

## Роль системы секреции III типа в развитии госпитальных инфекций, вызванных антибиотикорезистентными штаммами *Pseudomonas aeruginosa*

Зигангирова Н.А., Нестеренко Л.Н., Капотина Л.Н., Белый Ю.Ф., Шеремет А.Б., Бондарева Н.Е., Федина Е.Д., Мелкумян А.Р., Поликарпова С.В., Пивкина Н. В., Зубашева М.В., Жуховицкий В.Г.

ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

Контактный адрес:

Наиля Ахатовна Зигангирова  
Эл. почта: zigangirova@mail.ru

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, система секреции III типа, ССТТ эффекторы, цитотоксичность, антибиотикорезистентность.

Система секреции III типа (ССТТ) является ключевым фактором патогенности *Pseudomonas aeruginosa*, подавление активности которой позволит блокировать инфекционный процесс вне зависимости от приобретенной антибиотикорезистентности микроорганизма. С целью изучения роли ССТТ псевдомонад при развитии госпитальных инфекций проведена характеристика 75 изолятов *P. aeruginosa* в отношении наличия генов, кодирующих эффекторный белки ССТТ, и активности секреторного аппарата у этих изолятов в условиях *in vitro*. Гены эффекторов ССТТ были выявлены у всех изолятов с преобладанием *exoS*<sup>+</sup> генотипа (80%). Изоляты с токсичным *exoU*<sup>+</sup>-генотипом выделялись из ран, мочи и крови в 2 раза чаще, чем из дыхательных путей: 26,5% против 12,8%. Наличием функционального ССТТ аппарата в условиях индукции низкими концентрациями кальция характеризовались 60,4% изолятов, в то время как 76,6% культур псевдомонад проявляли выраженную цитотоксичность *in vitro*. Изучение связи ССТТ-генотипов с устойчивостью к определенным группам антибиотиков показало большую распространенность резистентности к гентамицину и ципрофлоксацину у *exoU*<sup>+</sup>-генотипа. В совокупности, полученные данные свидетельствуют о наличии ССТТ и ее активности у клинических изолятов с различным профилем антибиотикорезистентности и говорят в пользу ведущей роли системы секреции III типа в развитии инфекционного процесса, что делает ССТТ перспективной мишенью для подавления инфекции, вызванной полирезистентными штаммами *P. aeruginosa*.

## The role of type III secretion system in the development of nosocomial infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains

Zigangirova N.A., Nesterenko L.N., Kapotina L.N., Belyi Ju.F., Sheremet A.B., Bondareva N.E., Fedina E.D., Melkumyan A.R., Polikarpova S.V., Pivkina N.V., Zubasheva M.V., Zhukhovitskiy V.G.

Research Institute for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

Contacts:

Nailya A. Zigangirova  
E-mail: zigangirova@mail.ru

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, type III secretion system, TTSS effectors, cytotoxicity, antimicrobial resistance.

Type III Secretion System (TTSS) is a key pathogenicity factor of *Pseudomonas aeruginosa*. The suppression of the activity of TTSS would potentially allow block the infection independently on the presence of antimicrobial resistance. To study the role of TTSS *P. aeruginosa* in the development of nosocomial infections we characterized genes coding TTSS effector proteins and the activity of its secretion *in vitro* in 75 *P. aeruginosa* isolates. Genes of TTSS effectors were detected in all studied isolates with *exoS*<sup>+</sup>-genotype being the predominant one (80%). Isolates with *exoU*<sup>+</sup>-genotype were revealed twice more frequent from urine and blood than from respiratory material: 26.5% vs 12.8%. The presence of functional TTSS during the induction by low calcium concentrations was observed for 60.4% of isolates. At the same time 76.6% of strains were highly cytotoxic *in vitro*. Exploring the relation of TTSS-genotypes with resistance to particular groups of antimicrobials has shown higher resistance rates to gentamicin and ciprofloxacin in *exoU*<sup>+</sup>-genotype. Overall we can conclude that TTSS is a potentially interesting target for control of infections caused by multi-resistant *P. aeruginosa* strains.

### Введение

*P. aeruginosa* вызывает до 30%, а в некоторых клинических отделениях до 50% всех внутрибольничных инфекций. Она является причиной нозокомиальных пневмоний, первичных бактериемий, инфекций мочеполовой системы и гнойных хирургических инфекций в высоком проценте случаев, особенно в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) у пациентов с искусственной вентиляцией легких и другими инвазивными процедурами [1]. Инфекции сопровождаются высокой летальностью – 34-48% [2]. Важную роль *P. aeruginosa* играет при муковисцидозе [3]. Такая угрожающая ситуация вызвана

чрезвычайно высоким уровнем устойчивости этого патогена к большинству, а иногда и ко всем антибиотикам у клинических штаммов. *P. aeruginosa* лидирует среди антибиотикорезистентных грамотрицательных бактерий, вызывающих инфекции у госпитализированных больных. Интересно отметить, что элиминация *P. aeruginosa* у больного косвенно способствует повышению резистентности организма хозяина к другим инфекциям, подавленной в результате действия факторов патогенности возбудителя, основными из которых являются эффекторы системы секреции III типа (ССТТ).

Система секреции III типа обнаружена у целого ряда грамотрицательных бактерий – возбудителей социально значимых и особо опасных инфекций, таких как *Chlamydia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Yersinia* и др. ССТТ демонстрирует значительное сходство для таксономически далеких родов микроорганизмов. ССТТ состоит, как минимум, из 32 белков, составляющих аппарат для транспорта молекул в клетку хозяина (молекулярный шприц или инъектосома), а также ряда эффекторных молекул – факторов патогенности, взаимодействующих с мембраной или проникающих непосредственно в цитоплазму клетки хозяина и изменяющих ее нормальное физиологическое состояние [4]. Мутации, нарушающие даже один из компонентов ССТТ, приводят к снижению или потере вирулентности.

У *P. aeruginosa* биогенез и регуляция ССТТ кодируются 36 генами, объединенными в 5 оперонов в составе хромосомы. К настоящему времени идентифицировано 4 эффекторных белка ССТТ *P. aeruginosa*, т.е. этот патоген имеет наименьшее число эффекторов среди всех микроорганизмов, обладающих ССТТ. Фактически все штаммы псевдомонад имеют гены, кодирующие секреторный аппарат, однако большинство штаммов не содержат полный набор генов, детерминирующих синтез эффекторных белков [5]. Секретируемые белки определяют фенотип штамма и патогенные свойства.

Наиболее вирулентные штаммы содержат ген *exoU*. N-концевой фрагмент *ExoU* токсина обладает фосфолипазной активностью и активируется в присутствии эукариотического клеточного фактора [6, 7]. Конечным результатом токсического действия *ExoU* на клетку является клеточная гибель, которая характеризуется стремительным, в течение 1-2 часов, нарушением целостности цитоплазматической мембраны как при некрозе. Токсическое действие *ExoU* направлено против фагоцитов, а также на преодоление эпителиального барьера, что способствует бактериальной диссеминации и персистенции [8, 9].

*ExoS* является бифункциональным токсином, активирующим ГТФ-азы и обладающим АДФ-рибозилтрансферазной активностью. Активность *ExoS* направлена на нарушение цитоскелета, что приводит к округлению клеток и снижению захвата псевдомонад определенными типами клеток, т.е. вызывает подавление фагоцитоза. Необратимое разрушение цитоскелета может приводить к нарушению клеточных контактов и способствовать проникновению псевдомонад через эпителиальный барьер. Гибель иммунных клеток при действии *ExoS* *P. aeruginosa* позволяет патогену персистировать [10].

*ExoT* по аминокислотной последовательности на 76% идентичен *ExoS* и также является бифункциональным белком. Активность *ExoT* направлена на подавление миграции, адгезии и пролиферации клеток, а также блокирование фагоцитоза и нарушение целостности эпителиального барьера, что способствует бактериальной диссеминации [11].

Значение 4-го эффекторного белка, *ExoY*, являющегося нуклеотидилциклазой, до конца еще не изучено. Его активность приводит к нарушению цитоскелета, ингибированию захвата псевдомонад клетками хозяина и увеличению проницаемости эндотелия [12].

Клинические изоляты *P. aeruginosa* характеризуются различными генотипами и фенотипами, что влияет на тяжесть заболевания и клинический прогноз. Изучение частоты смертельных исходов, бактериальной персистенции в легких и диссеминации бактерий показало, что секреция токсина *ExoU* вносит наибольший вклад в вирулентность, в то время как секреция белка *ExoS* связана с меньшей вирулентностью, а белок

*ExoT* имеет минимальный эффект на проявление вирулентных свойств патогена. Патогенез поражения легких связан с активностью *ExoU*, который индуцирует прокоагулянтные процессы в эпителиальных клетках, гиперпроницаемость сосудов, активацию тромбоцитов и образование тромбов при псевдомонадной пневмонии и сепсисе [13].

Было показано, что цитотоксический или инвазивный фенотип *P. aeruginosa* связан с конкретным ССТТ генотипом. Инвазивные изоляты характеризуются *exoS<sup>+</sup>exoT<sup>+</sup>exoU<sup>-</sup>* генотипом, в то время как цитотоксические изоляты относятся к *exoS<sup>-</sup>exoT<sup>+</sup>exoU<sup>+</sup>* генотипу [14].

Более того, как было показано Mitov с соавт. [15], ген *exoU* чаще выявлялся у полирезистентных изолятов (40,2%), нежели у штаммов, не отличающихся множественной резистентностью. Garey с соавт. [16] показали, что изоляты из крови с *exoU<sup>+</sup>* генотипом характеризовались высокой резистентностью ко многим антибиотикам, включая карбапенемы, фторхинолоны, цефепим, и гентамицин. Неблагоприятный клинический прогноз наблюдали у больных с пневмонией, вызванной псевдомонадами с *exoU<sup>+</sup>* генотипом и устойчивостью к фторхинолонам [17, 18].

Фундаментальные исследования последних 10 лет позволили изменить стратегию борьбы с инфекциями. В частности, в качестве мишеней для поиска антибактериальных препаратов выбирают факторы патогенности бактерий. Такие препараты должны не убивать микробы, а подавлять вирулентность, не создавая условий для селективного отбора, что принципиально снижает риск развития генетически детерминированной резистентности к применяемому препарату. ССТТ псевдомонад, являясь ключевым фактором патогенности возбудителя, может служить перспективной мишенью для подавления инфекционного процесса.

Целью данного исследования явилось изучение роли ССТТ псевдомонад при развитии госпитальных инфекций на основе характеристики клинических изолятов по ССТТ генотипам, функциональной активности ССТТ *in vitro*, их токсичности в отношении эукариотических клеток, а также выявление возможной корреляции между конкретным ССТТ генотипом и антибиотикорезистентностью.

## Материалы и методы

### Выделение *P. aeruginosa* из клинического материала

Выделение культур *P. aeruginosa* из нативного клинического материала различной природы производилось согласно общепринятым методикам [19]; идентификация выделенных культур и оценка их антибиотикорезистентности производились с помощью бактериологических анализаторов WalkWay 40S (DadeBehring, Германия) и Phoenix100 (Becton Dickinson, США) согласно инструкциям производителей.

### Культивирование *P. aeruginosa*

Культуры эталонных и свежесделанных штаммов *P. aeruginosa* культивировали в жидком LB (Difco, США) питательном бульоне при температуре 37°C в течение 18-20 часов до концентрации 10<sup>9</sup> микробных клеток/мл.

### Постановка ПЦР

На основании опубликованных статей были выбраны олигонуклеотиды к исследуемым мишеням [20]. Для данных праймеров провели определение температуры плавления, возможности образования димеров праймеров, «шпилек», а также их специфического связывания. Результаты представлены в таблице 1. При оптимизации ПЦР подбирали концентрации компонентов реакционной смеси и температурный режим ам-

**Таблица 1.** Последовательность праймеров, выбранных для определения наличия генов, кодирующих эффекторные белки ССТТ *P. aeruginosa*

Наименование олигонуклеотида	Исследуемый ген	Последовательность
5-PrimerS	<i>exoS</i>	GCGAGGTCAGCAGAGTATCG
3-PrimerS		TTCGGCGTC ACT GTG GAT GC
5-PrimerT	<i>exoT</i>	AAT CGC CGT CCA ACT GCA TGC G
3-PrimerT		TGT TCG CCG AGG TAC TGC TC
5-PrimerU	<i>exoU</i>	CCG TTG TGG TGC CGT TGA AG
3-PrimerU		CCA GAT GTT CAC CGA CTC GC
5-PrimerY	<i>exoY</i>	CGG ATT CTA TGG CAG GGA GG
3-PrimerY		GCC CTT GAT GCA CTC GAC CA

плификации, обеспечивающие максимальную чувствительность и специфичность обнаружения ДНК *P. aeruginosa*. Объем реакционной смеси составил 25 мкл: 10 мкл 2,5× ПЦР буфера, по 10 мкмоль каждого праймера, 0,2 мкл термостабильной полимеразы, 8 мкл деионизированной H<sub>2</sub>O и 5 мкл ДНК.

#### Метод иммуноблота

Ночную культуру исследуемых штаммов *P. aeruginosa* разводили 1:100 в свежей среде LB, добавляли 5 мМ EGTA и продолжали выращивание при встряхивании в течение 3 часов при 37°C. После культивирования бактериальные клетки осаждали центрифугированием. Внеклеточные белки концентрировали трихлоруксусной кислотой (10% насыщения), отмывали 100% ацетоном и суспендировали в 1-кратном электрофоретическом буфере Laemmli для образцов. После проведения электрофореза в полиакриламидном геле [21] белки переносили методом полусухого блота из геля на нитроцеллюлозные мембраны (Bio-Rad, США) с использованием системы TE70 PWR (GE, Россия). Нитроцеллюлозные мембраны окрашивали красителем Ponceau S (Sigma-Aldrich, США) для проверки качества переноса, после чего отмывали раствором 20 мМ Tris-HCl+150 мМ NaCl+0,05% Tween20 (TBS-T), блокировали 5% раствором обезжиренного молока в TBS-T и инкубировали с мышинной сывороткой к белку ExoT в разведении 1:20 000 в течение ночи при 4°C. Реакцию учитывали после инкубации мембран с анти-мышинным конъюгатом, меченным пероксидазой хрена (разведение 1:5000), в течение 1 часа при комнатной температуре и обработкой мембран реагентом для хемилюминисценции. В качестве положительного контроля использовали очищенный препарат АДФ-рибозилирующего фрагмента ExoY. Реакцию учитывали на хемилюминиметре (VilberLourmat, Франция).

#### Тест на цитотоксичность

К суточному монослою клеток CHO (Chinese Hamster Ovary cells), выращенному в 96-луночном планшете, добавляли 3-х часовую культуру псевдомонад с множественностью инфекции (МИ) 10 и инкубировали 3 часа. Планшет центрифугировали 10 мин при 5000 об/мин для осаждения бактерий, а надосадочную жидкость отбирали. Определение лактатдегидрогеназы проводили с помощью набора CytoTox Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, США) согласно инструкции. Цитотоксичность выражали в процентах по отношению к образцам чистым клеткам.

## Результаты

### Характеристика клинических изолятов *P. aeruginosa*

Была собрана коллекция штаммов псевдомонад, выделенных из клинических образцов (кровь, моча, отделяемое дыхательных путей и открытые инфицированные раны различной локализации) в нескольких стационарах г. Москвы и идентифицированных как *P. aeruginosa*. Всего было получено 75 изолятов, среди них: из промывных вод бронхов (реанимация) – 20; из бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) (нейрореанимация) – 9; из мокроты при пневмонии – 4; из мокроты при муковисцидозе – 6; из отделяемого ран – 28; из мочи – 4; из крови – 1; из отделяемого глаза – 1; из пунктатов – 2.

Была определена чувствительность полученных изолятов *P. aeruginosa* к антибиотикам. У 48 изолятов была выявлена множественная устойчивость с высоким уровнем устойчивости к 4-20 антибиотикам. Кроме того, из 42 изолятов, устойчивых к 4-16 антибиотикам с высоким уровнем устойчивости, 28 изолятов также имели умеренную устойчивость к 1-5 антибиотикам.

Среди изученных клинических изолятов наиболее часто встречалась устойчивость к следующим антибиотикам: гентамицину (51%); ципрофлоксацину (35%); ампициллину (34%); цефуроксиму (34%); меропенему (32%); амикацину (30%); цефтазидиму (23%); тобрамицину (23%); имипенему (23%); пиперациллину (19%); левофлоксацину (18%); азтреонаму (16%). Частота других типов антибиотикорезистентности составляла менее 10%.

Таким образом, более половины (62%) клинических изолятов синегнойной палочки, составляющих полученную коллекцию, демонстрировало множественную устойчивость к большинству клинически значимых антибиотиков.

### Генетические профили эффекторных белков ССТТ у клинических изолятов *P. aeruginosa*

Изучение частоты встречаемости генов, кодирующих белки-эффекторы ССТТ псевдомонад, у полученных госпитальных изолятов, проводили с помощью ПЦР с ДНК изолятов. При отработке условий проведения реакции были использованы референс-штаммы *P. aeruginosa* с известным ССТТ генотипом, PAO (*exoS<sup>+</sup>exoT<sup>+</sup>exoY<sup>+</sup>exoU<sup>-</sup>*) и PA103 (*exoS<sup>-</sup>exoT<sup>+</sup>exoY<sup>+</sup>exoU<sup>+</sup>*).

Среди всех проанализированных изолятов *exoU<sup>+</sup>* генотип встречался в 13,8%, полученных из ОРИТ, и в несколько большем проценте – 22,7% у изолятов из других отделений (не ОРИТ). При сравнении источников выделения для этого токсичного генотипа было установлено, что в 12,8% он был выделен из дыхательных путей и 26,5% – из отделяемого ран, мочи и крови.

*exoS<sup>+</sup>* генотип был выявлен у анализируемых госпитальных изолятов в значительно большем проценте, чем *exoU<sup>+</sup>* генотип, что соответствует известным опубликованным данным [22]. Так, в группе изолятов, полученных из ОРИТ, *exoS<sup>+</sup>* генотип был детектирован в 86,2%, а в группе не ОРИТ – в 79,5%. Частота выделения *exoS<sup>+</sup>* генотипа из дыхательных путей составила 87,2%, из ран, мочи и крови – 42,9%. Результаты представлены в таблице 2.

### Характеристика функциональной активности ССТТ у клинических изолятов в условиях индукции *in vitro*

Известно, что ССТТ является индуцибельной и активируется в условиях макроорганизма после контакта с клетками хозяина, после воздействия факторов сыворотки крови, а также при изменении солевого баланса [23]. С целью изучения

**Таблица 2.** Результаты ССТТ генотипирования клинических изолятов *P. aeruginosa* при определении генов эффекторных белков методом ПЦР и результаты характеристики функциональной активности ССТТ при определении секреции ExoT белка методом иммуноблота

Группы	Ген/мишень, (n/%)				Группы	Секреция белка ExoT, (n/%)
	exoT	exoY	exoU	exoS		
Промывные воды бронхов (реанимация) (n=20)	18/90	18/90	3/15	17/85	Промывные воды бронхов (реанимация) (n=17)	11/64,7
БАЛЖ (нейрореанимация) (n=9)	9/100	9/100	1/11,1	8/88,9	БАЛЖ (нейрореанимация) (n=3)	2/66,7
Мокрота при пневмонии (n=4)	4/100	4/100	1/25	3/75	Мокрота при пневмонии (n=4)	3/75
Мокрота при муковисцидозе (n=6)	6/100	6/100	0/0	6/100	Мокрота при муковисцидозе (n=6)	0/0
Отделяемое ран (n=28)	28/100	28/100	7/25	20/71,4	Отделяемое ран (n=20)	14/70
Моча (n=4)	4/100	4/100	0/0	4/100	Моча (n=1)	0/0
Кровь (n=1)	1/100	1/100	1/100	0/0	Кровь (n=1)	1/100
Отделяемое глаза (n=1)	1/100	1/100	1/100	0/0	Отделяемое глаза (n=1)	1/100
Пунктат (n=2)	2/100	2/100	0/0	2/100	Пунктат (n=2)	не ставили
Всего (n=75)					Всего (n=55)	

активности ССТТ псевдомонад в условиях *in vitro* в наших экспериментах использовали модель индукции функциональной активности транспортной системы при снижении концентрации кальция в среде культивирования бактерий. Для этого к активно делящейся культуре псевдомонад добавляли хелатор кальция, EGTA, и тестировали присутствие секреторного белка ExoT в культуральной среде с помощью специфических антител методом иммуноблота.

При анализе транслокации белка ExoT изучаемыми изолятами *P. aeruginosa* было выявлено, что они характеризовались высокой гетерогенностью по продукции данного эффектора как по качественным (есть или нет продукция), так и по количественным (разный уровень продукции белка) характеристикам (рис. 1). Изучение функциональной активности ССТТ у полученных клинических изолятов *P. aeruginosa* в условиях индукции низкими концентрациями кальция показало, что не все изоляты в этих условиях секретируют эффекторный белок ExoT. При сравнении изолятов, полученных из разных клинических материалов, не было выявлено значимых различий в индукции эффекторной функции патогена. Процент изолятов, секретирующих токсин ExoT, составлял от 64,7% до 75% для разных групп. Среднее значение для всех проанализированных изолятов составило 60,4%. При этом не наблюдалось различий между *exoU*<sup>+</sup> и *exoS*<sup>+</sup> генотипами.

#### Характеристика цитотоксичности клинических изолятов *P. aeruginosa*

Для изучения цитотоксичности использовали общепринятую методику оценки активности токсинов *P. aeruginosa*,



**Рисунок 1.** Выявление секретируемого белка ExoT *P. aeruginosa* с сывороткой к данному эффектору. Названия изолятов *P. aeruginosa* указаны в верхней части рисунка. Красным цветом выделены названия изолятов, демонстрирующих сильную реакцию

эффекторов ССТТ [24]. Токсичность в отношении эукариотических клеток, связанная с секрецией ExoU или ExoS белков, в условиях *in vitro* проявляется очень быстро, в течение первых 3-4 часов, и выражается в нарушении целостности клеточной мембраны с последующей гибелью клеток путем некроза. Мы использовали в тестах на цитотоксичность клетки линии СНО и оценивали гибель клеток в тесте по количественному определению лактатдегидрогеназы в культуральной среде через 3 часа после внесения на клетки изолятов псевдомонад. Лактатдегидрогеназа – стабильный фермент, который присутствует в цитоплазме клетки, а при нарушении целостности цитоплазматической мембраны попадает во внешнюю среду.

Изучение уровня цитотоксичности анализируемых клинических изолятов псевдомонад показало, что они различаются по действию на жизнеспособность эукариотических клеток. На основании полученных данных все изоляты можно было разделить на 4 группы по проценту гибели клеток: токсичные – Т (от 90 до 70%), среднетоксичные – С (от 70 до 50%), и малотоксичные – М (от 50 до 20%). При подсчете процента токсичности за 100% считали надосадочную жидкость чистых клеток, полученный после полного лизиса 0,1% тритоном. Значения для интактных клеток выступали в качестве нулевого. Результаты представлены в таблице 3.

Всего в тесте на цитотоксичность было проанализировано 47 изолятов. Результаты показали, что среди 12 протестированных изолятов с *exoU*<sup>+</sup> генотипом только 1 изолят характеризовался отсутствием цитотоксичности. При этом 8 изолятов характеризовались высоким уровнем цитотоксичности, вызывая гибель более 70% клеток монослоя. Среди 31 изолята (без изолятов от больных муковисцидозом) с *exoS*<sup>+</sup> генотипом 10 (32,3%) были нетоксичными.

При сравнении цитотоксичности изолятов, полученных из разного клинического материала и различных отделений, можно провести следующие параллели: ОРИТ и не ОРИТ, дыхательные пути и раны. При этом значимых различий в цитотоксичности выявлено не было: ОРИТ – 68,4% и не ОРИТ – 76,9%; дыхательные пути – 72,4% и раны – 80%.

Таблица 3. Результаты анализа цитотоксичности госпитальных изолятов псевдомонад\*

Группы	exoU+			exoS+			Цитотоксичность, (n/%)
	T	C	M	T	C	M	
Промывные воды бронхов (реанимация) (n=10)	2	1	-	1	3	0	7/70
БАЛЖ (нейрореанимация) (n=9)	1	-	-	0	3	2	6/66,6
Мокрота при пневмонии (n=4)	1	-	-	1	0	1	3/75
Мокрота при муковисцидозе (n=6)	-	-	-	-	-	-	6/100
Отделяемое ран (n=10)	3	1	-	0	2	2	8/80
Моча (n=4)	-	-	-	1	1	0	2/50
Кровь (n=1)	1	-	-	-	-	-	1/100
Отделяемое глаза (n=1)	-	1	-	-	-	-	1/100
Пунктат (n=2)	-	-	-	1	-	1	2/100
Всего (n=47)							

\* Токсичные – Т (от 90 до 70%), среднетоксичные – С (от 70 до 50%), и малотоксичные – М (от 50 до 20%).

Отдельно следует отметить изоляты псевдомонад, полученные от больных муковисцидозом. Все 6 изолятов характеризовались *exoS*<sup>+</sup> генотипом. Изучение цитотоксичности этих изолятов показало, что 4 из них были токсичными, 1 – среднетоксичным и 1 – малотоксичным, т.е. эти изоляты характеризовались типичным токсичным фенотипом, связанным с наличием эффекторов ССТТ.

#### Генотипические профили клинических изолятов *P. aeruginosa* и антибиотикорезистентность

Для всех полученных госпитальных изолятов *P. aeruginosa* была проанализирована связь между конкретным генотипом и профилем антибиотикорезистентности.

Для изолятов, относящихся к наиболее токсичному генотипу *exoU*<sup>+</sup>, было показано, что для 2-х из 14 изолятов не было выявлено устойчивости к антибиотикам. Наибольшее количество изолятов (9) было устойчиво к гентамицину, 13 изолятов – к фторхинолонам. К карбапенемам устойчивость была выявлена у 3-х изолятов.

В процентном отношении полирезистентных изолятов было больше среди *exoU*<sup>+</sup> псевдомонад – 57%, в отличие от 43,3% для *exoS*<sup>+</sup> изолятов. Соотношение чувствительных изолятов в обеих группах было практически одинаковым: 14,3% – для *exoU*<sup>+</sup> и 15% – для *exoS*<sup>+</sup>-генотипа.

Устойчивых к гентамицину *exoU*<sup>+</sup> изолятов было больше, чем *exoS*<sup>+</sup>: 64,3% и 48,3% соответственно. Устойчивых к ципрофлоксацину *exoU*<sup>+</sup> изолятов также было больше: 50% против 36,6% у *exoS*<sup>+</sup>. Только к карбапенемам резистентность у *exoU*<sup>+</sup> изолятов была ниже: 21,4% и 45% у *exoS*<sup>+</sup>.

#### Обсуждение

Была проведена характеристика в отношении наличия системы секреции III типа у госпитальных изолятов *P. aeruginosa*, выделенных в стационарах Москвы в 2014-2015 гг. Выявление генов, кодирующих эффекторный белок ССТТ, с помощью ПЦР показало наличие этих генов у всех проанализированных изолятов. Практически все изоляты имели по 3 гена эффекторов ССТТ: *exoU*, *exoT*, *exoY* либо *exoS*, *exoT*, *exoY*, что является характерным для псевдомонад. Так, в работе Shulert с соавт.

было показано, что ССТТ присутствует практически у всех клинических изолятов, а также изолятов, полученных из объектов внешней среды [25]. В нашей работе было несколько исключений: у 2 изолятов отсутствовали одновременно *exoS* и *exoU* гены, у 2 изолятов отсутствовали *exoT* и *exoY* гены, у 1 изолята одновременно выявлялись гены *exoS* и *exoU*.

Наиболее вирулентный генотип *exoU*<sup>+</sup> был выявлен у 18,7% изолятов, а менее вирулентный *exoS*<sup>+</sup> – у 80%, что коррелирует с известными данными, опубликованными в литературе [8]. Garey с соавт. [16] показали, что 97,5% изолятов из крови содержали гены *exoS* или *exoU*, при этом *exoS*<sup>+</sup> изолятов было больше (70,5%), чем изолятов с *exoU*<sup>+</sup> генотипом (25,4%).

Именно с гетерогенностью системы секреции III типа *P. aeruginosa* связаны различия в тяжести заболевания, характере тканевых повреждений и клинической картине синегнойной инфекции. Вероятно, не всегда инфицирование псевдомонадами будет развиваться одинаково, а внутривидовые различия в вирулентности между штаммами или изолятами настолько выражены, что являются определяющими при прогрессии заболевания. Становится понятным, что родовая или видовая идентификация изолятов синегнойной палочки не достаточна для прогноза течения инфекции, решающее значение при выборе тактики лечения может иметь определение ССТТ генотипа. Известно, что секреция ExoU может служить маркером высоко вирулентных штаммов и, по всей видимости, связана с тяжелым клиническим прогнозом. Это необходимо учитывать при лечении пациентов, инфицированных *exoU*<sup>+</sup> вариантами *P. aeruginosa*, которые должны получать раннюю и интенсивную антибиотикотерапию.

В нашей работе изоляты с токсичным *exoU*<sup>+</sup>-генотипом выделялись из ран, мочи и крови в 2 раза чаще, чем из дыхательных путей: 26,5% против 12,8%. Эти данные подтверждают полученные ранее Jabalameli с соавт. о том, что *exoU*<sup>+</sup> генотип имеет большую тропность к мягким тканям [26]. Однако в работе Кузнецовой М.В. с соавт. на основании полученных данных не было выявлено достоверной связи между присутствием определенных эффекторов и материалом выделения штаммов псевдомонад [27].

Частота выделения *exoS*<sup>+</sup> генотипа в нашем исследовании была достоверно выше для дыхательных путей (87,2%), по сравнению с образцами ран, мочи и крови (42,9%). Эти данные коррелируют с преобладанием *exoS*<sup>+</sup> генотипа в ОРИТ, что является причиной внутрибольничных пневмоний, особенно в ОРИТ у пациентов с искусственной вентиляцией легких и другими инвазивными процедурами.

Изучение функциональной активности ССТТ у полученных клинических изолятов *P. aeruginosa* в условиях индукции низкими концентрациями кальция показало, что не все изоляты в этих условиях секретируют эффекторный белок. Так, из 53 проанализированных изолятов лишь 32 (60,4%) характеризовались наличием функционального аппарата ССТТ.

Исследование цитотоксичности госпитальных изолятов псевдомонад, которая связана с активностью ССТТ, показало, что больший процент тестированных изолятов проявляет токсичность (76,6%). Среди проверенных 11 изолятов с *exoU*<sup>+</sup> генотипом 8 обладали высокой цитотоксичностью, а 3 – средней токсичностью в отношении эукариотических клеток.

Различия при тестировании активности ССТТ для двух методов (иммуноблот и тест на цитотоксичность) можно объяснить наличием различных механизмов, которые регулируют работу секреторного аппарата в зависимости от индуцирующего сиг-

нала. В работе Dasgupta N. с соавт. [23] было показано, что экспрессия белков ССТТ контролируется двумя различными механизмами. Первый механизм опосредован регуляторным белком ExsC, который контролирует транскрипцию белков ССТТ в условиях низких концентраций кальция. Такая индукция связана с цитотоксичностью псевдомонад в отношении амёб, клеток насекомых и эритроцитов. Второй механизм функционирует независимо от белка ExsC и необходим для цитотоксичности в отношении отдельных типов клеток млекопитающих. Авторы предполагают, что ExsC-зависимый сигнальный путь обеспечивает выраженную цитотоксичность, однако ExsC-независимый путь может представлять собой адаптационный механизм, позволяющий псевдомонадам усиливать экспрессию ССТТ в ответ на контакт с определенными типами клеток млекопитающих.

Отдельно следует отметить изоляты псевдомонад, полученные от больных муковисцидозом. Хотя выборка была небольшой (6 изолятов из мокроты), однако можно заметить определенную тенденцию. Все 6 изолятов характеризовались *exoS*<sup>+</sup> генотипом. При анализе активности ССТТ в условиях индукции снижением концентрации кальция, для всех изолятов было выявлено отсутствие транслокации эффекторного белка ExoT. При этом изучение цитотоксичности этих изолятов показало, что 4 из них были токсичными, 1 – среднетоксичным и 1 – малотоксичным, т.е. эти изоляты характеризовались типичным токсичным фенотипом, связанным с наличием эффекторов ССТТ. Такое расхождение между результатами двух использованных тестов *in vitro* можно объяснить наличием вышеописанных различных механизмов индукции ССТТ.

Изучение связи ССТТ-генотипов с устойчивостью к определенным группам антибиотиков показало большую распространенность устойчивости к гентамицину и ципрофлоксацину у *exoU*<sup>+</sup> генотипа. Кроме того, в процентном отношении полире-

зистентных изолятов было больше среди *exoU*<sup>+</sup> псевдомонад – 57%, в отличие от 43,3% для *exoS*<sup>+</sup> штаммов.

Полученные данные о распространенности генов ССТТ и их активности у госпитальных изолятов *P. aeruginosa* говорят в пользу ключевой роли системы секреции III типа в развитии инфекционного процесса. Как указывалось выше, два эффекторных белка ССТТ псевдомонад являются основными факторами патогенности возбудителя оппортунистических внутрибольничных инфекций, которые участвуют в инвазии, подавлении защиты хозяина и диссеминации патогена. Наличие ССТТ напрямую связывают с тяжелым течением инфекции и с неблагоприятным прогнозом заболевания. Совершенно очевидно, что ССТТ является принципиально значимой мишенью для подавления токсических эффектов и снижения тяжести заболевания. Секреторный аппарат синегнойной палочки функционирует вне зависимости от приобретенной патогеном устойчивости к антибактериальным препаратам, а значит, подавление ССТТ специфическими ингибиторами позволит существенно снизить вирулентность резистентных бактерий и ограничить распространение инфекции.

К настоящему времени уже получены данные, подтверждающие выдвинутую концепцию об эффективности антивирулентных препаратов. Низкомолекулярный ингибитор ССТТ псевдомонад, гидроксифинолин, снижал гибель животных после интраназального заражения летальной дозой *P. aeruginosa*. Кроме того, у мышей, получавших препарат, наблюдали уменьшение патологических изменений в легких и примерно в 30 раз снижение количества бактерий в этих тканях. Учитывая низкую эффективность антибиотикотерапии внутрибольничных инфекций, вызываемых антибиотикорезистентными штаммами *P. aeruginosa*, разработка новых препаратов, действующих по отличному от антибиотиков механизму, является крайне актуальной задачей.

## Литература

- Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* 2007;3:351-68.
- Kurahashi K, Kajikawa O, Sawa T, Ohara M, Gropper MA, Frank DW, et al. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest* 1999;104:743-50.
- Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Høiby N, et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology* 2012;12:841-51.
- Zychlinsky A, Kenny B, Ménard R, Prévost MC, Holland IB, Sansonetti PJ. IpaB mediates macrophage apoptosis induced by *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 1994;11:619-27.
- Feltman H, Schult G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser AR. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol* 2001;147:2659-69.
- Roy-Burman A, Savel RH, Racine S, Swanson BL, Revadigar NS, Fujimoto J, et al. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis* 2001;183:1767-74.
- Diaz MH, Hauser AR. *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU is injected into phagocytosis cells during acute pneumonia. *Infect Immun* 2010;78:1447-56.
- Allewelt, Coleman FT, Grout M, Priebe GP, Pier G. Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect Immun* 2000;68:3998-4004.
- Schulert GS, Feltman H, Rabin SD, Martin CG, Battle SE, Hauser AR. Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia. *J Infect Dis* 2003;188:1695-706.
- Sawa T, Shimizu M, Moriyama K, Wiener-Kronish JP. Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. *Crit Care* 2014;18(6):668.
- Yahr TL, Wolfgang MC. Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol* 2006;62(3):631-40.
- Hauser AR. The Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by Injection. *Nat Rev Microbiol* 2009;7(9):654-65.
- Hauser AR, Cobb E, Bodi M, Mariscal D, Valles J, Engel JN, Rello J. Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Med* 2002;30:521-8.
- Torrens G, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Conejo MC, Zamorano L, Navarro F, et al. Activity of ceftazidime-avibactam against clinical and isogenic laboratory *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing combinations of most relevant  $\beta$ -lactam resistance mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60(10):6407-10.
- Mitov I, Strateva T, Markova B. Prevalence of virulence genes among Bulgarian nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Braxilian J Microbiol* 2010;41:588-95.
- Garey KW, Vo OP, Larocco MT, Tam VH. Prevalence of type III protein exoenzymes and antimicrobial susceptibility patterns from bloodstream isolates of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *J Chemother* 2008;20:714-20.
- Wong Beringer A, Wiener-Kronish JP, Lurch S, Flanagan J. Comparison of type III secretion system virulence among fluoroquinolone-susceptible and resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:330-6.
- Agnello M, Wong-Beringer A. Differentiation in guinolone resistance by virulence genotype in *Pseudomonas aeruginosa*. *Plos One* 2012;7:e42973.

19. Клиническая лабораторная аналитика. Том IV. Аналитические технологии в клинической лаборатории. Под ред. В.В. Меньшикова, М.: Агат-Мед, 2003: Т. 4, 816 с.
20. Ajayi T, Allmond LR, Sawa T, Wiener-Kronish JP. Single-nucleotide-polymorphism mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion toxins for development of a diagnostic multiplex PCR system. *J Clin Microbiol* 2003;41(8):3526-31.
21. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
22. Sawa T. The molecular mechanism of acute lung injury caused by *Pseudomonas aeruginosa*: from bacterial pathogenesis to host response. *J Intensive Care* 2014;2(1):10.
23. Dasgupta N, Ashare A, Hunninghake GW, Yahr TL. Transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by low Ca<sup>2+</sup> and host cell contact proceeds through two distinct signaling pathways. *Infect Immun* 2006;74(6):3334-41.
24. Lee VT, Smith RS, Tümmler B. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the type III secretion system in vitro and during infection. *Infect Immun* 2005;73(3):1695-705.
25. Schulert GS, Feltman H, Rabin SD, Martin CG, Battle SE, Hauser AR. Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia. *J Infect Dis* 2003;188:1695-706.
26. Jabalamei F, Mirsalehian A, Khoramian B, et al. Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Burns* 2012;38:1192-7.
27. Кузнецова МВ, Максимова АВ, Карпунина ТИ, Демаков ВА. Распространенность эффекторов цитотоксичности у нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. *ЖМЭИ* 2014;6:9-14.

## References

1. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* 2007;3:351-68.
2. Kurahashi K, Kajikawa O, Sawa T, Ohara M, Gropper MA, Frank DW, et al. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest* 1999;104:743-50.
3. Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Hoiby N, et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology* 2012;12:841-51.
4. Zychlinsky A, Kenny B, Ménard R, Prévost MC, Holland IB, Sansonetti PJ. IpaB mediates macrophage apoptosis induced by *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 1994;11:619-27.
5. Feltman H, Schulert G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser AR. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol* 2001;147:2659-69.
6. Roy-Burman A, Savel RH, Racine S, Swanson BL, Revadigar NS, Fujimoto J, et al. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis* 2001;183:1767-74.
7. Diaz MH, Hauser AR. *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU is injected into phagocytosis cells during acute pneumonia. *Infect Immun* 2010;78:1447-56.
8. Allewelt, Coleman FT, Grout M, Priebe GP, Pier G. Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect Immun* 2000;68:3998-4004.
9. Schulert GS, Feltman H, Rabin SD, Martin CG, Battle SE, Hauser AR. Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia. *J Infect Dis* 2003;188:1695-706.
10. Sawa T, Shimizu M, Moriyama K, Wiener-Kronish JP. Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. *Crit Care* 2014;18(6):668.
11. Yahr TL, Wolfgang MC. Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol* 2006;62(3):631-40.
12. Hauser AR. The Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by Injection. *Nat Rev Microbiol* 2009;7(9):654-65.
13. Hauser AR, Cobb E, Bodi M, Mariscal D, Valles J, Engel JN, Rello J. Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Med* 2002;30:521-8.
14. Torrens G, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Conejo MC, Zamorano L, Navarro F, et al. Activity of ceftazidime-avibactam against clinical and isogenic laboratory *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing combinations of most relevant  $\beta$ -lactam resistance mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60(10):6407-10.
15. Mitov I, Strateva T, Markova B. Prevalence of virulence genes among Bulgarian nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Brazilian J Microbiol* 2010;41:588-95.
16. Garey KW, Vo OP, Larocco MT, Tam VH. Prevalence of type III protein exoenzymes and antimicrobial susceptibility patterns from bloodstream isolates of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *J Chemother* 2008;20:714-20.
17. Wong Beringer A, Wiener-Kronish JP, Lurch S, Flanagan J. Comparison of type III secretion system virulence among fluoroguinolone-susceptible and resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:330-6.
18. Agnello M, Wong-Beringer A. Differentiation in quinolone resistance by virulence genotype in *Pseudomonas aeruginosa*. *Plos One* 2012;7:e42973.
19. Menshikov VV (Ed.), 2003. Clinical laboratory analytics. Volume IV. Analytical technologies in the clinical laboratory. Moscow: Agat-Med.
20. Ajayi T, Allmond LR, Sawa T, Wiener-Kronish JP. Single-nucleotide-polymorphism mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion toxins for development of a diagnostic multiplex PCR system. *J Clin Microbiol* 2003;41(8):3526-31.
21. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
22. Sawa T. The molecular mechanism of acute lung injury caused by *Pseudomonas aeruginosa*: from bacterial pathogenesis to host response. *J Intensive Care* 2014;2(1):10.
23. Dasgupta N, Ashare A, Hunninghake GW, Yahr TL. Transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by low Ca<sup>2+</sup> and host cell contact proceeds through two distinct signaling pathways. *Infect Immun* 2006;74(6):3334-41.
24. Lee VT, Smith RS, Tümmler B. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the type III secretion system in vitro and during infection. *Infect Immun* 2005;73(3):1695-705.
25. Schulert GS, Feltman H, Rabin SD, Martin CG, Battle SE, Hauser AR. Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia. *J Infect Dis* 2003;188:1695-706.
26. Jabalamei F, Mirsalehian A, Khoramian B, et al. Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Burns* 2012;38:1192-7.
27. Kuznetsova MV, Maksimova AV, Karpunina TI, Demakov VA. Prevalence of cytotoxicity effectors in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Microbiol Epidemiol Immunobiol* 2014;6:9-14.