

УДК 579.8(476)

DOI: 10.14427/jipai.2018.2.59

Генетическое разнообразие штаммов *Acinetobacter baumannii*, продуцирующих карбапенемазы, в Беларуси: роль «международных клонов высокого риска» в распространении устойчивости к карбапенемам

Е.А. Шек¹, Д.В. Тапальский², Е.Ю. Склеенова¹, М.В. Сухорукова¹, И.А. Карпов³,
М.В. Эйдельштейн¹

¹ НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет», г. Смоленск, Российская Федерация

² УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Республика Беларусь

³ УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

Genetic diversity of *Acinetobacter baumannii* strains producing carbapenemases in Belarus: the role of "international high-risk clones" in the spread of resistance to carbapenems

E.A. Shek¹, D.V. Tapalski², E.Yu. Skleenova¹, M.V. Sukhorukova¹, I.A. Karpov³, M.V. Edelstein¹

¹ Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia

² El «Gomel State Medical University», Gomel, Belarus

³ El «Belorussian State Medical University», Minsk, Belarus

Аннотация

В различных регионах мира отмечено быстрое распространение карбапенемазопродуцирующих штаммов *A.baumannii* с экстремальной антибиотикорезистентностью. Цель исследования – оценить наличие приобретенных карбапенемаз различных типов среди карбапенеморезистентных клинических изолятов *A.baumannii*, выделенных в Беларуси, а также их генетическое разнообразие и принадлежность к «международным клоном высокого риска».

В исследование включен 91 клинический изолят *A.baumannii* с устойчивостью к карбапенемам. Детекция генов приобретенных карбапенемаз выполнена методом ПЦР в режиме реального времени. Оценка генетического разнообразия штаммов проведена методом SNP-типирования, основанном на анализе однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в десяти хромосомных локусах.

У 4,4% штаммов *A.baumannii* выявлено наличие генов группы *bla*_{OXA-23}, у 93,4% – группы *bla*_{OXA-40}, у 2,2% – одновременное присутствие генов обеих групп: *bla*_{OXA-23} и *bla*_{OXA-40}. По результатам SNP-типирования изоляты *A.baumannii* были отнесены к 13 различным генотипам, входящим в 5 клональных комплексов. К международному клональному комплексу CC92^{OXF}/CC2^{PAS} отнесено 42,9% изолятов, к CC109^{OXF}/CC1^{PAS} – 25,3% изолятов. Показано вертикаль-

Summary

The rapid spread of extensively drug-resistant carbapenemase-producing *A. baumannii* strains has been noted in various regions of the world. The objective of the study is to assess the presence of various acquired carbapenemases among carbapenem-resistant *A.baumannii* clinical isolates collected in Belarus as well as the genetic diversity of the isolates and their attribution to the international "high-risk clones".

Ninety-one carbapenem-resistant *A.baumannii* clinical isolates were included in the study. Genes of acquired carbapenemases were detected by real-time PCR. Genetic diversity of isolates was assessed by SNP-typing, based on the analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in ten chromosomal loci.

*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-40-like} and a combination of *bla*_{OXA-23-like} and *bla*_{OXA-40-like} genes were detected in 4.4%, 93.4%, and 2.2% of the isolates, respectively. Using the SNP-typing, the *A.baumannii* isolates were assigned to 13 different genotypes belonging to 5 clonal complexes. 42.9% of the isolates were referred to international clonal complex CC92^{OXF}/CC2^{PAS} and 25.3% – to CC109^{OXF}/CC1^{PAS}. The vertical distribution of OXA-carbapenemase genes as part of "international high-risk clones" is shown, as well as the possibility of horizontal gene exchange between the representatives from various clonal groups.

ное распространение генов ОХА-карбапенемаз в составе «международных клонов высокого риска», а также возможность горизонтального обмена между представителями различных клональных групп.

Ключевые слова

Acinetobacter baumannii, антибиотикорезистентность, карбапенемазы, популяционная структура

Acinetobacter baumannii – условно-патогенный грамотрицательный неферментирующий микроорганизм, являющийся важнейшим возбудителем оппортунистических инфекций во всем мире [1]. В опубликованном в 2017 г. Всемирной организацией здравоохранения «Глобальном приоритетном списке антибиотикорезистентных бактерий для научных исследований и разработки новых антибиотиков» *A. baumannii* включен в группу «критический уровень приоритета», занимая в ней самую верхнюю строку. В качестве критериев приоритетности для включения в данный список послужили летальность, нагрузка на систему здравоохранения, распространенность антибиотикорезистентности и ее 10-летняя динамика, а также имеющиеся возможности для антибиотикотерапии [2]. С начала 2000-х годов во многих странах отмечается увеличение частоты возникновения ацинетобактерных инфекций, сопровождающееся быстрым распространением устойчивости возбудителей к антимикробным препаратам [3].

Среди возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), выделенных в рамках многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» в 2013-2014 гг. в Российской Федерации, на долю *A. baumannii* приходилось 13,7%, при этом фенотипом множественной антибиотикорезистентности (MDR) обладали 98,0% изолятов, а фенотипом экстремальной антибиотикорезистентности (XDR) – 64,4% изолятов [4]. По данным Ю.Л. Горбича и соавт. в стационарах г. Минска в структуре *A. baumannii*-ассоциированных инфекций преобладали инфекции кровотока (40,4% от всех ацинетобактерных инфекций), инфекции дыхательных путей и плевры (36,2%) и инфекции кожи и мягких тканей (12,7%), более 50% клинических изолятов были устойчивы к карбапенемам [5, 6].

Одним из наиболее важных механизмов резистентности *A. baumannii* к карбапенемам является продукция приобретенных карбапенемаз молекулярного класса D, относящихся к группам

Keywords

Acinetobacter baumannii, antimicrobial resistance, carbapenemases, population structure

ОХА-23, ОХА-24/40 и ОХА-58. ОХА-карбапенемазы не ингибируются клавулановой кислотой, сульбактамом, тазобактамом, а также устойчивы к действию металлохелаторов [7]. В Беларуси в 2008-2009 гг. распространенность карбапенемаз группы ОХА-40 среди карбапенеморезистентных изолятов *A. baumannii* составляла 94,6%, другие типы карбапенемаз не выявлялись [6]. В различных регионах Российской Федерации отмечается быстрое распространение карбапенемазопродуцирующих штаммов *A. baumannii*, их доля на протяжении 9 лет возросла более чем в 20 раз: с 3% в 2006-2007 гг. до 64% в 2013-2014 гг. Продуцентами ОХА-40-подобных карбапенемаз являлись 39,7% изолятов, ОХА-23 – 23,8%, ОХА-58 – 0,6%. Выявлено 3 изолята (0,6%) *A. baumannii*, являющихся ко-продуцентами карбапенемаз ОХА-23 и ОХА-40 [4].

Накопление антибиотикорезистентности среди грамотрицательных неферментирующих бактерий, приводящее к формированию у них экстремальной антибиотикорезистентности, происходит двумя основными путями. Первый связан с распространением отдельных биологически успешных антибиотикорезистентных клонов с постепенным замещением ими антибиотикочувствительной части бактериальной популяции (так называемое вертикальное распространение антибиотикорезистентности). Второй путь подразумевает передачу детерминант антибиотикорезистентности в составе плазмид и транспозонов от антибиотикорезистентных штаммов антибиотикочувствительным (горизонтальное распространение). Несмотря на то, что оба пути взаимосвязаны, основную роль в наблюдаемом в последнее десятилетие увеличении частоты XDR среди грамотрицательных бактерий играет глобальное распространение отдельных клональных групп микроорганизмов, впервые обозначенных в 2011 г. Woodford et al. как «клоны высокого риска» («High-risk clone») [8].

Описание закономерностей распространения MDR и XDR в бактериальных популяциях стало возможным после создания унифицированных

генетических методов внутривидового типирования микроорганизмов, и главным образом метода мультилокусного секвенирования-типирования (MLST), позволяющего оценивать степень филогенетического родства между штаммами одного вида. Для *A.baumannii* разработаны две схемы MLST. Первая из них («Оксфордская схема») была представлена в 2005 г. Bartial et al. Вторая схема была разработана в Институте Пастера («Пастеровская схема») и представлена в 2010 г. Каждая из схем работает с 7 генами «домашнего хозяйства», при этом 3 гена являются общими для двух схем [9]. Определяемые в MLST сиквенс-типы (ST) объединены в группы родственных ST, обозначаемых как клональные комплексы (CC). Различные ST в пределах одного CC отличаются между собой по 1 из 7 или 2 из 7 типизируемых локусов. Отдельные клональные комплексы («клоны высокого риска») грамотрицательных бактерий, несущие в себе различные детерминанты антибиотикорезистентности, включая гены приобретенных карбапенемаз, в течение короткого времени распространились во многих странах мира [8].

У *A.baumannii* глобальное распространение антибиотикорезистентности связано с несколькими международными клональными группами. Самой крупной и наиболее широко распространенной из них является CC92^{Oxf}/CC2^{Pas}. Циркуляция штаммов данного клонального комплекса выявлена в 34 странах на 5 континентах, в том числе во многих европейских странах (Италии, Испании, Германии, Великобритании, Греции, Нидерландах, Дании, Чехии, Франции, Польше, Турции, Норвегии, Швеции, Португалии, Бельгии, Румынии). Среди штаммов CC92^{Oxf}/CC2^{Pas} были обнаружены различные карбапенемазы (VIM-1, OXA-23, OXA-40, OXA-58). Описаны

госпитальные вспышки, вызванные карбапенемаза-продуцирующими штаммами *A.baumannii* ST92^{Oxf} с устойчивостью к полимиксинам, а также панрезистентными штаммами [10].

Второй по распространенности клональной группой *A.baumannii* является CC109^{Oxf}/CC1^{Pas}. Штаммы CC109^{Oxf}/CC1^{Pas} обнаружены в 31 стране на 5 континентах, в том числе в 18 западноевропейских странах. Штаммы данного клонального комплекса также характеризуются множественной и экстремальной антибиотикорезистентностью, а также продукцией карбапенемаз VIM-4, OXA-23, OXA-58. Интересно, что среди штаммов CC109^{Oxf}/CC1^{Pas} отсутствовали продуценты карбапенемазы OXA-40 [10].

Цель исследования – оценить наличие приобретенных карбапенемаз различных типов среди карбапенеморезистентных клинических изолятов *A.baumannii*, выделенных в Беларуси, а также их генетическое разнообразие и принадлежность к «международным клоном высокого риска».

Материалы и методы

В исследование включены карбапенеморезистентные MDR и XDR клинические изоляты *A.baumannii*, выделенные в 2014-2015 гг. от госпитализированных пациентов в Гомеле (24 изолята), Могилеве (39 изолятов) и Минске (28 изолятов). Распределение исследованных изолятов в соответствии с источниками их выделения и локализацией инфекций представлено на рисунке 1.

Первичная видовая идентификация выполнена в локальных микробиологических лабораториях с использованием автоматических микробиологических анализаторов. Реидентификация проведена методом матрично-ассоциированной лазерной десорбции-ионизации - времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS)

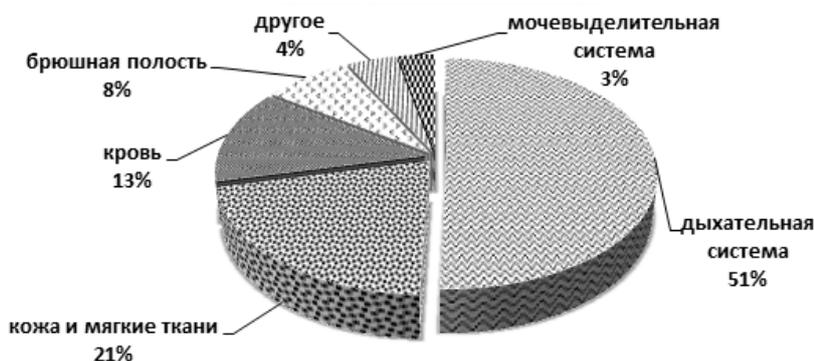


Рис. 1. Распределение включенных в исследование изолятов *A.baumannii* в зависимости от локализации инфекции

с использованием системы Microflex LT и программного обеспечения MALDI Biotyper Compass v.4.1.70 (Bruker Daltonics, Германия). До проведения исследований изоляты хранились при температуре -70°C в триптиказо-соевом бульоне с добавлением 30% глицерина.

Определение чувствительности к антибиотикам выполнено методом микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтон (Oxoid, Великобритания) в соответствии со стандартом ISO 20776-1:2006 [11]. Для всех включенных в исследование изолятов подтверждена устойчивость к карбапенемам в соответствии с интерпретационными критериями EUCAST (МПК меропенема и/или имипенема >8 мкг/мл) [12]. Детальный анализ уровней устойчивости к различным антибиотикам не входил в задачи настоящей работы, поскольку значительная преселекция штаммов на этапе их включения в исследование (преимущественный отбор для направления в референсную лабораторию и проведения молекулярно-генетических исследований штаммов с экстремальной антибиотикорезистентностью) могла бы существенным образом повлиять на полученные результаты.

Наличие генов приобретенных карбапенемаз класса D (групп ОХА-23, ОХА-24/40, ОХА-58 и ОХА-143), а также карбапенемаз класса В (металло- β -лактамаз (MBL) групп VIM, IMP и NDM) определяли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием коммерческих наборов «АмплиСенс MDR Acinetobacter-OXA-FL» и «АмплиСенс MDR MBL-FL» (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) и системы DTPPrime 5X1 (ДНК-Технология, Россия). Штаммы *A. baumannii*, *A. pittii* и *P. aeruginosa*, продуцирующие известные карбапенемазы перечисленных групп, были использованы в качестве положительных контролей.

Для оценки генетического разнообразия штаммов *A. baumannii* использовали метод SNP-типирования, основанный на анализе однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в десяти хромосомных локусах (*gltA*, *recA*, *cpn60*, *gyrB*, *gdhB*, *rpoD*, *fusA*, *pyrG*, *rplB* и *rpoB*), используемых в существующих схемах MLST *A. baumannii* [13, 14]. Метод обеспечивает возможность высокопроизводительного типирования изолятов и определения их принадлежности к известным сиквенс-типам (ST) и клональным комплексам (CC), включая «международные клоны высокого риска». Детекцию SNP в указанных локусах проводили с помощью аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени с универсальными

флуорогенными праймерами (AmpliFluor). Для подготовки и проведения ПЦР в формате 384-луночных планшетов использовали систему QIAgility (QIAGEN, Германия) и DTPPrime 5X1 (ДНК-Технология, Россия). Штаммы *A. baumannii* известных сиквенс-типов из коллекции НИИАХ были использованы в качестве контролей. Кластерный анализ SNP профилей осуществляли с помощью онлайн ресурса SNPTAb (<http://snptab.antibiotic.ru>) и программы PHYLOViZ 2 (<http://www.phyloviz.net>). Результаты типирования всех изолятов депонированы в онлайн базу данных SNPTAb [15].

Результаты и обсуждение

С использованием молекулярно-генетического метода показано присутствие генов ОХА-карбапенемаз у всех включенных в исследование штаммов. У 4 штаммов *A. baumannii* (4,4%) в ПЦР выявлено наличие генов группы *bla*_{OXA-23}, у 85 (93,4%) – генов группы *bla*_{OXA-40}. Еще у 2 штаммов (2,2%) обнаружено одновременное присутствие генов обеих перечисленных групп (рисунок 2).

По результатам SNP-типирования все карбапенемазопродуцирующие изоляты *A. baumannii*, выделенные в 2014-2015 гг. в Гомеле, Могилеве и Минске, были отнесены к 13 различным генотипам, входящим в 5 клональных комплексов (генетических кластеров, объединяющих штаммы родственных генотипов). Установлено преобладание штаммов трех групп, относящихся к международным клональным комплексам: CC92^{OXF}/CC2^{PAS} – 39 изолятов (42,9%), представленных 7 родственными генотипами, CC109^{OXF}/CC1^{PAS} – 23 изолята (25,3%), представленных 3 родственными генотипами, CC944^{OXF}/ST78^{PAS} – 24 изолята (26,4%), представленных 1 генотипом (рисунок 3).

Гены ОХА-23-подобных карбапенемаз были выявлены у изолятов, принадлежащих к 3 различным генотипам, в том числе и к входящим в международные клональные комплексы CC92^{OXF}/CC2^{PAS} и CC109^{OXF}/CC1^{PAS}. Гены ОХА-40-подобных карбапенемаз выявлены у изолятов, принадлежащих к 11 генотипам, в том числе к входящим в международные клональные комплексы CC92^{OXF}/CC2^{PAS} (38 изолятов), CC109^{OXF}/CC1^{PAS} (20 изолятов) и CC944^{OXF}/ST78^{PAS} (24 изолята). Два выделенных в Могилеве изолята, несущие одновременно гены карбапенемаз двух различных групп (ОХА-23 и ОХА-40), были отнесены к одному генотипу, принадлежащему к CC109^{OXF}/CC1^{PAS}. К этому же генотипу принадлежали также 8 изолятов *A. baumannii*, несущих только ген

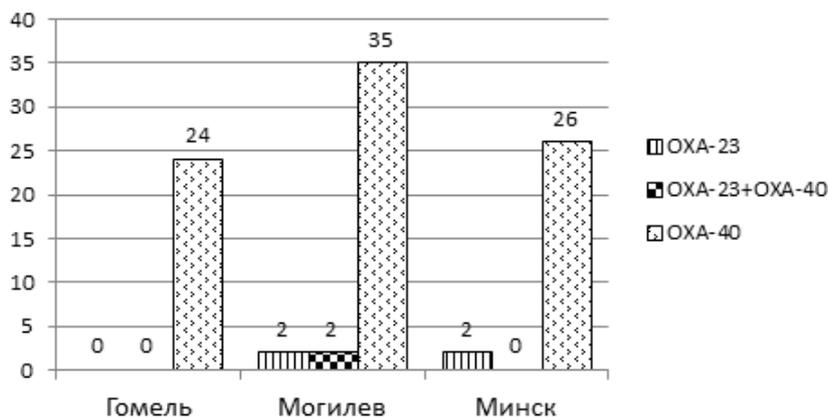


Рис. 2. Присутствие генов карбапенемаз у госпитальных изолятов *A. baumannii*, выделенных в 3 городах Беларуси, количество изолятов

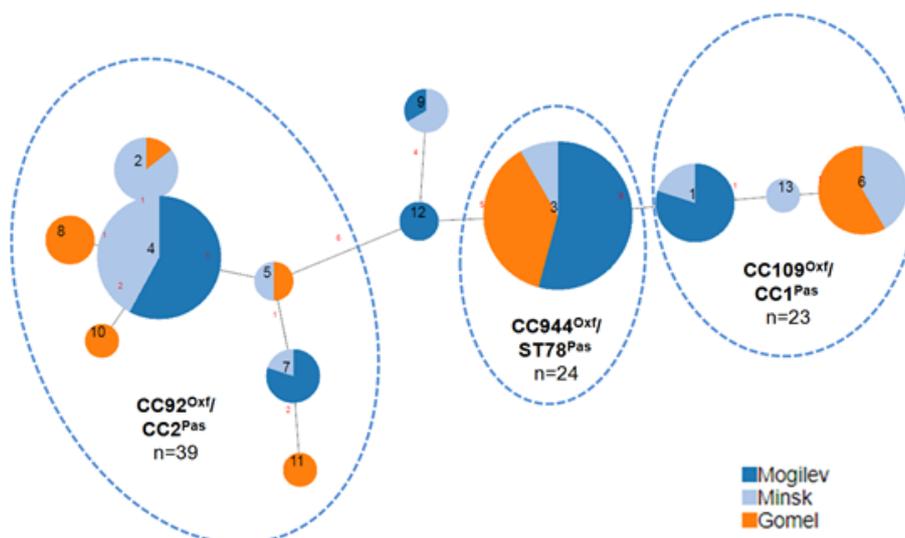


Рис. 3. Генетическое разнообразие карбапенемазопродуцирующих штаммов *A. baumannii* в Беларуси по данным SNP-типирования, кластерный анализ SNP-профилей (PHYLOViZ 2.0)

Примечание: Узлы соответствуют различным генотипам. Размеры узлов пропорциональны числу изолятов. Группы, относящиеся к доминирующим международным клональным комплексам, выделены пунктирными линиями.

карбапенемазы OXA-40 (6 изолятов, выделенных в Могилеве, и 2 изолята, выделенных в Минске), что косвенно свидетельствует о дополнительном приобретении *bla*_{OXA-23} отдельными штаммами этого генотипа.

Заключение

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что быстрый рост резистентности к карбапенемам и распространение карбапенемаз в бактериальной популяции *A. baumannii* связаны в первую очередь с распространением не-

скольких международных клонов, относящихся к «клонам высокого риска», характеризующихся выраженной антибиотикорезистентностью и способностью быстро приобретать дополнительные детерминанты резистентности. Также отмечается горизонтальное распространение генов карбапенемаз между отдельными представителями различных клональных групп. Подобная эпидемиологическая ситуация может быть описана как аллодемия – быстрое распространение резистентности из множества независимых генетических источников [16].

Литература

1. Чеботарь И.В., Лазарева А.В., Масалов Я.К. и др. *Acinetobacter*: микробиологические, патогенетические и резистентные свойства. Вестник Российской академии медицинских наук 2014; 9-10: 39-50.
2. Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* 2018; 18: 318-327. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
3. Manchanda V., Sanchaita S., Singh N.P. Multidrug resistant *Acinetobacter*. *J. Glob. Infect. Dis.* 2010; 2: 291-304. DOI: 10.4103/0974-777X.68538.
4. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Acinetobacter* spp. в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» 2013–2014. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия* 2017; 19(1): 42-48.
5. Горбич Ю.Л., Карпов И.А., Кречикова О.И., Левшина Н.Н. *Ацинетобактер-ассоциированные инфекции в Республике Беларусь*. *Медицинские новости* 2010; 3: 75-79.
6. Горбич Ю.Л., Карпов И.А., Мартинович А.А., Левшина Н.Н. Особенности резистентности *Acinetobacter baumannii* к карбапенемам в Республике Беларусь. *Здравоохранение* 2011; 5: 25-30.
7. Evans B.A., Amyes S.G. OXA beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014; 27: 241-263. DOI: 10.1128/CMR.00117-13.
8. Woodford N., Turton J.F., Livermore D.M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011; 35: 736-755. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x.
9. Tomaschek F., Higgins P.G., Stefanik D. et al. Head-to-head comparison of two multi-locus sequence typing (MLST) schemes for characterization of *Acinetobacter baumannii* outbreak and sporadic isolates. *PLoS One* 2016; 11(4): e0153014. DOI: 10.1371/journal.pone.0153014.
10. Karah N., Sundsfjord A., Towner K., Samuelsen O. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resist. Updat.* 2012; 15: 237-247. DOI: 10.1016/j.drug.2012.06.001.
11. ISO 20776-1:2006 Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. - Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases.
12. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, 2018. <http://www.eucast.org>.
13. Bartual S.G., Seifert H., Hippler C. et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 4382-4390. DOI: 10.1128/JCM.43.9.4382-4390.2005.
14. Diancourt L., Passet V., Nemeč A. et al. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One* 2010; 5(4): e10034. DOI: 10.1371/journal.pone.0010034.
15. Fedintsev A., Sheck E., Avramenko A. et al. Development of an online database and web application for analysis of SNP typing data of *Acinetobacter baumannii*. EP0313. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Amsterdam, 9-12 April 2016.
16. Baquero F., Coque T.M., Canton R. Allodemics. *Lancet Infect. Dis.* 2002; 2: 591-592. DOI: 10.1016/S1473-3099(02)00393-6.

Сведения об авторах:

Шек Е.А., научный сотрудник НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России
Тапальский Д.В., к.м.н., доцент, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии УО «Гомельский государственный медицинский университет»
Скленова Е.Ю., научный сотрудник НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России
Сухорукова М.В., к.м.н., старший научный сотрудник НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России
Карпов И.А., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой инфекционных болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет»
Эйдельштейн М.В., к.б.н., заведующий лабораторией антибиотикорезистентности НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России
Адрес для корреспонденции: УО «Гомельский государственный медицинский университет», ул. Ланге, 5, г. Гомель, 246050, Республика Беларусь
E-mail: tapalskiy@gsmu.by - Тапальский Дмитрий Викторович

Поступила 07.05.2018 г.