

Молекулярно-генетическое типирование *Acinetobacter baumannii*, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови, методом ПЦР случайных полиморфных фрагментов ДНК

С. А. Хрульнова*, А. В. Федорова, И. Н. Фролова, Г. А. Клясова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»
Минздрава России

Резюме

Актуальность. *Acinetobacter baumannii* относятся к значимым нозокомиальным возбудителям, способным вызывать тяжелые инфекции, особенно у иммунокомпрометированных больных. **Цель исследования.** Изучить генетическое разнообразие *A. baumannii*, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови, методом ПЦР случайных полиморфных фрагментов ДНК (RAPD-ПЦР). **Материалы и методы.** Генотипирование *A. baumannii*, выделенных из гемокультуры больных из 7 лечебных учреждений России (2003–2017 гг.), осуществляли методом RAPD-ПЦР с использованием праймера OPA-2. Кластерный анализ RAPD-профилей проводили с помощью программного обеспечения GeI с использованием метода невзвешенного попарного среднего (UPGMA) и коэффициента Dice. Для объединения штаммов в группы использовали коэффициент сходства (КС) $\geq 65\%$. Генетически подобные *A. baumannii* имели КС $\geq 80\%$, штаммы с полностью совпадающими RAPD-профилями – КС 100%. **Результаты и обсуждение.** Всего было исследовано 96 *A. baumannii*, из которых 77 (80,2%) штаммов были карбапенем-нечувствительными. Гены приобретенных ОХА-карбапенемаз были детектированы у 79,2% карбапенем-нечувствительных *A. baumannii*. По результатам RAPD-генотипирования было выявлено 84 RAPD-профиля. На основании кластерного анализа RAPD-профилей 98% штаммов *A. baumannii* были объединены в 4 группы (A-D) с КС $\geq 65\%$. Доминирующая по числу штаммов группа А включала 58 (60,4%) *A. baumannii*, группы С и В - по 15 штаммов (по 15,6%), группа D – 6 штаммов (6,3%). Генетически подобные *A. baumannii* (КС $\geq 80\%$) были объединены в 20 кластеров (клонов), включавших 82 (85,4%) штамма. Полное совпадение RAPD-профилей (КС 100%) было определено для 22 штаммов, относящихся к 6 кластерам в группе А и одному в группе В. *A. baumannii* с полностью совпадающими RAPD-профилями были выделены как внутри одного стационара, так и в стационарах, расположенных в разных городах. **Заключение.** Проведенное исследование продемонстрировало генетическое разнообразие и распространение клонов *A. baumannii* в гематологических стационарах.

Ключевые слова: *Acinetobacter baumannii*, гемокультура, опухоли системы крови, RAPD-ПЦР, генотипирование, устойчивость к карбапенемам, ОХА-карбапенемазы

Конфликт интересов не заявлен.

Для цитирования: Хрульнова С. А., Федорова А. В., Фролова И. Н., Клясова Г. А. Молекулярно-генетическое типирование *Acinetobacter baumannii*, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови, методом ПЦР случайных полиморфных фрагментов ДНК. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2020; 19 (4): 38–47. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-4-38-47>.

Genotyping by Random Amplified Polymorphic DNA Assay of *Acinetobacter baumannii* Isolated from Blood Culture of Patients with Hematological Malignancies

SA Khrulnova**, AV Fedorova, IN Frolova, GA Klyasova

National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Abstract

Relevance. *Acinetobacter baumannii* is a significant nosocomial pathogen that can cause severe infections, especially in immunocompromised patients. **Aims.** This study aimed to investigate clonal diversity of *A. baumannii* isolated from blood culture in hematological patients by random amplified polymorphic DNA assay (RAPD). **Materials & Methods.** Genotyping of *A. baumannii* isolated from blood culture in hematological patients in 7 Russian hospitals (2003–2017) was assessed by RAPD-PCR with primer OPA-2 (5'-TGCCGAGCTG-3'). The computer-assisted analysis was performed by using GeI software by UPGMA method and Dice similarity coefficient for banding patterns comparison. Using a similarity coefficient (SC) of $\geq 65\%$, the strains were grouped. Based

* Для переписки: Хрульнова Светлана Алексеевна, старший научный сотрудник лаборатории клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии НМИЦ гематологии. +7 (495)-614-92-72, khrulnovas@mail.ru. ©Хрульнова С. А. и др.

** For correspondence: Khrulnova Svetlana A., Senior researcher in Laboratory of clinical bacteriology, mycology, and antibiotic treatment of National Research Center for Hematology. +7 (495)-614-92-72, khrulnovas@mail.ru. ©Khrulnova SA et al.

on the similarity coefficient, the strains were determined as genetically related ($\geq 80\%$). Strains had identical RAPD-patterns if the similarity coefficient was 100%. **Results.** A total of 96 *A. baumannii* strains were examined, of those 77 (80.2%) were non-susceptible to carbapenems. Acquired OXA-carbapenemase genes were detected among 79.2% carbapenem non-susceptible strains. RAPD-PCR genotyping revealed 84 RAPD patterns. The four groups (A-D) including 98% strains were defined by similarity coefficient $\geq 65\%$. The predominant group A included 58 (60.4%) strains, the C and B groups – had 15 strains (15.6%) each, and the group D – 6 strains (6.3%). A total of 82 (85.4%) genetically related *A. baumannii* with a similarity coefficient $\geq 80\%$ were allocated into 20 clusters. Identical RAPD-patterns were defined for 22 strains that belonged to 6 clusters within the group A and 1 cluster within the group B. Strains with identical RAPD-patterns were detected in a single hospital as well as in several hospitals located in different cities. **Conclusions.** The current study has demonstrated genetic diversity and clonal dissemination of *A. baumannii* in hematological departments.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, hematological malignancies, blood culture, genotyping, RAPD-PCR, carbapenem resistance, OXA-carbapenemases

No conflict of interest to declare.

For citation: Khrulnova SA, Fedorova AV, Frolova IN, Klyasova GA. Genotyping by Random Amplified Polymorphic DNA Assay of *Acinetobacter baumannii* Isolated from Blood Culture of Patients with Hematological Malignancies. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2020; 19 (4): 38–47 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-4-38-47>.

Введение

Нозокомиальные инфекции являются серьезной проблемой современного здравоохранения по причине увеличения времени пребывания больных в стационаре и высокой летальности. Неудачи в лечении этих инфекций часто обусловлены приобретенной устойчивостью бактерий к противомикробным препаратам. К значимым нозокомиальным возбудителям относятся *Acinetobacter baumannii*, способные вызывать как тяжелые инфекции, так и вспышки инфекций, особенно в отделениях интенсивной терапии [1]. Доля *A. baumannii* составляет 3–11% среди возбудителей инфекций кровотока у больных опухолями системы крови [2–4]. Ранняя летальность у пациентов с бактериемией, вызванной *A. baumannii*, варьирует от 30% до 80%, у больных опухолями системы крови – 70–80% [5–7].

Отличительной чертой *A. baumannii* является кажущаяся бесконечной способность приобретать устойчивость к антибактериальным препаратам. В связи с тем, что штаммы *A. baumannii* обладают многими механизмами устойчивости к антибиотикам [8], возможности терапии в отношении данных микроорганизмов весьма ограничены. Во всем мире отмечается увеличение доли *A. baumannii*, обладающих фенотипом множественной резистентности (multidrug resistance, MDR). Длительное время карбапенемы были препаратами выбора для лечения инфекций, вызванных MDR *A. baumannii*. Однако в последние годы возросло число сообщений об увеличении доли карбапенем-нечувствительных штаммов *A. baumannii*, выделенных от разных категорий больных. Так, среди *A. baumannii*, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови, доля карбапенем-нечувствительных штаммов составила 66–74,3% [4,9]. Высокий уровень устойчивости к карбапенемам наблюдался также и у *A. baumannii*, выделенных в многопрофильных стационарах. По данным проспективного исследования (2008–2009 гг.),

проведенного в 10 странах Азии, устойчивыми к имипенему были 67,3% *Acinetobacter* spp., ставших причиной нозокомиальных пневмоний [10]. В России доля карбапенем-резистентных *A. baumannii* составила 77% [11], в Болгарии – около 91% [12].

Устойчивость к карбапенемам среди *A. baumannii* может быть обусловлена несколькими механизмами, из которых продукция приобретенных карбапенемаз занимает весомую долю. Ферменты оксациллиназы (ОХА), обладающие гидролитической активностью в отношении карбапенемов, получили наибольшее распространение среди *A. baumannii*, тогда как металло- β -лактамазы встречаются реже. Среди генов, кодирующих ОХА-карбапенемазы, выделяют 5 филогенетических групп: видоспецифичные *bla*_{ОХА-51-подобные} и приобретенные *bla*_{ОХА-23-подобные}, *bla*_{ОХА-24/40-подобные}, *bla*_{ОХА-58-подобные} и *bla*_{ОХА-143-подобные}. Продукция ферментов групп ОХА-23, ОХА-24/40 и ОХА-58 всегда обуславливает устойчивость к карбапенемам, в то время как видоспецифичные ферменты группы ОХА-51 могут быть причиной устойчивости только при условии их гиперпродукции [13].

Одной из отличительных особенностей *A. baumannii* является также способность сохранять жизнеспособность в течение длительного времени на поверхностях, что способствует их распространению в лечебных учреждениях. В работе LS Munoz-Price с соавт. [14] было показано, что если в палате находился больной, от которого были выделены *A. baumannii* из клинически значимых образцов или со слизистых оболочек, то в 39% случаев палата этого пациента была контаминирована *A. baumannii* [14]. DJ Morgan с соавт. [15] показали, что при контакте медицинского персонала с больными, инфицированными MDR *A. baumannii* или колонизированными этими микроорганизмами, контаминация перчаток и халатов медицинских работников составляла 38,7%, кожа рук

Original Articles

медицинского персонала после снятия перчаток – 4,5%. Независимыми факторами риска контаминации MDR *A. baumannii* было выполнение таких медицинских процедур, как обработка ран, обработка области трахеостомы и эндотрахеальной трубки, а также пребывание в палате больного более 5 минут.

Для определения источников возникновения и циркуляции клонов *A. baumannii* внутри стационаров широко применяются методы молекулярно-генетического типирования, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. Метод ПЦР случайных полиморфных фрагментов ДНК (Random amplification of polymorphic DNA, RAPD-ПЦР) имеет ряд преимуществ, таких как низкая стоимость, простота выполнения и минимальные временные затраты. При оптимальных условиях проведения RAPD-ПЦР обладает высокой дискриминирующей способностью.

Цель нашего исследования состояла в изучении генетического разнообразия *A. baumannii*, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови, методом RAPD-ПЦР.

Материалы и методы

Источники бактериальных изолятов

Материалом исследования были *A. baumannii* (n = 96), выделенные из гемокультуры больных, находившихся на стационарном лечении в гематологических отделениях 7 лечебных учреждений 6 городов России с 2003 г. по 2017 г. В исследование включали первый изолят, выделенный из гемокультуры больного. Все изоляты были доставлены в лабораторию НМИЦ гематологии, где были проведены окончательная идентификация микроорганизмов и определение их чувствительности к антимикробным препаратам, а также детекция генов карбапенемаз.

Видовая идентификация и хранение

Идентификацию изолятов до вида проводили в НМИЦ гематологии методом матричной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) на анализаторе Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия). Для идентификации полученных изолятов до вида брали изолированные колонии бактерий. Ионизацию бактериальных белков осуществляли с помощью специального реагента – матрицы (α -циано-4-гидроксикоричная кислота и раствор, содержащий 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты). Идентификацию проводили в автоматическом режиме с использованием программы MALDI Biotyper Real Time Classification, версия 3.1 (Bruker Daltonics, Германия). В качестве критерия надежной видовой идентификации использовали рекомендуемые значения коэффициента совпадения («Score») от 2,0 и выше. Видовую идентификацию изолятов *A. baumannii* дополнительно подтверждали с помощью детекции генов видоспецифических

β -лактамаз группы OXA-51 методом ПЦР в режиме реального времени с использованием коммерческого набора «АмплиСенс® MDR Ab-OXA-FL» (Центральный НИИ эпидемиологии, Россия), предназначенного для исследовательских целей. Изоляты хранили при температуре -70 °С в триптиказо-соевом бульоне с добавлением 20% глицерина.

Определение чувствительности к антибактериальным препаратам

Чувствительность к антимикробным препаратам исследовали методом последовательных микроразведений в бульоне в соответствии с рекомендациями Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018) [16]. Категории чувствительности *A. baumannii* к меропенему и имипенему определяли на основании пограничных значений минимальных подавляющих концентраций (МПК), установленных CLSI (чувствительные ≤ 2 мкг/мл, умеренно-резистентные 4 мкг/мл, резистентные ≥ 8 мкг/мл). Термин «нечувствительные» штаммы объединял умеренно-резистентные и резистентные к антибиотикам микроорганизмы. Для внутреннего контроля качества определения чувствительности использовали референтные штаммы *Escherichia coli* ATCC®25922 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Детекция генов карбапенемаз

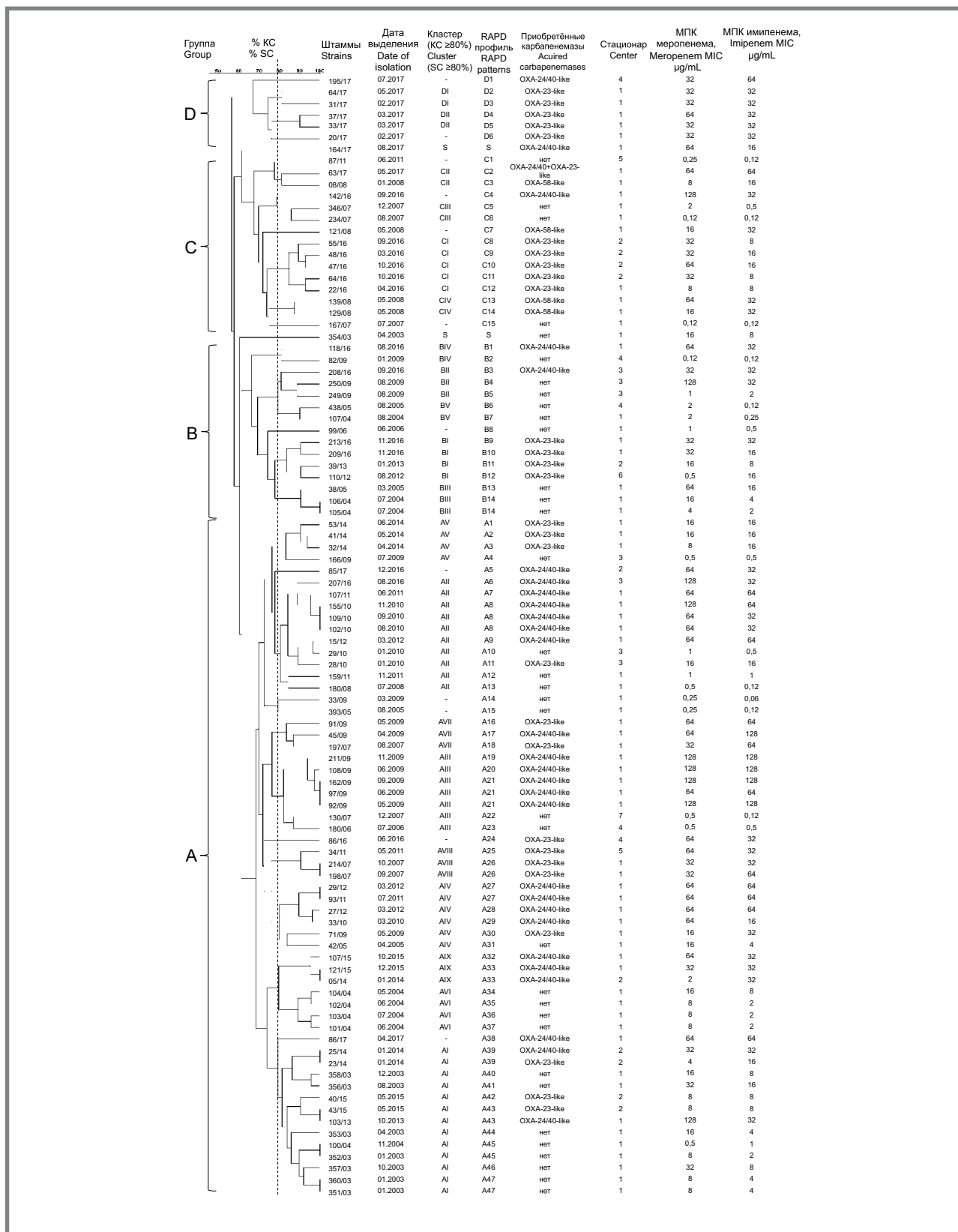
Выделение ДНК проводили с помощью коммерческого набора «ГК-Экспресс» (Центральный НИИ эпидемиологии, Россия).

Наличие у штаммов *A. baumannii* наиболее распространенных генов карбапенемаз класса D (групп OXA-23, OXA-24/40 и OXA-58) и класса B (групп IMP, VIM и NDM) определяли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием коммерческих наборов «АмплиСенс® MDR Ab-OXA-FL» и «АмплиСенс® MDR MBL-FL» (Центральный НИИ эпидемиологии, Россия). Амплификацию проводили в термоциклере CFX96 Touch (BioRad, США).

Внутривидовое генотипирование

Внутривидовое генотипирование штаммов *A. baumannii* осуществляли методом RAPD-ПЦР с праймером OPA-2 (5'-TGCCGAGCTG-3') [17]. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации RAPD-ПЦР проводили в 1,5% агарозном геле с использованием трис-ацетатного ЭДТА-буфера. В качестве стандарта молекулярных длин применяли ДНК-маркер 100bp GeneRulerTM (Thermo Fisher Scientific, США). Для проведения кластерного анализа RAPD-профилей было использовано программное обеспечение GelJ [18] с использованием метода невзвешенного попарного среднего (UPGMA) и коэффициента Dice, толерантность 1,5%. Дискриминирующую способность метода типирования оценивали с помощью индекса Хантера–Гастона (D) [19]. Для объединения

**Рисунок 1. Дендрограмма кластеризации штаммов *A. baumannii* (n = 96)/
Figure 1. Dendrogram illustrating the relationship between *A. baumannii* (n = 96)**

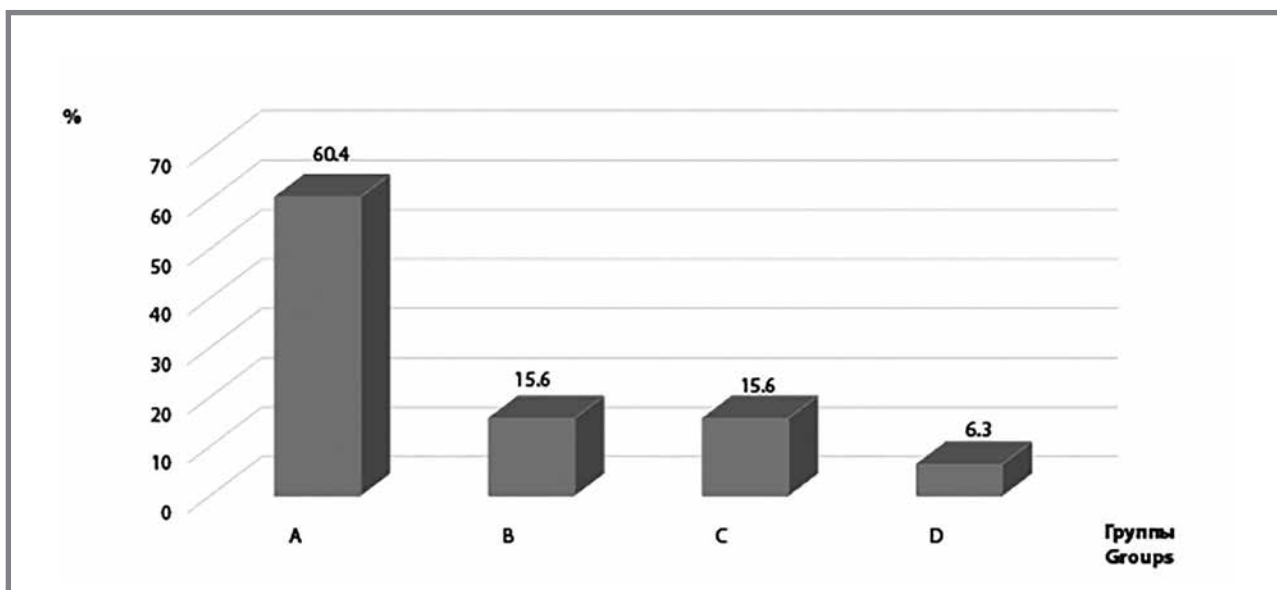


Примечание: В группы А–D были включены штаммы с КС ≥ 65%. В кластеры, обозначенные латинскими буквами с римскими цифрами, были объединены генетически подобные штаммы с КС ≥ 80%, индекс Хантера-Гастона = 0,952. S – уникальные штаммы (КС ≤ 65%). RAPD-профиль – электрофоретический профиль амплифицированных фрагментов. МПК – минимальная подавляющая концентрация антибиотика. Дендрограмма построена с помощью компьютерного анализа (GelJ) с использованием метода невзвешенного попарного среднего (UPGMA) с коэффициентом Dice, толерантность 1,5

Note: A–D groups included strains with SC ≥ 65%. Genetically related strains (SC ≥ 80%) were combined into clusters, which were marked Latin letters with roman numerals. Hunter-Gaston index = 0.952. S - unique strains (SC ≤ 65%). RAPD-pattern is the electrophoretic profile of amplified fragments. MIC - minimal inhibitory concentration. The dendrogram was constructed by Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) with Dice coefficient and 1.5 tolerance.

Рисунок 2. Распределение штаммов *A. baumannii*, выделенных от больных опухолями системы крови, по группам (КС \geq 65%)

Figure 2. Distribution of groups (SC \geq 65%) with *A. baumannii* isolated from blood culture in hematological patients



штаммов в группы использовали коэффициент сходства (КС) \geq 65%. Штаммы *A. baumannii* считали уникальными, если КС был меньше 65%. В кластеры (клоны) были объединены штаммы с КС \geq 80%, которые относили к генетически подобным. Если КС составлял 100%, то *A. baumannii* оценивали, как имеющие полное совпадение RAPD-профилей.

Результаты и обсуждение

Всего было исследовано 96 штаммов *A. baumannii*, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови. Нечувствительными к карбапенемам были 77 (80,2%) штаммов *A. baumannii*, из них резистентными к имипенему – 67 (87%) штаммов, к меропенему – 73 (94,8%).

Гены приобретенных карбапенемаз были обнаружены у 61 (79,2%) из 77 карбапенем-нечувствительных *A. baumannii*. Все детектированные гены приобретенных карбапенемаз относились к ОХА-карбапенемазам и принадлежали к трем группам, из них лидирующими были гены *bla*_{ОХА-24/40-подобные} (45,9%, n = 28) и гены *bla*_{ОХА-23-подобные} (45,9%, n = 28), затем следовали гены *bla*_{ОХА-58-подобные} (10%, n = 4), у одного штамма (1,6%) было определено сочетание генов ОХА-24/40-подобных и ОХА-23-подобных ферментов. Гены металло- β -лактамаз не были детектированы.

По результатам RAPD-генотипирования было выявлено 84 RAPD-профиля (рис. 1). На основании кластерного анализа RAPD-профилей 94 (98%)

Таблица 1. Характеристика групп *A. baumannii* по результатам анализа RAPD-ПЦР

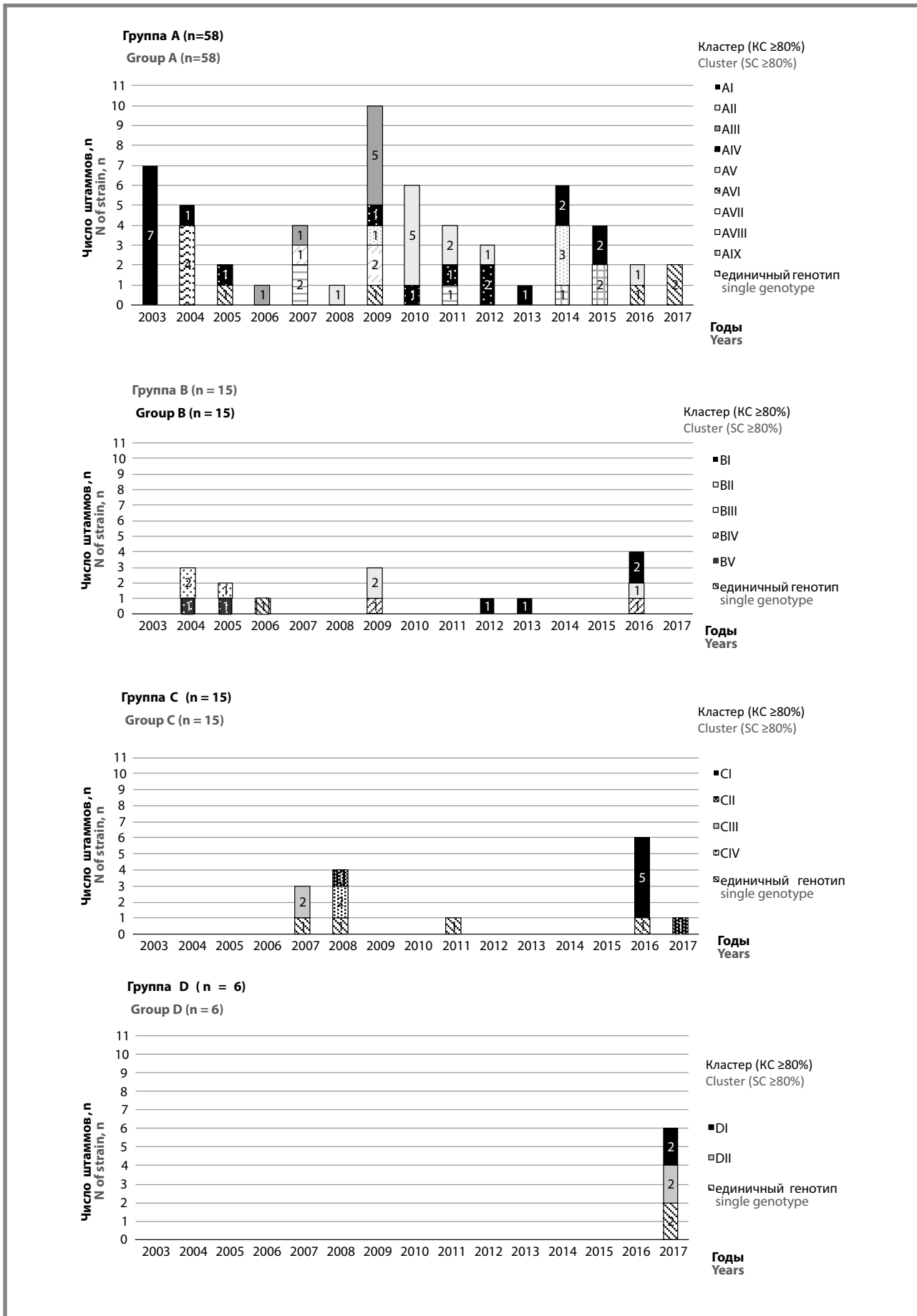
Table 1. Characterization of *A. baumannii* groups by RAPD-PCR

Группа Groups	Число штаммов в группе, N of strains in group	Число кластеров в группе (КС* \geq 80%), Clusters (*SC \geq 80%)	Число RAPD профилей, RAPD patterns	<i>A. baumannii</i> с полностью совпадающими RAPD-профилями (КС 100%), <i>A. baumannii</i> with identical RAPD-patterns	Карбапенем-нечувствительные <i>A. baumannii</i> Carbapenem non-susceptible <i>A. baumannii</i>	
					Всего, Total	Приобретенные ОХА-карбапенемазы, Acquired carbapenemase genes
	n	n	n	n (%)	n (%)	n (%)
A	58	9	47	20 (34,5)	49 (84,5)	37 (75,5)
B	15	5	14	2 (13,3)	10 (66,7)	6 (66,7)
C	15	4	15	0	11 (73,3)	11 (100)
D	6	2	6	0	6 (100)	6 (100)

Примечание: *КС – коэффициент сходства.

Note: *SC – similarity coefficient

Рисунок 3. Распределение кластеров *A. baumannii* внутри групп А–D в течение периода исследования. КС – коэффициент сходства
Figure 3. Distribution of *A. baumannii* clusters into A–D groups during the study period



штамма *A. baumannii* были объединены в 4 группы (A-D) с КС \geq 65% (рис. 2). Только два штамма (2,1%) были отнесены к уникальным (КС \leq 65%). Большинство штаммов с КС \geq 65% принадлежало к группе А (60,4%, $n = 58$). Доля *A. baumannii*, вошедших в группы В и С, составила по 15,6% (по 15 штаммов в каждой), в группу D – 6,3% ($n = 6$). На основании RAPD-генотипирования КС \geq 80% был определен для 82 (85,4%) *A. baumannii*, которые были распределены в 20 кластеров (клонов) генетически подобных штаммов (табл. 1). Каждый кластер содержал от 2-х до 13 штаммов. Полностью совпадающие RAPD-профили (КС 100%) были определены для 22 штаммов, относящихся к 6 кластерам (клонам) в группе А и одному в группе В.

В каждой группе большинство штаммов *A. baumannii* были нечувствительными к карбапенемам (см. табл. 1). Наиболее высокий процент карбапенем-нечувствительных *A. baumannii* был определен в группе D (100%) и группе А (84,5%). Гены приобретенных ОХА-карбапенемаз были детектированы среди всех карбапенем-нечувствительных штаммов в группах С и D, реже в группах А и В (75,5% и 66,7% соответственно).

На рисунке 3 представлена динамика распределения кластеров *A. baumannii* внутри групп по годам. Штаммы доминирующей группы А были детектированы в течение всего периода исследования. Ряд клонов, таких как AI, AII, AIII и AIV, были циркулирующими и определялись в течение нескольких лет подряд или с перерывом. Так, штаммы, относящиеся к кластеру AI, впервые были определены в начале исследования в 2003 г. и в 2004 г., а затем с 2013 г. по 2015 г. Штаммы кластера AII впервые были выделены в 2008 г., затем в течение трех лет подряд (2010–2012 гг.), далее в 2016 г. Штаммы *A. baumannii*, входящие

в состав менее многочисленных групп, таких как В и С, были детектированы позднее, чем штаммы группы А, определялись непостоянно в течение периода исследования, но среди них также были отмечены и другие циркулирующие клоны (BI, BII и CII). Штаммы *A. baumannii*, входившие в группу D, в отличие от штаммов групп А, В и С, впервые были определены только в 2017 г. Следует отметить, что последние два года исследования (2016–2017 гг.) характеризовались появлением новых клонов (CI, DI и DII), вошедших в состав групп С и D (рис. 3).

Штаммы с полностью совпадающими RAPD-профилями (КС 100%) в основном были детектированы в доминирующей по числу штаммов группе А. В эту группу вошли 20 (34,5%) *A. baumannii* с КС 100%, из которых 19 (95%) были резистентными к карбапенемам (табл. 2). Гены приобретенных ОХА-карбапенемаз имели 16 (84,2%) из 19 *A. baumannii*, преобладали гены *bla*_{ОХА-24/40-подобные} (75%). В группе В только два штамма имели полностью совпадающие RAPD-профили (КС 100%). Эти штаммы *A. baumannii* были нечувствительными к карбапенемам, однако гены приобретенных ОХА-карбапенемаз в их геномах не были обнаружены.

На рисунке 4 представлено распределение *A. baumannii* с полностью совпадающими RAPD-профилями (КС 100%) в течение исследования. Следует отметить, что 14 (70%) из 20 штаммов с полностью совпадающими RAPD-профилями в группе А и два штамма в группе В были выделены в одном стационаре в 2003–2012 гг. (см. рис. 1). В 2013 г. и в 2015 г. было выделено 2 штамма (RAPD-профиль А43) с КС 100% в двух стационарах, расположенных в разных городах, как и в 2014–2015 гг. (RAPD-профиль А33). Интерес вызывает тот факт, что у некоторых *A. baumannii* с полностью совпадающими RAPD-профилями (RAPD-профиль А43 и А39) были обнаружены гены приобретенных

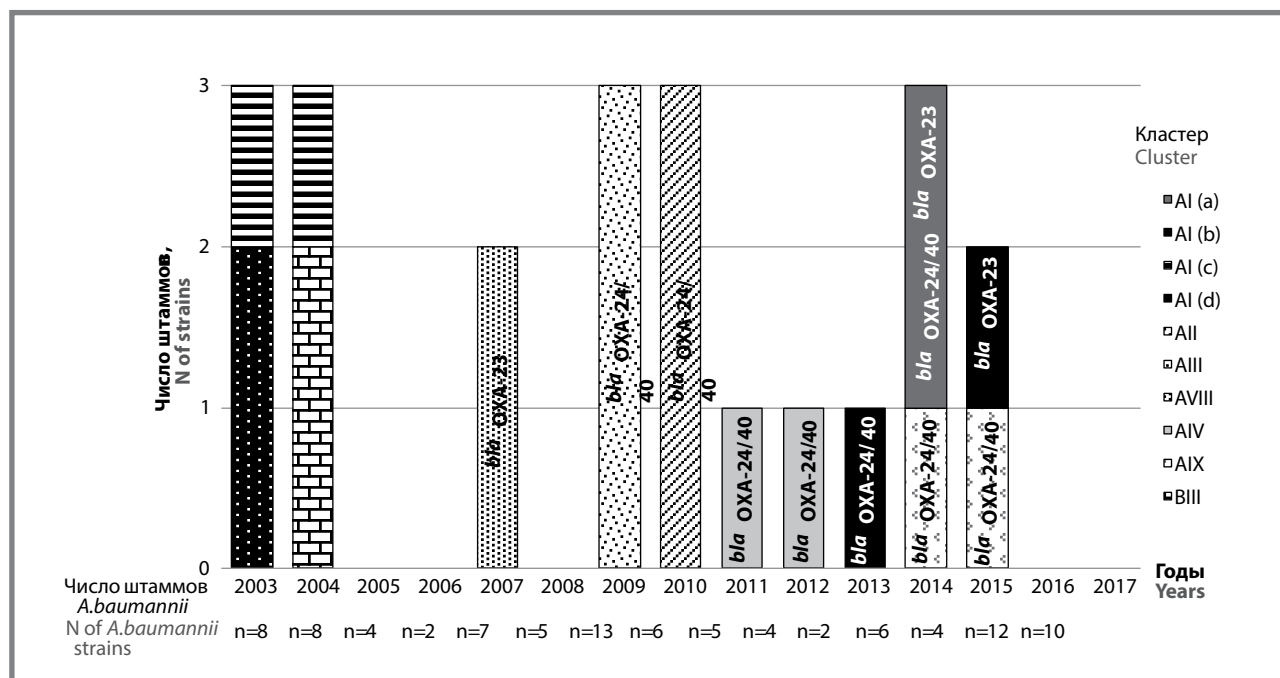
Таблица 2. *A. baumannii* с полностью совпадающими RAPD-профилями (КС 100%)

Table 2. *A. baumannii* with identical RAPD-patterns (SC 100%)

<i>A. baumannii</i>	Группа Group		Всего Total n = 22
	А (n = 20)	В (n = 2)	
Чувствительные к карбапенемам Carbapenem-susceptible	1(5%)	0	1 (4,5%)
Умеренно-резистентные к карбапенемам Carbapenem-intermediate	0	1	1 (4,5%)
Резистентные к карбапенемам Carbapenem-resistant	19 (95%)	1	20 (91%)
Гены приобретенных ОХА-карбапенемаз Acquired carbapenemase genes	16 (84,2%)	0	16 (80%)
<i>bla</i> _{ОХА-24/40-подобные} <i>bla</i> _{ОХА-24/40-like}	12 (75%)	0	12 (75%)
<i>bla</i> _{ОХА-23-подобные} <i>bla</i> _{ОХА-23-like}	4 (25%)	0	4 (25%)

Рисунок 4. Выделение *A. baumannii* с полностью совпадающими RAPD-профилями (КС 100%) в течение периода исследования

Figure 4. Detection of *A. baumannii* with identical RAPD-patterns (SC 100%) during the study period



Примечание: Наличие генов приобретенных OXA-карбапенемаз указано в столбиках. Латинскими буквами обозначены RAPD-профили в кластере AI: а – A39, b – A43, с – A45, d – A47.

Note: The presence of acquired OXA-carbapenemase genes is indicated in columns. Lowercase Latin letters indicate RAPD-patterns in A1 cluster: a – A39, b – A43, c – A45, d – A47

OXA-карбапенемаз, относящиеся к разным типам (рис. 4).

Частота детекции карбапенем-резистентных *A. baumannii* остается высокой на протяжении длительного периода. В текущем исследовании доля карбапенем-нечувствительных *A. baumannii*, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови, составила 80,2%, в ранее проведенном исследовании – 74% [9]. Полученные данные свидетельствуют о продолжающемся увеличении доли устойчивых к карбапенемам *A. baumannii* в РФ. Высокий уровень резистентности к карбапенемам от 53% до 77% отмечен и среди *A. baumannii*, выделенных от больных, находящихся на лечении в многопрофильных стационарах [11,20]. В проведенных российских исследованиях было показано, что большинство карбапенем-резистентных *A. baumannii* содержало гены приобретенных карбапенемаз, из которых *bla*_{OXA-24/40-подобные} были наиболее распространенными на территории РФ и составляли 57,5–94,2% [11,20,21]. В сравнении с проведенным ранее исследованием среди карбапенем-нечувствительных *A. baumannii*, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови, наблюдается увеличение доли штаммов, содержащих гены *bla*_{OXA-23-подобные}. Так, до 2015 г. доля *A. baumannii*, несущих гены *bla*_{OXA-23-подобные}, составляла 38,5% [9], в текущем исследовании – 45,9%, в то время как среди штаммов *A. baumannii*, выделенных в многопрофильных стационарах РФ, гены *bla*_{OXA-23-подобные} были

детектированы только в 5,8–18,4% [11,20,21]. Можно предположить, что в гематологических стационарах увеличение доли *A. baumannii*, содержащих гены *bla*_{OXA-23-подобные}, связано с распространением новых клонов *A. baumannii*.

Молекулярные методы типирования успешно применяются для определения генетически родственных штаммов; для понимания путей распространения возбудителей инфекции в стационарах; определения источника инфекции. Одним из применяемых методов генотипирования является RAPD-ПЦР, который быстро выполняем, является простым в исполнении, не требует больших финансовых затрат. В то же время данный метод имеет ряд ограничений, к которым относят невозможность провести сравнение результатов, полученных в разных лабораториях, существует сложность в стандартизации проведения RAPD-ПЦР. Однако при оптимальных условиях RAPD-ПЦР обладает высокой дискриминирующей способностью. В нашем исследовании значение индекса Хантера-Гастона составило 0,952 при разделении штаммов на кластеры с КС ≥ 80%, что свидетельствовало о высокой дискриминирующей способности выбранного нами метода. В результате RAPD-генотипирования было выявлено 20 кластеров (клонов) генетически подобных штаммов, что является подтверждением генетического разнообразия *A. baumannii*, выделенных от больных с заболеваниями системы крови. В то же время большинство *A. baumannii* (60,4%) относилось к доминирующей по числу

Original Articles

штаммов группы А, в которой было отмечено наибольшее число ($n = 20$) штаммов с полностью совпадающими RAPD-профилями (КС 100%), что не исключало циркуляции одних и тех же штаммов *A. baumannii* в стационаре. Немаловажным фактом было то, что большинство *A. baumannii* в каждой группе были карбапенем-нечувствительными (66–100%), а уровень резистентности к карбапенемам у *A. baumannii* с полностью совпадающими RAPD-профилями (КС 100%) составлял 95%. При этом гены приобретенных ОХА-карбапенемаз были обнаружены у 84,2% *A. baumannii* с КС 100% в доминирующей по числу штаммов группе А, что, вероятно, давало этим штаммам дополнительную возможность для распространения и сохранения внутри стационара. Необходимо отметить, что *A. baumannii* с полностью совпадающими RAPD-профилями были выделены как внутри одного стационара, так и в стационарах, расположенных в разных городах. В ходе исследования были определены циркулирующие клоны *A. baumannii*, которые были детектированы в течение нескольких лет как в доминирующей по числу штаммов группе А, так и малочисленных группах, таких как В и С. Наряду с циркуляцией клонов *A. baumannii* в течение длительного времени в стационаре также было выявлено появление новых клонов в 2016–2017 гг., вошедших в новую группу D и ранее детектируемую группу С (кластер С1), что могло свидетельствовать о расширении генетического разнообразия *A. baumannii*. Сопоставимые данные были получены и другими исследователями. Изучение *A. baumannii* методом SNP-типирования позволило отнести все штаммы *A. baumannii*, выделенные в многопрофильных стационарах РФ в 2015–2016 гг., к 34 генотипам и 18 клональным группам (генетическим кластерам, объединяющим штаммы родственных генотипов) [11]. А. Alsultan с соавт. [22] было проведено генотипирование методом пульс-гель электрофореза, которое показало наличие 13 различных клонов, циркулирующих в нескольких стационарах Саудовской Аравии, расположенных в разных городах. В исследовании, проведенном в Болгарии, при RAPD-генотипировании было выявлено от 2-х до 6 кластеров генетически родственных штаммов в четырех госпиталях, что могло

свидетельствовать о циркуляции эндемичных клонов *A. baumannii* [12]. Следует отметить, что популяция *A. baumannii*, выделенных от больных, является неоднородной по своей структуре. В литературе представлены случаи как поликлонального распространения *A. baumannii* в условиях стационаров, что подтверждает их генетическое разнообразие, так и распространение одного или ограниченного числа клонов.

Заключение

Исследование продемонстрировало высокий уровень резистентности *A. baumannii* к карбапенемам (80,2%) и среди них 79,2% штаммов имели гены приобретенных ОХА-карбапенемаз.

В ходе RAPD-генотипирования было выявлено генетическое разнообразие штаммов *A. baumannii*. В ходе изучения они были распределены на 20 клонов. Часть клонов были циркулирующими и определялись неоднократно. В последние годы (2016–2017 гг.) было отмечено появление новых клонов, что свидетельствовало о расширении генетического разнообразия исследуемых микроорганизмов. Все штаммы, относящиеся к новым клонам, имели гены приобретенных ОХА-карбапенемаз, которые, вероятно, имели позитивное значение в успешной адаптации *A. baumannii* к условиям стационара.

В то же время большинство исследуемых *A. baumannii* (60,4%) были объединены в одну группу, включая штаммы с полностью совпадающими RAPD-профилями, что не исключало клонального распространения *A. baumannii* в стационаре. Среди *A. baumannii* с полностью совпадающими RAPD-профилями доминировали карбапенем-резистентные *A. baumannii* (91%). Клональное распространение *A. baumannii* было выявлено как внутри одного стационара, так и в стационарах, расположенных в разных городах.

Финансирование исследования. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № АААА-А18-118012490209-7).

Acknowledgment. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (theme No. АААА-А18-118012490209-7).

Литература

- Gedik H., Simssek F., Kantürk A., et al. Bloodstream infections in patients with hematological malignancies: which is more fatal - cancer or resistant pathogens? // *Ther Clin Risk Manag.* 2014. Vol. 10, P. 743-752. <https://doi.org/10.2147/tcrm.s68450>.
- Wang X., Zhang L., Sun A., et al. Acinetobacter baumannii bacteraemia in patients with haematological malignancy: a multicenter retrospective study from the Infection Working Party of Jiangsu Society of Hematology. // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017. Vol. 36, N7. P. 1073-1081. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2895-2>.
- Клясова Г. А., Сперанская Л. Л., Миронова А. В., и др. Возбудители сепсиса у иммунокомпрометированных больных: структура и проблемы антибиотикорезистентности (результаты многоцентрового исследования) // *Гематология и трансфузиология.* 2007. Т. 52, №1. С. 13-18.
- Клясова Г. А., Ожмат В. А. Антимикробная терапия. Под редакцией Савченко В.Г. В кн: Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови. М.: Практика; 2018. С. 1067-1113.
- Ballouz T., Aridi J., Afif C., et al. Risk factors, clinical presentation, and outcome of Acinetobacter baumannii bacteremia. // *Front Cell Infect Microbiol.* 2017. N7. P. 156. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00156>.
- Freire M.P., de Oliveira Garcia D., Garcia C.P., et al. Bloodstream infection caused by extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii in cancer patients: high mortality associated with delayed treatment rather than with the degree of neutropenia // *Clin Microbiol Infect.* 2016. N 22. P. 352-358. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.010>.
- Shargian-Alon L., Gafter-Gvili A., Ben-Zvi H., et al. Risk factors for mortality due to Acinetobacter baumannii bacteremia in patients with hematological malignancies - a retrospective study. // *Leuk Lymphoma.* 2019. Vol. 60, N11. P. 2787-2792. <https://doi.org/10.1080/10428194.2019.1599113>.
- Lee C.R., Lee J.H., Park M., et al. Biology of Acinetobacter baumannii: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. // *Front Cell Infect Microbiol.* 2017. N7. P. 55. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00055>.
- Хрульнова С. А., Коробова А. Г., Федорова А. В. и др. Детекция генов приобретенных карбапенемаз у изолятов Acinetobacter baumannii, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови. // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2019. Т. 21, № 1. С. 50-55. <https://doi.org/10.36488/cmac.2019.1.56-60>.

- Chung D.R., Song J.H., Kim S.H., et al. High prevalence of multidrug-resistant nonfermenters in hospital-acquired pneumonia in Asia. // *Am J Respir Crit Care Med.* 2011. N184. P. 1409–1417. <https://doi.org/10.1164/rccm.201102-0349oc>.
- Шек Е. А., Сухорукова М. В., Эдельштейн М. В. и др. Антибиотикорезистентность, продукция карбапенемаз и генотипы нозокомиальных штаммов *Acinetobacter spp.* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015–2016». // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2019. Т.21, №2. С. 171–180. <https://doi.org/10.36488/cm.2019.2.171-180>.
- Strateva T., Sirakov I., Stoeva T., et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: Current status of the problem in four Bulgarian university hospitals (2014–2016). // *J Glob Antimicrob Resist.* 2019. N16. P. 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.10.027>.
- Evans B.A., Amyes S.G. OXA β -lactamases. // *Clin Microbiol Rev.* 2014. N27. P. 241–263. <https://doi.org/10.1128/cmr.00117-13>.
- Munoz-Price L.S., Namias N., Cleary T., et al. *Acinetobacter baumannii*: association between environmental contamination of patient rooms and occupant status. // *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013. Vol. 34, N5. P. 517–20. <https://doi.org/10.1086/670209>.
- Morgan D.J., Liang S.Y., Smith C.L., et al. Frequent multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination of gloves, gowns, and hands of healthcare workers. // *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010. Vol. 31, N7. P. 716–21. <https://doi.org/10.1086/653201>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Seventh Informational Supplement. CLSI document M100-S28. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- Dahdouh E., Gómez-Gil R., Sanz S., et al. A novel mutation in *pmrB* mediates colistin resistance during therapy of *Acinetobacter baumannii* // *Int J Antimicrob Agents.* 2017. Vol. 49, N6. P. 727–733. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.01.031>.
- Heras J., Domínguez C., Mata E., et al. GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics.* 2015;16:270. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0703-0>.
- Hunter P.R. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods // *J Clin Microbiol.* 1990;28(9):1903–1905. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.9.1903-1905.1990>.
- Горди́нская Н. А., Сабирова Е. В., Абрамова Н.В. и др. Антибиотикочувствительность и молекулярные механизмы резистентности *Acinetobacter baumannii*, возбудителей раневой ожоговой инфекции. // *Медицинский альманах.* 2015. Т. 5, № 40. С. 99–101.
- Mayanskiy N., Chebotar I., Alyabieva N., et al. Emergence of the Uncommon Clone ST944/ST78 Carrying *bla*_{CTX-M-48-like} and *bla*_{CTX-M-15-like} Genes Among Carbapenem-Nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in Moscow, Russia. // *Microb Drug Resist.* 2017. Vol. 23, N7. P. 864–870. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0302>.
- Alsultan A.A., Aboulmagd E., Evans B.A., et al. Clonal diversity of *Acinetobacter baumannii* from diabetic patients in Saudi Arabian hospitals. // *J Med Microbiol.* 2014. Vol. 63, N11. P. 1460–1466. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.079640-0>.

Reference

- Gedik H, Simsək F, Kantürk A, et al. Bloodstream infections in patients with hematological malignancies: which is more fatal - cancer or resistant pathogens? *Ther Clin Risk Manag.* 2014;10:743–752. <https://doi.org/10.2147/tcrm.s68450>.
- Wang X, Zhang L, Sun A, et al. *Acinetobacter baumannii* bacteraemia in patients with haematological malignancy: a multicenter retrospective study from the Infection Working Party of Ji-angsu Society of Hematology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36(7):1073–1081. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2895-2>.
- Klyasova GA, Speranskaya LL, Mironova AV, et al. The pathogens causing sepsis in immunocompromized patients: structure and problems of antibiotic resistance. Results of a multi-center cooperative study. *Gematologiya i transfuziologiya.* 2007;52(1):3–18 (In Russ).
- Klyasova GA, Okhmat VA. Antimicrobial therapy. In: Savchenko VG, ed. Algorithms of diagnosing and protocols of treatment of blood system diseases. Moscow: Praktika; 2018:1069–1113 (In Russ).
- Ballouz T, Aridi J, Aff C, et al. Risk factors, clinical presentation, and outcome of *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:156. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00156>.
- Freire MP, de Oliveira Garcia D, Garcia C.P., et al. Bloodstream infection caused by extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in cancer patients: high mortality associated with delayed treatment rather than with the degree of neutropenia. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22:352–358. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.010>.
- Sharqian-Alon L, Gafter-Givili A, Ben-Zvi H, et al. Risk factors for mortality due to *Acinetobacter baumannii* bacteremia in patients with hematological malignancies - a retrospective study. *Leuk Lymphoma.* 2019;60(11):2787–2792. <https://doi.org/10.1080/10428194.2019.1599113>.
- Lee CR, Lee JH, Park M, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:55. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00055>.
- Khrulnova SA, Korobova AG, Fyodorova AV, et al. Detection of acquired carbapenemase genes among *Acinetobacter baumannii* isolated from blood culture in patients with hematological malignancies. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2019;21(1):56–60. (In Russ). <https://doi.org/10.36488/cm.2019.1.56-60>.
- Chung DR, Song JH, Kim SH, et al. High prevalence of multidrug-resistant nonfermenters in hospital-acquired pneumonia in Asia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184:1409–1417. <https://doi.org/10.1164/rccm.201102-0349oc>.
- Shek EA, Sukhorukova MV, Edelstein MV, et al. Antimicrobial resistance, carbapenemase production, and genotypes of nosocomial *Acinetobacter spp.* isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study «MARATHON 2015–2016». *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2019;21(2):171–80 (In Russ). <https://doi.org/10.36488/cm.2019.2.171-180>.
- Strateva T, Sirakov I, Stoeva T, et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: Current status of the problem in four Bulgarian university hospitals (2014–2016). *J Glob Antimicrob Resist.* 2019;16:266–273. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.10.027>.
- Evans BA, Amyes SG. OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27:241–263. <https://doi.org/10.1128/cmr.00117-13>.
- Munoz-Price LS, Namias N, Cleary T, et al. *Acinetobacter baumannii*: association between environmental contamination of patient rooms and occupant status. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013;34(5):517–20. <https://doi.org/10.1086/670209>.
- Morgan DJ, Liang SY, Smith CL, et al. Frequent multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination of gloves, gowns, and hands of healthcare workers. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010;31(7):716–21. <https://doi.org/10.1086/653201>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Seventh Informational Supplement. CLSI document M100-S28. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- Dahdouh E, Gómez-Gil R, Sanz S, et al. A novel mutation in *pmrB* mediates colistin resistance during therapy of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;49(6):727–733. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.01.031>.
- Heras J, Domínguez C, Mata E, et al. GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics.* 2015;16:270. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0703-0>.
- Hunter P.R. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J Clin Microbiol.* 1990;28(9):1903–1905. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.9.1903-1905.1990>.
- Горди́нская Н. А., Сабирова Е. В., Абрамова Н.В. и др. Антибиотикочувствительность и молекулярные механизмы резистентности *Acinetobacter baumannii*, возбудителей раневой ожоговой инфекции. // *Медицинский альманах.* 2015; 5(40):99–101 (In Russ).
- Mayanskiy N, Chebotar I, Alyabieva N, et al. Emergence of the Uncommon Clone ST944/ST78 Carrying *bla*_{CTX-M-48-like} and *bla*_{CTX-M-15-like} Genes Among Carbapenem-Nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in Moscow, Russia. *Microb Drug Resist.* 2017;23(7):864–870. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0302>.
- Alsultan AA, Aboulmagd E, Evans BA, et al. Clonal diversity of *Acinetobacter baumannii* from diabetic patients in Saudi Arabian hospitals. *J Med Microbiol.* 2014;63(11):1460–66. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.079640-0>.

Об авторах

- Светлана Алексеевна Хрульнова** – старший научный сотрудник лаборатории клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии НМИЦ гематологии. +7 (495)-614-92-72, khrulnovas@mail.ru. ORCID: 0000-0002-1127-3333.
- Анастасия Владимировна Федорова** – старший научный сотрудник лаборатории клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии НМИЦ гематологии. +7 (495)-614-92-72, mirmas19@yandex.ru. ORCID: 0000-0003-3919-1150.
- Ирина Николаевна Фролова** – научный сотрудник лаборатории клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии НМИЦ гематологии. +7 (495)-614-92-72, Frolova.i@blood.ru. ORCID: 0000-0001-9308-9259.
- Галина Александровна Клысова** – заведующая лабораторией клинической бактериологии, микологии и антибиотической терапии НМИЦ гематологии. +7 (495)-614-92-72, klyasova.g@blood.ru. ORCID: 0000-0001-5973-5763.

Поступила: 17.04.2020. Принята к печати: 02.07.2020.
Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

About the Authors

- Svetlana A. Khrulnova** – Senior researcher, Laboratory of clinical bacteriology, mycology, and antibiotic treatment National Research Center for Hematology +7 (495)-614-92-72, khrulnovas@mail.ru ORCID: 0000-0002-1127-3333.
- Anastasija V. Fedorova** – Senior researcher, Laboratory of clinical bacteriology, mycology, and antibiotic treatment of National Research Center for Hematology. +7 (495)-614-92-72, mirmas19@yandex.ru. ORCID: 0000-0003-3919-1150.
- Irina N. Frolova** – Researcher, Laboratory of clinical bacteriology, mycology, and antibiotic treatment of National Research Center for Hematology. +7 (495)-614-92-72, Frolova.i@blood.ru. ORCID: 0000-0001-9308-9259.
- Galina A. Klyasova** – Head of Laboratory of clinical bacteriology, mycology, and antibiotic treatment of National Research Center for Hematology. +7 (495)-614-92-72, klyasova.g@blood.ru. ORCID: 0000-0001-5973-5763.

Received: 17.04.2020. Accepted: 02.07.2020.
Creative Commons Attribution CC BY 4.0.