

Е.П. Сиволодский^{1,2}, Е.В. Зуева²

Таксономическое и прикладное значение профилей утилизации белковых аминокислот бактерий *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter nosocomialis*

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург²Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

Резюме. Изучены профили утилизации 20 белковых аминокислот 118 штаммов *A. baumannii*, 9 штаммов *A. pittii*, 7 штаммов *A. nosocomialis*. Утилизация аминокислот определялась на минимальном солевом агаре с аминокислотой в качестве единственного источника азота и углерода. Видовая идентификация ацинетобактеров проводилась с помощью методики матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетной масс-спектрометрией с базой данных Biotope (Bruker Daltonics Inc. Germany). У *A. baumannii* были выявлены 14 профилей утилизации белковых аминокислот, из них первые 6 профилей включали 87,3% штаммов. Впервые установлено широкое распространение штаммов *A. baumannii*, которые не утилизируют L-гистидин – 56 (47,4%) штаммов. Признаки утилизации L-гистидина (His⁺) или отсутствия утилизации (His⁻) стабильно сохраняются у повторных штаммов, выделенных от пациентов. Предлагается подразделять все штаммы *A. baumannii* на два трофова: «гистидинотрицательный трофовар His⁻», который не утилизирует L-гистидин в качестве единственного источника азота и углерода, и «гистидинположительный трофовар His⁺», который его утилизирует, что будет полезно для эпидемиологического надзора. У бактерий *A. pittii* и *A. nosocomialis* установлено близкое фенотипическое сходство с *A. baumannii* по профилям утилизации аминокислот, что подтверждает правомерность объединения этих видов в комплекс *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*. У бактерий видов *A. pittii* и *A. nosocomialis* нет гистидинотрицательного трофова His⁻, что отличает их от вида *A. baumannii*.

Ключевые слова: профили утилизации аминокислот, таксономия, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter nosocomialis*, эпидемиологический надзор, L-гистидин, трофовар, идентификация.

Введение. Приоритетные для раневых и госпитальных инфекций бактерии *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* объединяют при лабораторной диагностике в «комплекс *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*» ввиду их сходства. Видовая идентификация ацинетобактеров еще несовершенна и достоверно осуществляется матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией с времяпролетной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS) и молекулярно-генетическими методиками. В систематике ацинетобактеров применялись пробы утилизации аминокислот как единственных источников углерода только в ограниченном диапазоне – от трех [5] до семи [3] аминокислот. Ранее нами была выявлена существенная таксономическая значимость профилей утилизации всех 20 белковых аминокислот в качестве единственного источника азота и углерода для псевдомонад [7] и клебсиелл [2]. Представляет интерес использование этого методического подхода для изучения бактерий наиболее актуальных видов ацинетобактеров.

Цель исследования. Определить значение профилей утилизации всех белковых аминокислот в качестве единственного источника азота и углерода для видовой и внутривидовой идентификации ацинетобактеров, разработки селективных питательных сред и видовой идентификации методом MALDI-TOF MS.

Материалы и методы. Объектами исследования были 134 штамма бактерий рода *Acinetobacter*, в том числе *A. baumannii* – 118, *A. pittii* – 9, *A. nosocomialis* – 7 штаммов. Все штаммы были выделены в 2017–2018 гг. из клинического материала в клинично-бактериологической лаборатории Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова. Штаммы идентифицировали традиционными биохимическими пробами. Дополнительно осуществляли видовую идентификацию всех штаммов, используя методику MALDI-TOF масс-спектрометрии в Научно-исследовательском институте эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Все указанные штаммы находятся в рабочей коллекции культур Е.П. Сиволодского. Использовали 20 аминокислот, входящих в состав белков, производства фирм «Merck» (Соединенные Штаты Америки – США), «Reanal» (Венгрия), «Реахим» (Россия): L-аспарагин (Asn), L-аспарагиновая кислота (Asp), L-глутамин (Gln), L-глутаминовая кислота (Glu), L-аланин (Ala), глицин (Gly), L-лизин гидрохлорид (Lys), L-аргинин гидрохлорид (Arg), L-гистидин гидрохлорид (His), L-метионин (Met), L-цистеин гидрохлорид (Cys), L-треонин (Thr), L-тирозин (Tyr), L-триптофан (Try), L-фенилаланин (Phe), L-лейцин (Leu), L-изолейцин (Ile), L-валин (Val), L-серин (Ser), L-пролин (Pro). Бактерии выращивали на питательной среде

«Колумбийский агар сухой» производства Научно-исследовательского центра фармакотерапии (г. Санкт-Петербург). Для изучения профилей утилизации аминокислот в качестве единственного источника азота и углерода использовали минимальный агар, приготовленный на дистиллированной воде, содержащей (г/л): NaCl – 5, Na₂SO₄ – 2, KH₂PO₄ – 1, K₂HPO₄ – 2,5; MgSO₄ – 0,1; агар бактериологический фирмы «Difco» (США) – 15, 1,6% водный раствор бромтимолового синего 4 мл, pH 7,2; стерилизация при 120°C 20 мин. Каждую из исследуемых аминокислот вносили в отдельную колбу с 50 мл горячей среды в количестве 0,1 г (L-тирозин 0,05 г), корректировали pH до 7,2 по окраске индикатора в среде, разливали в чашки Петри. В контроле применяли минимальный агар без аминокислоты. В качестве инокулята использовали культуры бактерий, выросших на питательном агаре при 37°C в течение 18–24 ч, которые отбирали по полной петле (d=2мм) и суспендировали в 0,2 мл стерильного 0,85% раствора NaCl в лунках стерильного полимерного планшета. Чашки сред с аминокислотой и контрольную среду разделяли на 8 секторов и маркировали по номерам штаммов. Засевали исследуемую культуру по полной петле взвеси из лунки (посевная доза 1×10⁷ колониеобразующих единиц (КОЕ) радикальным штрихом на сектор чашек с аминокислотами и контроля. Посевы выращивали при 37°C в течение 3 суток, просматривая ежедневно. Положительным результатом утилизации аминокислот считали наличие четко выраженного газона бактерий по следу посева при отсутствии роста на контрольной среде без аминокислоты. Профили утилизации различных видов ацинетобактеров сравнивали, используя коэффициент сходства Жаккарда: $S_j = a/a+b$, где a – число совпадающих положительных результатов утилизации аминокислот; b – число несовпадающих результатов, выявленных при сопоставлениях профилей утилизации аминокислот штаммов каждого варианта профиля по отношению к профилю с большинством штаммов (среди профилей всех видов ацинетобактеров). Для идентификации видов ацинетобактеров согласно методике MALDI-TOF MS использовали настольный MALDI-TOF масс-спектрограф «Microflex» с базой данных MALDI Biotyper фирмы «Bruker Daltonics» (Германия). Подготовку к исследованию чистых культур бактерий и проведение исследований осуществляли в соответствии с инструкцией к прибору. Уровень идентификации бактерий трактовали по критериям, указанным в инструкции: ранг 2,300 – 3,000 высокая вероятность идентификации вида; 2,000 – 2,299 надежная идентификация рода, вероятная идентификация вида; 1,700 – 1,999 вероятная идентификация рода; 0,000 – 1,699 ненадежная идентификация.

Результаты и их обсуждение. При изучении 118 штаммов вида *A. baumannii* были выявлены 14 вариантов профилей утилизации 20 белковых аминокислот в качестве единственных источников азота и углерода (табл.).

A. baumannii утилизировали от 2 до 12 аминокислот. Преобладал профиль № 1 (утилизация только Ala, Glu, Gln, Asp, Pro, Arg, His, Try, Tyr, Phe), выявленный у 35 (29,6%) штаммов. Профили № 1–6 в совокупности имели 103 (87,3%) штаммов. Штаммы остальных профилей выявлялись редко (по 1–5 штаммов). Показатель видового сходства по коэффициенту Жаккарда, обоснованный нами ранее [7], имели большинство вариантов профилей, кроме № 7 ($S_j = 0,54$) и № 14 ($S_j = 0,18$). Штаммы профилей № 7 и № 14 были определены с помощью методики MALDI-TOF MS как вид *A. baumannii* с рангом 2,300, но требуют дополнительного молекулярно-генетического изучения.

Нами впервые выявлена необычно высокая частота штаммов *A. baumannii*, которые не утилизируют L-гистидин (His⁻) – 56 (47,4%) штаммов. Они входят в шесть вариантов профилей (№ 3–8) и часто сопряжены с утратой утилизации L-аспарагина и L-триптофана. Признаки утилизации L-гистидина или отсутствия его утилизации очень четкие и стабильные. При утилизации L-гистидина наблюдается пышный газон роста бактерий через 18–24 ч инкубации при 37°C; при отсутствии утилизации L-гистидина наблюдается полное отсутствие роста бактерий через 18–24 ч, которое сохраняется более 3 суток. Утилизация L-аспарагина и L-триптофана у многих штаммов *A. baumannii* замедленная: через 24 ч нет роста бактерий, однако через 48–72 ч появляется газон роста бактерий, что трактуется как положительная утилизация. В отношении L-гистидина отсутствие роста *A. baumannii* через 18–24 ч уже достаточно, чтобы трактовать результат как окончательно отрицательный. У пациентов и умерших при ацинетобактер инфекции повторные штаммы сохраняют исходный фенотип утилизации L-гистидина. Предлагаем подразделить все штаммы *A. baumannii* на два трофовара: гистидинположительный трофовар (His⁺), который утилизирует L-гистидин в качестве единственного источника азота и углерода, и гистидинотрицательный трофовар (His⁻), который не утилизирует L-гистидин в качестве единственного источника азота и углерода. Определение указанных трофоваров может быть полезным для эпидемиологического надзора ацинетобактер инфекции. По данным A. Nemes et al. [6], утилизируют L-гистидин 96% штаммов *A. baumannii*, по данным E.L. Carr et al. [3], P.Gerner-Smidt et al. [5], – 100% штаммов. Эти данные были получены на малом количестве исследованных штаммов (по 25 штаммов). При этом L-гистидин изучали как единственный источник только углерода.

Установлено, что 95,8±1,8% штаммов *A. baumannii* утилизируют L-фенилаланин в качестве единственного источника азота и углерода. Этот показатель свидетельствует о потенциально высокой диагностической чувствительности селективной питательной среды «Ацинетобактер фенилаланин агар», разработанной нами ранее для выделения и идентификации бактерий «комплекса *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*» [1]. У бактерий *A. pittii* выявлены три варианта про-

Профили утилизации белковых аминокислот бактериями *Acinetobacter*

Номер профиля	Профиль утилизации аминокислот									Число штаммов профиля	S _j
	Ala, Glu, Gln, Pro, Asp	Arg	His	Asn	Try	Tyr	Phe	Leu	Lys, Ser, Gly, Val, Ile, Thr, Cys, Met		
<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=118)											
1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	35	1
2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	11	0,91
3	+	+	-	+	+	+	+	-	-	22	0,91
4	+	+	-	+	+	+	+	+	-	8	0,91
5	+	+	-	-	-	+	+	-	-	12	0,72
6	+	+	-	+	-	+	+	-	-	12	0,82
7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	1	0,54
8	+	+	-	+	+	-	+	-	-	1	0,82
9	+	+	+	+	-	+	+	-	-	2	0,90
10	+	+	+	+	-	+	+	+	-	5	0,83
11	+	+	+	+	+	+	-	-	-	2	0,91
12	+	+	+	+	-	+	-	-	-	1	0,82
13	+	-	+	+	-	+	+	+	-	2	0,75
14	-	+	+	-	-	-	-	-	-	1	0,18
<i>Acinetobacter pittii</i> (n=9)											
1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	6	1
11	+	+	+	+	+	+	-	-	-	1	0,91
12	+	+	+	+	-	+	-	-	-	2	0,82
<i>Acinetobacter nosocomialis</i> (n=7)											
1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	4	1
9	+	+	+	+	-	+	+	-	-	2	0,90
15	+	+	+	+	-	-	+	-	-	1	0,82

Примечание : + – утилизация аминокислоты; – – нет утилизации аминокислоты; S_j – коэффициент Jaccard.

филей утилизации аминокислот, которые полностью соответствуют профилям № 1, 11, 12 *A. baumannii*. У них также преобладает профиль № 1. Утилизируют L-фенилаланин 66,7% штаммов.

У бактерий *A. nosocomialis* выявлены три профиля утилизации аминокислот № 1, 9, 15, из которых № 1 и № 9 соответствуют *A. baumannii*; профиль № 15 оригинальный, только у *A. nosocomialis*. Утилизируют L- фенилаланин 100% штаммов *A. nosocomialis*. Полученные данные указывают на близкое фенотипическое сходство по утилизации белковых аминокислот бактерий *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* и подтверждают правомерность объединения этих видов в «комплекс *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*» [5,6].

У бактерий видов *A. nosocomialis*, *A. pittii* отсутствует трофовар His⁻, что отличает их от *A. baumannii*.

Применение методики MALDI-TOF MS для идентификации бактерий *A. baumannii* выявило высокую вероятность идентификации вида у 55 (46,6%) штаммов; вероятную идентификацию вида у 47 (39,9%) штаммов; вероятную идентификацию рода у 16 (13,5%)

штаммов. У бактерий *A. pittii* только один штамм имел высокую вероятность идентификации вида, 6 штаммов имели вероятную идентификацию вида, 2 штамма – вероятную идентификацию рода. Среди бактерий *A. nosocomialis* имел высокую вероятность идентификации вида 1 штамм, вероятную идентификацию вида – 5 штаммов, вероятную идентификацию рода – 1 штамм. Следовательно, этой методикой надежно идентифицирован вид 86,5% штаммов *A. baumannii* и большинства штаммов *A. pittii*, *A. nosocomialis*. Однако у 13,5% штаммов *A. baumannii* идентификация вида недостаточно надежная. Вероятно, это обусловлено отсутствием в используемой нами базе данных MALDI Biotyper представителей новых видов, входящих в комплекс *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*: *A. dijkshoorniae*, *A. seiferti* [4].

Заключение. У *A. baumannii* обнаружены 14 профилей утилизации белковых аминокислот в качестве единственных источников азота и углерода. Они утилизируют от 2 до 12 аминокислот, у них преобладает профиль с утилизацией 11 аминокислот. Видовое сходство по коэффициенту Жаккарда имеют

бактерии 12 профилей. Впервые выявлено широкое распространение штаммов *A. baumannii*, которые не утилизируют L-гистидин – 47,4%. Признаки утилизации L-гистидина или отсутствия его утилизации стабильно сохраняются у повторных штаммов, выделенных у пациентов с ацинетобактер инфекцией. Предлагается подразделять штаммы *A. baumannii* на 2 трофовара: гистидинположительный трофовар (His⁺), который утилизирует L-гистидин в качестве единственного источника азота и углерода, и гистидинотрицательный трофовар (His⁻), который его не утилизирует. Установлено, что 95,8±1,8% штаммов *A. baumannii* утилизируют L-фенилаланин в качестве единственного источника азота и углерода, что определяет потенциально высокую диагностическую чувствительность селективной питательной среды «Ацинетобактер фенилаланин агар» для выделения и идентификации бактерий комплекса *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*. У бактерий видов *A. pittii* и *A. nosocomialis* обнаружено близкое фенотипическое сходство с *A. baumannii* по профилям утилизации белковых аминокислот, что подтверждает правомерность объединения этих видов в комплекс *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*. У бактерий видов *A. pittii*, *A. nosocomialis* нет гистидинотрицательного трофовара His⁻, что отличает их от *A. baumannii*.

Литература

1. Пат. № 2660567 Российская Федерация, МПК C12 Q1/04. Способ выделения и идентификации бактерий комплекса *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* / Е.П. Сиволодский; опубл. 06.07. 2018, Б и № 19. – С. 24–26.
2. Сиволодский Е.П. Таксономическое значение профилей утилизации белковых аминокислот бактерий рода *Klebsiella* / Е.П. Сиволодский, В.Д. Бадиков, Е.В. Зуева // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2016. – № 4 (56). – С. 148–151.
3. Carr, E.L. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge / E.L. Carr [et al.] // Int. J. Sys. Evol. Microbiol. – 2003. – Vol. 53. – P. 953–963.
4. Cosgaya, C. *Acinetobacter dijkshoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries / C. Cosgaya [et al.] // Int. J. Sys. Evol. Microbiol. – 2016. – Vol. 66. – P. 4105–4111.
5. Gerner-Smidt, P. Reliability of phenotypic test for identification of *Acinetobacter* species / P. Gerner-Smidt [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1991. – Vol. 29, № 2. – P. 277–282.
6. Nemeč, A. 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 13U) / A. Nemeč [et al.] // Res. Microbiol. – 2011. – Vol. 162, № 4. – P. 393–404.
7. Сиволодский, Е.П. Application the profiles of amino acid utilization as the sole carbon and nitrogen sources for *Pseudomonas* taxonomy / Е.П. Сиволодский // Microbiology (Moscow). – 2009. – Vol. 78, № 6. – P. 711–716.

Е.П. Сиволодский, Е.В. Зуева

Taxonomic and applied value of profiles utilization of protein amino acids of bacteria *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter nosocomialis*

Abstract. The profiles of utilization of 20 protein amino acids 118 strains of *A. baumannii*, 9 strains of *A. pittii*, 7 strains of *A. nosocomialis* were studied. Utilization of amino acids was determined on a minimum salt agar with an amino acid as the only source of nitrogen and carbon. Species identification of acinetobacters was carried out by matrix-activated laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry with a database of Biotyper (by BrukerDaltonics Inc. Germany.) At *A. baumannii* was identified 14 profiles utilization of protein amino acids, of which the first 6 profiles included 87,3% of the strains. For the first time, a wide spread of *A. baumannii* strains that do not utilize L-histidine – 56 (47,4%) strains was established. Signs of utilization of L-histidine (His⁺) or lack of utilization (His⁻) persist steadily in repeated strains isolated from patients. It is proposed to subdivide all the strains of *A. baumannii* for two trophies: the «histidine-negative trophy (His⁻)», which does not utilize L-histidine as the sole source of nitrogen and carbon, and the «histidine-positive trophy (His⁺)», which utilize it, which will be useful for epidemiological surveillance. In bacteria, *A. pittii* and *A. nosocomialis* are installed close phenotypic similarity with *A. baumannii* at the profiles of utilization of amino acids, which proves the validity of combining these species in a complex of *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*. Bacteria of the species *A. pittii* and *A. nosocomialis* has no «histidine-negative trophy (His⁻)», that distinguishes them from *A. baumannii*.

Key words: profiles of amino acid utilization, taxonomy, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter nosocomialis*, epidemiological surveillance, L-histidine, trophies, identification.

Контактный телефон: 8-911-780-27-85; e-mail: vmeda-nio@mil.ru