

СПОСОБ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *ACINETOBACTER NOSOCOMIALIS*

Е.П. Сиволодский^{1,2}, Е.В. Зуева²

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

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

Резюме. Цель исследования — разработка способа идентификации бактерий вида *Acinetobacter nosocomialis* по совокупности фенотипических признаков группы *Acinetobacter baumannii* (*Ab*) с использованием признака уреазной активности. Объектами исследования были клинические штаммы группы *Ab*, выделенные в 2018–2019 гг. в бактериологической лаборатории Военно-медицинской академии (Санкт-Петербург), из них *A. baumannii* — 85, *A. nosocomialis* — 12, *A. pittii* — 10 штаммов. Еще 9 штаммов *A. nosocomialis* были выделены из воды реки Невы и 2 штамма *A. calcoaceticus* — из цианобактеральных матов. Принадлежность штаммов к группе *Ab* устанавливали по совокупности метаболических и физиологических признаков таксономическими тестами для данной группы. Видовая принадлежность всех штаммов была установлена методом матрично-ассоциированной лазерной десорбции/ионизации времяпролетной (MALDI-TOF) масс-спектрометрии. Уреазную активность бактерий определяли микрообъемным методом. Использовали среду с мочевиной следующего состава (г/л): Na₂HPO₄ — 1,1; KH₂PO₄ — 1,1; NaCl — 5,0; 0,4%-ный водно-щелочной раствор фенолового красного — 5 мл; мочевина — 10,0–15,0; вода дистиллированная — 1 л. Ингредиенты, кроме мочевины, растворяли в дистиллированной воде, разливали во флаконы, стерилизовали 20 мин при 121°C, затем добавляли во флаконы мочевину в расчетном количестве. Среду с мочевиной вносили по 0,1 мл в лунки планшета, затем засеивали по полной петле (диаметром 2 мм) суточной агаровой культуры исследуемых и контрольных штаммов и инкубировали в аэробных условиях при 37°C. Результаты реакции на уреазу быстрой активности учитывали через 3 часа инкубации по изменению исходной окраски среды. Для выявления уреазы слабой активности реакцию учитывали через 7–24 часа. Было установлено, что у бактерий группы *Ab* уреазную активность имели 100% штаммов *A. nosocomialis* и 18,82% штаммов *A. baumannii*. При этом уреазу быстрой активности имели все штаммы *A. nosocomialis* и только один штамм *A. baumannii* (1,17%). Следовательно, уреазу быстрой активности имеет таксономическое значение как маркер бактерий вида *A. nosocomialis*, отличающий этот вид от других видов группы *A. baumannii*. Чувствительность и специфичность указанного способа идентификации бактерий вида *A. nosocomialis* относительно идентификации методом MALDI-TOF масс-спектрометрии составили 100 и 98,83% ($\chi^2 = 103,2$; $p < 0,0001$).

Ключевые слова: *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter baumannii*, уреазы бактерий, уреазы быстрой активности, утилизация глюкозы.

METHOD FOR PHENOTYPIC IDENTIFICATION OF *ACINETOBACTER NOSOCOMIALIS* BACTERIA

Sivolodskii E.P.^{a,b}, Zueva E.V.^b

¹ Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation

² St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The study's purpose was the developing of the method for *Acinetobacter nosocomialis* bacteria identification by the totality of phenotypic characteristics of the *Acinetobacter baumannii* (*Ab*) group based on the urease activity trait.

Адрес для переписки:

Зуева Елена Викторовна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, ФБУН НИИ
эпидемиологии и микробиологии им. Пастера.
Тел.: 8 (921) 382-50-07.
E-mail: elenazueva9@gmail.com

Contacts:

Elena V. Zueva
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14, St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (921) 382-50-07.
E-mail: elenazueva9@gmail.com

Для цитирования:

Сиволодский Е.П., Зуева Е.В. Способ фенотипической идентификации бактерий *Acinetobacter nosocomialis* // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 591–596. doi: 10.15789/2220-7619-MFP-1422

Citation:

Sivolodskii E.P., Zueva E.V. Method for phenotypic identification of *Acinetobacter nosocomialis* bacteria // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 591–596. doi: 10.15789/2220-7619-MFP-1422

The research's objects were clinical strains of the *Ab* group, isolated in 2018–2019 in the bacteriological laboratory of Kirov Military Medical Academy (St. Petersburg), of which were *A. baumannii* ($n = 85$), *A. nosocomialis* ($n = 12$), *A. pittii* ($n = 10$). In addition, 9 strains of *A. nosocomialis* were isolated from water samples from the Neva River and 2 strains of *A. calcoaceticus* from the cyanobacterial mats. The belonging of the strains to *Ab* group was determined by the combination of the metabolic and physiological characteristics of the taxonomic tests for this group. The species identification of the studied strains was determined by the matrix-associated laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). The urease activity of bacteria was determined using the microvolume method. We used a medium with urea in the following composition (g/l): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 1.1$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1.1$; $\text{NaCl} - 5.0$; 40% alkaline solution phenol red — 5 ml; urea — 10–15; distilled water — 1 l. The ingredients, without urea, were dissolved in distilled water, dispensed to vials, sterilized for 20 minutes at 121°C , urea was added in the calculated amount. The medium with urea was added in 0.1 ml to wells of the plate, then inoculated the daily agar culture of the studied and control strains by full loop (2 mm in diameter) and incubated under aerobic conditions at 37°C . The reaction results for a rapid urease activity were determined after 3 hours by a change in the initial color of the medium. The reactions were accounted after 7–24 hours to detect activity urease. It was found that 100% of *A. nosocomialis* strains and 18.82% of *A. baumannii* strains had urease activity. At the same time, high activity urease was found only in one strain of *A. baumannii* (1.17%) and in all strains of *A. nosocomialis*. Therefore, the presence of high urease activity is of taxonomic importance for the species *A. nosocomialis* as the marker of distinguishing this species from other bacteria species of the *Ab* group. The sensitivity and specificity of the identifying *A. nosocomialis* strains by suggested approach compared to the studied strains identification by MALDI-TOF MS were 100 and 98.83% ($\chi^2 = 103.2$; $p < 0.0001$), respectively.

Key words: *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter baumannii*, bacterial urease, rapid activity urease, glucose utilization.

Введение

Ацинетобактеры относятся к приоритетным возбудителям инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, а также раневых инфекций. Еще в 1991 г. основные возбудители этих инфекций, геновиды 1, 2, 3, 13TU, были объединены в комплекс *Acinetobacter calcoaceticus* — *Acinetobacter baumannii* (комплекс АСВ) ввиду невозможности дифференциации этих видов фенотипическими тестами [6]. Так как бактерии *A. calcoaceticus* очень редко обнаруживаются в клиническом материале, в настоящее время эта группа включает три вида (*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*) и называется «группа *A. baumannii* (*Ab*)». Выявлением ацинетобактеров группы *A. baumannii* (*Ab*) обычно завершается лабораторная диагностика ацинетобактер-инфекции рутинными фенотипическими тестами. Наиболее точным методом идентификации видов ацинетобактеров группы *Ab* является метод секвенирования участков гена *rpoB* [8, 10]. Метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) также обеспечивает достоверную и быструю идентификацию видов этой группы, но требует иногда коррекции протокола исследования для *A. nosocomialis* [5, 9]. В связи с возможностью видового контроля штаммов методом MALDI-TOF MS представляет интерес дальнейший поиск надежных и доступных фенотипических тестов идентификации видов бактерий группы *Ab*. Наше внимание привлек уреазный тест ввиду отсутствия сведений об уреазном признаке в таксономических описаниях видов бактерий комплекса АСВ [4, 6, 7].

Цель исследования — разработать способ идентификации бактерий вида *Acinetobacter nosocomialis* по совокупности фенотипических признаков с использованием признака уреазной активности.

Материалы и методы

Штаммы бактерий. Объектами исследования были 116 штаммов бактерий группы *Acinetobacter baumannii* (*Ab*) и 2 штамма *Acinetobacter calcoaceticus*. Все клинические штаммы были выделены в бактериологической лаборатории Военно-медицинской академии в 2018–2019 гг., из них 85 штаммов *A. baumannii*, 10 штаммов *A. pittii*, 12 штаммов *A. nosocomialis*. Еще 9 штаммов *A. nosocomialis* были выделены нами из проб воды реки Невы. Два штамма *A. calcoaceticus* из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, изолированных из цианобактериальных матов, были предоставлены д.м.н. Краевой Л.А. Видовая принадлежность всех указанных штаммов была идентифицирована методом MALDI-TOF масс-спектрометрии 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 изучали на колумбийском агаре с 5% крови барана. Утилизацию субстратов в качестве единственного источника углерода осуществляли на минимальном солевом агаре (г/л): $\text{NH}_4\text{Cl} - 5$;

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 чашки Петри. Использовали следующие субстраты: этанол, L-арабиноза, D-декстроза, L-гистидин гидрохлорид, L-аргинина гидрохлорид, путресцина дигидрохлорид, трикарбаллиловая кислота (Sigma-Aldrich, Швейцария).

Отношение бактерий к окраске по Граму. Использовали тест тяжа с 3%-ным раствором КОН и/или микроскопию чистой культуры бактерий, окрашенных по методу Грама. Рост бактерий при 37, 41, 44°C изучали посевом суточных бульонных культур бактерий на сектора колумбийского агара с учетом результата через 48 ч. Наличие каталазы выявляли тестом с 3%-ным раствором пероксида водорода.

Тест на цитохромоксидазу бактерий. Несколько капель 1%-ного водного раствора тетраметилпарафенилендиамина (bioMerieux, Франция) наносили на фильтровальную бумагу в чашке Петри. Запаянным концом пастеровской пипетки отбирали часть колонии или газона исследуемых бактерий и наносили их на влажную бумагу с реактивом. Появление синей окраски комочка бактерий в течение до 20 секунд указывало на наличие цитохромоксидазы. Отсутствие окраски или появление ее в более поздние сроки указывало на отрицательный результат.

Методика определения нитратредуктазы бактерий [3]. Использовали питательную среду с 0,1% KNO_3 . Состав среды (г/л): пептон ферментативный — 0,5; NaCl — 0,5; KNO_3 — 0,1; вода дистиллированная — 100 мл; стерилизация при 121°C 20 мин. Вносили по 0,1 мл среды в лунки полимерного планшета, затем засеивали в лунки по 1 полной петле суточной агаровой культуры исследуемых бактерий, одну из лунок не засеивали (контроль среды). Посевы инкубировали при 37°C аэробно в течение 3 часов, после чего вносили в каждую лунку реактивы на нитриты — 0,05 мл 0,2%-ного водного раствора риванола, затем 0,05 мл 12%-ного раствора соляной кислоты (приготовленной из концентрированной 36,5%-ной соляной кислоты). Мгновенное появление красной окраски среды в лунке с посевом указывало на наличие нитратредуктазы бактерий, желтая окраска указывала на отсутствие нитратредуктазы, в контрольной среде без посева сохранялась желтая окраска реактива.

Методика пероксидводородного микрообъемного ОФ-теста для экспрессного (1 ч) определения окисления и ферментации глюкозы грамотрицательными бактериями [2]. Использовали

«Набор для определения ферментации и окисления глюкозы (ОФ-теста) пероксидводородным микрообъемным методом» (НИИЭМ имени Пастера, Санкт-Петербург), содержащий среду № 1 (для ферментации глюкозы) — 100 мл 1%-ного раствора D-глюкозы в фосфатно-буферной основе pH = 7,6 с индикатором фенол-рот и 5 мл пергидроля (30%-ный раствор пероксида водорода). Среду № 2 (для окисления глюкозы) готовили путем внесения 10 мл среды № 1 в отдельный флакон, добавления 0,2 мл пергидроля до 0,6%-ной конечной концентрации пероксида водорода. Среду № 2 использовали в течение 12 часов. В лунки полимерного планшета вносили отдельно по 0,1 мл среды № 1 (для ферментации глюкозы) и среды № 2 (для окисления глюкозы). Исследуемую культуру вносили полной петлей диаметром 2 мм (не платиновой) в лунку со средой № 1 и перемешивали. Таким же образом засеивали культуру в лунку со средой для окисления глюкозы, в которой при перемешивании наблюдается бурное выделение пузырьков газа (кислорода) вследствие действия каталазы бактерий на пероксид водорода в среде. Посевы инкубировали аэробно при 37°C в течение 1 ч. Изменение исходного красного цвета среды № 1 на желтый цвет означало ферментацию глюкозы; переход окраски в желтый цвет и газообразование в лунке со средой № 2 указывало на окисление глюкозы. Отсутствие изменения окраски среды в обеих лунках при газообразовании в среде № 2 указывало на отсутствие ферментации и окисления глюкозы. Контроль — те же среды без посева бактерий.

Методика утилизации субстратов в качестве единственного источника углерода. Суточные агаровые культуры бактерий по полной петле (диаметром 2 мм) суспендировали в 0,2 мл стерильного 0,85%-ного раствора NaCl в лунках стерильного 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 бактерий из лунки радиальным штрихом на сектор чашки с субстратом и чашки без субстрата (контроль). Посевы 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 определения уреазы быстрой активности микрообъемным методом в планшетах [1]. Использовали среду с мочевиной (pH = 7,0±0,1) следующего состава: Na_2HPO_4 — 1,1 г; KH_2PO_4 — 1,1 г; NaCl — 5,0 г; 0,4%-ный воднощелочной раствор фенолового красного — 5 мл; мочевина (CAS no. 57-13-6) — 10,0–15,0 г; вода

дистиллированная — 1 л. Для приготовления среды ингредиенты, кроме мочевины, растворяли в 1 л дистиллированной воды, разливали по 50 мл во флаконы, стерилизовали 20 мин при 121°C, затем добавляли во флаконы по 0,5–0,75 г самостерилизованной мочевины. Прозрачную, желтой окраски среду использовали в течение 30 суток при хранении от 4°C до 8°C. Для постановки теста среду с мочевиной вносили по 0,1 мл в лунки стерильного полимерного планшета, суточную агаровую культуру исследуемых штаммов бактерий засеивали полной петлей диаметром 2 мм в лунку со средой и перемешивали. Таким же образом засеивали в отдельные лунки суточные культуры контрольных штаммов уреазопозитивного *A. nosocomialis* (положительный контроль) и уреазонегативного *A. baumannii* (отрицательный контроль), одну лунку со средой не засеивали (один контроль использовали для всех штаммов, исследуемых в данный день). Посевы выращивали аэробно при 37°C в течение 3 ч, после чего учитывали результат: изменение исходной желтой окраски среды на красную в лунке с посевом исследуемого штамма указывало на выявление уреазы быстрой активности при наличии такого же результата в лунке положительного контроля. В лунках отрицательного контроля без посева бактерий среда сохраняла исходную желтую окраску. Выявление уреазы после более длительной инкубации посевов указывало на наличие уреазы слабой активности.

Идентификация видов бактерий методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Масс-спектры образцов бактериальных клеток получали в линейном положительном режиме работы MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex LRF (Bruker Daltonik, Германия). Идентификацию микроорганизмов осуществляли с помощью программного обеспечения MALDI Biotyper RTC (Bruker Daltonik, Германия) путем сопоставления масс-спектров каждого исследуемого образца с данными эталонных спектров из таксономической базы и вычислением коэффициентов совпадения, представленных в виде оценок в баллах.

Методика статистической обработки. Статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.). Определение согласия между результатами идентификации *A. nosocomialis* методом с выявлением уреазы быстрой активности и методом MALDI-TOF масс-спектрометрии осуществляли анализом таблицы сопряженности 2 × 2 бинарных величин с вычислением критерия χ^2 с поправкой Йейтса.

Результаты

Изучение распределения штаммов бактерий группы *A. baumannii* (*Ab*) и *A. calcoaceticus* по времени выявления уреазы микрообъемным методом при аэробном культивировании показало, что у всех 21 штаммов *A. nosocomialis* уреазы выявляется быстро — в течение 3 ч, преимущественно через 1–2 ч (табл. 1). У 15 из 85 штаммов *A. baumannii* уреазы была обнаружена через 24 ч культивирования и только у 1 штамма — через 2 ч (табл. 1). У всех 10 штаммов *A. pittii* уреазы не выявлена, у одного из двух штаммов *A. calcoaceticus* обнаружена через 18 ч (табл. 1). Всего имели уреазу 18±2,9% штаммов *A. baumannii* и 100% штаммов *A. nosocomialis*, при этом уреазы быстрой активности, выявляемую через 3 ч, имели 100% штаммов *A. nosocomialis* и только 1 штамм (1,17%) *A. baumannii* (табл. 2). Бактерии видов *A. pittii* и *A. calcoaceticus* не имели уреазы быстрой активности (табл. 2). Результаты были полностью воспроизводимы при трехкратных повторах. Определение уреазы микрообъемным методом в условиях ограничения доступа воздуха (культивирования посевов на среде с мочевиной под слоем вазелинового масла) выявило уреазу быстрой активности (через 3 ч) у 16 из 21 штамма *A. nosocomialis* (76,2±2,7%) и 1 штамма *A. baumannii*.

Все исследуемые штаммы ацинетобактеров были изучены фенотипическими тестами по указанной выше методике для выявления их принадлежности к группе *A. baumannii* (*Ab*). Было

Таблица 1. Распределение штаммов бактерий группы *A. baumannii* (*Ab*) и *A. calcoaceticus* по времени выявления уреазы

Table 1. Time-dependent urease detection related to distribution of *A. baumannii* group (*Ab*) and *A. calcoaceticus* bacterial strains

Вид бактерий Bacterial species	Число штаммов Number of strains	Число выявленных штаммов с уреазой по интервалам времени, ч* Number of detected time-dependent urease-positive strains, hours*							
		0,5	1	2	3	4–6	7–9	10–17	18–24
<i>A. baumannii</i>	85	0	0	1	1	1	5	11	16
<i>A. nosocomialis</i>	21	2	13	19	21				
<i>A. pittii</i>	10	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. calcoaceticus</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	1

Примечание. * — суммарное число штаммов на каждом интервале учета.

Note.* — total number of stains at each checkup time point.

Таблица 2. Характеристика бактерий группы *A. baumannii* (*Ab*) и *A. calcoaceticus* по уреазной активностиTable 2. Characteristics of *A. baumannii* group (*Ab*) and *A. calcoaceticus* bacteria by urease activity

Вид бактерий Bacterial species	Число штаммов Number of strains	Число штаммов с уреазной активностью Number of strains with urease activity			
		Общее количество Total quantity		Количество с уреазой быстрой активности* Quantity of rapid urease activity-positive strains*	
		n	%	n	%
<i>A. baumannii</i>	85	16	18,82±2,9	1	1,17
<i>A. nosocomialis</i>	21	21	100	21	100
<i>A. pittii</i>	10	0	0	0	0
<i>A. calcoaceticus</i>	2	1		0	0

Примечание. * — выявление уреазы за 3 ч.

Note.* — 3-hour urease detection.

установлено, что это неподвижные граммотрицательные кокковые бактерии, которые растут при 37, 41 и/или 44°C, не гемолизуют кровь барана, не имеют цитохромоксидазы и нитрат-редуктазы, но содержат каталазу; не ферментируют, но окисляют D-глюкозу, утилизируют этанол, L-арабинозу, L-аргинин, L-гистидин, путресцин, трикарбаллиловую кислоту, не утилизируют D-глюкозу. Штаммы *A. nosocomialis*, *A. pittii* имели одинаковые признаки по всем тестам. Среди штаммов *A. baumannii* выявлены варианты, утилизовавшие L-гистидин. Штамм *A. baumannii*, имевший уреазу быстрой активности, не утилизировал L-арабинозу.

Исследование методом MALDI-TOF масс-спектрометрии выявило принадлежность изученных штаммов к видам *A. baumannii*, *A. nosocomialis*, *A. pittii*, *A. calcoaceticus* с показателями баллов 2,05–2,85. Статистическая обработка результатов видовой идентификации 116 штаммов бактерий группы *A. baumannii* (*Ab*) по совокупности фенотипических тестов с применением теста на уреазу быстрой активности в сравнении с результатами видовой идентификации методом MALDI-TOF масс-спектрометрии показала, что чувствительность и специфичность идентификации штаммов вида *A. nosocomialis* составили 100 и 98,83% ($\chi^2 = 103,2$; $p < 0,0001$) соответственно.

Обсуждение

В данном исследовании впервые был обнаружен фенотипический признак, отличающий бактерии *A. nosocomialis* от других видов группы *Ab* (*A. baumannii*, *A. pittii*) и *A. calcoaceticus*. С 1991 г. надежную идентификацию этих видов фенотипическими тестами считали невозможной и лабораторную диагностику завершали определением группы *Ab* или комплекса ACB [6]. Этот признак — наличие уреазы быстрой активности, выявляемой в течение 3 ч, был обнаружен у всех штаммов *A. nosocomialis* (100%), одного штамма *A. baumannii* (1,17%) и отсутствовал у всех

изученных штаммов *A. pittii*, *A. calcoaceticus*. Следовательно, уреазы быстрой активности имеет таксономическое значение как маркер бактерий вида *A. nosocomialis*, отличающий этот вид от других видов группы *A. baumannii*.

Экспериментальным путем были оптимизированы состав среды с мочевиной и условия постановки теста на уреазу быстрой активности. При этом установлено, что оптимальной является постановка теста на уреазу микрообъемной технологией в условиях аэробного культивирования при 37°C в течение 3 ч. Методика постановки теста на уреазу изложена выше в разделе «Материалы и методы».

Для определения принадлежности исследуемых бактерий к группе *A. baumannii* (*Ab*) был установлен и апробирован минимальный набор тестов, изложенных в разделе «Материалы и методы», который позволял надежно идентифицировать бактерии группы *Ab* в течение 24–48 ч.

В ходе идентификации штаммов ацинетобактеров, выделенных нами летом 2019 г. из проб воды реки Невы, по совокупности фенотипических признаков бактерий группы *A. baumannii* (*Ab*) и уреазы быстрой активности были выявлены 9 штаммов вида *A. nosocomialis*. Контрольная идентификация этих штаммов методом MALDI-TOF масс-спектрометрии подтвердила принадлежность всех штаммов к виду *A. nosocomialis*, что указывает на надежность разработанного метода идентификации. На данный способ идентификации бактерий вида *A. nosocomialis* получен патент РФ на изобретение № 2712895 от 2020 г. [1].

Благодарности

Авторы благодарят врачей-бактериологов Горелову Г.В., Богословскую С.П. (Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова) и д.м.н. Краеву Л.А. (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера) за штаммы бактерий *Acinetobacter*, предоставленные для исследования.

Список литературы/References

1. Патент № 2712895 Российская Федерация, МПК C12Q 1/04 (2006.01), C12N 1/20 (2006.01), C12R 1/01 (2006.01). Способ идентификации бактерий *Acinetobacter nosocomialis*: № 2019129885; заявлено 2019.09.23; опубликовано 2020.01.31 / Сиволодский Е.П. Патентообладатель: Сиволодский Евгений Петрович. 9 с. [Patent No. 2712895 Russian Federation, Int. Cl. C12Q 1/04 (2006.01), C12N 1/20 (2006.01), C12R 1/01 (2006.01). Bacterial method of identifying *Acinetobacter nosocomialis* bacteria. No. 2019129885; application: 2019.09.23; date of publication 2020.01.31 / Sivolodskij E.P. Proprietors: Sivolodskij Evgenij Petrovich. 9 p.]
2. Сиволодский Е.П. Пероксидводородный микрообъемный метод ОФ-теста: экспрессное определение окисления и ферментации глюкозы грамотрицательными бактериями // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1991. № 1. С. 14–17. [Sivolodskii E.P. Hydrogen peroxide microvolume method of the of test the rapid determination of the oxidation and fermentation of glucose by gram-negative bacteria. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1991, no. 1, pp. 14–17. (In Russ.)]
3. Сиволодский Е.П., Кудакеев М.Т. Ускоренное определение нитратредуктазы неферментирующих грамотрицательных бактерий // Лабораторное дело. 1991. № 1. С. 61–63. [Sivolodskii E.P., Kudakaev M.T. Accelerated definition of nitrate reductase in non-fermentative gram-negative bacteria. *Laboratornoe delo = Laboratory Science*, 1991, no. 1, pp. 61–63. (In Russ.)]
4. Bouvet P.J., Grimont P.A. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, 1987, vol. 138, no. 2, pp. 569–578.
5. Espinal P., Seifert H., Dijkshoorn L., Vila J., Roca I. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2012, vol. 18, no. 11, pp. 1097–1103. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03696.x
6. Gerner-Smidt P., Tjernberg I., Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.*, 1991, vol. 29, no. 2, pp. 277–282. doi: 10.1128/JCM.29.2.277-282.1991
7. Nemeš A., Krizova L., Maixnerova M., Van der Reijden T.J., Deschaght P., Passet V., Venechoutte 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, pp. 393–404. doi: 10.1016/j.resmic.2011.02.006
8. Park G.N., Kang H.S., Kim H.R., Jung B.K., Kim D.H., Chang K.S. A comparison of genospecies of clinical isolates in the *Acinetobacter* spp. complex obtained from hospitalized patients in Busan, Korea. *Biomed. Sci. Letters*, 2019, vol. 25, no. 1, pp. 40–53. doi: 10.15616/bsl.2019.25.1.40
9. Sedo O., Nemeš A., Krizova L., Kacalova M., Zdrahal Z. Improvement of MALDI-TOF MS profiling for the differentiation of species within the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2013, vol. 36, no. 8, pp. 572–578. doi: 10.1016/j.syapm.2013.08.001
10. Wang J., Ruan Z., Feng Y., Fu Y., Jiang Y., Wang 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 имени С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия; старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических технологий ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Зуева Е.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, 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, St. Petersburg, Russian Federation; Senior Researcher, Laboratory of Molecular and Biological Technologies, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Zueva E.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 28.03.2020
Отправлена на доработку 14.04.2020
Принята к печати 24.05.2020

Received 28.03.2020
Revision received 14.04.2020
Accepted 24.05.2020