

Оценка потенциальной патогенности клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa* билюминесцентным методом

Кузнецова М.В.^{1,2}, Масленникова И.Л.¹, Карпунина Т.И.², Николаева Н.В.²

Assessment of potential pathogenicity among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* using bioluminescent technique

Kuznetsova M.V., Maslennikova I.L., Karpunina T.I., Nikolayeva N.V.

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь

² Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера, г. Пермь

© Кузнецова М.В., Масленникова И.Л., Карпунина Т.И., Николаева Н.В.

Изучено влияние метаболитов штаммов *P. aeruginosa* на билюминесценцию *E. coli lux⁺* и экспериментально обосновано целесообразность использования билюминесцентного метода для оценки их потенциальной патогенности. В работе использованы экзометаболиты клинических изолятов *P. aeruginosa* ($n = 27$). Индекс потенциальной патогенности (ИПП) вычисляли по формуле $ИПП = (I_k - I_o) / I_k \cdot 100\%$, где I_k — интенсивность билюминесценции *Escherichia coli lux⁺* контрольной пробы (LB), I_o — интенсивность билюминесценции опытной пробы (экзометаболиты). Определены условия проведения анализа и продолжительность экспозиции. Согласно индексу потенциальной патогенности штаммы *P. aeruginosa* разделены на три группы: штаммы с низкой степенью патогенности, умеренно и высоко патогенные штаммы. Группа с ИПП не менее 70% характеризовалась достоверно высоким коэффициентом корреляции с уровнем продукции пиоцианина, пленкообразующей способностью. Это указывает на возможность использования билюминесцентного метода в качестве скринингового или дополнительного способа оценки степени агрессивности изолятов *P. aeruginosa*, в частности при гнойно-септических инфекциях (ГСИ).

Ключевые слова: *P. aeruginosa*, патогенность, билюминесценция, *E. coli lux⁺*.

The aim: to study the influence of *P. aeruginosa* exometabolites on *E. coli lux⁺* bioluminescence and experimentally prove the expediency of use of a bioluminescent method for an estimation of their potential pathogenicity. Objectives and Methods. Exometabolites of *P. aeruginosa* ($n = 27$) nosocomial strains were used. Index of potential pathogenicity (IPP) was calculated with the formula: $IPP = (I_k - I_o) / I_k \cdot 100\%$, where I_k — intensity of *Escherichia coli lux⁺* bioluminescence in control test (LB), I_o — intensity of a bioluminescence in experimental test (exometabolites). Results. Protocol of analysis implementation and exposure duration has been determined. According to IPP, *P. aeruginosa* strains were subdivided into 3 groups: strains with low degree of pathogenicity, moderate and highly pathogenic. The group of $IPP \geq 70\%$ was characterized by reliably high correlation coefficient relatively to pyocyanin production, film-forming ability. This indicates the possibility of bioluminescent method application as screening or additional method of the assessment of *P. aeruginosa* isolate aggressiveness, and in purulent-septic infections (PSI) in particular.

Key words: *P. aeruginosa*, pathogenicity, bioluminescence, *E. coli lux⁺*.

УДК 616-022.7:579.841.11.063.8]-073.584

Введение

Pseudomonas aeruginosa является хорошо известным возбудителем внутрибольничных инфекций, занимая первое место в этиологии нозокомиальных пневмоний и других гнойно-септических инфекций (ГСИ), с высоким уровнем летальности [7—9]. Очевидно, что условия стационаров с учетом иммунодефицитного состояния пациентов, обилием инвазивных процедур на фоне селективного воздействия антибиотиков и дезинфицирующих средств провоцируют и закрепляют агрессивность циркулирующих в них штаммов синегнойной палочки. Патогенность *P. aeruginosa* детерминирована способностью к инвазии и персистенции в тканях, а также набором цитотоксических веществ, таких как экзотоксин А, пиоцианин, фосфолипаза С, продуктов системы экскреции III типа, обеспечивающих выведение экзоэнзимов из внутренней среды бактериальной клетки и их транслокацию внутрь эукарио-

тической клетки непосредственно к мишеням (ExoS, ExoT, ExoY, ExoU) [8]. Активное изучение *P. aeruginosa* показало гетерогенность ее популяции по способности к синтезу и секреции факторов токсигенности [11, 14, 16]. В настоящее время существует необходимость экспрессной, экономичной оценки и дифференцировки большого числа штаммов *P. aeruginosa*, изолируемых в лечебно-профилактических учреждениях. Однако традиционные микробиологические методы оценки отдельных свойств этих бактерий не позволяют составить целостного представления о патогенном потенциале *P. aeruginosa*, что обусловлено в том числе известными в биологии эффектами взаимовлияния токсических веществ при их совместном действии.

В настоящее время в биомедицинских исследованиях и клинической медицине широко используются методики на основе биолюминесцентной реакции [17]. Высокая чувствительность и быстрый ответ на действие различных агентов делают их эффективным инструментом для оценки большого числа ингибиторов биологической активности. Рекомбинантные штаммы *E. coli* с генами свечения значительно расширяют сферу использования биолюминесценции в медицине и помогают решать задачи скринингового анализа [2, 3, 5]. Однако данные об использовании биолюминесценции как показателя токсигенности *P. aeruginosa* отсутствуют.

Цель работы — изучить влияние метаболитов референтного и клинических штаммов *P. aeruginosa* на биолюминесценцию *E. coli lux⁺* и экспериментально обосновать целесообразность использования биолюминесцентного метода для оценки их потенциальной патогенности.

Материал и методы

Клинические изоляты *P. aeruginosa* ($n = 27$) выделены из различного биологического материала больных с признаками воспаления в крупных хирургических стационарах г. Перми. Для сравнения использовали штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Рекомбинантный биолюминесцентный штамм *E. coli lux⁺* (полный lux-регулон *Vibrio fischeri*) [2] регидратировали охлажденной H₂O (1 мл на ампулу) 30 мин при температуре 4 °С. Затем взвесь сенсора разводили 0,9% NaCl до рабочего объема и выдерживали 30 мин при температуре 20 °С.

Клинические и референтный штаммы *P. aeruginosa* с исходным числом клеток $6 \cdot 10^8$ КОЕ/мл (до 2,0 по стандарту Мак-Фарленда) засеивали в соотношении 1 : 4 в Луриа—Бертани-бульон (LB, pH 7,0) и статически выращивали 18 ч при температуре 37 °С. Экзометаболиты получали путем центрифугирования 1—2 мл ночной культуры *P. aeruginosa* при 13 000 об/мин 10 мин на микроцентрифуге «Эппендорф» (Германия) и фильтрованием (диаметр пор 0,22 мкм). Надосадочную жидкость использовали в анализе немедленно или после замораживания при температуре –18 °С в течение 1 ч. По 50 мкл цельных экзометаболитов добавляли к 50 мкл сенсора, предварительно разлитого в лунки белого 96-луночного полистиролового планшета. Смесь выдерживали 60 мин при температуре 20 °С. Измерения проводили через 15, 30, 45, 60 мин на планшетном люминометре Luminoscan Ascent (Финляндия).

Поскольку подавление люминесценции *E. coli lux⁺* рассматривается как средство оценки потенциальной патогенности *P. aeruginosa*, для анализа ингибирующего эффекта предложен индекс потенциальной патогенности (ИПП), вычисляемый по формуле $ИПП = \frac{I_k - I_0}{I_k} \cdot 100\%$, где I_k — интенсивность люминесценции контрольной пробы (*E. coli lux⁺* + LB); I_0 — интенсивность биолюминесценции опытной пробы (*E. coli lux⁺* + метаболиты). Образование биопленок изучали в лунках плоскодонного 96-луночного полистиролового планшета согласно И.А. Шагиняну и соавт. [10]. Гемолитическую активность определяли на 5%-м кровяном агаре после 24 ч инкубации по величине зоны просветления в миллиметрах вокруг колоний исследуемых штаммов. Продукцию пиоцианина оценивали согласно E. Deziel и соавт. путем измерения оптической плотности (ОП) супернатантов суточных культур при длине волны 695 нм на планшетном спектрофотометре Benchmark Plus (Bio-Rad, США) [12]. Для исследования антагонистических свойств бактерий использовали метод отсроченного антагонизма по P. Muriana и T. Klaenhammer [14] с модификацией [6]. Антагонистическую активность штамма выражали как процент прироста тест-культуры (*E. coli lux⁺*) при ее культивировании в течение 5 ч с экзометаболитами антагониста.

Статистический анализ проводили с использованием программы Excel 2003. Результаты представлены в виде среднего арифметического M и стандартной ошибки среднего m . Статистическая достоверность коэффициента корреляции рассчитывалась при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что однократное замораживание бесклеточных экзометаболитов *P. aeruginosa* не приводило к достоверному снижению их действия на свечение *E. coli lux*⁺. Более того, в ряде случаев заморозка незначительно усиливала ингибирующие свойства экзометаболитов, что, возможно, обусловлено преобладающим влиянием экзотоксина А, активность которого увеличивается при многократном замораживании-оттаивании [11]. Для унификации методики в дальнейших экспериментах экзометаболиты проходили обязательный этап замораживания-оттаивания, что может быть рекомендовано при использовании данного метода в клинических и референтных лабораториях, где не всегда есть возможность анализа *ex tempore*. Хотя экзометаболиты большей части штаммов *P. aeruginosa* ингибировали свечение *E. coli lux*⁺ в пределах 66,0—96,8% уже через 15 мин контакта без последующего усиления (таблица), ряд супернатантов обуславливали максимальное снижение уровня биолюминесценции в течение 30 мин без достоверных изменений при пролонгации экспозиции. Это время и было использовано во всех последующих экспериментах.

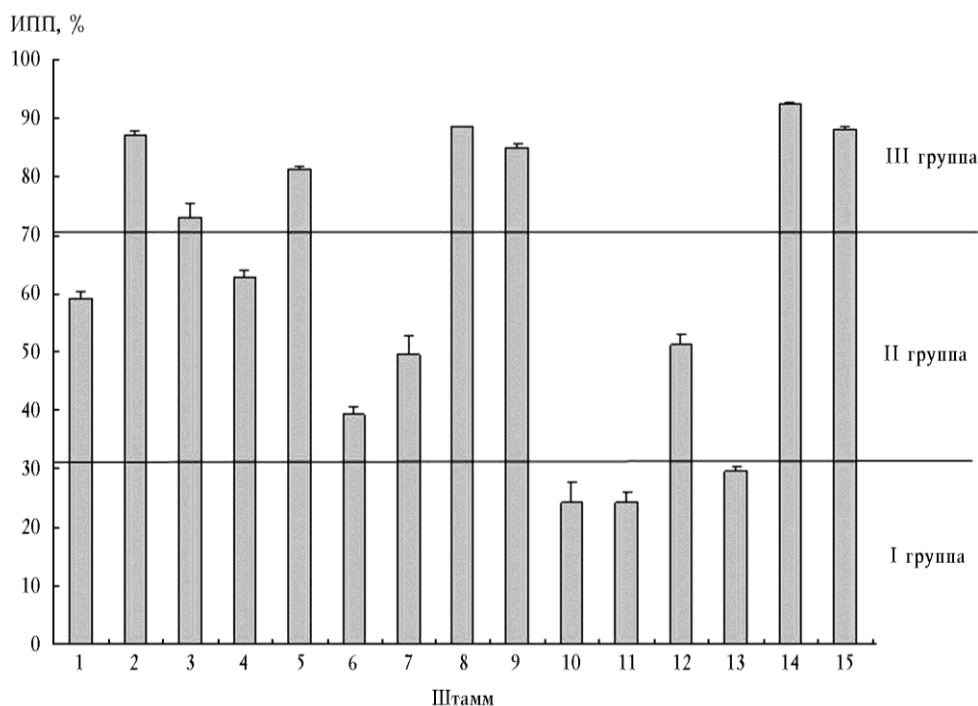
Индекс потенциальной патогенности типового и клинических штаммов *P. aeruginosa* при разных сроках контакта

Штамм <i>P. aeruginosa</i>	Срок контакта, мин			
	15	30	45	60
ATCC 27853	48,52 ± 3,71	49,10 ± 3,46	47,57 ± 3,83	49,96 ± 3,48
801	96,89 ± 0,35	98,19 ± 0,38	98,39 ± 0,28	96,39 ± 0,27
797	90,82 ± 0,10	93,06 ± 0,27	93,39 ± 0,12	93,46 ± 0,16
836	66,03 ± 0,92	66,96 ± 0,96	64,09 ± 0,77	59,20 ± 1,31
8-7	89,50 ± 0,79	93,10 ± 0,52	93,65 ± 0,43	93,49 ± 0,49
ИТТ	25,96 ± 2,21	37,38 ± 0,95	40,80 ± 1,09	39,50 ± 1,27
711	64,81 ± 1,92	67,05 ± 1,15	65,11 ± 1,34	61,20 ± 1,68

Выявлено, что экзометаболиты клинических штаммов *P. aeruginosa* по-разному влияли на биолюминесценцию сенсора *E. coli lux*⁺. На основе сравнительного анализа ряда клинических и референтного штаммов *P. aeruginosa* по уровню влияния их экзометаболитов на свечение *E. coli lux*⁺, изолированные культуры были распределены согласно ИПП по группам (рисунок): I группа ИПП < 30% — штаммы с низкой степенью, II группа 30% ≤ ИПП ≤ 70% — с умеренной степенью, III группа ИПП > 70% — с высокой степенью ингибирования люминесценции. Сопоставление клинических штаммов *P. aeruginosa* с учетом принадлежности к группе по проявлению ими традиционно учитываемых в практике факторов патогенности показало, что ИПП умеренно коррелирует с уровнем продукции пиоцианина во II группе ($r = 0,40$) и значительно в большей степени — в III группе ($r = 0,61$; $p < 0,05$), а наиболее сильная положительная связь между этими показателями отмечена для всей совокупности изолятов ($r = 0,81$; $p < 0,05$). Кроме того, показана умеренная положительная корреляция ИПП штаммов III группы с уровнем гемолитической активности ($r = 0,48$). Участие данных факторов (пиоцианин, фосфолипаза С, рамнолипид) в развитии воспалительного процесса бесспорно, так как они непосредственно влияют на формирование локального и системного воспаления посредством цитотоксического эффекта и стимуляции генерализованной воспалительной реакции [8, 18].

Известно, что одним из главных механизмов, определяющих экспрессию факторов вирулентности синегнойной палочки, является феномен кооперативной чувствительности (Quorum sensing). Под контролем данной системы находится синтез всех экзотоксинов (Las-система), пиоцианина (Rhl-система), а также образование биопленки [18]. В исследовании зафиксирована сильная положительная корреляция с пленкообразующей способностью у штаммов III группы ($r = 0,87$; $p = 0,05$). Можно полагать, что обнаружение совокупности факторов с высокой активностью у штаммов с ИПП > 70% будет сочетаться с выраженными проявлениями других вирулентных свойств. В соответствии с современными представлениями о госпитальных штаммах они не только должны проявлять множе-

ственную лекарственную устойчивость, но и иметь широкий набор экспрессируемых факторов патогенности, а также проявлять антагонистическую активность по отношению к другим микроорганизмам [1, 4]. При оценке антагонистической активности выявлено, что уровень прироста биомассы *E. coli lux⁺* имел сильную отрицательную корреляционную связь со степенью ингибирования билюминесценции при учете воздействия метаболитов всех штаммов ($r = -0,81$; $p < 0,05$), но в особенности в III группе ($r = -0,87$; $p < 0,05$). Высокая вирулентность и антагонистическая активность обеспечивают конкурентоспособность штамма по сравнению с другими микроорганизмами и, как следствие, способствуют его закреплению и распространению в стационаре.



ИПП штаммов *P. aeruginosa* (ингибирование свечения *E. coli lux⁺* после экспозиции с экзометаболитами через 30 мин контакта): 1 — ATCC 27853; 2 — 801; 3 — 797; 4 — 836; 5 — 8-7; 6 — ИТТ; 7 — 711; 8 — 8-4; 9 — 3-7; 10 — 9-3; 11 — дренаж; 12 — 88р; 13 — 9-8; 14 — 8-3; 15 — 5 (представлена часть штаммов)

Таким образом, показана возможность оценки потенциальной патогенности *P. aeruginosa*, основанной на изменении свечения люминесцентного тест-штамма при действии экзометаболитов. Такой подход основывается, по крайней мере, на двух соображениях. Во-первых, основной фактор патогенности *P. aeruginosa* — экзотоксин А — катализирует реакцию аденозинтрифосфат-рибозилирования и инактивации фактора элонгации II, что приводит к нарушению биосинтеза белка и других метаболических процессов прокариот и эукариот [11]. Свечение рекомбинантного штамма *E. coli lux⁺* отражает характер изменения внутриклеточного содержания основных восстановительных эквивалентов (NAD(P), аденозинтрифосфат), длинноцепочечных алифатических альдегидов, молекулярного кислорода — субстратов люциферазы, с

учетом рецепторного комплекса реципиента — *E. coli*. Во-вторых, пигмент пиоцианин и другие факторы также способны оказывать токсическое действие на оба типа клеток посредством промежуточных активных форм кислорода, таких как супероксид-радикал и перекись водорода с последующим снижением внутриклеточного циклического аденозинмонофосфата. В литературе показан высокий уровень корреляции между значениями EC₅₀ (ингибирование билюминесценции на 50% от контроля) тест-системы Microtox (ISO № 11348) и LD₅₀ (median lethal dose), EC₅₀ эукариот [13].

При лабораторной диагностике инфекций, ассоциированных с условно патогенными бактериями, такими как *P. aeruginosa*, их обнаружение в исследуемом патологическом материале требует ответа на во-

прос, является ли изолируемый микроб этиопатогеном либо это случайная контаминация анализируемого образца. Оценка по степени обсемененности изучаемого образца далеко не всегда является адекватной. Учитывая, что *P. aeruginosa* обладает большим набором факторов патогенности, их полный учет и интегральная оценка возможного вклада данного микроорганизма в патологический процесс при культуральном исследовании требует значительных материальных и временных затрат. Предлагаемый метод быстрый, унифицированный, позволяет комплексно оценить патогенный потенциал выделенного штамма для определения его роли в этиологии ГСИ, дать прогноз в отношении возможного развития инфекционного процесса. Индекс потенциальной патогенности целесообразно использовать в качестве дополнительного критерия госпитальной природы штаммов.

Литература

1. Брусина Е.Б., Рычагов И.П. Внутрибольничные инфекции, обусловленные формированием госпитального штамма // Стерилизация и госпит. инфекция. 2006. № 2. С. 32—34.
2. Данилов В.С., Зарубина А.П., Ерошников Г.Е. и др. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов люминесцентных бактерий // Вестн. МГУ. Сер. 16. Биология. 2002. № 3. С. 20—24.
3. Дерябин Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты. М.: Наука, 2009. 246 с.
4. Зуева Л.П., Яфаев Р.Х. Эпидемиология. СПб.: Фолиант, 2005. 752 с.
5. Медведева С.Е., Тюлькова Н.А., Кузнецов А.М. и др. Биолюминесцентные биотесты на основе светящихся бактерий // Журн. Сиб. федерального ун-та. Сер. Биология. 2009. Т. 2, № 4. С. 418—452.
6. Перунова Н.Б. Характеристика биологических свойств микроорганизмов в бактериально-грибковых ассоциациях кишечника: дис. ... канд. мед. наук. Оренбург, 2003. 127 с.
7. Решедько Г.К., Рябова Е.Л., Фарацук А.Н. и др. Неферментирующие грамотрицательные возбудители нозокомиальных инфекций в ОРИТ России: проблемы ан-

- тибиотикорезистентности // Клинич. микробиология и антимикроб. химиотерапия. 2006. Т. 8, № 3. С. 243—259.
8. Руднов В.А. Антибиотикотерапия госпитальных инфекций, вызванных *P. aeruginosae* // Рус. мед. журн. 2005. Т. 13, № 7. С. 485—490.
9. Сидоренко С.В., Резван С.П., Стерхова Г.А., Грудина С.А. Госпитальные инфекции, вызванные *Pseudomonas aeruginosa*. Распространение и клиническое значение антибиотикорезистентности // Антибиотики и химиотерапия. 1999. № 3. С. 25—34.
10. Шагинян И.А., Данилина Г.А., Чернуха М.Ю. и др. Формирование биопленок клиническими штаммами бактерий комплекса *Burkholderia cepacia* в зависимости от их фенотипических и генотипических характеристик // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2007. № 1. С. 3—8.
11. Armstrong S., Yates S.P., Merrill A.R. Insight into the catalytic mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. Studies of toxin interaction with eukaryotic elongation factor-2 // J. Biol. Chem. 2002. V. 277, № 48. P. 46669—46675.
12. Deziel E., Comeau Y., Villemur R. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpilated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming and twitching motilities // Bacteriol. 2001. V. 183, № 4. P. 1195—1204.
13. Kaiser K. Correlation of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms // Environ. Health. Perspect. 1998. V. 106, № . P. 583—591.
14. Muriana P.M., Klaenhammer T.R. Conjugal transfer of plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88 // Appl. Environ. Microbiol. 1987. V. 53, № 3. P. 553—560.
15. Riese M.J., Goehring U.M., Ehrmantraut M.E. et al. Auto-ADP-ribosylation of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS // J. Biol. Chem. 2002. V. 277, № 14. P. 12082—12088.
16. Roy-Burman A., Savel R.H., Racine S. et al. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. // J. Infect. Dis. 2001. V. 183, № 12. P. 1767—1774.
17. Simon L., Fremaux C., Cenatiempo Y. et al. Luminescent method for the detection of antibacterial activities // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 57, № 5—6. P. 757—63.
18. Smith R.S., Iglewski B.H. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence // Curr. Opin. Microbiol. 2003. V. 6, № 1. P. 56—60.

И.Л. Масленникова — канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории иммунорегуляции ФНБУ ИЭГМ УрО РАН (г. Пермь).

Т.И. Карпунина — д-р биол. наук, профессор кафедры микробиологии и вирусологии ПГМА им. акад. Е.А. Вагнера (г. Пермь).

Н.В. Николаева — ассистент кафедры микробиологии и вирусологии ПГМА им. акад. Е.А. Вагнера (г. Пермь).

Для корреспонденции

Кузнецова Марина Валентиновна, тел. (342) 282-80-91; (342) 212-44-76; e-mail: mar@iegm.ru

Поступила в редакцию 20.12.2011 г.

Утверждена к печати 05.03.2012 г.

Сведения об авторах

М.В. Кузнецова — канд. биол. наук, науч. сотрудник лаборатории химического мутагенеза ИЭГМ УрО РАН, доцент кафедры микробиологии и вирусологии ПГМА им. акад. Е.А. Вагнера» (г. Пермь).