

ACINETOBACTER BAUMANNII bv TRYPTOPHANDESTRUENS bv NOV., ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Е.П. Сиволодский^{1,2}, Л.А. Краева^{1,2}, Д.А. Старкова², Н.В. Михайлов², Г.В. Горелова¹

¹ ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Цель исследования — определить таксономический статус группы атипичных штаммов *Acinetobacter baumannii*, выявить их характеристики и методы, необходимые для идентификации. Объектом исследования были 10 штаммов *A. baumannii* (из них 6 первичных), имеющих одинаковый профиль атипичных признаков. Они были выделены из клинического материала (моча, мокрота) в 2017–2019 гг. в Военно-медицинской академии. В сравнительных исследованиях использовали клинические штаммы типичных *A. baumannii* (n = 36), *Acinetobacter nosocomialis* (n = 14), *Acinetobacter pittii* (n = 9) и 1 штамм *Acinetobacter calcoaceticus*, выделенный из внешней среды. Атипичные штаммы обладали признаками бактерий комплекса *A. calcoaceticus* — *A. baumannii* (АСВ) и были идентифицированы как *A. baumannii*. Утилизацию субстратов в качестве единственных источников углерода изучали на плотной синтетической среде с 0,2% субстрата при инкубации посевов 72 часа при 37°C. Окисление углеводов с кислотообразованием выявляли на среде Хью–Лейфсона и микрометодом. Биотрансформацию ароматических аминокислот осуществляли в жидких и плотных питательных средах по хромогенной реакции. Для генетической характеристики штаммов использовали ген *rpoB*. Амплификацию двух фрагментов гена *rpoB* длиной 940 п. н. и 1210 п. н. проводили методом стандартной полимеразной цепной реакции с использованием праймеров, имеющих описанные ранее последовательности. Продукты амплификации секвенировали по Сэнгеру с использованием BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, США) и капиллярного электрофореза на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, США) с последующим применением методов определения уровней сходства секвенированных фрагментов с последовательностями гена *rpoB* референс-штамма *A. baumannii* ATCC 17978 (GenBank acc. no. CP053098.1). Было установлено, что все штаммы группы атипичных *A. baumannii* имели специфическую совокупность признаков, отличающих их от типичных штаммов *A. baumannii* и других видов комплекса АСВ: наличие биотрансформации L-триптофана (антранилатным путем) и антраниловой кислоты при однозначном отсутствии этих признаков у других бактерий; отсутствие утилизации гиппурата натрия и L-арабинозы при однозначном наличии утилизации у других бактерий; отсутствие утилизации L-триптофана, путресцина, L-орнитина при наличии утилизации у большинства штаммов других видов. Генетический анализ показал, что контрольные штаммы типичных *A. baumannii* имели 99,20–99,21% сходства последовательностей секвенированных фрагментов гена *rpoB* с последовательностями гена *rpoB* референсного штамма. Такие же показатели имели все 10 штаммов атипичных *A. baumannii* (99,20–99,21%). При этом показатели контрольных штаммов других видов достоверно отличались: *A. nosocomialis* — 95,10–95,97%, *A. pittii* — 94,63–94,92%, *A. calcoaceticus* — 93,00%. Следовательно, штаммы атипичных и типичных *A. baumannii* генетически однородны и принадлежат к одному виду. Представленные факты позволяют считать данную группу атипичных штаммов *A. baumannii* новым биоваром. Предлагаем название

Адрес для переписки:

Краева Людмила Александровна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 232-94-85. Факс: 8 (812) 498-09-39.
E-mail: lykraeva@yandex.ru

Contacts:

Lydmila A. Kraeva
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-94-85. Fax: +7 (812) 498-09-39.
E-mail: lykraeva@yandex.ru

Для цитирования:

Сиволодский Е.П., Краева Л.А., Старкова Д.А., Михайлов Н.В.,
Горелова Г.В. *Acinetobacter baumannii* bv *Tryptophandestruens* bv nov.,
выделенный из клинического материала // Инфекция и иммунитет.
2021. Т. 11, № 5. С. 965–972. doi: 10.15789/2220-7619-ABB-1676

Citation:

Sivolodskii E.P., Kraeva L.A., Starkova D.A., Mikhailov N.V., Gorelova G.V.
Acinetobacter baumannii bv *Tryptophandestruens* bv nov. isolated from clinical
samples // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet,
2021, vol. 11, no. 5, pp. 965–972. doi: 10.15789/2220-7619-ABB-1676

новому биовару: *tryptophandestruens* (триптофанразрушающий) (лат. *destruens* — разрушающий). Идентификацию бактерий *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* можно осуществлять в лабораториях любого уровня тестами на биотрансформацию L-триптофана и утилизацию гиппурата натрия.

Ключевые слова: *Acinetobacter baumannii*, биовар *tryptophandestruens*, идентификация, биотрансформация L-триптофана антранилатным путем, гиппурат натрия, антраниловая кислота.

ACINETOBACTER BAUMANNII bv TRYPTOPHANDESTRUENS bv NOV. ISOLATED FROM CLINICAL SAMPLES

Sivolodskii E.P.^{a,b}, Kraeva L.A.^{a,b}, Starkova D.A.^b, Mikhailov N.V.^b, Gorelova G.V.^a

^a Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to determine the taxonomic status of a group consisting of atypical strains of *Acinetobacter baumannii*, outline relevant characteristics and methods necessary for their identification. There were examined 10 strains of *A. baumannii* (6 of them primary comprised) bearing similar profile of atypical features isolated from clinical samples (urine, sputum) in 2017–2019 at the Military Medical Academy. Clinical strains of typical *A. baumannii* (n = 36), *Acinetobacter nosocomialis* (n = 14), *Acinetobacter pittii* (n = 9) and 1 strain of *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from the external environment were used in comparative studies. Atypical strains had the characteristics of *A. calcoaceticus* — *A. baumannii* (ACB) complex bacteria and were identified as *A. baumannii*. The utilization of substrates as the only carbon source was studied on a dense synthetic medium added with 0.2 % substrate during incubation for 72 hours at 37°C. Carbohydrate oxidation coupled to acid formation was detected on the Hugh–Leifson medium by using a micromethod. Aromatic amino acid biotransformation was carried out in liquid and dense nutrient media assessed in chromogenic reaction. The *rpoB* gene was used for strain genetic characterization. Amplification of two 940 and 1210 base pair (bp)-long fragments from the *rpoB* gene was performed by the routine polymerase chain reaction using primers with previously described sequences. Amplification products were sequenced by Sanger using Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA) and capillary electrophoresis on an automatic sequencer ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, USA), followed by using methods for determining the similarity levels of sequenced fragments with the *rpoB* gene sequences of the reference strain *A. baumannii* ATCC 17978 (GenBank accession no. CP053098.1). It was found that all strains belonging to atypical *A. baumannii* spp. had a specific set of features that distinguish them from typical strains of *A. baumannii* as well as other types of the ACB complex: detected biotransformation of L-tryptophan (via anthranilate pathway) and anthranilic acid under unambiguous lack of such signs in other bacteria; lack of utilized sodium hippurate and L-arabinose being unambiguously evident in other bacteria; lack of utilized L-tryptophan, putrescine, L-ornithine being utilized in the majority of strains of belonging to other bacterial species. Genetic analysis showed that the control strains of typical *A. baumannii* displayed 99.20–99.21% similarity within the sequenced fragments of the *rpoB* gene with those from the *rpoB* gene of the reference strain. All 10 strains of atypical *A. baumannii* had similar features (99.20–99.21%). At the same time, parameters of control strains from other bacterial species significantly differed: *A. nosocomialis* (95.10–95.97%), *A. pittii* (94.63–94.92%), *A. calcoaceticus* (93.00%). Hence, the strains of atypical and typical *A. baumannii* are genetically homogeneous and belong to the same species. The data presented allow us to consider this group of atypical *A. baumannii* strains as a new biovar. We propose the name for this new biovar — *tryptophandestruens* (tryptophan-destroying) stemming from the Latin word *destruens* — destroying. Identification of *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* bacteria can be carried out in laboratory of any level by using tests for L-tryptophan biotransformation as well as sodium hippurate utilization.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, biovar *tryptophandestruens*, identification, biotransformation of L-tryptophan by anthranilate, sodium hippurate, Anthranilic acid.

Введение

В период 2017–2019 гг. в Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова были выделены из клинического материала 10 штаммов атипичных бактерий рода *Acinetobacter*, имеющих одинаковый фенотипический профиль. Группа атипичных бактерий принадлежала по фенотипическим признакам к бактериям комплекса *Acinetobacter calcoaceticus* — *Acinetobacter baumannii* (ACB), но четко отличалась по ряду признаков от известных видов этого комплекса.

Методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) все штаммы группы атипичных бактерий были идентифицированы как *A. baumannii*. Актуальность и приоритет бактерий комплекса ACB как возбудителей раневой инфекции и заболеваний, связанных с оказанием медицинской помощи, определили необходимость дальнейших исследований по уточнению систематического положения атипичных бактерий и методов их идентификации.

Цель исследования — определить таксономический статус группы атипичных штаммов *A. baumannii*, выявить их характеристики и предложить методы, необходимые для их идентификации.

Материалы и методы

Штаммы бактерий. Объектом исследования выбраны 10 штаммов группы атипичных *A. baumannii*. Все штаммы были выделены в 2017–2019 гг. в бактериологической лаборатории Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова. Шесть штаммов были первичными (№ 15107, 14638, 5678, 5868, 5870, 5871), четыре — повторными (№ 5108, 6623, 6624, 7107); из них 6 были изолированы из мокроты, 4 — из мочи. В сравнительных исследованиях использовались клинические штаммы *A. baumannii* (n = 36), *A. pittii* (n = 9), *A. nosocomialis* (n = 14) и 1 штамм *A. calcoaceticus*, выделенный из внешней среды. В генетических исследованиях изучались 10 штаммов атипичных *A. baumannii* и в контроле по 2 штамма *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, 1 штамм *A. calcoaceticus*. Видовая принадлежность всех штаммов была подтверждена методом MALDI-ToF MS в НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Все указанные штаммы находятся в рабочей коллекции культур Е.П. Сиволодского на кафедре микробиологии Военно-медицинской академии.

Питательные среды и реактивы. Для культивирования бактерий использовали колумбийский агар (НИЦФ, Санкт-Петербург). Гемолитическую активность бактерий выявляли на Колумбийском агаре с 5% крови барана, желатиназу — в мясопептонном бульоне с 12% желатина.

Утилизацию субстратов в качестве единственного источника углерода осуществляли на минимальном солевом агаре (г/л): NH_4Cl — 5; NH_4NO_3 — 1; Na_2SO_4 — 2; K_2HPO_4 — 3; KH_2PO_4 — 1; MgSO_4 — 0,1; агар — 15; 1,6%-ный водный раствор бромтимолового синего — 4 мл, дистиллированная вода — 1 л, pH = 7,2; стерилизация при 121°C — 20 мин. Каждый субстрат вносили по 0,1 г в отдельную колбу с 50 мл стерильной горячей среды, устанавливали pH = 7,2; в одну колбу субстрат не вносили (контроль среды), разливали в стерильные чашки Петри. Использовали субстраты: L-триптофан L-орнитина гидрохлорид, L-арабиноза, путресцина дигидрохлорид, гиппурат нартия, антралиловая кислота (Merck, Германия).

Нитратредуктазу бактерий определяли на питательной среде с 0,1% KNO_3 . Состав среды: пептон ферментативный — 0,5 г; NaCl — 0,5 г; KNO_3 — 0,1 г; вода дистиллированная — 100 мл; стерилизация при 121°C 20 мин. Для выявления биотрансформации ароматических

аминокислот применяли жидкие и плотные питательные среды. Состав жидкой среды: пептон сухой ферментативный — 1 г; натрий хлорид — 0,5 г; L-триптофан — 0,5 г; вода дистиллированная — 100 мл, pH = 7,0; стерилизация при 121°C 20 мин. Другие аминокислоты использовали в составе среды по 0,5%, антралиловую кислоту — 0,3%. Плотную питательную среду готовили следующим образом: в колбу с 200 мл расплавленного стерильного колумбийского агара вносили 0,2 г L-триптофана, кипятили до его растворения, добавляли 1 мл 10%-ного водного раствора FeCl_3 и 1N раствор NaOH до pH = 7,0; разливали в стерильные чашки Петри. Другие аминокислоты вносили в состав среды в концентрации 0,1%.

Биохимические тесты на лизиндекарбоксилазу, орнитиндекарбоксилазу, аргининдегидролазу, уреазу, продукцию индола осуществляли используя среды и реактивы микрообъемной тест-системы «Рапид-Энтеро» (НИИЭМ имени Пастера, Санкт-Петербург). Для проведения ОФ-теста с глюкозой и окисления углеводов использовали среду Хью–Лейфсона, а также «Набор для определения ферментации и окисления глюкозы (ОФ-теста) пероксид-водородным микрообъемным методом» (НИИЭМ имени Пастера, Санкт-Петербург).

Методика постановки тестов. Отношение бактерий к окраске по Граму выявляли тестом «тяжа» с 3% раствором КОН и/или микроскопией. Рост бактерий при 26°C, 37°C, 41°C, 44°C определяли аэробным культивированием посевов суточных бульонных культур на колумбийском агаре с учетом через 48 ч. Гемолитическую активность бактерий исследовали на агаре с кровью барана при 37°C с учетом через 24 ч. Желатиназу выявляли на мясопептонном агаре с 12% желатина при 37°C с учетом через 5 суток. Наличие каталазы устанавливали тестом с 3% раствором пероксида водорода. Цитохромоксидазу бактерий выявляли тестом с 1%-ным водным раствором тетраметилпарафенилендиамина по появлению синей окраски бактерий в течение 20 с.

Методика определения нитратредуктазы бактерий. Использовали питательную среду с 0,1% KNO_3 , указанную выше. По 0,1 мл среды вносили в лунки полимерного планшета, затем засеивали в лунки по полной петле суточной агаровой культуры исследуемых бактерий, одну из лунок не засеивали (контроль среды). Посевы инкубировали при 37°C аэробно 3 часа, после чего вносили в каждую лунку реактивы на нитриты — 0,05 мл 0,2% водного раствора риванола, затем 0,05 мл 12% раствора соляной кислоты (приготовленной из концентрированной 36,5% соляной кислоты). Мгновенное появление красной окраски среды в лунке с посевом ука-

звало на наличие нитратредуктазы бактерий, желтая окраска указывала на отсутствие нитратредуктазы, в контрольной среде без посева сохранялась желтая окраска реактива.

Методика утилизации субстратов в качестве единственного источника углерода [1]. Суточные агаровые культуры бактерий по полной петле (диаметром 2 мм) суспендировали в 0,2 мл стерильного 0,85%-ного раствора хлорида натрия в лунках полимерного планшета. Чашки сред с субстратами (состав сред указан выше) и контрольную среду без субстрата разделяли на 8 секторов и маркировали по номерам штаммов. Засевали исследуемые культуры по полной петле взвеси из лунки радиальным штрихом на сектор чашки с субстратом и чашки без субстрата (контроль). Посевы аэробно выращивали при 37°C в течение 3 суток, просматривая ежедневно. Положительным результатом утилизации субстрата считали наличие четко выраженного газона бактерий по следу посева при отсутствии роста бактерий на контрольной среде без субстрата.

Методика биотрансформации ароматических аминокислот бактериями. В три лунки полимерного планшета вносили по 0,1 мл жидкой питательной среды с аминокислотой (состав сред указан выше), в две лунки засевали по полной петле суточной агаровой культуры исследуемого штамма, одну лунку со средой не засевали (контроль среды). Инкубировали посевы аэробно при 37°C в течение 3 ч (среду с антралиновой кислотой 5 ч), затем добавляли в одну лунку с посевом реактив — 0,05 мл водного 10% раствора FeCl₃; во вторую лунку с посевом и контрольную лунку вносили реактив через 18–24 ч инкубации. Положительным результатом биотрансформации считали появление красно-бурой, бурой, темно-бурой окраски среды (из L-триптофана, L-тирозина), зеленой окраски (из L-фенилаланина) или черной окраски (из антралиновой кислоты). При использовании плотных питательных сред с ароматическими аминокислотами (состав сред указан выше) предварительно суспендировали по полной петле суточных агаровых культур в 0,2 мл 0,85% раствора NaCl в лунках полимерного планшета. Засевали исследуемые культуры по полной петле взвеси бактерий из лунки радиальным штрихом на сектора чашек с субстратом и без субстрата (контроль). Положительным результатом биотрансформации субстрата считали появление четко выраженного изменения окраски газона бактерий и/или окружающей его питательной среды при отсутствии изменения окраски контрольной среды.

Идентификация видов бактерий методом MALDI-ToF масс-спектрометрии. Использовали настольный MALI-ToF масс-спектрометр Microflex с базой данных MALDI Biotyper

(Bruker Daltonics Inc., Германия) в соответствии с инструкцией по применению.

Молекулярно-генетические исследования. Идентификацию 17 штаммов *Acinetobacter* spp. проводили с помощью полимеразной цепной реакции для детекции участка видоспецифического гена *rpoB* с использованием прямых *rpoB*-F1(CCTTCATGACCTGGAAYGGNTA), *rpoB*-F2(CATGACCTGGAACGGCTAYAAAYTAYGA) и обратных *rpoB*-R1(TCCAGGATCTGNCCNACRTTCAT), *rpoB*-R2(TGGTTCAGCTTCAGCATRTACATRTA) праймеров согласно условиям, описанным ранее [11]. Реакцию секвенирования (по Сэнгеру) полученных продуктов амплификации (940 п. н. и 1210 п. н.) проводили с использованием BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя. Капиллярный электрофорез выполняли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, США). Обработка хроматограмм секвенирования и выравнивание сиквенсов на референсный геном *A. baumannii* ATCC 17978 (acc. no. CP053098.1) были выполнены с использованием пакета программ Unipro UGENE 1.12 (Россия). Межвидовое разнообразие оценивали с использованием сходства полученных последовательностей участка гена *rpoB* и штаммов различных видов *Acinetobacter* в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

Результаты

Сравнительное изучение 10 штаммов группы атипичных *A. baumannii* и 36 штаммов типичных *A. baumannii* с использованием таксономических тестов для ацинетобактеров комплекса ACB [7, 10] выявило совпадение следующих фенотипических признаков. Все штаммы являются неподвижными грамотрицательными коккобактериями. На колумбийском агаре растут при 26°C, 37°C, 41°C, 44°C, формируя круглые, выпуклые, гладкие колонии светлосерой окраски диаметром 1–2 мм с четкими краями. На крованом агаре с кровью барана растут без гемолиза. Оксидазоотрицательные, каталазоположительные, не имеют нитратредуктазы и желатиназы. Не ферментируют глюкозу и другие углеводы.

Окисляют с образованием кислоты D-глюкозу, D-галактозу, D-маннозу, D-ксилозу, D-рамнозу, D-лактозу, D-мелибиозу, этанол. Не окисляют D-фруктозу, L-сорбозу, D-сахарозу, D-мальтозу, D-мелицитозу, D-трегалозу, D-раффинозу, маннит, сорбит, дульцит, m-инозит, глицерин. Не образуют индол, сероводород; не имеют уреазы, лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы; вариабельны по аргининдегидролазе.

Утилизируют на синтетической среде в качестве единственного источника углерода ацетат, цитрат, этанол, ксилозу, пируват натрия, L-гистидин, L-тирозин, L-фенилаланин, L-глутаминовую кислоту, L-глутамат, L-аланин, L-аспарагин. Не утилизируют D-глюкозу, D-фруктозу, D-галактозу, D-сахарозу, D-лактозу, D-маннозу, D-мальтозу, D-мелицитозу, D-мелибиозу, D-трегалозу, L-рамнозу, D-раффинозу, маннит, адонит, сорбит, дульцит, инозит, глицерин, крахмал, глицин, антраниловую кислоту, L-метионин, L-лизин, L-серин, L-валин, L-треонин, L-изолейцин, L-цистеин. Варибельная утилизация: L-аргинин, L-лейцин.

Бактерии группы атипичных *A. baumannii* отличались от типичных штаммов *A. baumannii* по многим признакам: наличием биотрансформации L-триптофана и антраниловой кислоты; отсутствием утилизации L-триптофана, гиппурата натрия, L-арабинозы, L-орнитина, путресцина. В связи с этим были изучены по указанным отличительным признакам бактерии других видов, входящих в комплекс АСВ. Было установлено, что по признакам биотрансформации L-триптофана и антраниловой кислоты все штаммы группы атипичных *A. baumannii* были однозначно положительными, а все штаммы комплекса АСВ однозначно отрицательными; по утилизации гиппурата натрия и L-арабинозы все штаммы группы атипичных *A. baumannii* были однозначно отрицательными, а все штаммы комплекса АСВ однозначно положительными; по утилизации L-триптофана, L-орнитина, путресцина штаммы группы атипичных *A. baumannii* были однозначно отрицательными, штаммы комплекса АСВ — в большинстве положительными (табл. 1).

Неожиданно нами была обнаружена особенность процесса биотрансформации L-трип-

тофана штаммами атипичных *A. baumannii*, которая состояла в отсутствии сопряженности дезаминирования L-триптофана и L-фенилаланина. Известно, что у энтеробактерий (*Proteus*, *Morganella*) трансформация L-триптофана путем окислительного дезаминирования дегидрогеназами всегда происходит сопряженно с L-фенилаланином. Поэтому были проведены дополнительные исследования с бактериями комплекса АСВ и *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii* (табл. 2). Было установлено, что биотрансформация L-триптофана протекает замедленно (положительная реакция только через 18 ч культивирования в жидкой питательной среде микрометодом), продукты реакции после добавления $FeCl_3$ имеют темно-коричневую окраску; отмечена сопряженная положительная реакция только с антраниловой кислотой через 4–5 ч культивирования (продукты реакции черной окраски). На плотной питательной среде с L-триптофаном положительная реакция в виде зоны темно-коричневой окраски среды через 24–48 ч; на плотной питательной среде с антранилатом зона черной окраски среды четко выражена через 24 ч. В контроле все штаммы *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *M. morganii* осуществляли биотрансформацию L-триптофана быстро, через 2–3 ч культивирования микрометодом в жидкой питательной среде, продукт реакции имел характерную красно-бурую или бурую окраску; сопряженно протекала биотрансформация L-фенилаланина (также быстро — 2–3 ч), продукт реакции имел характерную зеленую окраску; трансформации антраниловой кислоты не наблюдалось. Все штаммы типичных *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. calcoaceticus* не трансформировали L-триптофан, L-фенилаланин, антраниловую кислоту, L-тирозин (табл. 2).

Таблица 1. Фенотипические особенности *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* в сравнении с фенотипическими особенностями видов комплекса *A. calcoaceticus* — *A. baumannii*

Table 1. Phenotypic properties of *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* vs. species of the *A. calcoaceticus* — *A. baumannii* complex

Фенотипические признаки Phenotypic features	<i>A. baumannii</i> bv. <i>tryptophan-</i> <i>destruens</i> (n = 10)	<i>A. baumannii</i> (n = 36)	<i>A. pittii</i> (n = 9)	<i>A. nosocomialis</i> (n = 14)	<i>A. calcoaceticus</i> (n = 1)
Биотрансформация/Biotransformation					
L-Триптофан/L-Tryptophan	+	–	–	–	–
Антраниловая кислота/Anthranilic acid	+	–	–	–	–
Утилизация/Utilization					
L-Триптофан/L-Tryptophan	–**	V(28)*	V(7)	V(8)	+
Гиппурат натрия/Sodium hippurate	–	+	+	+	+
L-Арабиноза/L-Arabinose	–	+	+	+	+
Путресцин/Putrescine	–	V(27)	+	V(13)	+
L-Орнитин/L-Ornithine	–	V(28)	+	V(12)	+

Примечание. «+» — все штаммы положительные; «–» — все штаммы отрицательные; *V () — варибельно (число положительных штаммов).
Note. «+» — all strains are positive; «–» — all strains are negative; *V () — variable (number of positive strains).

Исследование методом MALDI-ToF масс-спектрометрии выявило принадлежность всех штаммов группы атипичных *A. baumannii* к виду *A. baumannii* с показателями score 2,265–2,553.

Генетический анализ показал, что контрольные штаммы типичных *A. baumannii* имели

99,20–99,21% сходства последовательностей секвенированных фрагментов гена *rpoB* с последовательностями гена *rpoB* референсного штамма *A. baumannii* ATCC 17978 (GenBank acc. no. CP053098.1). Такие же показатели имели все 10 штаммов атипичных *A. baumannii* (99,20–

Таблица 2. Особенности биотрансформации ароматических аминокислот *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* в жидкой питательной среде*

Table 2. Features of aromatic amino acid biotransformation by *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* in a liquid nutrient medium*

Аминокислоты Amino acids	Время культивирования до получения положительного результата с продуктами трансформации аминокислот Timeframe cell culture until obtaining a positive result with products of amino acid transformation							
	Виды бактерий**/Species of bacteria**							
	1	2	3	4	5	6	7	8
L-Триптофан/L-Tryptophan	+(18)***	–	–	–	–	+(2)	+(2)	+(1)
L-Фенилаланин/L-Phenylalanine	–	–	–	–	–	+(3)	+(3)	+(2)
Антралиловая кислота/Anthranilic acid	+(4–5)	–	–	–	–	–	–	–
L-Тирозин/L-Tyrosine	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание. * — по методике раздела «Методы». ** — виды бактерий: 1 — *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* (n = 10); 2 — *A. baumannii* (n = 10); 3 — *A. pittii* (n = 9); 4 — *A. nosocomialis* (n = 14); 5 — *A. calcoaceticus* (n = 1); 6 — *Morganella morganii* (n = 2); 7 — *Proteus vulgaris* (n = 2); 8 — *Proteus mirabilis* (n = 2). ***+(18) — положительный результат (через 18 ч культивирования бактерий); — отрицательный результат через 24 ч культивирования.

Note. * — according to the section “Methods”. ** — species of bacteria: 1 — *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* (n = 10); 2 — *A. baumannii* (n = 10); 3 — *A. pittii* (n = 9); 4 — *A. nosocomialis* (n = 14); 5 — *A. calcoaceticus* (n = 1); 6 — *Morganella morganii* (n = 2); 7 — *Proteus vulgaris* (n = 2); 8 — *Proteus mirabilis* (n = 2). ***+(18) — positive result (18 hour-bacterial culture); — negative result after 24 hour-bacterial culture.

Таблица 3. Генетическая характеристика *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens*

Table 3. Genetic characteristics of *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens*

Вид, штамм (<i>rpoB</i> , часть гена)* Species, strain (<i>rpoB</i> , partial gene)*	Уровень сходства секвенированных последовательностей с участком гена <i>rpoB</i> <i>A. baumannii</i> ATCC 17978 CP053098.1** Similarity levels for sequenced <i>rpoB</i> gene fragments of <i>A. baumannii</i> ATCC 17978 CP053098.1**	Результат генетической идентификации Result of genetic identification
Штаммы <i>A. baumannii</i> bv. <i>tryptophandestruens</i> Strains of <i>A. baumannii</i> bv. <i>tryptophandestruens</i>		
<i>A. baumannii</i> 15108	99,20%	<i>A. baumannii</i>
<i>A. baumannii</i> 15107	99,21%	<i>A. baumannii</i>
<i>A. baumannii</i> 14636	99,21%	<i>A. baumannii</i>
<i>A. baumannii</i> 5678	99,21%	<i>A. baumannii</i>
<i>A. baumannii</i> 5868	99,21%	<i>A. baumannii</i>
<i>A. baumannii</i> 5870	99,21%	<i>A. baumannii</i>
<i>A. baumannii</i> 5871	99,21%	<i>A. baumannii</i>
<i>A. baumannii</i> 6623	99,33%	<i>A. baumannii</i>
<i>A. baumannii</i> 7107	99,21%	<i>A. baumannii</i>
<i>A. baumannii</i> 6624	99,21%	<i>A. baumannii</i>
Контрольные штаммы комплекса <i>A. calcoaceticus</i> — <i>A. baumannii</i> Control strains of the <i>A. calcoaceticus</i> — <i>A. baumannii</i> complex		
<i>A. nosocomialis</i> 5903	95,97%	
<i>A. nosocomialis</i> 6033	95,10%	
<i>A. pittii</i> 6107	94,92%	
<i>A. pittii</i> 6021	94,63%	
<i>A. baumannii</i> 4042	99,20%	<i>A. baumannii</i>
<i>A. baumannii</i> 7151	99,21%	<i>A. baumannii</i>
<i>A. calcoaceticus</i> 10	93,00%	

Примечание. * — секвенированные фрагменты гена *rpoB* длиной 940 п. н. и 1210 п. н.; ** — по Wang J. и соавт. [11].

Note. * — sequenced 940 bp- and 1210 bp-long *rpoB* gene fragments; ** — according to Wang J. et al. [11].

99,21%) (GenBank acc. no. MW404310). При этом показатели контрольных штаммов других видов комплекса АСВ достоверно отличались: *A. nosocomialis* 95,10–95,97%, *A. pittii* 94,63–94,92%, *A. calcoaceticus* 93,00% (табл. 3) (GenBank acc. no. MW401640, MW401641, MW401642).

Представленные факты позволяют считать, что штаммы атипичных и типичных *A. baumannii* генетически однородны и принадлежат к одному виду.

Обсуждение

На основании генетического анализа секвенированных фрагментов гена *rpoB*, исследованный методом MALDI-ToF масс-спектрометрии, характеристики метаболических и физиологических признаков таксономическими тестами для рода *Acinetobacter* подтверждено, что все клинические штаммы группы атипичных *A. baumannii* относятся к виду *A. baumannii*. Эти штаммы имеют одинаковую специфическую совокупность независимых фенотипических признаков, отличающих их от типичных штаммов *A. baumannii* и бактерий других видов, входящих в комплекс АСВ, а именно: наличие биотрансформации L-триптофана (антранилатным путем) и антралиновой кислоты при однозначно отрицательных результатах у штаммов других видов; отсутствие утилизации гиппурата натрия и L-арабинозы при однозначной утилизации штаммами других видов; отсутствие утилизации L-триптофана, L-орнитина, путресцина при утилизации большинством штаммов других видов. В связи с отсутствием у нас для исследования штаммов новых видов ацинетобактеров комплекса АСВ *Acinetobacter seifertii* [8], *Acinetobacter lactucae* [9], *Acinetobacter dijkshoorniae* (более поздний гетеротипический синоним *A. lactucae*) [3] проводили сравнительный анализ их признаков с признаками атипичных *A. baumannii* по источникам научной информации. Только у бактерий *A. seifertii* был выявлен один общий признак с атипичными штаммами *A. baumannii* — однозначное отсутствие утилизации L-арабинозы [8].

Мы считаем, что данная группа атипичных штаммов *A. baumannii* представляет новый биовар на основании наличия у них специфической совокупности многих независимых фенотипических признаков, указанных выше; стабильности этих признаков в условиях организма

человека (у повторных штаммов) и во внешней среде (при хранении и изучении штаммов в лаборатории); длительной циркуляции бактерий в клиниках. Предлагаем название новому биовару *tryptophandestruens* (триптофанразрушающий), от лат. слова *destruens* — «разрушающий». Следует отметить, что у бактерий *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* нами был выявлен антранилатный путь аэробной биотрансформации L-триптофана. Ранее, в 2003 г., был обнаружен антранилатный путь расщепления L-триптофана до антранилата у бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* [5]. Недавно было обнаружено антиплечное действие L-триптофана и антранилата на микробные биопленки. Было установлено, что триптофан подавляет экспрессию Quorum-Sensing-ассоциированных генов *lasR*, *lasB*, *lasI* бактерий *P. aeruginosa* [4]. Обе изоформы триптофана ингибировали образование биопленки *P. aeruginosa* [2]. Антранилаты подавляли развитие биопленок у бактерий *P. aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Vibrio vulnificus*. Эффективность ингибирования биопленки антранилатами была выше, чем у триптофана [6]. Учитывая приведенные сведения, можно предполагать, что бактерии *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens*, разрушающие L-триптофан и антранилат, могут способствовать сохранению микробных биопленок и потенциально имеют повышенную лекарственную резистентность.

Заключение

Полученные результаты и их анализ позволяют считать описанную выше группу атипичных штаммов *A. baumannii* новым биоваром. Предложено название для нового биовара *tryptophandestruens* (триптофанразрушающий), от слова *destruens* (лат.) — «разрушающий». Идентификацию бактерий *A. baumannii* bv. *tryptophandestruens* можно осуществлять в лабораториях любого уровня тестами на биотрансформацию L-триптофана и утилизацию гиппурата натрия.

Благодарности

Авторы благодарят врачей-бактериологов Богословскую С.П. и Мельникову Е.В. (Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова) за клинические штаммы бактерий *Acinetobacter* spp., предоставленные для исследования.

Список литературы/References

1. Сиволодский Е.П., Фрейлихман О.А. Генетическая и фенотипическая характеристика изолятов *Klebsiella michiganensis* // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 648–654. [Sivolodskii T.P., Freylikhman O.A. Genetic and phenotypic characteristics of *Klebsiella michiganensis*. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 648–654. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-648-654

2. Brandenburg K.S., Rodriguez K.J., McAnulty J.F., Murphy C.J., Abbott N.L., Schurr M.J., Czuprynski C. Tryptophan inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, vol. 57, no. 4, pp. 1921–1925. doi: 10.1128/AAC.00007-13
3. Cosgaya C., Mari-Almirall M., Van Assche A., Fernandez-Orhn D., Mosqueda N., Telli M., Huys G., Higginns P., Seifert H., Lievens B., Roce I., Vila J. *Acinetobacter dijkshoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus* — *Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2016, vol. 66, pp. 4105–4111. doi: 10.1099/ijsem.0.001318
4. Chakraborty P., Daware A.V., Kumari M., Chatterjee A., Bhattacharyya D., Mitra G., Akhter Y., Bhattacharjee S., Ttbedi P. Free tryptophan residues inhibit quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa*: a potential approach to inhibit the development of microbial biofilm. *Arch. Microbiol.*, 2018, vol. 200, no. 10, pp. 1419–1425. doi: 10.1007/s00203-018-1557-4
5. Kurnasov O., Jablonsky L., Polanuy B., Dorrestein P., Bergley T., Osterman A. Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel kynurenine formamidase. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2003, vol. 227, no. 2, pp. 219–227. doi: 10.1016/s0378-1097(03)00684-0
6. Li X.H., Kim S.K., Lee J.H. Anti-biofilm effects of anthranilate on a range of bacteria. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, no. 1: 8604. doi: 10.1038/s41598-017-06540-1
7. Nemes A., Krisova I., Maixerova M., van der Reijden T.J.K., Deschaght P., Passet V., Vanechoutte M., Brisse S., Dijkshoorn L. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus* — *Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13 TU). *Res. Microbiol.*, 2011, vol. 162, no. 2, pp. 393–404. doi: 10.1016/j.resmic.2011.02.006
8. Nemes A., Krisova I., Maixnerova M., Sedo O., Brisse S., Higgins P.G. *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of *Acinetobacter calcoaceticus* — *Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2015, vol. 65, pp. 934–942. doi: 10.1099/ijse.0.000043
9. Rooney A.P., Dunlap C.A., Flor-Weiler L.B. *Acinetobacter lactucae* sp. nov., isolated from iceberg lettuce (*Asteraceae*: *Lactuca sativa*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2016, vol. 66, no. 9, pp. 3566–3572. doi: 10.1099/ijsem.0.001234
10. Vijayakumar S., Biswas I., Veerarayaven B. Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: an update. *Future Sci. OA*, 2019, vol. 5, no. 6: FSO395. doi: 10.2144/foa-2018-0127
11. Wang J., Ruan Z., Feng Y., Fu Y., Jiang Y., Weng H., Yu Y. Species distribution of clinical *Acinetobacter* isolates revealed by different identification techniques. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 8: e104882. doi: 10.1371/journal.pone.0104882

Авторы:

Сиволодский Е.П., д.м.н., профессор кафедры микробиологии ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ; старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических технологий ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Краева Л.А., д.м.н., зав. лабораторией медицинской бактериологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера; профессор кафедры микробиологии ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия;

Старкова Д.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории идентификации патогенов, научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Михайлов Н.В., к.м.н., старший научный сотрудник отдела новых технологий ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Горелова Г.В., зав. лабораторией бактериологии Центральной клинико-диагностической лаборатории ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Sivolodskii E.P., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Microbiology, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg; Senior Researcher, Laboratory of Molecular and Biological Technologies, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Kraeva L.A., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Medical Bacteriology, St. Petersburg Pasteur Institute; Professor of the Department of Microbiology, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation;

Starkova D.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for Identification of Pathogens, Researcher of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Mikhailov N.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of New Technologies, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Gorelova G.V., Head of the Laboratory of Bacteriology, Central Clinical Diagnostic Laboratory, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation.