4
НОМЕР

2017
ГОД ЭКОЛОГИИ
В РОССИИ

ISSN 2304-9081
ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ
On-line версия журнала на сайте
http://www.elmag.uran.ru

БОНЦ

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УрО РАН



2017

УЧРЕДИТЕЛИ
УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УрО РАН

© Е.А. Щуплова, 2017

УДК 616-093:616.157-078

Е.А. Щуплова

АДАПТАЦИЯ МЕТОДА ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ IN SITU ГИБРИДИЗАЦИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ С ЭРИТРОЦИТАМИ

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

Цель. Разработать оптимальный протокол FISH для изучения взаимодействия бактерий с эритроцитами.

Материалы и методы. В исследовании использовали кровь от здорового донора, различные штаммы микроорганизмов из рабочей коллекции лаборатории экологии микроорганизмов. В основу разработки оптимального протокола FISH для изучения взаимодействия бактерий с эритроцитами была положена методика ДНК-гибридизации в растворе с олигонуклеотидными зондами, мечеными FITC, описанная в работе Sladjana Malic et al.

Результаты. В данной работе были подобраны условия необходимые при получении качественных образцов крови для выявления бактерий, локализованных на поверхности или внутри эритроцитов, а также подобрано время специфического связывания меченого FITC ДНК-зонда с ДНК исследуемых бактерий и с помощью люминесцентной или конфокальной лазерной сканирующей микроскопии регистрировали результаты исследований.

Заключение. Разработан оптимальный протокол FISH для изучения взаимодействия бактерий с эритроцитами. Данный метод позволяет провести быструю дифференциацию и идентификацию микроорганизмов в образцах крови, что является перспективным для диагностики бактериемии и септических состояний. Результаты данного исследования могут быть использованы в клинических лабораториях лечебных учреждений для экспресс-диагностики септических состояний пациентов.

Ключевые слова: эритроциты, микроорганизмы, ДНК-зонды, гибридизация, флуоресцентная микроскопия.

E.A. Shchuplova

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

Objective. Develop an optimal FISH protocol for studying the interaction of bacteria with erythrocytes.

Materials and methods. The study used blood from a healthy donor, various strains of microorganisms from the working collection of the laboratory of ecology of microorganisms. The basis for the development of the optimal FISH protocol for the study of the interaction of bacteria with erythrocytes was the DNA hybridization technique in solution with oligonucleotide probes labeled with FITC described in Sladjana Malic et al.

Results. In this study, the conditions necessary for obtaining qualitative blood samples for detecting bacteria localized on the surface or inside the red blood cells were selected, and the time for the specific binding of the labeled FITC DNA probe to the DNA of the bacteria was determined and the results of the studies were recorded with luminescent or confocal laser scanning microscopy.

Conclusion. An optimal FISH protocol has been developed to study the interaction of bacteria with erythrocytes. This method allows rapid differentiation and identification of microorganisms in blood samples, which is promising for the diagnosis of bacteremia and septic states.

The results of this study can be used in clinical laboratories of medical institutions for the rapid diagnosis of septic states of patients.

Key words: erythrocytes, microorganisms, DNA probes, hybridization, fluorescence microscopy.

Введение

На сегодняшний день изучение механизмов взаимодействия бактерий с эритроцитами остается достаточно актуальным. Все чаще появляются работы, описывающие не только нахождение микробов в кровотоке, но и их локализацию внутри эритроцитов [1]. Известные методы обнаружения микроорганизмов в кровотоке можно разделить на две основные группы: классические (микробиологические) и современные (молекулярно-биологические), эффективность которых зависит от многих факторов и критериев. Первая группа методов используется и совершенствуется практически с начала возникновения микробиологии как научной дисциплины. Вторая активно разрабатывается в последние два десятилетия [2]. Примерами молекулярно-генетических методов являются ПЦР-анализ гемокультуры, метод мультиплексного ПЦР-анализа в режиме реального времени [3], а также физико-химические методы: метод матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) и метод газовой хроматографии [4]. Однако при использовании последних методов необходима гемокультура, которая выделяется в 45% случаев [5], исследование занимает по меньшей мере 24-48 ч и требуется дорогостоящее оборудование [4]. Известен метод FISH (флуоресцентная *in situ* гибридизация), в котором используются флуоресцирующие молекулы для детекции специфических фрагментов ДНК и РНК [6, 7]. Материалом для исследования методом FISH может служить кровь, костный мозг, биоптат, плацента и др. В исследуемых образцах флуоресцентная гибридизация *in situ* позволяет выявлять нуклеиновые кислоты в клеточных структурах, морфологию и одновременно проводить идентификацию микроорганизмов [6].

Цель данной работы – разработать оптимальный протокол FISH для изучения взаимодействия бактерий с эритроцитами.

Материал и методы

В основу разрабатываемого протокола была положена методика ДНК-гибридизации в растворе с олигонуклеотидными зондами, мечеными FITC,

описанная в работе Sladjana Malic et al. [8]. Авторы применили метод FISH для изучения способности микроорганизмов формировать биопленки. Адаптация протокола флуоресцентной *in situ* гибридизации для изучения взаимодействия бактерий с эритроцитами включала эксперименты по подбору оптимального антикоагулянта, вида и концентрации фиксирующих растворов, а также времени гибридизации и температурного режима.

Для изучения взаимодействия бактерий с эритроцитами брали штаммы разных микроорганизмов из рабочей коллекции лаборатории экологии микроорганизмов ИКВС УрО РАН: *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*. Все исследуемые штаммы бактерий выращивали на МПА при 37°С в течение 24 часов и готовили их взвесь в физиологическом растворе в концентрации 10^9 КОЕ/мл. Эритроциты получали путем взятия крови шприцем от здорового донора из локтевой вены и переливали её в стерильную пробирку, содержащую антикоагулянт. Далее эритроциты отделяли от плазмы и форменных элементов с помощью фосфатно-солевого буфера (ФСБ). Для этого в образец крови объемом 2 мл добавляли 8 мл ФСБ (pH=7,4) и трехкратно отмывали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 мин, затем эритроциты доводили до концентрации 10^6/мл. Далее смешивали 0,5 мл эритроцитов, 1 мл микробной взвеси исследуемых микроорганизмов и 0,5 мл питательной среды RPMI – 1640 (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург), инкубировали в термостате при 37°С в течение 24 ч. Затем 1 мл клеточной суспензии осаждали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 мин.

Для фиксации эритроцитов использовали несколько видов фиксаторов с разной концентрацией: 0,5 и 2,5% растворы глутарового альдегида (Sigma), а также 4 и 10% растворы параформальдегида (Sigma). Фиксирующие растворы добавляли в осадок объемом 400 мкл и выдерживали в течение 30 мин при комнатной температуре. После этого фиксированные эритроциты промывали и ресуспендировали в ФСБ (pH=7,4). На следующих этапах фиксации добавляли раствор этанола с восходящей концентрацией 50%, 80% и 100%, внося в исследуемые образцы по 400 мкл каждого раствора этанола с последующей инкубацией при 4°С в течение 10 мин. Далее эритроциты промывали ФСБ путем центрифугирования 5 мин при 1000 об/мин и ресуспендировали. Затем аликвоты по 100 мкл фиксированных клеток осаждали центрифугиро-

ванием при 1000 об/мин в течение 5 мин и ресуспендировали в 100 мкл буферного раствора для гибридизации (0,9 M NaCl и 20 mM Tris-HCl, pH=7), содержащего 500нМ соответствующего ДНК-зонда. Все пробы инкубировали в соответствии с температурой отжига для каждого вида зонда. Для проведения FISH синтезировали зонды, меченные на 5'-конце флуоресцеина изотиоцианатом (FITC) (ООО «ДНК-синтез», Москва). После гибридизации клетки центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин и добавляли 500 мкл промывочного раствора для удаления ДНК-зондов, не связавшихся с ДНК исследуемых бактерий. Инкубировали в течение 30 мин при соответствующей температуре. Операции, связанные с FISH, проводили в темноте. После гибридизации клетки центрифугировали и ресуспендировали в 300 мкл ФСБ. Эритроциты дополнительно окрашивали синим Эванса, который обеспечивал красное свечение клеток. Регистрацию результатов FISH проводили с помощью люминесцентного микроскопа Биомед 6 (Люм) (ув. 1000×) (ООО «Биомед», Санкт-Петербург) или конфокального лазерного сканирующего микроскопа Olympus FV 1000 (Olympus Corporation, Япония) с использованием 100 х иммерсионного объектива (числовая апертура 1,4).

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований по изучению взаимодействий бактерий с эритроцитами, используя метод FISH, необходимо было подобрать различные условия. В первую очередь, разработать и адаптировать режим фиксации эритроцитов, для того чтобы они выдерживали температуру нагрева до 60°С и не лизировались. Для этого использовали 4 разных раствора фиксаторов: 0,5 и 2,5% глутаровый альдегид, а также 4 и 10% параформальдегид. Время инкубации всех опытных образцов составило 30 мин при комнатной температуре. В результате исследований установлено, что выбор фиксатора влияет на качество фиксированных эритроцитов. В частности, при фиксации 0,5% раствором глутарового альдегида эритроциты сохраняли четко выраженные контуры и характерное двояковогнутое углубление в середине клетки (рис. 1).

Необходимо отметить, что во время просмотра исследуемых образцов с помощью люминесцентного микроскопа у эритроцитов не менялась окраска и они сохраняли красно-розовый цвет. Аналогичные результаты получали и при использовании 2,5% раствора глутарового альдегида.

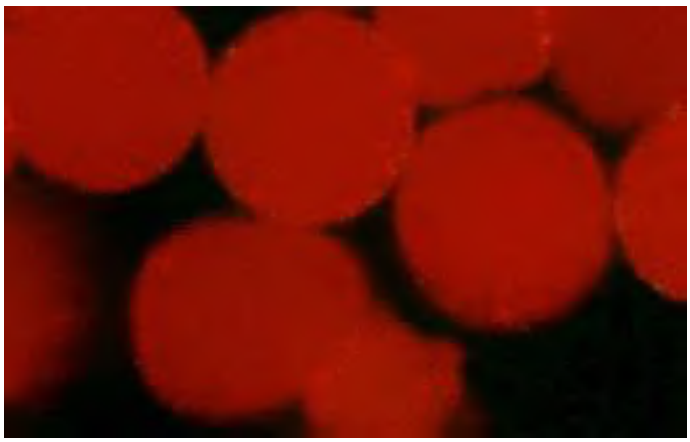


Рис. 1. Эритроциты, фиксированные 0,5% глутаровым альдегидом.
Окраска эритроцитов синим Эванса. Ув. 1000×

Полученные результаты подтверждаются данными Лобова И.А. с соавт. [9], показавшими отсутствие деформаций эритроцитов при воздействии глутарового альдегида.

При использовании в качестве фиксатора раствор параформальдегида в концентрации 4 или 10% качество мембраны эритроцитов ухудшалось. С помощью люминесцентного микроскопа наблюдали нелизированные эритроциты с нечетко выраженными контурами клетки (рис.2).

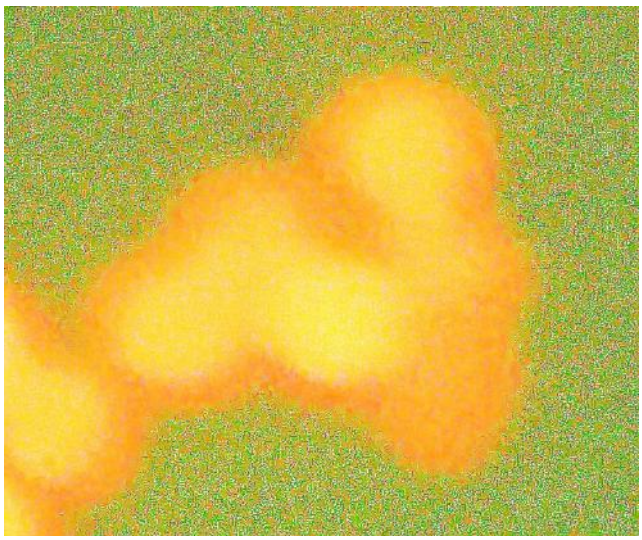


Рис. 2. Эритроциты, фиксированные 4% параформальдегидом.
Окраска эритроцитов синим Эванса. Ув. 1000×

Таким образом, при изучении взаимодействия эритроцитов с микроорганизмами методом FISH рекомендуется использовать 0,5 или 2,5% раствор глутарового альдегида в качестве фиксатора эритроцитов.

На следующем этапе проведенных исследований при подготовке эритроцитов к высокой температуре гибридизации необходимо было выполнить

еще один этап фиксации. После обработки 0,5% раствором глутарового альдегида в исследуемые образцы необходимо было добавлять раствор этанола с последовательно увеличивающимися концентрациями: 50, 80 и 100%. Время инкубации в каждом растворе составляло 10 мин при 4°С. Результаты исследования показали, что комбинация, состоящая из 0,5 % раствора глутарового альдегида с последующим добавлением раствора этанола с восходящими концентрациями 50, 80 и 100%, способствовала укреплению мембран эритроцитов и не приводила к образованию астроцитоза, микро- или макроцитоза, а также пойкилоцитоза.

Далее, на последующих этапах эксперимента было подобрано оптимальное время для гибридизации зондов, меченных FITC с ДНК или РНК бактерий, находящихся на поверхности или внутри эритроцитов. По результатам исследования оказалось, что при инкубации 45-60 мин наблюдали неспецифическое связывание зонда с бактериями, проявляющееся свечением в контрольных пробах, содержащих бактерии других таксонов. В работе экспериментально было подобрано минимальное время гибридизации для специфического связывания зонда с ДНК и РНК бактерий, исключающее ложноположительные результаты, которое составляло не менее 5 ч. В опытных образцах наблюдали эритроциты с типичной для них формой и размером, а также с четко выраженным углублением в середине клетки. Хорошо была видна адгезия бактерий на эритроцитах (рис. 3), а в некоторых образцах – внутриэритроцитарно расположенные микроорганизмы.

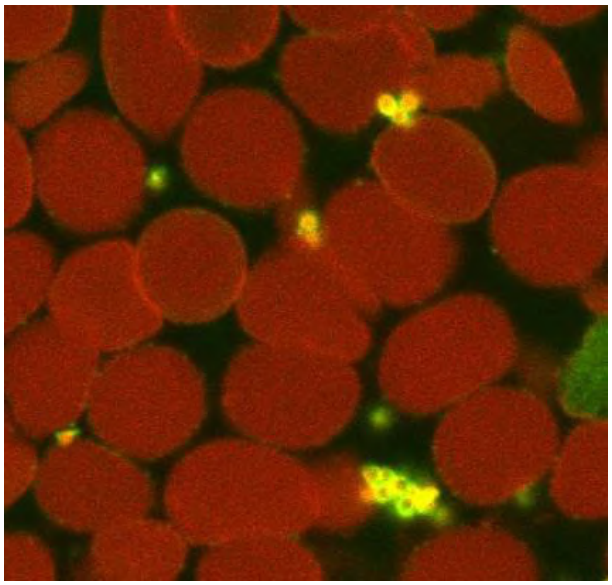


Рис. 3. Результаты FISH для оценки адгезии *S. epidermidis* на эритроцитах. Ув. 1000×

Заключение

В результате данного исследования адаптирован протокол флуоресцентной *in situ* гибридизации, наиболее эффективно обеспечивающий этапы подготовки эритроцитов и исключающий их лизис к проведению дальнейших манипуляций для флуоресцентной микроскопии. В работе подобраны оптимальные условия получения качественных образцов крови для выявления бактерий, локализованных на поверхности или внутри эритроцитов, а также определено время специфического связывания меченого FITC ДНК-зонда с ДНК исследуемых бактерий для люминесцентной или конфокальной лазерной сканирующей микроскопии регистрации результатов исследования.

В изученных образцах ДНК или РНК микроорганизмов гибридизуется с флуоресцентно мечеными олигонуклеотидными зондами, комплементарными видоспецифическим участкам гена 16S рРНК, после чего образцы исследуются с помощью флуоресцентной микроскопии. По наличию бактерий со специфическим свечением делается вывод о таксономической принадлежности бактерий, а также их локализации на поверхности или внутри эритроцитов. Данный метод позволяет провести быструю дифференциацию и идентификацию микроорганизмов в образцах крови, что является перспективным для диагностики бактериемии и септических состояний [10].

Результаты данного исследования могут быть использованы в клинических лабораториях лечебных учреждений для экспресс-диагностики септических состояний пациентов.

Благодарность. Автор выражает искреннюю признательность за техническую помощь в проведении исследований заведующему лабораторией по изучению механизмов формирования микробиоценозов человека ИКВС УрО РАН, член-корр. РАН С.В. Черкасову и ведущему научному сотруднику этой лаборатории, д.б.н., доценту А.В. Сгибневу, а также заведующему Центром коллективного пользования «Персистенция микроорганизмов» ИКВС УрО РАН, к.м.н., доценту А.О. Плотникову

(Работа проводилась в рамках государственного задания по теме «Роль микробного фактора в функционировании физиологических систем организма человека» № 0420-2015-0005)

ЛИТЕРАТУРА

1. Potgieter M., Bester J., Douglas B. Kell, Pretorius E. The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases. Microbiology Reviews. 2015. 39: 567-591.
2. Чеботкевич В.Н., Кайтанджан Е.И., Бурылев В.В., Щетинкина Е.Е. Современные методы лабораторной диагностики сепсиса. Клиническая микробиологическая антимикробная химиотерапия. 2013. Т. 15. 4: 295-300.

3. Киселева Е.Е. Алгоритм выявления и видовой идентификации бактерий в крови с использованием ПЦР. Вестник гематологии. 2017. Т.XIII.1: 19-24.
4. Попов Д.А., Овсеенко С.Т., Осипов Г.А., Вострикова Т.Ю. Ускоренный способ идентификации возбудителей бактериемий с применением метода газовой хромато-масс-спектрометрии. Клиническая лабораторная диагностика. 2013. 5: 54-58.
5. Гаврилов С.Н., Скачкова Т.С., Шипулина О.Ю., Савочкина Ю.А., Шипулин Г.А., Малеев В.В. Современные молекулярно-генетические методы, используемые для этиологической диагностики сепсиса. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. 2: 91-99.
6. Frickmann H., Zautner A.E., Moter A., Kikhney J., Hagen R.M., Stender H., et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review. Crit Rev Microbiol. 2017. 43 (3): 263-293.
7. Torres C. E., Gibello A., Nande M., Martin M., Blanco A. Fluorescent in situ hybridization and flow cytometry as tools to evaluate the treatments for the control of slime-forming enterobacteria in paper mills. Appl Microbiol Biotechnol. 2008. 78: 889-897.
8. Malic S., Hill K.E., Hages A., Percival S.L., Thomas D.W., Williams D.W. Detection and identification of specific bacteria in wound biofilms using peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization (PNA FISH). Microbiology. 2009. 155: 2603-2611.
9. Лобов И.А., Давлеткильдеев Н.А. Влияние способа подготовки образца на морфофункциональные характеристики эритроцитов при исследовании методом атомно-силовой микроскопии. Вестник Омского университета. 2013. 2: 129-132.
10. Laub R. R. & Knudsen J. D. Clinical consequences of using PNA-FISH in Staphylococcal bacteraemia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014. 33: 599-601.

Поступила 22.11.2017

(*Контактная информация:* **Щуплова Елена Алексеевна** – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экологии микроорганизмов ИКВС УрО РАН; 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел. 8 (3532) 77-54-17; e-mail: Khanina83@yandex.ru)

LITERATURA

1. Potgieter M., Bester J., Douglas B. Kell, Pretorius E. The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases. Microbiology Reviews. 2015. fuv013. 39: 567-591.
2. Chebotkevich V.N., Kajtandzhan E.I., Burylev V.V., Shchetinkina E.E. Sovremennye metody laboratornoj diagnostiki sepsisa. Klinicheskaya mikrobiologicheskaya antimikrobnaya himioterapiya. 2013. T. 15. 4: 295-300.
3. Kiseleva E.E. Algoritm vyyavleniya i vidovoj identifikacii bakterij v krovi s is-pol'zovaniem PCR. Vestnik gematologii. 2017. T. XIII. 1: 19-24.
4. Popov D.A., Ovseenko S.T., Osipov G.A., Vostrikova T.YU. Uskorennyj sposob identifikacii vozbuditelej bakteriemij s primeneniem metoda gazovoj hromato-mass-spektrometrii. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. 2013. 5: 54-58.
5. Gavrilov S.N., Skachkova T.S., Shipulina O.YU., Savochkina YU.A., Shipulin G.A., Maleev V.V. Sovremennye molekulyarno-geneticheskie metody, ispol'zuemye dlya ehtiologicheskoj diagnostiki sepsisa. Zhurnal mikrobiologii, ehpidemiologii i immunobiologii. 2016. 2: 91-99.
6. Frickmann H., Zautner A.E., Moter A., Kikhney J., Hagen R.M., Stender H., et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review. Crit Rev Microbiol. 2017. 43 (3): 263-293.
7. Torres C. E., Gibello A., Nande M., Martin M., Blanco A. Fluorescent in situ hybridization and flow cytometry as tools to evaluate the treatments for the control of slime-forming enterobacteria in paper mills. Appl Microbiol Biotechnol. 2008. 78: 889-897.

8. Malic S., Hill K.E., Hages A., Percival S.L., Thomas D.W., Williams D.W. Detection and identification of specific bacteria in wound biofilms using peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization (PNA FISH). Microbiology. 2009. 155: 2603-2611.
9. Lobov I.A., Davletkil'deev N.A. Vliyanie sposoba podgotovki obrazca na morfofunk-cional'nye harakteristiki ehritrocitov pri issledovanii metodom atomno-silovoj mikroskopii. Vestnik Omskogo universiteta. 2013. 2.: 129-132.
10. Laub R. R. & Knudsen J. D. Clinical consequences of using PNA-FISH in Staphylococcal bacteraemia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014. 33: 599-601.

Образец ссылки на статью:
Щуплова Е.А. Адаптация метода FISH для изучения взаимодействия микроорганизмов с эритроцитами. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2017. 4. 8 с. [Электр. ресурс] (URL:http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2017-4/Articles/EAS-2017-4.pdf).