

Генотипический анализ нозокомиальных штаммов *Acinetobacter baumannii*

А.П. Соломенный¹, Н.А. Зубарева², А.Е. Гончаров³

¹ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, Пермь, Россия

²ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, Пермь, Россия

³ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

В статье обсуждается проблема генотипического разнообразия бактерий *Acinetobacter baumannii*, выделенных от пациентов с различными инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП). Показано, что доминирующие в исследуемом регионе карбапенемоустойчивые штаммы возбудителя относятся к эпидемической клональной линии II и несут в своем геноме интегроны 1-го класса. Доля интегрон-позитивных изолятов при

ИСМП может быть весьма информативным показателем, характеризующим госпитальную популяцию *A. baumannii*. Установлено, что гены (генные кассеты) в составе интегров определяют резистентность к аминогликозидам, но не карбапенемам.

Ключевые слова: инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, *Acinetobacter baumannii*, резистентность, интегрон, карбапенемы, аминогликозиды.

Genotyping Analysis of Nosocomial *Acinetobacter baumannii* Strains

A.P. Solomenniy¹, N.A. Zubareva², A.E. Goncharov³

¹ Institute of Microorganisms Ecology and Genetics, Perm, Russia

² Perm State Medical University named after E.A. Vagner, Perm, Russia

³ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

The problem of genotypic variety of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients with *healthcare associated infections* (HCAIs) are discussed. Carbapenem-resistant strains, which are predominant in the study region, were shown to belong to the epidemic clonal line II and carry 1st class integron in their genome. Fraction of integron-positive isolates in HCAIs may be an indicator of

nosocomial population of *A. baumannii*. The genes (gene cassettes) of integrons determine resistance to aminoglycosides, but not carbapenems.

Key words: healthcare associated infections, *Acinetobacter baumannii*, resistance, integron, carbapenems, aminoglycosides.

Контактный адрес:

Александр Петрович Соломенный

Эл. почта: solomen@iegm.ru

Вхождение *Acinetobacter baumannii* в верхнюю часть списка возбудителей *инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи* (ИСМП), во многом объясняется формированием и географическим распространением генетически четко дифференцируемых эпидемических типов — клональных линий. Было показано, что эпидемические штаммы отличаются друг от друга характерным набором мобилизуемых элементов генома [1]. В России и за рубежом описан лекарственно-устойчивый (но карбапенемочувствительный) эпидемический штамм *A. baumannii* с интегроном 1-го класса, где ассоциированные генные кассеты определяют высокий уровень резистентности к аминогликозидам [2]. Известно, что карбапенемостойчивость также может определяться наличием в геноме интегров [3].

В 2004 г. в медицинских учреждениях г. Перми нами были обнаружены экстремально резистентные штаммы *Acinetobacter baumannii* (в том числе устойчивые к карбапенемам). При последующем мониторинговом исследовании, проведенном в 2010–2012 гг., выявлено превалирование интегрон-позитивных штаммов. Доминировавший в регионе исследования штамм *A. baumannii* 60perm был изучен молекулярно-генетическими методами, наличие интегрона подтверждено данными полногеномного секвенирования (GenBank асс. по AUZL000000001.1.) [4].

С точки зрения практического инфекционного контроля и сдерживания распространения антибиотикорезистентности представляет интерес оценка возможности укоренения и длительной циркуляции в стационарах географического региона отдельных эпидемических генотипов ацинетобактеров. В связи с этим мы посчитали необходимым провести в 2014 году очередное мониторинговое исследование распространенности интегрон-позитивных штаммов *A. baumannii*, сопоставить полученные результаты с данными предыдущих исследований и сравнить выделенные интегрон-позитивные культуры со штаммами известных международных эпидемических клональных линий, используя методы молекулярно-генетического типирования.

Материал и методы

С целью идентификации интегров 1-го класса были изучены 42 последовательные, неповторяющиеся, лекарственно-устойчивые изоляты *A. baumannii*, которые были выделены из крови, раневого отделяемого и бронхоальвеолярного лаважа пациентов, лечившихся в отделениях реанимации четырех многопрофильных стационаров г. Перми в январе-мае 2014 года.

Хемотаксономическая идентификация проведена с использованием общепринятых тестов, а также теста на способность поддерживать рост при температуре 44 °С [5]. Лекарственная устойчивость определялась диско-диффузионным методом на агаре Мюллера–Хинтона с использованием дисков Becton Dickinson (США) в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.1890-04 [6].

Бактериальную ДНК получали методом «горячего лизиса» клеточной суспензии при 95 °С с последующей очисткой высокоскоростным центрифугированием. При генетическом типировании использовали метод многолокусного анализа вариабельных тандемных повторов, известный как MLVA-типирование. MLVA-анализ по восьми хромосомным локусам выполнен в соответствии с методикой, разработанной С. Pourcel и соавт. [7], причем локусы *Abaum_0826*, *Abaum_3002*, *Abaum_3406*, *Abaum_3468* и *Abaum_3530* были выбраны вследствие наличия высококонсервативных генов синтеза клеточной стенки. Гармонизация данных и кластерный анализ (Dice, UPGMA) были выполнены с построением дендрограммы при помощи программного обеспечения, размещенного по URL-адресу http://insilico.ehu.es/dice_upgma. Данные MLVA-типирования штамма *A. baumannii* 60perm были использованы для сопоставления.

Реакции амплификации (ПЦР) для определения интегрон-ассоциированных генов выполнялись согласно опубликованной ранее схеме [8]. Генные кассеты микробной устойчивости были амплифицированы с помощью праймеров и в условиях, описанных Р.А. White и соавт. [9], с авторскими модификациями. Реагенты для проведения ПЦР получены от компании «СибЭнзим» (Россия).

Определение нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК (на прямой и обратной цепях) проведено с помощью автоматического генетического анализатора Genetic analyzer 3500XL (Applied Biosystems) с использованием реагентов и в условиях, рекомендованных производителем.

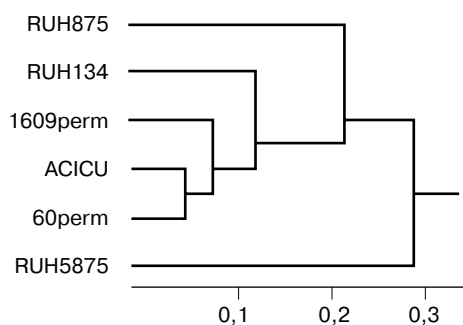
Результаты и обсуждение

Среди 42 выделенных изолятов *A. baumannii* 40 (95,2%) были резистентны к карбапенемам.

Единственный интегрон-позитивный штамм *A. baumannii* 1609, устойчивый к карбапенемам, был выделен 17.01.2014 г. из раневого отделяемого пациента с тяжелой сочетанной травмой, осложненной развитием двусторонней пневмонии, инфекцией области хирургического вмешательства и тяжелого сепсиса.

Анализ филогенетического дерева, построенного на основе MLVA-типирования, позволил

отнести штамм 1609perm к эпидемической клональной линии II с его кластеризацией в единой группе с карбапенеморезистентными штаммами 60perm и ACICU, который был выделен в 2005 году в ОРИТ госпиталя «Сан Джованни-Аддолората» (Рим, Италия, www.hsangiovanni.roma.it/home.aspx) (см. рисунок).



Дендрогрaмма генетического сходства изученных штаммов *A. baumannii*, выполненная по методу UPGMA. Штаммы RUN875, RUN134 и RUN5875 являются корневыми для I, II и III эпидемических типов соответственно.

У штамма *A. baumannii* ACICU устойчивость к карбапенемам определяется двумя копиями гена *bla*_{OXA}-58 на трансмиссивной плазмиде. Устойчивость к карбапенемам штамма *A. baumannii* 60perm лишь в малой степени может быть обусловлена присутствием гена, кодирующего бета-лактамазу расширенного спектра *bla*_{OXA}-66. Однако карбапенеморезистентный фенотип штаммов 60perm и 1609perm, скорее всего, определяется множественными факторами, в том числе связанными с проницаемостью клеточной стенки, а также молекулярными механизмами, обеспечивающими эффлюкс. В геноме штаммов ACICU и 60perm в составе «островов резистентности» с интегронами 1-го класса присутствуют гены, кодирующие аминокликозид-N-ацетилтрансферазы: *aac*-6'-Ib у ACICU и *aac*(6')-II и *aac*(3)-I у 60perm. У штамма 1609perm в составе интегрона 1-го класса выявляются: генная кассета *aac*(3)-I и две открытые рамки считывания *orfX* и *orfY* в сопровождении кассеты *aadA1a*, детерминирующей фенотип устойчивости лишь к стрептомицину и спектиномицину.

Доля интегрон-позитивных изолятов среди всех *A. baumannii*, выделенных в 2010–2012 гг., была достаточно высокой и составила 74,2%. По-видимому, это можно объяснить доминированием в указанный период определенного генотипа. Однако в 2014 году нами обнаружен единственный интегрон-позитивный изолят, что составило лишь 2,4% (95% ДИ=0,6–12,4) всей исследованной популяции.

Карбапенеморезистентные грамотрицательные бактерии являются в настоящее время наиболее проблемными возбудителями ИСМП с высоким уровнем летальности. Увеличение назначения карбапенемов и расширение применения их генериков достоверно коррелируют с ростом устойчивости к ним *A. baumannii* [10].

На наш взгляд, важно, что устойчивость к карбапенемам в локальной популяции *A. baumannii* сегодня не определяется наличием интегрона(ов) и других мобилизуемых структур. Вместе с тем, именно интегрон-позитивные штаммы особенно опасны в качестве возбудителей инфекции. В первую очередь, они способны акцептировать новые генные кассеты с образованием структур множественной лекарственной устойчивости. Кроме того, *aac*(3)-I-включающие интегроны находятся у *A. baumannii* на геномном острове *AbaR5* [11]. Подобные участки генома с определенной видовой специфичностью известны и среди *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* (данные полногеномного секвенирования согласно GenBank). Вставка в интегроны детерминант устойчивости к карбапенемам лишь ускорит мобилизацию и распространение таких генов.

Работа выполнена при поддержке Программы Президиума УрО РАН «Молекулярная и клеточная биология» (проект № 12-П-4-1046). Авторы выражают благодарность Н.С. Авдеевой, М.И. Еремеевой, М.Н. Муц, И.П. Новоселовой и С.В. Проворовой за выполнение бактериологических исследований, а также сотрудникам лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ИЭГМ УрО РАН за автоматическое секвенирование фрагментов ДНК.

Литература

1. Turton J.F., Baddal B., Perry C. Use of accessory genome for characterization and typing of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2011; 49(4):1260-66.

2. Соломенный А.П., Максимов А.Ю., Саралов А.И., Яфаев Р.Х., Гончаров А.Е., Кериопан Е.А., Мултых И.Г. Появление интегрон-позитивного полирезистентного штамма *Acinetobacter baumannii* в российских стаци-

- онарах. Журн микробиол эпидемиол иммунобиол 2008; 4:89-91.
3. Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Шевченко О.В. и соавт. Распространенность и молекулярная эпидемиология грамотрицательных бактерий, продуцирующих металло- β -лактамазы (МБЛ), в России, Беларуси и Казахстане. Клин микробиол антимикроб химиотер 2012; 14(2):132-52.
 4. Гончаров А.Е., Еремеева М.И., Зубарева Н.А., Соломенный А.П. Генотипический анализ карбапенем-устойчивого штамма *Acinetobacter baumannii*. Пермский медицинский журнал 2011; 6:95-9.
 5. Townner K. The genus *Acinetobacter*. Prokariotes 2006; 6:746-58.
 6. Методические указания МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». 2004.
 7. Pourcel C., Minandri F., Hauck Y., et al. Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Acinetobacter baumannii* and interlaboratory validation of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. J Clin Microbiol 2011; 49(2):539-48.
 8. Соломенный А.П., Зубарева Н.А., Гончаров А.Е., Сатосова Н.В., Крылов К.М. Мультиплексная ПЦР-диагностика интегронов резистентности возбудителей нозокомиальной инфекции. Инфекции в хирургии 2011; 3:26-27.
 9. White P.A., McIver C.J., Deng Y.M., Rawlinson W.D. Characterisation of two new gene cassettes, *aadA5* and *dfrA17*. S Microbiol Lett 2000; 182(2):265-69.
 10. Ортенберг Э.А., Шафеева Ю.Э., Кирушок Г.И., Хохлявин Р.Л., Шень Н.П. Карбапенемы в многопрофильном стационаре: некоторые клинические и экономические аспекты. Клин микробиол антимикроб химиотер 2014; 16(1):33-8.
 11. Post V., Hall R.M. AbaR, a large multiple-antibiotic resistance region found in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(6):2667-71.