

## ОСОБЕННОСТИ РЕКОМБИНАЦИОННОЙ ГЕНОМИКИ БАКТЕРИЙ РОДА ACINETOBACTER — ПАТОГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов — филиал Пермского федерального исследовательского центра УРО РАН, Пермь; <sup>2</sup>Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А.Вагнера

*Цель.* Определение роли изменчивости генетических маркеров в формировании лекарственно-устойчивого фенотипа представителей рода *Acinetobacter*. *Материалы и методы.* Проведен сравнительный анализ изменчивости важного для генетической рекомбинации фрагмента ДНК у *A.baumannii* — одного из наиболее актуальных возбудителей послеоперационных инфекций, а также *A. pittii* и *A. lwoffii*. *Результаты.* Показано, что последовательность изученного участка хромосомы с геном интегразы/рекомбиназы XerC весьма изменчива, в частности, здесь могут быть представлены гены, ответственные за развитие резистентности к полимиксинам и (фтор)хинолонам, а также другим антибиотикам. *Заключение.* Полученные результаты важны для контроля за эпидемическими (пандемическими) штаммами ацинетобактера.

Журн. микробиол., 2018, № 3, С. 40—45

Ключевые слова: *Acinetobacter baumannii*, эпидемический (пандемический) клон, антибиотикорезистентность, эффлюкс-транспортеры, интегразы/рекомбиназа XerC

А.П.Solomennyi<sup>1</sup>, N.A.Zubareva<sup>2</sup>

## PECULIARITIES OF RECOMBINATIVE GENOMICS OF ACINETOBACTER — HUMAN PATHOGEN

<sup>1</sup>Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm; <sup>2</sup>Wagner State Medical University, Perm, Russia

*Aim.* The disclosure of the role of genetic markers variability among *Acinetobacter* genus in connection with multidrug-resistant phenotype realization. *Materials and methods.* A comparative analysis was reviewed on DNA fragments important for genetic recombination in *A. baumannii* — one of the most relevant pathogens of postoperative infection, as well as *A. pittii* and *A. lwoffii*. *Results.* Integrase/recombinase XerC gene-bearing region of the chromosome is notably different and could include the genes responsible for the development of resistance against polymyxins and (fluoro)quinolones, as well as other antibiotics. *Conclusion.* The results obtained are important in surveillance of epidemic (pandemic) strains of *Acinetobacter* spp.

Zh. Mikrobiol. (Moscov), 2018, No. 3, P. 40—45

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, epidemic (pandemic) clone, antibiotic resistance, multidrug efflux transporters, integrase/recombinase XerC

## ВВЕДЕНИЕ

*Acinetobacter baumannii* — оппортунистический патоген, один из наиболее важных возбудителей широкого спектра нозокомиальных, в том числе и послеоперационных, инфекций с уровнем летальности до 35%. Инфекционные вспышки в стационаре и учреждениях длительного ухода часто связаны с множественной лекарственной устойчивостью данного патогена. Результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон» демонстри-

руют неуклонное увеличение роли ацинетобактера в этиологии нозокомиальных инфекций в Российской Федерации и нарастании устойчивости изолятов к большинству антибактериальных препаратов, в том числе, к карбапенемам [2, 3]. Большинство инфекций вызываются двумя основными популяционными клонами *A. baumannii*, распространенными во всех регионах мира. При этом вирулентность и патогенный потенциал данного возбудителя окончательно не определены и являются предметом интенсивных исследований [5, 9]. Естественные места обитания и потенциальные резервуары *A. baumannii* как нозокомиального возбудителя также окончательно не установлены [15]. Способность к колонизации и хорошей адаптации во внешней среде, в том числе и за счет образования биопленок, делают необходимым соблюдение строгих мер инфекционного контроля в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), пациенты которых являются наиболее уязвимыми для инфекций [7, 10]. Предшествующая колонизация пациентов полирезистентными штаммами *A. baumannii* является фактором риска неблагоприятного исхода при последующих госпитализациях [13]. При этом совершенно не исключена возможность обмена генетическим материалом между штаммами в очаге инфекции. Расширение списка видов, геном которых полностью секвенирован, позволяет провести их сравнительный филогенетический анализ с целью понимания молекулярных механизмов адаптации ацинетобактера к роли патогена человека [8, 9].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования — доступные в базе данных GenBank геномы *A. baumannii*, *Acinetobacter pittii* и *Acinetobacter lwoffii* с различным уровнем устойчивости к антимикробным препаратам. Полногеномное пиросеквенирование штамма *A. baumannii* Perm [1] после приготовления библиотек фрагментов ДНК (shotgun) по стандартному протоколу (454/Roche) проведено на аппарате «GS Junior» в Центре коллективного пользования и высокопроизводительного секвенирования Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта (Москва). Геном был прочитан с 50-кратным покрытием, биоинформационное аннотирование выполнено на сервере RAST (GenBank AUZL000000000). Штамм *A. baumannii* 28 секвенирован на приборе «GS Junior» в рамках коллективного проекта (GenBank Acc. no. MAFT000000000). Глобальное выравнивание и геномный анализ нуклеотидных последовательностей выполнено с помощью алгоритм BLAST.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее установлено, что эффлюкс-транспортер SMR-типа QacE кодируется в геноме большинства лекарственно-устойчивых грамотрицательных бактерий, в том числе в аттенуированной форме в составе большинства интегрон-резистентности [14]. Поиск ассоциации генов, кодирующих иные системы выброса антимикробных агентов из бактериальной клетки, с генами интеграз/рекомбиназ выявил, что гены, кодирующие такие системы, расположены на хромосоме представителей рода *Acinetobacter* проксимально гену тирозиновой рекомбиназы *XerC*.

При сравнении последовательности, прилегающей к *xerC* установлены определенные закономерности (табл.). Так, выявлена высокая степень гомологии (не менее 97%) нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих эффлюкс-транспортер с обеспечением устойчивости к антимикробным пре-

## Геномы бактерий рода *Acinetobacter*, включенные в исследование

Вид, штамм, номер в GenBank	Описание	Последовательность на хромосоме (представлены наименования продуктов генов и их функция или особенность)	QRDR (Gly81Asp, Ser83Leu, Ala84Pro)
<i>A. baumannii</i> Perm (AUZL00000000)	MDR-штамм, панкреонекроз, гемокультура, ОРИТ, Пермь, РФ (2010 год)	XerC → флавопротеин транспорта электронов ETF, В и А субъединицы → ДНК гираза, субъединица А → ArnT → ArnC (ундекапренилфосфат-альфа-L-Ara4N трансфераза и Ara4N-гликозилтрансфераза в переносе Ara4N на липид А) → AdeABC-транспортная система (пермеаза) → мембранный белок MFP	G, L, A
<i>A. baumannii</i> 28 (MAFT00000000)	MDR-штамм, инфицированный ожог, раневое отделяемое, выделен Гончаровым А.Е., С.-Петербург, РФ (2002 год)	XerC → флавопротеин транспорта электронов ETF В и А → ДНК гираза, субъединица А → ArnT → ArnC → AdeABC-транспортная система (пермеаза) → мембранный белок MFP	G, L, A
<i>A. baumannii</i> XDR-BJ83 (NZ_CP018421)	XDR-штамм, цирроз печени, асцитическая жидкость, Китай (2007 год)	XerC → флавопротеин транспорта электронов ETF В и А → ДНК гираза, субъединица А → ArnT → ArnC → белок с неустановленной функцией → AdeABC-транспортная система (пермеаза) → мембранный белок MFP	G, L, A
<i>A. baumannii</i> ACICU (CP000863)	MDR-штамм, ликвор, ОРИТ, Рим, Италия (2005 год)	XerC → флавопротеин транспорта электронов ETF В и А → ДНК гираза, субъединица А → ArnT → ArnC → белок с неустановленной функцией → AdeABC-транспортная система (пермеаза) → мембранный белок MFP	G, L, A
<i>A. baumannii</i> SDF (CU468230)	Авирулентный штамм с природной чувствительностью к антимикробным препаратам, выделен от вши человека	Инсерционная последовательность ISAbab → транспортер L-лизина → XerC → флавопротеин транспорта электронов ETF В и А → ДНК гираза, субъединица А → ArnT → ISAbab → фрагментированная ArnC → AdeABC-транспортная система (пермеаза) → мембранный белок MFP → xxxx → ISAbab → xxxx → comA* → ISAbab	G, S, A
<i>A. pittii</i> AP_882 (CP014477)	NDM-1-позитивный штамм, раневое отделяемое, Малайзия (2014 год)	XerC → флавопротеин транспорта электронов ETF В и А → ДНК гираза, субъединица А → AdeABC-транспортная система (пермеаза) → мембранный белок MFP → xxxx → интегразы (множественные копии на хромосоме и плазмиде pNDM-AP882 с геном blaNDM-1)	G, S, A
<i>A. lwoffii</i> 51m (LZDF00000000)	Выделен Гончаровым А.Е. из пищеварительного тракта ископаемого (28610 лет до н.э.) мамонта, Якутия-Саха, РФ	XerC → белок с неустановленной функцией → регулятор транскрипции AsnC → эффлюкс-транспортер аминокислот → флавопротеин транспорта электронов ETF В и А → ДНК гираза, субъединица А → белок с неустановленной функцией → AdeABC- транспортная система (пермеаза) → мембранный белок MFP	G, S, A

Примечание. MDR и XDR — штаммы с множественной и экстремальной устойчивостью к доступным антибактериальным препаратам соответственно. Ara4N — сокращение от 4-амино-4-дезоксигалактозы. QRDR (quinolone resistance determining region) — последовательность гена *gyrA*, важная для резистентности к препаратам группы фторхинолонов. xxxx — пропущенная для компактности табл. последовательность. \*Продукт гена *comA*, участвует в обеспечении генетической компетентности.

паратам и токсичным ионам, а именно AdeABC (*Acinetobacter* drug efflux и ATPbinding cassette), а также мембранный белок MFP транспортной системы RND и компоненты системы MFS (дистальнее по хромосоме). У лекарственно-устойчивых штаммов *A. baumannii* присутствует сцепление генов *arnTCS*, кодирующих ферменты, вовлеченные в процесс переноса 4-амино-4-дезоксигалактозы на липид А, в то же время, у лекарственно-чувствительного

штамма SDF последовательность *argTC* фрагментирована вставкой IS-элемента, полученной, по-видимому, от другого вида бактерий. Интегразная последовательность обнаруживается здесь в геноме *A. pittii*. Аминокислотная замена Ser83Leu в транслированной последовательности QRDR-региона гена *rugA* отмечена только среди клинических штаммов *A. baumannii* с устойчивостью к фторхинолонам. Таким образом, присутствие и возможность модификации данного «горячего» участка хромосомы разных видов и штаммов может реализоваться в лекарственно-резистентном фенотипе.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Эффлюкс-транспортные системы представляют собой один из ключевых молекулярных механизмов множественной лекарственной устойчивости грамотрицательных бактерий. Транспортеры ABC способны активно экспортировать широкий спектр антимикробных агентов (таких как антибиотики, антисептики и многие цитотоксические химические вещества). Их присутствие в специфическом сайте хромосомы может быть связано не только с более высокой вероятностью генетической рекомбинации, но и с обеспечением определенной стабильности этих ассоциированных (сцепленных) генов в популяции [4].

С другой стороны, изменения биохимического процесса синтеза липида А способны привести к снижению аффинности липополисахарида клеточной стенки бактерий к полимиксинам, что важно для клинических изолятов [4]. Число сообщений об обнаружении колистин-резистентных штаммов среди бактерий, которые не обладают естественной устойчивостью (*A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и представители семейства *Enterobacteriaceae*) прогрессивно увеличивается, при этом установлен факт формирования группы панрезистентных возбудителей [11]. Устойчивость *A. baumannii* к колистину, например, в Греции достигла 21,1% [12]. В Российской Федерации ситуация в отношении полимиксин-резистентных возбудителей более благоприятна, в частности, штаммы *A. baumannii* Perm и 28 чувствительны к полимиксину В и колистину. Однако они являются устойчивыми к фторхинолонам в соответствии с критериями EUCAST (ципрофлоксацин МПК >2 мг/л, левофлоксацин МПК 2 мг/л).

В отличие от ацинетобактера у лекарственно-устойчивых энтеробактерий разных видов изменчивость последовательности, расположенной проксимально гену *hexC* практически не прослеживается, и с резистентным фенотипом здесь можно связать лишь наличие гена, кодирующего хлорамфеникол-чувствительный мембранный белок *RarD* молекулярного семейства EAM (данные не приведены). Однако и здесь *Hex*-связывающие сайты вовлечены в мобилизацию отдельных фрагментов ДНК посредством сайт-специфической рекомбинации [6].

Таким образом, в исследовании получено новое доказательство пластичности генома ацинетобактера, что, безусловно, способствует формированию лекарственно-устойчивой популяции. Полногеномное секвенирование должно стать неотъемлемой частью молекулярной диагностики данного возбудителя, т.к. иными методами получить представленную в работе информацию практически невозможно. Молекулярно-генетический подход позволяет, среди прочего, уточнить особенные свойства эпидемического генотипа.

*Авторы выражают благодарность Гончарову А.Е. (Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова, Санкт-Петербурге) и коллегам, принимавшим участие в секвенировании и биоинформационном анализе. Работа выполнена в*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гончаров А.Е., Еремеева М.И., Зубарева Н.А., Соломенный А.П. Генотипический анализ карбапенем-устойчивого штамма *Acinetobacter baumannii*. Перм. мед. журнал. 2011, 28 (6): 95-99.
2. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Иванчик Н.В., Тимохова А.В., Шек Е.А., Дехнич А.В., Козлов Р.С. и исследовательская группа «Марафон». Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Acinetobacter* spp. в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011—2012 гг. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2014, 16 (4): 266-272.
3. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Иванчик Н.В., Шек Е.А., Дехнич А.В., Козлов Р.С. и исследовательская группа «Марафон» Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Acinetobacter* spp. в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон» 2013—2014. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2017, 19 (1): 42-48.
4. Чеботарь И.В., Лазарева А.В., Масалов Я.К., Михайлович В.М., Маянский Н.А. *Acinetobacter*: микробиологические, патогенетические и резистентные свойства. Вестник РАМН. 2014, 9-10: 39-50.
5. Antunes L.C., Visca P., Towner K.J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. Pathog. Dis. 2014, 71: 292-301.
6. Castillo F., Benmohamed A., Szatmari G. Xer site specific recombination: double and single recombinase systems. Front. Microbiol. 2017, 8: Art. 453.
7. Dettori M., Piana A., Deriu M.G. et al. Outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit. New Microbiol. 2014, 37: 185-191.
8. Ellington M.J., Ekelund O., Aarestrup F.M. et al. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. Clin. Microbiol. Infect. 2017, 23: 2-22.
9. Harding C.M., Hennon S.W., Feldman M.F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. Nat. Rev. Microbiol. 2018. 16: 91-102.
10. Krzyściak P., Chmielarczyk A., Pobiega M. et al. *Acinetobacter baumannii* isolated from hospital-acquired infection: biofilm production and drug susceptibility. APMIS. 2017, 125: 1017-1026.
11. Olaitan A.O., Morand S., Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. Front. Microbiol. 2014, 5: Art. 643.
12. Oikonomou O., Sarrou S., Papagiannitsis C.C. et al. Rapid dissemination of colistin and carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in Central Greece: mechanisms of resistance, molecular identification and epidemiological data. BMC Infect. Dis. 2015, 15: Art. 559.
13. Segagni Lusignani L., Starzengruber P., Dosch V. et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: A 10-year analysis in a large tertiary care university hospital in central Europe with international admissions. Wien Klin. Wochenschr. 2017, 129: 816-822.
14. Shafaati M., Boroumand M., Nowroozi J. et al. Correlation between *qacE* and *qacEΔ1* efflux pump genes, antibiotic and disinfectant resistant among clinical isolates of *E. coli*. Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov. 2016, 11: 189-195.
15. Wilharm G., Skiebe E., Higgins P.G. et al. Relatedness of wildlife and livestock avian isolates of the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* to lineages spread in hospitals worldwide. Environ. Microbiol. 2017, 19: 4349-4364.

Поступила 05.02.18

Контактная информация: Соломенный Александр Петрович, к.б.н., 614081, Пермь, ул. Голева, 13, р.т. (342)280-83-32