

ОСОБЕННОСТИ РЕКОМБИНАЦИЙ И МУТАЦИЙ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НОЗОКОМИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ В МНОГОПРОФИЛЬНЫХ СТАЦИОНАРАХ*



А.П. Соломенный,
Институт экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН



Н.А. Зубарева,
Пермская государственная
медицинская академия
им. ак. Е.А. Вагнера

Обоснована необходимость углубленных исследований интегров – генетических элементов множественной лекарственной устойчивости возбудителей госпитальной инфекции (на примере многопрофильных стационаров г. Перми и Санкт-Петербурга). Показано, что у бактерии *Acinetobacter baumannii* преобладают клинические изоляты, несущие в геноме интегроны 1-го класса, доля которых составила 77 % от 72 проспективно выделенных культур. Пермский карбапенем-устойчивый штамм 60 эпидемического типа II выбран в качестве объекта для полногеномного секвенирования.

Разработаны методические подходы в виде дуплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) для генотипической «сортировки» интегрон-позитивных штаммов, а также ПЦР для одновременного определения интегров и гена металло-бета-лактамазы NDM, характеризующей бактерии с практически абсолютной лекарственной устойчивостью.

Ключевые слова: *госпитальные инфекции, стационары детской сети, стационары взрослой сети, возбудители, множественная лекарственная устойчивость, мобильные генетические элементы, интегроны, металло-бета-лактамаза NDM.*

Изучение адаптивного потенциала, выяснение роли отдельных процессов приспособляемости микроорганизмов является одной из важнейших фундаментальных проблем современной биологии. Возникает необходимость исследования молекулярной природы лекарственной устойчи-

вости возбудителей жизнеугрожающих госпитальных инфекций. При этом список валидных методов исследования нуждается в существенном расширении.

Госпитальные инфекции (ГИ) – важнейшая проблема здравоохранения во всем мире. В России и других странах

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант РФФИ-Урал № 10-04-96023 на 2010–2012 гг.).

частота возникновения случаев ГИ является одним из индикаторов качества оказания медицинской помощи. Когорта пациентов, подверженных ГИ, оценочно достигает 2,0–2,5 млн человек в год (1,5 % населения страны). Отмечены изменения в этиологической структуре ГИ, связанные с увеличением в многопрофильных стационарах удельного веса осложнений, вызванных поли- и суперрезистентными микроорганизмами. Результаты клинических исследований доказали, что в этих случаях назначение неадекватной антимикробной терапии приводит к достоверному повышению смертности пациентов в 1,5–3 раза, особенно в очагах эпидемических вспышек.

В отличие от эпидемической ситуации прошлых лет, против современных возбудителей инфекции из всего арсенала средств антимикробной химиотерапии лишь одна или две (в лучшем случае) формулы остаются активными. Молекулярно-генетический анализ показал наличие концентрации генов лекарственной устойчивости в определенных хромосомных и плазмидных локусах, где с высокой частотой происходят генетические рекомбинации. Интегрированные гены лекарственной устойчивости были выявлены среди большого списка бактериальных штаммов.

Энтеробактерии и неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОБ) являются одними из наиболее распространенных возбудителей ГИ в различных регионах мира [11]. Среди НГОБ наибольшее клиническое значение имеют синегнойная палочка и представители рода *Acinetobacter*, прежде всего, *Acinetobacter baumannii*. В течение последних десятилетий повсеместно наблюдается неуклонный рост устойчивости этих микроорганизмов к антибактериальным препаратам [7–9]. Применение антибиотиков при отсутствии качественного микробиологического мониторинга и адекватного инфекционного контроля представляется одним из факторов риска формирования лекарственной устойчивости, что наиболее отчетливо прослеживается для бета-лакта-

ных антибиотиков, которые широко используются при лечении инфекционно-воспалительных заболеваний в различных областях медицины, в том числе в хирургии и интенсивной терапии [4, 12]. Одной из негативных тенденций в плане этиологической структуры ГИ является появление поли- и панрезистентных микроорганизмов с отчетливой тенденцией как к увеличению частоты, так и расширению географических регионов, где выявляют данные возбудители [3].

Частота встречаемости *A. baumannii* среди других грамотрицательных возбудителей в различных регионах существенно отличается. В Российской Федерации данный возбудитель занимает третье место после *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*, а в ряде городов является ведущим грамотрицательным возбудителем [6]. Выявленные случаи инфекций, вызванных ОХА-23-продуцирующими и ОХА-23-продуцирующими штаммами *Acinetobacter* spp., в различных регионах России следует рассматривать как фактор прогнозирования резистентности к карбапенемам [5]. Растущая устойчивость обуславливает сложности с назначением адекватной эмпирической антибактериальной терапии у наиболее тяжелого контингента больных и влияет на уровень летальности. Учитывая различия в фенотипах резистентности в различных стационарах, выбор препарата при подозрении на ГИ должен осуществляться исключительно на основании локальных данных [2].

Экспериментальные исследования. В 2010–2012 гг. впервые в сравнительном аспекте исследовали разнообразие интегрон-специфичных фрагментов условных патогенов *Acinetobacter baumannii* и *Klebsiella oxytoca* в многопрофильных стационарах по оказанию высокотехнологичных видов медицинской помощи. Показано, что в структуре госпитальных возбудителей вида *A. baumannii* в крупных многопрофильных медицинских стационарах г. Перми преобладают лекарственно-устойчивые (в т.ч. карбапенем-ре-

зистентные) изоляты, несущие в геноме интегроны 1-го класса, в основном при отсутствии гена *sull*. Доля таких изолятов в совокупности составила 77 % (исследованы 72 проспективно выделенные культуры).

Проведено проспективное исследование и среди локальной популяции условного патогена *K. oxytoca*, известного как инфекционный агент в стационарах детской сети. Всего обследовано 36 позитивных пациентов (из них 20 – дети от 0 до 8 лет). Выявлена селекция возбудителя в направлении множественной лекарственной устойчивости в госпитальной среде, что подтверждается выделением чувствительных изолятов лишь от амбулаторных больных. Среди госпитальных штаммов клебсиелл впервые в регионе исследования выявлены продуценты бета-лактамаз расширенного спектра действия (БЛРС). Выяснилось, однако, что ни один из изолятов в отделении новорожденных не содержит интегрон-подобных генетических структур.

Напротив, у пациента отделения сердечно-сосудистой хирургии в апреле 2011 года выделен полирезистентный БЛРС-продуцент *K. oxytoca* с интегроном 1-го класса состава *int11-dfr17-aadA5-qacEdelta1-sull*. Тандемный набор генных каскад *dfr17-aadA5* на 99 % гомологичен (по нуклеотидной последовательности) с интегронами стафилококков *Staphylococcus hominis* и *S. epidermidis*. *In vitro* в отношении интегрон-позитивного штамма были активны только карбапенемы имипенем и меропенем, а также офлоксацин. Следует заметить, что ген или гены, кодирующие БЛРС, в исследуемом случае не рекомбинированы в интегрон и, соответственно, не могут быть мобилизованы им для горизонтального переноса.

Выяснено, что определенные каскады в интегронах (в т.ч. кодирующая устойчивость к триметоприму *dfr*) чаще обнаруживаются в первом положении переменного сегмента (в направлении от 5' к 3') и находятся под контролем слабого промотора, что в рамках общепринятой

концепции отражает их недавнюю эволюционную историю. Однако более сильные типы промотора априори необходимы для экспрессии тандемного набора (из двух и более) генных каскад. Нами выявлено, что в ряде интегронов, в том числе состава *AacA7-BlaVim2-DfrB5-AacA5* (где каскад *Vim-2* кодирует металло-бета-лактамазу/карбапенемазу типа Verona), происходят мутации *de novo* с образованием двух видов гибридного промотора, что выражается в росте МПК карбапенемов до 64 мкг/мл.

Представлено доказательство мутирования генной каскады *ges* (кодирует оксациллиназу широкого спектра с активностью в отношении карбапенемов) в составе комплексного интегрона 1-го класса в направлении повышения активности от варианта GES-12 (в России) к варианту GES-14 (в Европе). Фенотипически это находит выражение в виде роста МПК имипенема от 8 мкг/мл до 32 мкг/мл (рис. 1). Распространение подобного интегрона горизонтальным генетическим переносом может привести к резкому росту лекарственной устойчивости в пределах госпитальной популяции. В итоге весьма вероятно (в случае неконтролируемого назначения и отсутствия системного мониторинга за устойчивыми штаммами) потеря клинической эффективности карбапенемов в самое ближайшее время.

К счастью для клиницистов, на сегодняшний момент ген металло-бета-лактамазы NDM не рекомбинирован в геномный интегрон (состав переменного сегмента которого *dfrA12-gcuF-aadA2*). Однако подобный интегрон ранее был найден на плазмиде штамма *K. pneumoniae* pJE137 и первичная структура плазмиды на 90 % идентична таковой у плазмиды p271A, содержащей ген *NDM-1* у *Escherichia coli* [10]. Известно, что против бактерий-носителей гена *NDM* практически отсутствует резерв антибиотиков и для определенной когорты (дети раннего возраста, тяжелые послеоперационные больные) летальный исход инфицированных пациентов чрезвычайно вероятен.

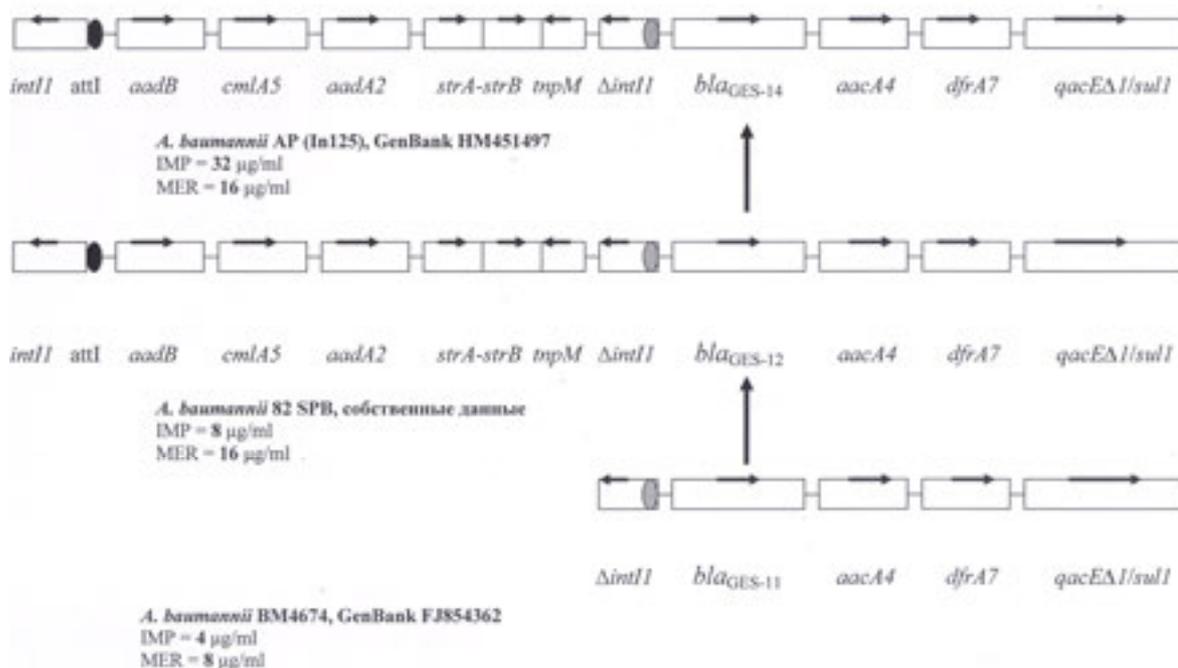


Рис. 1. Интегрон-ассоциированный ген *bla*_{GES} и МПК карбапенемов в отношении штаммов-хозяев

Разработанные в ходе выполнения проекта методические подходы в виде дуплексной ПЦР для определения наличия и типа интегрона 1-го класса (рис. 2) и ПЦР для одновременной детекции наличия интегрона и карбапенемазы типа NDM (рис. 3) позволяют выполнить анализ в течение одного рабочего дня (и соответственно вовремя распознать генотип жизнеугрожающего патогена), причем используя неградиентный термоциклер. Поскольку главная цель молекулярно-генетического анализа госпитальных штаммов – определить мероприятия, позволяющие снизить показатель заболеваемости и смертности в случае госпитальной инфекции, полученные результаты могут быть использованы в рамках технологии снижения потерь от социально значимых заболеваний (Критическая технология Российской Федерации).

Впервые в России при выполнении проекта доказано инфицирование пациента пермского стационара лекарственно-устойчивым штаммом *A. baumannii* глобальной эпидемической линии II (результат совместной работы с сотрудниками СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Пе-

тербург) [1]. Ближайший генетический «родственник» пермского штамма 60 – штамм ACICU, выделенный в 2005 году в госпитале «San Giovanni – Addolorata» (Рим, Италия). Карбапенем-устойчивый штамм выбран в качестве объекта для первого в отечественной практике полногеномного секвенирования бактерии рода *Acinetobacter* – возбудителя инфекции на территории нашей страны.

Предварительно выяснено, что элементы, определяющие лекарственную устойчивость штамма *A. baumannii* 60, филогенетически близки как возбудителям, выделенным в азиатско-тихоокеанском регионе, так и европейским штаммам. Похоже, наш регион действительно оказывается своеобразным «эпидемическим мостом», связующим Европу и Азию. Кроме того, у пермского госпитального штамма представлены гены, аннотированные только для непатогенных алканотрофных видов (например, *A. oleivorans*). Нам представляется, что проблема эволюции алканотрофных микроорганизмов к патогенному генотипу на сегодняшний момент требует гораздо более серьезного внимания.

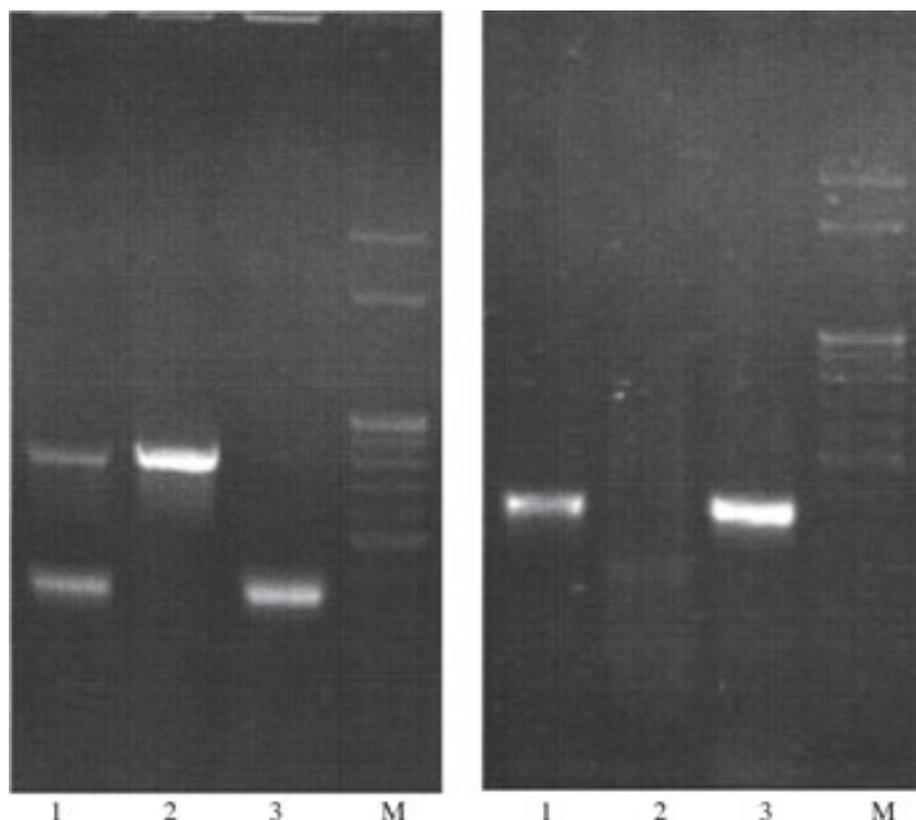


Рис. 2. ПЦР-амплификация интегронов 1-го класса в геноме *A. baumannii*: слева – интегрон *sul*-типа, справа – *sul*-негативный интегрон. Позиции: 1 – результат дуплексной ПЦР; 2 – ген *sul1* в отдельной ПЦР; 3 – ген *intI1* в отдельной ПЦР. М – маркер молекулярной массы 100–3000 пар нуклеотидов

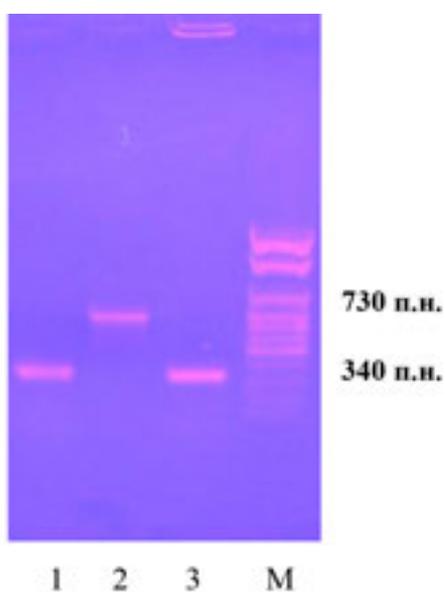


Рис. 3. Результат амплификации последовательности гена *NDM-1* (2) и гена интегразы *intI1* (3) на матрице геномной ДНК штамма *Klebsiella sp. VMA728*. М – маркер молекулярной массы (100 п.н.), 1 – позитивный контроль на ген *intI1*

В итоге, среди 3 498 кодирующих последовательностей, выявленных в геноме пермского штамма *A. baumannii*, в числе факторов вирулентности можно аннотировать 79 открытых рамок считывания (ORF). Из них девять ORF кодируют пептиды с антибактериальной активностью, а четырнадцать – конечные продукты, детерминирующие инвазивные свойства бактерии-хозяина. Резистентность к соединениям с антимикробной активностью (ионы тяжелых металлов, антибиотики и т.п.) определяется 56 кодирующими последовательностями, в том числе интегроном 1-го класса.

Таким образом, основным итогом работы следует считать установленный факт, что интегроны в виде устойчивых элементов генома могут отличать именно лекарственно-устойчивые эпидемические штаммы.

Выводы. Усовершенствование молекулярных методов исследований возбуди-

телей инфекции Международное общество по изучению инфекционных болезней (ISID) считает одной из важнейших задач современной медицинской науки. Так, в официальном документе ISID отмечено, что «...в то время как возникают мутации в направлении патогенности, методология выявления, профилактики, контроля и лечения также продолжает развиваться. Новые подходы к использованию интеллектуального анализа данных, новые быстрые лабораторные методы диагностики, оценки рисков и ответа на вспышки инфекций должны выглядеть инновационными...» (авторизованный перевод с англ.). Объединение практических усилий клиницистов и медицинских бактериологов с исследованиями академических микробиологов и молекулярных генетиков – подход, который за рубежом считается совершенно естественным.

Работы по молекулярно-генетическому исследованию бактерий родов *Acinetobacter* и *Klebsiella* в связи с ростом случаев выделения в стационарах супер- и панрезистентных штаммов позволяют сформулировать вывод о пригодности признака интегрон-носительства для описания современного возбудителя госпитальной инфекции.

Удается и частично обосновать положение о «двойном характере мобильно-

сти» генов устойчивости к современным антимикробным препаратам, а именно первоначальной ассоциации с небольшими мобильными элементами генома и последующим распространением среди возбудителей посредством больших «островов резистентности» или плазмид. В практическом плане молекулярно-генетические методы, разработанные в ходе выполнения проекта, способны обеспечить клинично-диагностические лаборатории стационаров набором экспресс-методов выявления возбудителей жизнеугрожающих инфекций.

На сайте Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН размещена разработанная нами Web-страница, посвященная проблеме интегронов (адрес: <http://www.iegm.ru/lab/aqua/napr/integron.html>). Данный материал в рейтинге релевантного поиска по ключевому слову «интегрон» на портале mail.ru занимает места в первой десятке (по состоянию на 10.06.2013).

Благодарим сотрудников ИЭГМ УрО РАН К.Н. Смарцалова и В.В. Галямину, а также врачей-бактериологов М.И. Еремееву и О.Е. Ямлиханову за участие в экспериментальной работе. Особая благодарность к.м.н. А.Е. Гончарову (СЗГМУ им. Мечникова, Санкт-Петербург) за ценную информацию по молекулярной эпидемиологии ацинетобактера.

Библиографический список

1. Генотипический анализ карбапенем-устойчивого штамма *Acinetobacter baumannii* / А.Е. Гончаров, М.И. Еремеева, Н.А. Зубарева, А.П. Соломенный // Пермский медицинский журнал. – 2011. – № 6. – С. 95–99.
2. Горбич Ю.Л., Карпов И.А. Значение адекватной эмпирической антибактериальной терапии при нозокомиальных инфекциях, вызванных *Acinetobacter baumannii* // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2012. – Т. 14. – № 1. – С. 67–73.
3. Иванов Д.В., Крапивина И.В., Галева Е.В. Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, этиология, антибактериальная терапия и профилактика // Антибиотики и химиотерапия. – 2005. – Т. 50. – № 12. – С. 19–28.
4. Козлов Р.С. Селекция резистентности микроорганизмов при использовании антимикробных препаратов: концепция «параллельного ущерба» // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2010. – Т. 14. – № 1. – С. 284–294.
5. Мартинович А.А. Динамика антибиотикорезистентности и эпидемиология инфекций, вызванных *Acinetobacter* spp., в России // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2010. – Т. 12. – № 2. – С. 96–105.
6. Фаращук А.Н. Оптимизация антибиотикотерапии нозокомиальных инфекций, вызванных *Acinetobacter baumannii*, в отделениях реанимации и интенсивной терапии России: автореф. дис. канд. мед. наук. – Смоленск, 2008. – 22 с.

7. *Andrasevic A.T., Dowzicky M.J.* In vitro activity of tigecycline and comparators against Gram-negative pathogens isolated from blood in Europe (2004–2009) // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2012. – Vol. 39. – № 2. – P. 115–23.
8. *Asencio M.A., Carranza R., Huertas M.* Resistencia a antimicrobianos de los microorganismos mas frecuetemente aislados en el Hospital General La Mancha Centro entre junio de 2009 y mayo de 2010 // *Rev. Esp. Quimioter.* – 2012. – № 25(3). – P. 183–188.
9. *Edelstein M.V., Stratchunski L.S., ROSNET study group.* Trends in the prevalence and susceptibility of ESBL-producing Enterobacteriaceae to various antimicrobial agents in Russian ICUs // *Clin. Microbiol. Antimicrob. Chemother.* – 2005. – № 7(4). – P. 342–346.
10. *Partridge S.R., Paulsen I.T., Iredell J.R.* pJIE137 carrying *bla*_{CTX-M-62} is closely related to p271A carrying *bla*_{NDM-1} // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 2012. – Vol. 56. –P. 2166–2168.
11. *Pendleton J.N., Gorman S.P., Gilmore B.F.* Clinical relevance of the ESKAPE pathogens // *Expert Rev. Anti Infect Ther.* – 2013. – № 11(3). – P. 297–308.
12. Recent trends in resistance to cell envelope-active antibacterial agents among key bacterial pathogens / *R.N. Master, J. Deane, C. Opiela, D.F. Sahn* // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2013. – № 1277. – P. 1–7.

SPECIAL FEATURES OF RECOMBINATIONS AND MUTATIONS OF THE NOSOCOMIAL PATHOGENS IN GENERAL HOSPITALS

A.P. Solomennyi, N.A. Zubareva

For the purpose of improving the molecular methods of revealing and monitoring the bacterial pathogens of nosocomial infections the paper substantiates the necessity of in-depth studies of integrons – genetic elements of multi-drug resistance (by the example of large teaching hospitals of Perm and St.-Petersburg). It is demonstrated that in Perm the integron-positive isolates carrying class 1 integrons are prevailing in the structure of *Acinetobacter baumannii*. In total, during the reporting period (2010–2012) the proportion of these isolates comprised 77 % (72 prospective isolates were analyzed). Perm carbapenem-resistant strain 60 (global epidemic type II) was chosen as the object for the first (in national practice) sequencing of complete genome of the pathogenic *Acinetobacter*.

A method of genotypic «sorting» of hospital strains using duplex PCR is suggested for practical application on the basis of clinical laboratories of hospitals providing high-technology medical care. In addition, optimal PCR mode has been selected to determine the gene of unique metallo-beta-lactamase NDM (New Delhi) and concurrently the integron-specific sequences in the super-resistant strains.

Keywords: nosocomial infection, children hospitals, teaching hospitals, pathogens, multi-drug resistance, mobile genetic elements, integrons, metallo-beta-lactamase NDM.

Сведения об авторах

Соломенный Александр Петрович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории водной микробиологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (ИЭГМ УрО РАН), 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; e-mail: solomen@iegm.ru

Зубарева Надежда Анатольевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры общей хирургии, Пермская государственная медицинская академия им. ак. Е.А. Вагнера, 614000, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26; e-mail: nzubareva07@mail.ru

Материал поступил в редакцию 27.06.2013 г.