чувствительностью при количестве КОЕ бактерий 10^5 . На представленном графике можно наблюдать, что элонгация цепи начинается при температуре около 60°C с пиковым подъемом при температуре плавления около 85°C.

Полученные в ходе амплификации данные также подтверждаются при помощи проведения электрофореза полученных образцов на агарозе. Это применяется с целью определения специфичности амплифицированных фрагментов бактериальной ДНК.

Неспецифичные (димеры праймеров) имеют массу 40-50 пары оснований (п.о.), специфичные — 500 п.о. Для контроля и оценки массы используется «100 bp DNA Ladder» — калибровочная жидкость, содержащая некоторое количество продуктов определенных масс (например 50, 100, 200 п.о.), полосы которого после проведения электрофореза располагаются на равных друг от друга расстояниях на агарозе от - к + постоянного тока. ДНК имеет отрицательный заряд.

Таким образом, предложенная нами методика позволяет детектировать фрагменты ДНК бактериальных агентов и является прямым методом детекции феномена бактериальной транслокации. Real-time PCR позволяет провести количественный анализ специфической ДНК в широком диапазоне концентраций. Чувствительность данной методики позволяет достоверно детектировать бактерии в количестве КОЕ = 10^5 .

1. Mizuno T., Yokoyama Y, Nishio H. et al. Intraoperative bacterial translocation detected by bacterium-specific ribosomal rna-targeted reverse-transcriptase polymerase chain reaction

- for the mesenteric lymph node strongly predicts postoperative infectious complications after major hepatectomy for biliary malignancies. *Ann Surg.*, 2010, vol.252(6), pp.1013-9.
2. Klar E., Rahmanian P.B., Bücken A., Hauenstein K et al. Acute Mesenteric Ischemia: a Vascular Emergency. *Deutsches Ärzteblatt International*, 2012, vol.109(14), pp.249–256.
3. Reginelli A., Iacobellis F., Berritto D. et al. Mesenteric ischemia: the importance of differential diagnosis for the surgeon. *BMC Surgery*, 2013, vol.13(Suppl 2). P.S51.
4. Copin P., Zins M., Nuzzo A., Purcell et al. Acute mesenteric ischemia: A critical role for the radiologist. *Diagn Interv Imaging.*, 2018, vol.99(3), pp.123-134.
5. Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 2010, vol.464, pp.59–65.
6. Luther B., Mamopoulos A., Lehmann C., Klar E. The Ongoing Challenge of Acute Mesenteric Ischemia., *Visc Med.*, 2018, vol.34(3), pp.217-223.
7. Montefiore Medical Center/Albert Einstein College of Medicine Bronx, New York, USA. AGA technical review on intestinal ischemia. American Gastrointestinal Association. *Gastroenterology*, 2000, vol.118(5), pp.954-68.
8. Nagpal R., Yadav H. Bacterial Translocation from the Gut to the Distant Organs: An Overview. *Ann Nutr Metab.*, 2017, vol.71, suppl.1, pp.11-16.
9. Wiest R., Lawson M., Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol.*, 2014, vol.60(1), pp.197-209.
10. Berg R.D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1999, vol.473, pp.11-30.
11. Krentz T., Allen S. Bacterial translocation in critical illness. *J Small Anim Pract.*, 2017, vol.58(4), pp.191-198.
12. Woodford N., Eastaway A.T., Ford M., Leanord A., Keane C., et al. Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan automated systems for detection and inference of mechanisms responsible for carbapenem resistance in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.*, 2010, vol.48(8), pp.2999-3002. doi: 10.1128/JCM.00341-10.
13. Hawkins S., Guest P. Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR Methods *Mol Biol.*, 2017, vol.1546, pp.125-133.
14. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. Available at: <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia-highres.pdf> (assessed: 09.08.2020).
15. Amanova D.E., Babenko D.B., Tokpanova A.S., Komarov T.V. et al. Copyright certificate No.6555 dated November 20, 2019. "Detection of intestinal microflora translocation by detecting bacterial DNA in the blood using polymerase chain reaction in acute intestinal obstruction".