

Особенности штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, вызывающих госпитальные инфекции у пациентов хирургических отделений ФНЦТИО им. В.И. Шумакова

О.Л. Воронина¹, М.С. Кунда¹, Л.Р. Аветисян¹, М.Ю. Чернуха¹,
Н.И. Габриэлян², И.А. Шагинян¹, В.Г. Лунин¹

¹ ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития», Москва, Россия

² ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова», Москва, Россия

Изучены причины длительной циркуляции штаммов *Pseudomonas aeruginosa* определенного генотипа в отделениях интенсивной терапии ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова. MLST показало, что ведущим генотипом является ST 235. Штаммы этого генотипа характеризует наличие в составе хромосомы мобильных интегров I класса с кассетами генов *bla*GES5 и *aad*A6, определяющих множественную устойчивость к антибиотикам. Интегроны отличаются от обнаруженных ранее у штаммов ST 235 в других лечебных учреждениях. Штаммы *P. aeruginosa* генотипа 446 близкородственны токсигенному штамму PA-103. Штаммы ST 446, 598 и 966, а

также большинство штаммов неферментирующих грамотрицательных бактерий, идентифицированных на основе фено- и генотипирования как *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* и *Oceanobacillus* spp., содержат функциональную платформу интегрона и могут быть потенциальными акцепторами генов, обеспечивающих адаптацию в стационаре. Показано, что штамм *P. aeruginosa*, выделенный из системы водоснабжения, не является возбудителем госпитальных инфекций у пациентов.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, MLST, генотип, интегрон I класса, множественная устойчивость.

Properties of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Causing Nosocomial Infections in Surgical Wards in Federal Scientific Center of Transplantology and Bioartificial Organs

O.L. Voronina¹, M.S. Kunda¹, L.R. Avetisyan¹, M.Yu. Chernukha¹, N.I. Gabrielyan²,
I.A. Shaginyan¹, V.G. Lunin¹

¹ Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

² Federal Scientific Center of Transplantology and Bioartificial Organs named after V.I. Shumakov, Moscow, Russia

Pseudomonas aeruginosa is the opportunistic microorganism dominating in intensive care units. The present research has been devoted to studying of the causes of

long-lasting circulation of certain genotype of *P. aeruginosa* strains in Federal Scientific Center of Transplantology and Bioartificial Organs. MLST has shown that a leading genotype is ST 235. The strains of this genotype are characterized by the presence of chromosomal mobile integrons class I with gene cassette *bla*GES5 and *aad*A6 determining multidrug resistance. These integrons differ from the integrons previously detected in strains of ST

Контактный адрес:

Ольга Львовна Воронина
123098 Москва, ул. Гамалеи, 18, ФГБУ «НИИЭМ
им. Н.Ф. Гамалеи» Минздравсоцразвития России

235 in other medical institutions. *P. aeruginosa* strains of genotype 446 are closely related to the toxigenic strain PA-103. Strains of ST 446, 598 and 966, and the majority of the strains of the nonfermentative bacilli, identified by pheno- and genotyping as *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Oceanobacillus spp.*, contain a functional integron platform and can be poten-

Внутрибольничные, ятрогенные и оппортунистические инфекции осложняют лечение больных в стационарах. Основную массу таких инфекций вызывают условно-патогенные микроорганизмы. К ним относятся: стафилококки, стрептококки, энтерококки, синегнойная палочка, протей, клебсиеллы, кишечная палочка, сальмонеллы, энтеробактер, серрации, бактероиды, клостридии, кандиды и другие микроорганизмы [1]. *Pseudomonas aeruginosa*, являясь ведущим условно-патогенным микроорганизмом в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), тяжело поддается элиминации, благодаря способности к быстрой аккумуляции молекулярных механизмов обеспечения антибиотикорезистентности. Чаще всего множественная устойчивость к антибиотикам у *P. aeruginosa* определяется наличием генов β -лактамаз расширенного спектра (extended-spectrum β -lactamases, ESBLs), разнообразие которых, по данным Bush K. & Jacoby G.A., достигло 17 групп [2]. Первоначально гены этих ферментов выявляли в транспозонах Tn1213, Tn4176 [3], затем в интегронах, как самостоятельных конструкциях, так и в интегронах в составе транспозона Tn5393C [4]. Сама структура перечисленных мобильных элементов позволяет встраивать кассеты генов и обмениваться ими между геномами микроорганизмов, представляющих внутрибольничную среду обитания. Проводимые в течение нескольких лет эпидемиологические наблюдения в ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова позволили собрать большую выборку штаммов условно-патогенных микроорганизмов. Выявлению молекулярно-генетических особенностей штаммов *P. aeruginosa*, обеспечивающих им длительную циркуляцию в стационаре, посвящено настоящее исследование.

Материал и методы

В работе использовали клинические изоляты *P. aeruginosa* и других неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных как от больных, так и из смывов с объектов внутрибольничной среды в отделениях ФГУ ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова (ФНЦТИО им. акад.

tial acceptors of the genes providing adaptation in a hospital. It is shown that the *P. aeruginosa* strain, allocated from water supply system, is not the agent of hospital infections at patients.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, MLST, genotype, integron class I, multidrug resistance.

В.И. Шумакова) в 2006–2010 гг., а также 2 коллекционных штамма *P. aeruginosa*: GIMC5010:PA-103 (ATCC29260; CIP102967, BCRC12902), продуцирующий экзотоксин А, и GIMC5011:PA-928, чувствительный к большинству антибиотиков.

Изоляты первоначально идентифицировали с помощью биохимических тестов Api 20 NE (bioMerieux, Франция). Определение профиля антибиотикорезистентности изолятов *P. aeruginosa* проводили на агаре Мюллера–Хинтона (HiMedia, Индия) диско-диффузионным методом в соответствии с МУК 4.2.1890-04 [5]; использовали антимикробные препараты производства HiMedia (Индия) и ФГУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Роспотребнадзора (табл. 1).

Тотальную ДНК бактерий выделяли с помощью набора «DNA-Extra-Sorb» (лаб. молекулярной диагностики и генно-инженерных конструкций НИИ СБ РАСХН).

Мультилокусное секвенирование (Multilocus sequence typing, MLST) штаммов *P. aeruginosa* выполняли по методике В. Curran et al. [6] с нашими модификациями и дополнительно спланированными праймерами (табл. 2).

Определение видовой принадлежности культур микроорганизмов других таксономических групп проводили на основе амплификации и секвенирования гена 16S рибосомальной РНК (16S rDNA, см. табл. 2).

Выявление генов интеграз 3 классов на основе ПЦР и секвенирования осуществляли по ранее опубликованной методике с нашими модификациями [7] (см. табл. 2).

Для амплификации интегронов использовали несколько пар праймеров из следующего перечня: intM1-U [7], HS286 [8], 5'-cs, 3'-cs [9], orf5-rev [10], orfDF 5' (см. табл. 2). Для секвенирования внутренних областей интегронов планировали праймеры на основе выявленных генов β -лактамазы (*bla*), транспозазы (*tnpA*), аминогликозид-аденилилтрансферазы (*aad*) (см. табл. 2).

При постановке реакций использовали следующие реактивы: Hot rescue DNA pol 5 ед/мкл, ПЦР буфер 10× (лаб. молекулярной диагностики и генно-инженерных конструкций ВНИИ СБ РАСХН),

Таблица 1. Устойчивость к антибиотикам исследованных штаммов *P. aeruginosa*

Антибиотики	Количество антибиотика на диске, мкг	ST 298	ST 296	ST235		
		GIMC5010: PA-103	GIMC5011: PAN-928	GIMC5001: PAT-23	GIMC5002: PAT-169	GIMC5004: PAT-895
Пенициллины:						
карбенициллин	100	S	S	R	R	R
тикарциллин/клавуланат	75/10	R	S	R	R	R
пиперациллин/тазобактам	100/10	S	S	R	R	R
Цефалоспорины:						
цефуроксим (2п)	30	S	S	S	R	S
цефотаксим (3п)	30	S	S	S	S	S
цефтазидим (3п)	30	S	S	S	S	S
цефепим (4п)	30	S	S	S	R	R
Монобактамы:						
азтреонам	50	S	S	R	R	R
Карбапенемы:						
имипенем	10	S	S	R	R	R
меропенем	10	R	S	R	R	R
Аминогликозиды:						
канамицин (1п)	30	S	S	S	R	R
гентамицин (2п)	10	S	S	R	R	R
нетилмицин (2п)	30	S	S	S	R	R
тобрамицин (2п)	100	S	S	S	R	R
Макролиды:						
азитромицин	15	I	I	R	R	R
klaritromicin	15	S	S	R	R	R
Фторхинолоны:						
офлоксацин	5	S	S	S	R	R
ципрофлоксацин	5	S	S	S	S	S
левофлоксацин	5	S	S	R	R	R
Гликопептиды:						
ванкомицин	30	S	S	R	R	R
Препараты разных групп:						
хлорамфеникол	15	S	I	R	R	R
фосфомицин	50	S	S	S	S	S

Примечание. S – чувствителен, R – устойчив, I – умеренно устойчив.

dNTP 5 мМ (Medigen), праймеры (Евроген, ЗАО «Синтол»), DMSO (Sigma).

После проведения ПЦР при наличии в пробе только основного продукта очистку и концентрирование проводили с помощью набора «DNA-Extra-Sorb». Для проб, содержащих минорные дополнительные продукты, применяли процедуру препаративного электрофореза в агарозном геле с последующим вырезанием фрагментов геля, элюцией ДНК

и концентрированием. Пробы концентрировали до 10-20 нг/мкл.

Секвенирование фрагментов ДНК проводили на приборе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems / Hitachi). Использовали наборы BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing. Режим амплификации выбирали согласно рекомендациям к прибору. Электрофорез продуктов реакции осуществляли в капиллярах длиной 50 см с полимером POP-7.

Таблица 2. Описание праймеров и параметров амплификации мишеней

Мишень для анализа	Название праймера	Последовательность	Программа амплификации	Ссылки
Гены схемы MLST	Для генов <i>acsA</i> , <i>aroE</i> , <i>guaA</i> , <i>mutL</i> , <i>nuoD</i> , <i>ppsA</i> , <i>trpE</i>	PubMLST [15]	Авторская	Curtan B. et al [6]
<i>mutL</i> , дополнительный аллель	mutLNF	5'-CGCGACSTGTCTTCAACACCC-3'	95 °C – 10 мин., (94 °C – 1 мин., 63 °C – 1 мин, 72 °C – 1 мин.) × 35, 72 °C – 10 мин.	н.р.
	mutLNR	5'-GTAGATGCCCTTGAGCTGCCG-3'		н.р.
16S rDNA	Lb16a		95 °C – 10 мин., (95 °C – 20 с, 56 °C – 30 с, 72 °C – 60 с) × 35, 72 °C – 5 мин.	Guan L. L. et al [12]
16S rDNA	Lb16b, 16Smidford, 16Smidrev			Naser S. M. et al [11]
<i>intM1</i> , <i>intM2</i> , <i>intM3</i>	<i>intM1-U</i> , <i>intM1-D</i> ; <i>intM2-U</i> , <i>intM2-D</i> ; <i>intM3-U</i> , <i>intM3-D</i> .			Su J. et al [7]
Интегрон	HS286, HS287			Stokes H. W. [8]
	blaR	5'-CATATGCAGAGTGAGCGATCCS-3'		н.р.
	blaF	5'-CGAAACTATCGGCCGTAGAACG-3'		н.р.
	5'-cs, 3'-cs			
	orf5-rev		95 °C – 10 мин., (95 °C – 1 мин., 55 °C – 1 мин, 72 °C – 1 мин.,) × 35, 72 °C – 5 мин.	Lévesque C. et al. [9]
	orfDF	5'-CAGTTAGCGCCCGTCGCCAAG-3'		Levings R. S. et al [10]
	tnpAF	5'-TGAGCAGCGCGATGCCCGTG-3'		н.р.
	tnpAR	5'-CAGCGGCATCGGCCCTGCTCA-3'		н.р.
	orfDR	5'-CAAAACCCAGCGGTGCACAGCG-3'		н.р.
	CSN	5'-ATCAGGTCAAGTCTGCTT-3'		н.р.
	aadF	5'-GATTGCTTGGCCSTCACGGCGG-3'		н.р.
	aadR	5'-GATTCCAGATGACGGCTCGATGGC-3'		н.р.

Примечание. н.р. – настоящая работа

Таблица 3. Аллельные профили штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных в ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова

Название штамма	Гены схемы MLST							ST
	<i>acsA</i>	<i>aroE</i>	<i>gua</i>	<i>mutL</i>	<i>nuoD</i>	<i>pps</i>	<i>trp</i>	
GIMC5001:PAT-23	38	11	3	13	1	2	4	235
GIMC5002:PAT-169	38	11	3	13	1	2	4	235
GIMC5003:PAT-1039	38	11	3	13	1	2	4	235
GIMC5004:PAT-895	38	11	3	13	1	2	4	235
GIMC5007:PAT-41	11	5	36	3	1	29	2	598
GIMC5008:PAT-35	11	5	36	3	1	29	2	598
GIMC5010:PA-103	18	4	13	3	1	17	13	298
GIMC5005:PAT-104	18	4	5	3	1	17	13	446
GIMC5006:PAT-977	18	4	5	3	1	17	13	446
GIMC5011:PAN-928	44	8	5	3	5	6	26	296
GIMC5009:PAT-298	17	3	5	4	4	4	3	966

Выделение плазмидной ДНК из штаммов *P. aeruginosa* проводили методом щелочного лизиса, согласно [13]. Очистку плазмидной ДНК осуществляли при помощи препаративного электрофореза в 1,5% агарозном геле с последующим переосаждением этанолом.

Для определения размера высокомолекулярной плазмиды очищенную ДНК обрабатывали рестриктазой HindIII (Fermentas). Продукты рестрикции разделяли с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле. В качестве контроля молекулярной массы использовали ДНК фага лямбда (Fermentas), обработанную рестриктазами EcoRI (Fermentas) и HindIII.

Выявление в плазмидной ДНК последовательностей интегров, а также генов интеграз проводили на основе ПЦР с использованием праймеров и условий амплификации, описанных в табл. 2.

Анализ последовательностей и выравнивание выполняли с помощью программы CLUSTALW2 – Multiple Sequence Alignment [14]. Для определения аллельного профиля штаммов на основе секвенированных последовательностей 7 генов использовали программную базу сайта PubMLST [15]. Идентификацию последовательностей 16S *rDNA* культур микроорганизмов других таксономических групп, а также анализ состава интегров проводили с применением геномной и программной базы BLAST. Установление границ открытых рамок считывания в последовательностях интегров осуществляли с помощью пакета программ ORF (Open Reading Frame) FINDER (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>). Поиск промоторных областей для генов интегразы, транспозазы, а также генов кассет интегрона проводили с исполь-

зованием следующих пакетов программ: Neural Network Promoter Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html); BPROM (<http://molbiol-tools.ca/Promoters.htm>); PPP (Prokaryotic Promoter Prediction) http://bioinformatics.biol.rug.nl/websoftware/ppp/ppp_start.php).

Результаты и обсуждение

Возбудители нозокомиальных инфекций в ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова на протяжении ряда лет находятся под наблюдением сотрудников бактериологической лаборатории ФНЦТИО им. В.И. Шумакова и лаборатории молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. В настоящем исследовании были проанализированы как штаммы прошлых лет (2006–2008 гг.), относящиеся, по данным RAPD-PCR, к генотипу А и доминировавшие среди штаммов внутрибольничных условно-патогенных микроорганизмов, выделенных от больных и из смывов с госпитальных объектов [16], так и штаммы 2009–2010 гг., представляющие наиболее часто встречающиеся генотипы, также предварительно проанализированные в RAPD-PCR.

Мультилокусное секвенирование позволило выявить несколько групп в выборке штаммов *Pseudomonas aeruginosa* (табл. 3). Штаммы (n=4), выделяемые с 2006 г. и отнесенные к генотипу А по результатам RAPD-PCR, принадлежат к генотипу ST sequence type) 235 по MLST. Штаммы этого генотипа, по данным сайта PubMLST [15], выделяют с 2002 г. в России, Венгрии, Сербии, Польше, Испании, Норвегии, Бразилии, Китае, Сингапуре и Нигерии. Источниками выделения служили мокрота, инфицированные мочевыводящие пути и мягкие

ткани, бронхиальный лаваж, кровь. В настоящее время в базе данных зарегистрировано 33 штамма этого генотипа.

2 штамма принадлежат генотипу 446. Генотип представлен в базе данных одним штаммом, выделенным в октябре 2007 г. и охарактеризованным S. Arduino в университете Мэриленд (США). Штаммы этого генотипа отличаются только по одному локусу аллельного профиля от хорошо охарактеризованного, токсигенного штамма PA-103, выделенного P.V. Liu в 1966 г. [17]. Отличие по фрагменту гена *gua* выражается в замене аллеля 13 в штамме PA-103 на аллель 5 в штаммах генотипа 446, что происходит благодаря точечной замене во второй позиции кодона CAG- CTG и приводит к замещению глутамина лейцином в белке. Этот факт свидетельствует о высокой степени генетического родства штаммов.

2 штамма принадлежат генотипу 598. В базе данных зарегистрирован только один штамм этого генотипа, выделенный в мае 2008 г. и типированный Van Mansfield R. из медицинского центра Утрехта в Нидерландах.

Еще один штамм, выделенный из смывов с раковой опухоли в хирургическом отделении, отнесен к генотипу 966. Этот генотип представлен в PubMLST одним штаммом, изолированным в мае 2010 г. M. Guzvinec в университетском госпитале Загреба в Хорватии.

Штаммы генотипов 235, 446 и 598 сходны только по локусу гена *tno*. От штамма генотипа 966 штаммы ST 446 и 235 отличаются по всем локусам. Штаммы ST 598 сходны с ST 966 только по локусу *gua*. Такое отличие групп штаммов свидетельствует

о многократном заносе синегнойной палочки в стационар из независимых источников.

Штаммы генотипа 235 отличал от других не только аллельный профиль, но и длительное выживание в условиях стационара (2006–2010 гг.). Анализ ДНК штаммов показал, что только у представителей генотипа 235 в составе генома есть интегроны (рис. 1). Как видно из рис. 1, выявленные интегроны отличались по количеству и составу кассет. Интегрон, названный нами малым (Accession JN711472), включает только 1 кассету, представляющую собой ген β -лактамазы GES-5. 3'-консервативный сегмент интегрона обнаружить не удалось.

Большой интегрон (Accession JN790946) содержит несколько кассет, целостность одной из которых (*aadA6*) нарушена встроенной последовательностью ISPa21, представляющей собой только ген транспозазы с промотором. При этом транскрибируемый фермент аминокликозид-аденилилтрансфераза сохраняет активный центр, но укорачивается на 6 аминокислотных остатков в С-концевой области. Еще 5 аминокислотных остатков перед последним транскрибируемым остатком пролина также изменены, 3 из них – на несинонимичные. Поскольку активный центр, сайты связывания металлов и нуклеотидтрифосфатов находятся в пределах первых 50 N-концевых аминокислотных остатков, нарушения в С-концевой области, скорее всего, не затрагивают активности фермента, что и показали эксперименты по проверке устойчивости штаммов к антимикробным реагентам.

Оставшийся фрагмент кассеты располагается в интегрене после левого повтора ISPa21, но как

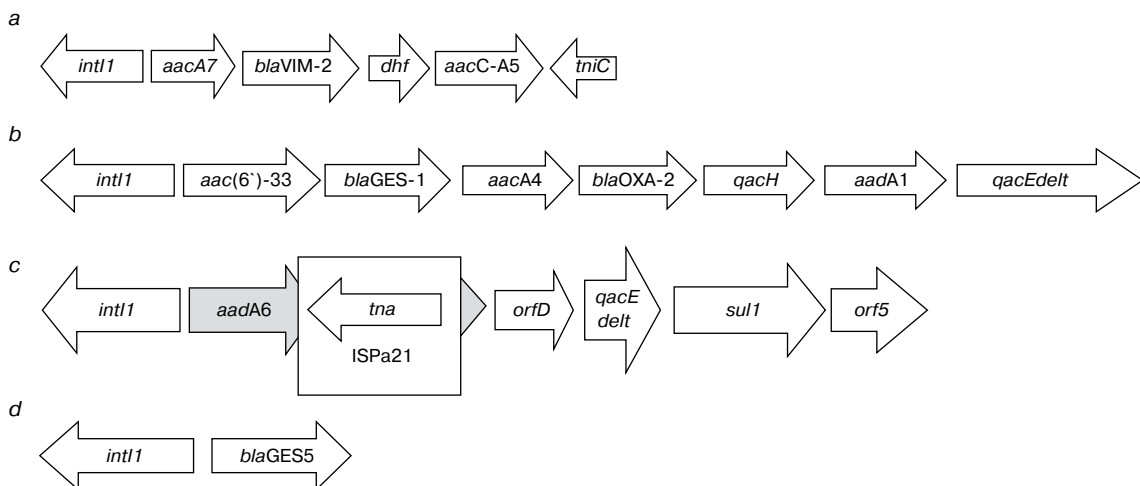


Рис. 1. Интегроны класса I штаммов генотипа 235:

a) DQ522233 – 3 107 bp; b) GQ337064 – 6 816 bp; c) JN790946 – 4 870 bp; d) JN711472 – 1 847 bp

не транслируемая единица длиной в 41 пн. За ним следует кассета с геном *orfD*. Активность промотора кассет, как правило, распространяется на 2 гена. Поскольку ген *orfD* удален от промотора интегрона не только кассетой гена *aadA6*, но и последовательностью ISPa21, возникает вопрос о возможности трансляции гена *orfD*, решить который пока не представляется возможным, так как продукт гена неизвестен. Для последующих генов классического 3'-концевого сегмента промотор обнаруживается, что позволяет считать эти гены активно транслируемыми.

Анализ литературы показал, что у штаммов генотипа 235, выделенных E. Viedma et al. в госпитале Испании, был обнаружен интегрон размером 6816 пн (Accession GQ337064), также содержащий гены β -лактамаз группы GES и аминогликозид-аденилтрансферазы группы A [18] (см. рис.1, в). В базе GenBank мы нашли описание интегрона штамма генотипа 235, представленное О.В. Шевченко и М.В. Эдельштейном из НИИ антимикробной химиотерапии г. Смоленска. Этот интегрон отличался и классом β -лактамазы, и генами других кассет (см. рис.1, а). Поиск в базе INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt/>), созданной A. Moura et al. [19], позволил обнаружить еще один интегрон *P. aeruginosa* этих же исследователей: *intI1 - blaVIM-2 - aadB - tnpA - blaOXA-2 - qacEdelta1* (4717 пн, Accession DQ522236), также содержащий встроенную последовательность ISPa21. Однако из описания авторов неясно, штамму какого генотипа принадлежит этот интегрон. Следует отметить, что он наиболее близок по структуре интегрон, секвенированному нами, но включает гены β -лактамаз и аминогликозид-аденилтрансферазы других классов.

Где же расположены интегроны у исследованных псевдомонад? Для ответа на этот вопрос мы провели выделение и дополнительную очистку плазмидной ДНК из штаммов *P. aeruginosa*. Плазмиду содержали как штаммы ST 235, так и ST 446. По размеру (около 21 000 пн) эта плазида соответствовала описанной С. Е. Raja et al. (23 000 пн), придающей *P. aeruginosa* устойчивость к ионам металлов, в частности к никелю и ампициллину [20]. Однако выделенная нами плазида интегроны не содержала. Таким образом, у штаммов генотипа 235, включенных в наше исследование, интегрон встроен в хромосомную ДНК. E. Viedma et al. также показали, что интегрон GQ337064, по-видимому, локализован в хромосоме [18]. Интегрон из клинического изолята, выделенного в Италии в 2011 г. в Центре интенсивной терапии новорожденных, содержащий по 2 гена β -лактамаз (*Vim-14*, *Oxa-20*) и аминогликозид-ацетилтрансфераз (*aacA7*,

aacA4), тоже не был обнаружен в конъюгативных или мобильных элементах вне хромосомы [21].

Таким образом, выявленная множественная устойчивость штаммов *P. aeruginosa* к антимикробным препаратам связана не с трансмиссивными плазмидами и подвижными элементами внутри них, а с хромосомными интегронами, в частности с их разновидностью – мобильными интегронами, являющимися главным вектором мультирезистентности к антибиотикам у грамотрицательных и некоторых грамположительных бактерий [22]. Такое внимание к топографии генов множественной устойчивости к антибиотикам связано, прежде всего, с выяснением возможного механизма передачи резистентности, особенно в пределах стационаров. Исторически сложилось так, что первоначально выявленная в середине 1950-х годов множественная устойчивость бактерий к антибиотикам [23] была сопряжена с плазмидами в исследованиях 1970-х годов [24]. А интегроны как структурная единица хромосомы бактерий были открыты позднее, в конце 1980-х [25].

Необходимо остановиться кратко на организации интегрона. Принципиальным компонентом интегрона является функциональная платформа, представляющая собой ген *intI*, кодирующий интегразу – сайт-специфическую тирозиновую рекомбиназу, и сайт рекомбинации *attI*. Интегразу катализирует встраивание в интегрон кассет генов, большинство из которых не содержат промоторов. В связи с этим наличие в составе функциональной платформы промотора, ориентированного в направлении точки встраивания кассет, важно для функционирования и регуляции активности включенных в интегрон генов. Сама функциональная платформа структурно стабильна и не способна к перемещению. Наличие только функциональной платформы в составе генома не гарантирует устойчивости бактерий к антибиотикам, а лишь свидетельствует о потенциальной возможности ее приобретения. Часто в работах, посвященных анализу клинических изолятов микроорганизмов, посредством ПЦР выявляют гены 3 классов интеграз в составе генома и интерпретируют эти данные как доказательство присутствия у бактерий интегронов того или иного класса [26]. Анализ 3 аннотированных геномов *P. aeruginosa* штаммов Less858 (Accession FM209186.1), PA7 (Accession CP000744.1) и UCВPP-PA14 (Accession CP000438.1) показал, что они не содержат интегронов, но включают большое количество интеграз бактериофагов, интеграз/рекомбиназ, рекомбиназу *Xer D* и собственно интегразы, которые в случае PA14 описаны как предположительно интегразы.

В нашей выборке штаммов *P. aeruginosa* представители не только генотипа 235, но и остальных содержали гены интеграз первого класса: ST966 – *intI* (Accession JN790954) и ST598 – *intI* (Accession JN790953), ST446 – *intI* (Accession JN79095). Однако интегрон в составе генома штаммов ST 966, 598 и 446 обнаружен не был.

Мы уже отмечали, что *P. aeruginosa* доминировали среди возбудителей госпитальных инфекций, выделенных в ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова. Однако с целью изучения возможности передачи мультирезистентности к антибиотикам посредством перемещения генов кассет интегрона мы проанализировали и некоторые клинические изоляты других таксономических групп микроорганизмов. Прежде всего, мы обратили внимание на неферментирующие грамотрицательные бактерии, учитывая их эпидемиологические особенности [27]. 5 изолятов – GIMC5501:ABT-717, GIMC5502:ABT-85, GIMC5503:ABT-688, GIMC5504:ABT-683 и GIMC5505:ABT-3CVC были фенотипированы как *Acinetobacter baumannii*. Посредством генотипирования на основе секвенирования гена *16S rDNA* видовая идентификация была подтверждена (Accession JN797775, JN797776, JN797773, JN797774, JN797777) и было доказано достоверное отличие выделенных микроорганизмов от вида *A. kwoffii*. Таксономическая принадлежность еще одного изолята – GIMC6001:SMFT-1001 была установлена посредством генотипирования – *Stenotrophomonas maltophilia* (Accession JN797778). Другой изолят в процессе идентификации был признан смесью двух культур. Из него было высеяно 2 штамма: GIMC6002:SMFT-1038 (Accession JN797780) – *Stenotrophomonas maltophilia* и GIMC6501:OBT-1038 (Accession JN797779) – *Oceanobacillus* spp. Проведенное исследование подтвердило эффективность сочетания фенотипирования в идентификации бактерий. Наличие же штамма *Oceanobacillus* sp. в дренаже перикарда свидетельствует о снижении иммунного статуса больного и требует дополнительных исследований возможной патогенности этого микроорганизма. Род *Oceanobacillus* был недавно реклассифицирован из рода *Bacillus* [28]. Его представители – экстремальные галлофилы, выдерживающие щелочные условия, найдены как на больших глубинах океанов (*Oceanobacillus iheyensis*), так и в традиционных ферментированных продуктах стран Юго-Восточной Азии (*Oceanobacillus kimchii*).

Перечисленные 8 штаммов мы проверили на наличие генов интеграз и интегрона. Интегрон в геноме этих штаммов выявлен не был. Гены *intI*, но не других классов интеграз, содержали все изо-

ляты (Accession JN790948, JN790949, JN790951, JN790950, JN790947), кроме GIMC5503:ABT-688.

Таким образом, большинство выделенных в стационаре микроорганизмов потенциально может акцептировать кассеты генов устойчивости к антибиотикам, но в момент исследования не содержало их в составе интегронов. Анализ данных литературы показал, что большинство интегронов, выявленных к 2009 г., относилось к так называемым нулевым [29], т.е. включало только функциональную платформу.

Другой особенностью штаммов синегнойной палочки, выделенных в ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова, было наличие у большинства из них дополнительного аллеля гена *mutL* (Accession JN797781). Этот аллель отсутствовал у штамма GIMC5007:PAT-41 и коллекционных штаммов GIMC5011:PAN-928 и GIMC5010:PA-103, выделенных из других источников.

Анализ 124 аллелей гена *mutL P. aeruginosa*, представленных в базе PubMLST, показал высокую степень сходства большинства из них. Исключение составили аллели *mutL*-91 и *mutL*-110, отличающиеся от остальных аллелей на 14–16% и 18–20% соответственно. Однако дополнительный аллель *mutL*, обнаруженный в штаммах PAT, был сходен с ними только на 82%, более высокий процент сходства (86%) наблюдался с аллелями *mutL*-96 и *mutL*-117. Сравнение выявленного аллеля в BLAST позволило установить его наибольшее совпадение по составу нуклеотидов с *mutL* некоторых штаммов *P. fluorescens*: SBW25 и WH6_4 – 89%. Сходство с *mutL* штаммов этого же вида Pf0-1 и Pf-5 было ниже – 85 и 84% соответственно. Однако попарное выравнивание всех перечисленных последовательностей с помощью CLUSTALW2 показало, что степень гомологии дополнительного аллеля штаммов PAT выше с аллелями гена *mutL P. fluorescens* (рис. 2). Поскольку кодируемый этим геном белок исправляет ошибки в местах замен, приводящих к образованию неспаренных нуклеотидов, то мутации в самом гене могут оказывать влияние на активность белка, и, следовательно, на скорость образования мутаций в геноме микроорганизмов [30]. Высокая изменчивость в пределах проанализированного фрагмента гена свидетельствует о его возможной роли в адаптации псевдомонад к условиям окружающей среды.

Длительная циркуляция штаммов PAT в стационаре может быть объяснена, прежде всего, их мультирезистентностью к антибиотикам (см. табл. 1). Мы проанализировали, насколько полученные данные согласуются с обнаруженными в интегронах генами. Ген *bla* GES-5 кодирует β -лактамазу расши-

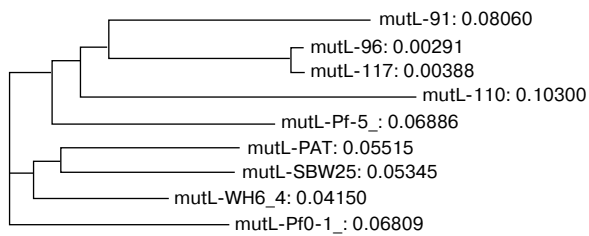


Рис. 2. Древо гомологии фрагментов *mutL* гена штаммов *P. aeruginosa* и *P. fluorescens* mutL-91, mutL-96, mutL-110, mutL-117 – аллели гена *mutL* из базы данных PubMLST [15]; mutL-PAT – аллель, выявленный в данной работе у штаммов из ФНЦГИО им. акад. В.И. Шумакова – GenBank Accession JN797781; mutL-Pf-5 – GenBank Accession CP000076.1: 656351–658261 пн в *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, complete genome; mutL-Pf0-1 – GenBank Accession CP000094.2: 603077–604984 пн в *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, complete genome; mutL-WH6_4 – GenBank Accession AEAZ01000004.1: 251466–253388 пн в *Pseudomonas fluorescens* WH6 WH6_4, whole genome shotgun sequence; mutL-SBW25 – GenBank Accession 229359445: 586953–588854 пн в *Pseudomonas fluorescens* SBW25 complete genome.

ренного спектра (ESBL). Она относится к классу А, согласно R.P. Ambler [31], и к группе 2f по Bush-Jacoby [2], является карбапенемазой по основному гидролизуемому субстрату. Как видно из табл. 1, к карбапенемам (меропенему, имипенему) устойчивы все штаммы генотипа 235. Однако цефалоспорины, такие как цефтазидим, слабо гидролизуются этой группой β -лактамаз [2]. Проверенные нами штаммы чувствительны к этому антибиотику. Кроме того, штаммы генотипа 235 устойчивы к пенициллинам даже в присутствии ингибиторов β -лактамаз, хотя *in vitro* для β -лактамазы GES-5 тазобактам является более сильным ингибитором, чем клавулановая кислота [2].

Обнаружение β -лактамазы семейства GES у госпитальных штаммов *P. aeruginosa* согласуется с данными литературы по широкому распространению генов *bla* GES. Впервые этот ген был идентифицирован в 1998 г. у бактерии *Klebsiella pneumoniae*, изолированной от заболевшего ребенка в госпитале Французской Гвинеи (отсюда название – Guiana extended-spectrum, GES) [32]. В 2010 г. для него было известно уже 15 аллелей [2]. Преимущественно этот ген находят у *P. aeruginosa*, например в клиниках Бразилии (2001 г.), ЮАР, Китая (2004 г.) [33, 34]. Более того, новые разновидности β -лактамаз группы 2, включающей классы А и D, все чаще идентифицируют у микроорганизмов в последние 20 лет, по данным К. Bush и G.A. Jacoby [2] (рис. 3), что свидетельствует о широких адаптивных возможностях госпитальных штаммов микроорганизмов.

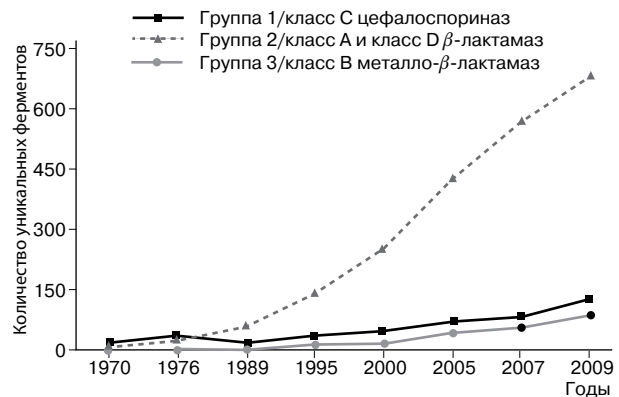


Рис. 3. Увеличение количества β -лактамаз групп 1, 2, и 3 с 1970 по 2009 гг. (цитируется по Bush K. & Jacoby G.A. [2])

Второй важный ген, обнаруженный в составе интегрона, *aadA6*, кодирующий аминогликозид-аденилтрансферазу – гентамицин-модифицирующий фермент. Как видно из табл. 1, к гентамицину устойчивы все штаммы генотипа 235. По данным F. Angelatou et al., активность аминогликозид-аденилтрансферазы составляет в случае тобрамицина – 40%, канамицина – 33% от активности в случае гентамицина [35]. Возможно, поэтому у штамма GIMC5001:PAT-23 не выявлена устойчивость к этим антибиотикам диско-диффузионным методом. В то же время, F. Angelatou et al. отмечали, что активность фермента отличалась у разных штаммов микроорганизмов. Другим объяснением различий в устойчивости к аминогликозидам между штаммом GIMC5001:PAT-23, выделенным в 2006 г., и более поздними изолятами может быть приобретение штаммами генотипа 235 в процессе адаптации к условиям стационара дополнительных генов, обеспечивающих устойчивость к антибиотикам.

Эпидемиологическое расследование, проведенное сотрудниками лаборатории молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций в 2006–2008 гг., позволило заключить, что штаммы генотипа А, т. е. ST 235, как показано в настоящей работе, имеют госпитальное происхождение [16]. Штаммы этого генотипа преобладали в *отделении реанимации и интенсивной терапии* (ОРИТ). В последующие годы штаммы *P. aeruginosa* изолировали от больных не только этого отделения, но и хирургических отделений. Следует отметить, что послеоперационное восстановительное лечение все пациенты стационара какое-то время проходят в ОРИТ, затем их переводят в хирургические отделения. Штаммы генотипов 235, 446 и 598 были изолированы у больных в отделении реанимации.

Таблица 4. Распространение обнаруженных штаммов условно-патогенных микроорганизмов, выделенных в отделениях ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова

Название штамма	Период выделения, мес.	Отделение	Источник	ST
GIMC5001:PAT-23	9–10.2006, 6–7.2007, 11–12.2007	ОРИТ	Разные	235
GIMC5002:PAT-169	12.2009	2-е хирургическое	Моча	235
GIMC5006:PAT-977	03.2010		Рана	446
GIMC5009:PAT-298	03.2010		Раковина	966
GIMC5503:ABT-688	03.2010		Дренаж	–
GIMC5501:ABT-717	03.2010		Канюля	–
GIMC5005:PAT-104	12.2009	3-е хирургическое	Трахея	446
GIMC5007:PAT-41	12.2009		Брюшная полость	598
GIMC5008:PAT-35	01.2010		Свищ	598
GIMC5505:ABT-3CVC	01.2010		Катетер	–
GIMC5003:PAT-1039	03.2010		Дренаж перикарда	235
GIMC5004:PAT-895	03.2010	Кардиохирургия	Рана	235
GIMC5504:ABT-683	03.2010		Катетер	–
GIMC5502:ABT-85	12.2009		Рана	–
GIMC6001:SMFT-1001	03.2010		Рана	–
GIMC6002:SMFT-1038	03.2010		Дренаж перикарда	–
GIMC6501:OBT-1038	03.2010	Дренаж перикарда	–	

Примечание. «–» – для штаммов неферментирующих бактерий ST не определяли.

В табл. 4 показано, как штаммы указанных генотипов распределились по хирургическим отделениям. Из приведенных данных следует, что инфицирование пациентов происходит в ОРИТ. Поскольку штамм, выделенный из смывов с раковины во 2-м хирургическом отделении, отличается уникальным генотипом 966 и от больных не изолирован, можно заключить, что системы водоснабжения ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова в период исследования не являлись резервуаром штаммов *P. aeruginosa*, вызывающих осложнения у больных.

Заключение

Контроль внутрибольничных штаммов условно-патогенных микроорганизмов – одна из ключевых задач эпидемиологии в стационарах. Методы молекулярного типирования уже зарекомендовали себя в расследовании вспышек инфекционных заболеваний. Развитие инженерной базы молекулярно-генетических методов, автоматизация процессов способствуют сокращению времени исследования и все большей ценовой доступности указанных подходов для массового скрининга. Регулярное молекулярное типирование ведущих условно-патогенных микроорганизмов, особенно в отделениях интенсивной терапии, может помочь в выявлении

изменений в эпидемиологии возбудителей и спланировать мероприятия по контролю инфекций. Поскольку источником условно-патогенных микроорганизмов являются пациенты, медперсонал и системы водоснабжения, все они подлежат постоянному контролю. Например, та же синегнойная палочка может быть составной частью микрофлоры кишечника у 2,6–24% пациентов больниц [36] и вызывать сопутствующие заболевания у больных с ослабленной иммунной системой. Водопровод без своевременной санитарной и температурной обработки также может быть резервуаром штаммов *P. aeruginosa*. При отсутствии соблюдения норм эксплуатации систем водоснабжения до 42% пациентов ОРИТ могут быть заражены штаммами, идентичными штаммам водопровода [37]. Штаммы, поступающие из указанных источников, являются экзогенными по отношению к госпитальной среде. В отличие от них штаммы, давно циркулирующие в стационаре, приспособившиеся к условиям санитарной обработки, являются эндогенными.

Постоянный эпидемиологический надзор в ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова продемонстрировал эффективность молекулярно-генетического контроля. В результате регулярно проводимых санитарных мероприятий количество циркулирующих

щих генотипов синегнойной палочки сократилось до 3. Штаммы *P. aeruginosa* с ST 235, 446 и 598, по всей видимости, являются эндогенными для стационара. Анализ аллельных профилей штаммов показал, что они сильно отличаются, что свидетельствует о независимом заносе штаммов в стационар. Наиболее адаптированным к условиям госпиталя является генотип 235, содержащий интегроны, включающие гены ферментов, обеспечивающих устойчивость штаммов к антибиотикам. Наличие плазмид, а также функциональной платформы интегрона у представителей других генотипов не исключает возможности приобретения генов устойчивости и этими штаммами. Общее для штаммов трех генотипов, кроме штамма GIMC5007:PAT-41, направление адаптации – дополнительный аллель гена *mutL*, также может характеризовать эти штаммы как эндогенные.

Экзогенный штамм ST 966, изолированный из системы водоснабжения, не является возбудителем госпитальных инфекций у пациентов ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова.

Исследование неферментирующих условно-патогенных микроорганизмов, выделенных от больных в отделениях стационара, показало наличие в геноме у большинства из них генов интегразы I класса, что может способствовать приобретению этими бактериями генов антибиотикорезистентности при дальнейшей циркуляции в госпитале.

Таким образом, сочетание фено- и генотипирования в контроле нозокомиальных условно-патогенных микроорганизмов позволило акцентировать внимание на основных возбудителях и предоставить информацию об особенностях их геномов для планирования мероприятий по элиминации потенциально опасных штаммов и предупреждения внутрибольничных инфекций.

Литература

1. Методические указания по эпидемиологическому надзору за внутрибольничными инфекциями. МУК №28-6/34. М., 1987 г.
2. Bush K., Jacoby G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3):969-76.
3. Empel J., Filczak K., Mrówka A., Hryniewicz W., Livermore D.M., Gniadkowski M. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. *J Clin Microbiol* 2007; 45(9):2829-34.
4. Poirel L., Brinas L., Fortineau N., Nordmann P. Integron-encoded GES-type extended-spectrum beta-lactamase with increased activity to ward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(8):3593-7.
5. МУК № 4.2.1890-04 Методические указания. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. М., 2004
6. Curran B., Jonas D., Grundmann H., Pitt T., Dowson C.G. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2004; 42(12):5644-9.
7. Su J., Shi L., Yang L., Xiao Z., Li X., Yamasaki Sh.. Analysis of integrons in clinical isolates of *Escherichia coli* in China during the last six years. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 254(1):75-80.
8. Stokes H.W., Holmes A.J., Nield B.S., Holley M.P., Nevalainen K. M. H., Mabbut B. C., Gillings M. R. Gene cassette PCR: sequence-independent recovery of entire genes from environmental DNA. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(11):5240-6.
9. Lévesque C., Piché L., Larose C., Roy P.H. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:185-91.
10. Levings R.S., Lightfoot D., Partridge S.R., Hall R.M., Djordjevic S.P. The genomic island SGI1, containing the multiple antibiotic resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 or variants of it, is widely distributed in other *S. enterica* serovars. *J Bacteriol* 2005; 187:4401-9.
11. Naser S.M., Hagen K.E., Vancanneyt M., Cleenwerck I., Swings J., Tompkins T.A. *Lactobacillus suntoryeus* Cachat and Priest 2005 is a later synonym of *Lactobacillus helveticus* (Orla-Jensen 1919) Bergey et al. 1925 (Approved Lists 1980). *Intern J System Evoluti Microbiol* 2006; 56:355-60.
12. Guan, L.L., Hagen, K.E., Tannock, G.W., Korver, D.R., Fasenko, G.M. & Allison, G.E. Detection and identification of *Lactobacillus* species in crops of broilers of different ages by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69:6750-7.
13. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7(6):1513-23.
14. The Main Site EMBL-EBI, European Bioinformatics Institute (URL:<http://www.ebi.ac.uk> 12-10-2011)
15. The Main Site PubMLST of the Faculty of Zoology, Oxford University, Great Britain (R/<http://pubmlst.org> 15.10.2011)
16. Аветисян Л.Р., Чернуха М.Ю., Габриелян Н.И., Ковтун Н.А., Горская Е.М., Шагинян И.А. Генетические особенности штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, циркулирующих в хирургическом стационаре. *ЖМЭИ* 2009; 5:33-9.
17. Liu P.V. The role of various fractions of *Pseudomonas aeruginosa* in its pathogenesis. III. Identity of the lethal

- toxins produced in vitro and in vivo. *J Infect Dis* 1966; 116:481-9.
18. Viedma E., Juan C., Acosta J., Zamorano L., Otero J.R., Sanz F., Chaves F., Oliver A. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum β -lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(11):4930-3.
 19. Moura A., Soares M., Pereira C., Leitão N., Henriques I., Correia A. INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics* 2009;25:1096-8.
 20. Raja C.E., Selvam G.S. Plasmid profile and curing analysis of *Pseudomonas aeruginosa* as metal resistant. *Int J Environ Sci Tech* 2009; 6(2):259-66.
 21. Mazzariol A., Mammina C., Koncan R, et al. A novel VIM-type metallo-beta-lactamase (VIM-14) in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from a neonatal intensive care unit. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(5):722-4.
 22. Partridge S.R., Tsafnat G., Coiera E., Iredell J.R. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* 2009; 33:757-84.
 23. Mitsuhashi S., Harada K., Hashimoto H., Egawa R. On the drug resistance of enteric bacteria. *Jpn J Exp Med* 1961; 31:47-52.
 24. Cambray G., Guerout A.-M., Mazel D. Integrons. *Annu Rev Genet* 2010, 44:141-66.
 25. Stokes H.W., Hall R.M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 1989, 3:1669-83.
 26. Moraga R.M., Santander E.P., Arias T.C., Méndez F.A. Integrons y su relación el fenotipo de Resistencia en bacilos gramnegativos aislados en el hospital Torres Galdames de Iquique, Chile. *Rev Chil Infect* 2007; 24(5):384-90.
 27. Шагинян И.А., Чернуха М.Ю. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2005; 7(3):271-85.
 28. Lu J., Nogi Y., Takami H. *Oceanobacillus iheyensis* gen. nov., sp. nov., a deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a depth of 1050 m on the Iheya Ridge. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 205(2):291-7.
 29. Joss M.J., Koenig J.E., Labbate M., et al. Database ACID: annotation of cassette and integron data. *BMC Bioinformatics* 2009; 10:118-126 (doi:10.1186/1471-2105-10-118).
 30. Shaver A.C., Sniegowski P.D. Spontaneously arising mutL mutators in evolving *Escherichia coli* populations are the result of changes in repeat length. *J Bacteriol* 2003; 185(20):6076-82.
 31. Ambler R.P. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond* 1980; B, 289:321-31.
 32. Walther-Rasmussen J., Høiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:470-82.
 33. da Fonseca E.L., Vieira V.V., Cipriano R., Vicente A.C. Emergence of blaGES-5 in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(3):576-7.
 34. Wang C., Cai P., Chang D., Mi Z. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57(6):1261-2.
 35. Angelatou F., Litsas S.B., Kontomichalou P. Purification and properties of two gentamicin-modifying enzymes, coded by a single plasmid pPK237 originating from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antibiotics* 1982; 35(2):235-44.
 36. Cuttelod M., Senn L., Terlerskiy V., et al. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units over a 10-year period (1998-2007). *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(1):57-62.
 37. Blanc D.S., Nahimana I., Petignat C., Wenger A, Bille J, Francioli P. Faucets as a reservoir of endemic *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infections in intensive care units. *Intensive Care Med* 2004; 30(10):1964-8.