

УДК 579.841.11

ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОЗОКОМИАЛЬНЫХ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

М. В. Кузнецова

Пермская государственная медицинская академия им. ак. Е. А. Вагнера,
Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН,
г. Пермь, Россия

CHARACTERIZATION OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF NOSOCOMIAL *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS

M. V. Kuznetsova

Perm State Academy of Medicine named after Academician E. A. Wagner,
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of Ural Branch of RAS, Perm, Russian Federation

Цель. Оценка биологических свойств нозокомиальных штаммов *P. aeruginosa* в зависимости от профилизации стационара и исследуемого клинического материала.

Материалы и методы. Исследовано 143 штамма *P. aeruginosa*, изолированных от пациентов крупных хирургических стационаров г. Перми, и 20 штаммов – от пациентов поликлинической службы. У всех культур определяли гемолитическую и фосфолипазную активность. Продукцию пиоцианина и пиовердина оценивали спектрофотометрическим методом.

Результаты. Фенотипические паттерны популяций синегнойной палочки достоверно не различались в разнопрофильных отделениях хирургических стационаров. Качественный сравнительный анализ позволил обнаружить слабую достоверную связь между наличием фосфолипазы и «легочным» происхождением изолята ($\varphi=0,285$; $p=0,0006$), а также между продукцией пиоцианина и выделением культуры из раны ($\varphi=0,237$; $p=0,0047$). При количественной оценке уровня продукции пигментов показана статистически значимая разница между их синтезом нозокомиальными и внебольничными изолятами (*U*-тест, $p<0,001$) и ее отсутствие в зависимости от материала выделения ($p>0,05$).

Выводы. Можно полагать, что госпитализированные в ОРИТ пациенты становятся причиной распространения высоковирулентных штаммов при переводе их в другие отделения ЛПУ. Изучаемые признаки являются доминантными и встречаются у подавляющего большинства природных штаммов *P. aeruginosa*, но их проявление на уровне модификационной изменчивости зависит от окружающих условий, что и выражается в фенотипической гетерогенности популяций синегнойной палочки.

Ключевые слова. *Pseudomonas aeruginosa*, нозокомиальный изолят, факторы патогенности, пиоцианин, пиовердин.

Aim. To assess the biological properties of *P. aeruginosa* strains depending on profiliation of hospital and the studied clinical material.

Materials and methods. 143 *P. aeruginosa* strains isolated from patients of large surgical hospitals of the city of Perm and 20 strains of polyclinic patients were studied. Hemolytic and phospholipase activity was

© Кузнецова М. В., 2014

e-mail: mar@iegm.ru

тел. 8 (342) 236 44 85

[Кузнецова М. В. – доцент кафедры микробиологии и вирусологии с курсом клинической лабораторной диагностики, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии, кандидат биологических наук].

determined in all the cultures. Pyocyanine and pyoverdin production was assessed using spectrophotometric method according to Deziel E. et al (2001).

Results. Phenotypic patterns of *Pseudomonas aeruginosa* population did not differ at the units of different profiles of surgical hospitals. Qualitative comparative analysis permitted to detect a weak reliable correlation between presence of phospholipase and “pulmonary” origin of the isolate ($\varphi=0,285$; $p=0,0006$) as well as between pyocyanine production and culture excretion from the wound ($\varphi=0,2374$; $p=0,00470$). When carrying out quantitative estimation of the level of pigment production, statistically significant difference between their synthesis with nosocomial and out-of-hospital isolates (*U*-test, $p<0,001$) as well as its absence, depending on the excreted material ($p<0,05$) was shown.

Conclusions. It may be assumed that patients hospitalized to Resuscitation and Intensive Therapy Units become the reason for propagation of high-virulent strains when being transferred to the other units of medical institutions. Probably, the studied characters are the dominant ones and are met in the overwhelming majority of natural *P. aeruginosa* strains, but their manifestation at the level of modification variability depends on environmental conditions that is expressed by phenotypic heterogeneity of *P. aeruginosa* bacillus.

Key words. *Pseudomonas aeruginosa*, nosocomial isolate, pathogenic factors, pyocyanine, pyoverdin.

ВВЕДЕНИЕ

При расследовании инфекций, связанных с условно-патогенными бактериями, дополнительным важным критерием этиологической значимости изолята служит определение у него факторов патогенности, а их широкий набор и выраженность могут свидетельствовать о внутрибольничном происхождении штамма [1]. Известно, что псевдомонады относятся к убиквитарным микроорганизмам, для которых свойственно популяционное разнообразие, дающее возможность виду осваивать практически любые места обитания и выживать в различных биотопах макроорганизма. В отличие от других представителей неферментирующих бактерий, *Pseudomonas aeruginosa* синтезирует многочисленные экстрацеллюлярные продукты, спектр и сила проявления которых обеспечивают высокую фенотипическую гетерогенность популяции [6]. По-видимому, на экспрессию вирулентных свойств оказывают влияние как индивидуальные особенности взаимодействия макроорганизма и бактерий, так и условия внешней (внутрибольничной) среды. Например, при изучении культур *P. aeruginosa*, выделенных от новорожденных с муковисцидозом, J. Manos et al. (2013) показали зависи-

мость паттернов вирулентности от пола, остроты процесса, сроков и места выделения штамма [4]. Вопросы о своеобразии фенотипов штаммов, циркулирующих в определенном отделении/стационаре, возможности оценки их патогенного потенциала, адаптивных свойств и принадлежности к госпитальному штамму остаются дискуссионными.

Цель исследования – оценка биологических свойств нозокомиальных штаммов *P. aeruginosa* в зависимости от профилизации стационара и исследуемого клинического материала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовано 143 штамма *P. aeruginosa*, изолированных от пациентов крупных хирургических стационаров г.Перми, и 20 штаммов – от пациентов поликлинической службы. Из них 61 культура выделена из раневого отделяемого, 72 – из мокроты и/или бронхиального лаважа (БАЛЖ), 10 – из содержимого кишечника, «поликлинические» культуры изолированы из различных биотопов (зев, нос, цервикальный канал, ухо, рана и др.). Гемолитическую активность (ГА) определяли на 5%-ном кровяном агаре после 24 ч инкубации при 37 °С по величине зоны просветления вокруг колоний исследуемых

штаммов. Фосфолипазную активность (ФЛА) определяли на мясопептонном агаре с добавлением 20%-ной желточной эмульсии через 24 ч инкубации культур при 37 °С. Продукцию пиоцианина и пиовердина (ПЦН, ПВД) анализировали согласно E. Deziel et al. (2001). Супернатанты получали стерильно путем центрифугирования 2,0 мл суточной культуры *P. aeruginosa* при 13000 об./мин 10 мин на микроцентрифуге «Эппендорф» (Германия) и фильтрованием через мембранные фильтры Millex-MP (0,22 мкм, Nihon Millipore, США). Содержание пиоцианина в супернатантах оценивали в относительных единицах путем измерения оптической плотности при длине волны 375/695 нм, используя многофункциональный микропланшетный ридер Infiniti M200 (Tecan, Австрия). Продукцию пиовердина (*f*, усл. ед.) оценивали путем измерения флюоресценции в супернатантах при длине волны 460 нм (экстинция) после возбуждения при 400 нм (эмиссия) [3]. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием програм-

мы Statistica 6.0. Рассчитывали медиану (*Me*), квартили (*Q1*; *Q3*) и межквартильный размах. Достоверность отличий двух выборок определяли по критерию Манна–Уитни (для независимых) и Уилкоксона (для зависимых). Для исследования связи между признаками вычисляли непараметрический коэффициент ранговой корреляции Спирмена (*R*), достоверными считали связи при $p < 0,05$. Сравнение качественных признаков выполняли с использованием коэффициента ассоциации (ϕ -критерий) и вычислением χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При традиционном определении факторов патогенности – пиоцианинообразования и гемолитической активности на кровяном агаре и продукции фосфолипазы на LB-агаре с добавлением желтка, подавляющее большинство изолятов всех лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ) проявляли эти признаки (табл. 1). Пигмент продуцировали 90% всех исследованных культур, при

Таблица 1

Встречаемость факторов вирулентности у штаммов *P. aeruginosa*, изолированных в различных хирургических стационарах

ЛПУ, № п/п	Отделение	Изоляты, <i>n</i>	ПЦН		ГА		ФЛА	
			абс.	%	абс.	%	абс.	%
1	ЭХО	20	20	100,00	20	100,00	12	60,00
	ТХО	18	18	100,00	18	100,00	16	88,89
	ОССХ	4	4	100,00	4	100,00	4	100,00
	ОРИТ	20	20	100,00	20	100,00	17	85,00
2	ОРИТ	16	14	87,50	14	87,50	16	100,00
3	ОРИТ	3	3	100,00	3	100,00	3	100,00
	ТХО	5	4	80,00	4	80,00	3	60,00
4	ОРИТ	14	12	85,71	14	100,00	14	100,00
	РО	12	10	83,33	10	83,33	5	41,67
5	ОРИТ	8	2	25,00	4	50,00	4	50,00
6	ОРИТ	18	17	94,44	16	88,89	16	88,89
7	ОРИТ	3	3	100,00	3	100,00	3	100,00
8	ОРИТ	2	2	100,00	2	100,00	2	100,00
Всего		143	129	90,21	132	92,93	115	80,42

Примечание: ЭХО – отделение экстренной хирургии, ТХО – торакальное хирургическое отделение, ОССХ – отделение острой сердечно-сосудистой хирургии; РО – реабилитационное отделение.

Встречаемость изучаемых признаков среди штаммов *P. aeruginosa*, изолированных из различного биоматериала

Материал	Признак					
	ПЦН		ГА		ФЛА	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Раневое отделяемое (61)	60	98,36	56	91,80	42	68,85
Мокрота, БАЛЖ (72)	61	84,72	69	95,83	66	91,67
Содержимое кишечника (10)	8	80,00	7	70,00	7	70,00

этом нужно отметить, что не все изоляты, выделенные из отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), были пигментообразующими, и, наоборот, штаммы, выделенные от пациентов из других отделений, в большом количестве, а иногда и в 100% случаев давали изменение окраски среды. Это же показано для гемолитической и фосфолипазной активности. Учитывая, что статистически значимой разницы между выделением изолята из ОРИТ и частотой встречаемости признаков нет, можно предположить, что в большей мере разница в распространенности штаммов, продуцирующих те или иные факторы патогенности, может быть связана не со специализацией отделения, а с биотопом выделения изолята.

Анализ встречаемости изучаемых признаков среди штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из различного биоматериала, показал, что чаще всего они были обнаружены у культур, изолированных из мокроты и трахеобронхиального отделяемого (табл. 2). Гемолитическую и фосфолипазную активность изоляты проявляли в 95,8 и 91,7% случаев соответственно. Определение степени «связанности» признаков показало, что только наличие фосфолипазы коррелирует с выделением изолята из мокроты: связь хотя и слабая, но достоверная ($\phi=0,285$; $p=0,0006$). Благодаря этому свойству микроорганизмам удается разрушать поверхностный сурфактантный слой альвеолярных мембран, содержащий значительное количество фосфолипидов, и закрепляться в зоне колонизации [2]. Можно было ожидать, что штаммы *P. aeruginosa*, изолируемые из содержимого кишечника и менее других испытывающие прямое селективное воздействие каких-либо факторов благодаря однотипным условиям их существования, будут проявлять минимальную активность в реализации патогенного потенциала. Тем не менее экспрессия факторов была у большей доли штаммов, что, скорее всего, обусловлено их «легочным»

происхождением. Значительный процент штаммов, изолированных из раневого отделяемого, продуцировали пигмент, проявляли гемолитическую активность, но не все из них давали «радужный венчик» на желточной среде. Несмотря на слабую связь, установленную между синтезом пиоцианина и выделением изолята из раневого отделяемого, все же она была статистически значима ($\phi=0,237$; $p=0,0047$).

Учитывая, что около 90% штаммов *P. aeruginosa* продуцируют пиоцианин, качественная оценка не дает исчерпывающей характеристики индивидуального фенотипа изолята, а следовательно, не позволяет оценить его патогенный потенциал. Представляется также важным количественное определение еще одного экзометаболита – пиовердина, продукцию которого в бактериологических лабораториях оценивают только качественно (есть/нет флюоресценция на среде КингВ) и только для идентификации вида. Он является значимым фактором для роста микроорганизма в сыворотке крови и способствует формированию хронической инфекции в легких [5]. При определении содержания пиоцианина и пиовердина в супернатантах методом спектрофотометрического анализа выявлено, что штаммы значительно различались по уровню их продукции (более чем в 100 раз) как между двумя группами (внебольничные

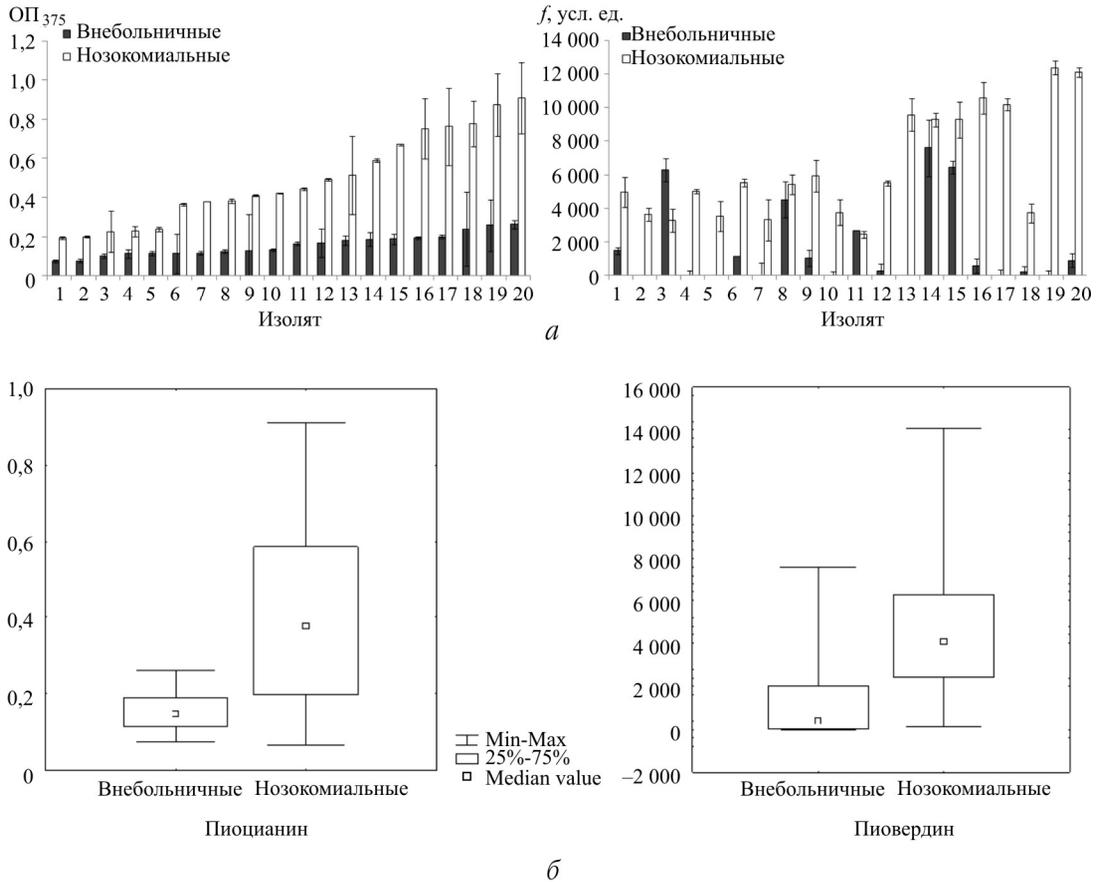


Рис. Количество пиоцианина и пиовердина (а) и диапазон показателей количества пигментов (б) в супернатантах суточных культур *P. aeruginosa*, изолированных от пациентов поликлиник ($n=20$) и стационаров ($n=60$)

и нозокомиальные изоляты), так и в пределах своих групп (рисунок). У нозокомиальных культур уровень пигментообразования варьировался от 0,065 до 0,910 усл. ед., медиана (квартили) составила 0,376 (0,195–0,587), тогда как у внебольничных штаммов – 0,146 (0,033–0,189) усл. ед. ($p=0,000001$). Для продукции пиовердина аналогичные показатели составили 4085,335 (2400,5–6280,335) и 393,5 (0–2045,875) усл. ед. соответственно ($p=0,000110$). Корреляционный анализ ($n=60$) выявил статистически значимую положительную связь между уровнем продукции двух экзомета-

болитов нозокомиальными изолятами ($R=0,382$, $p=0,002$). Анализ продукции пигментов клиническими штаммами с учетом материала выделения показал, что их уровень в двух группах (изоляты из мокроты и из раны) статистически значимо не различался ($M-W$ U -тест, $p>0,05$). Так, количество пиоцианина (Me ($Q1-Q3$)) в супернатантах культур из мокроты и из раны составило 0,409 (0,291–0,590) и 0,398 (0,236–0,625) усл. ед. (при $\lambda=375$ нм), а пиовердина – 4532,5 (2541,5–6376,7) и 3970,05 (3518,7–6414,0) усл. ед. соответственно.

Выводы

Фенотипические паттерны популяций синегнойной палочки достоверно не различались в разнопрофильных отделениях хирургических стационаров. В связи с высокой частотой встречаемости сходных по свойствам вариантов в различных отделениях можно полагать, что госпитализированные в ОРИТ пациенты становятся причиной распространения высоковирулентных штаммов при переводе их в другие отделения ЛПУ. В определенной степени популяционное разнообразие обуславливается особенностями биотопа, послужившего источником инфицированного материала. Качественный сравнительный анализ позволил обнаружить слабую достоверную связь между наличием фосфолипазы и «легочным» происхождением изолята, а также между продукцией пиоцианина и выделением культуры из раны. При этом количественная оценка уровня продукции пиоцианина и пиовердина с учетом материала выделения не показала статистически значимой разницы. В то же время нельзя не отметить в целом достоверно более выраженный их синтез нозокомиальными, чем внебольничными изолятами. По-видимому, изучаемые признаки являются доминантными и встречаются у подавляющего большинства природных штаммов *P. aeruginosa*, но их проявление на уровне модификационной изменчивости зависит от окружающих условий, что и выражается в фенотипической гетерогенности популяций синегнойной палочки.

Библиографический список

1. Брусина Е.Б., Рычагов И.П. Внутрибольничные инфекции, обусловленные формированием госпитального штамма. Стерилиз. госпит. инф. 2006; 2: 32–34.
2. Chastre J., Fagon J.Y. Ventilator-associated pneumonia. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2002; 165: 867–903.
3. 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. J. Bacteriol. 2001; 183: 1195–1204.
4. Manos J., Hu H., Rose B. R., Wainwright C. E., Zablotska I. B., Cheney J., Turnbull L., Whitcomb C. B., Grimwood K., Harmer C., Anuj S. N., Harbour C., the ACFBAL study group. Virulence factor expression patterns in *Pseudomonas aeruginosa* strains from infants with cystic fibrosis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2013; 32: 1583–1592.
5. Peek M.E., Bhatnagar A., McCarty N.A., Zugbaier S.M. Pyoverdine, the major siderophore in *Pseudomonas aeruginosa*, evades NGAL recognition. Int. Perspectives Inf. Dis. 2012; ID 843509: 1–10.
6. Smith R. S., Ingleski B. H. *P. aeruginosa* quorum sensing systems and virulence. Cur. Opin. Microbiol. 2003; 6 (1): 56–60.

Материал поступил в редакцию 28.02.2014