

**СПОСОБ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ
*ACINETOBACTER NOSOCOMIALIS***

Сиволодский Е. П.^{1,2}

Зуева Е. В.²

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

² ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и
микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

**METHOD FOR PHENOTYPIC IDENTIFICATION OF *ACINETOBACTER
NOSOCOMIALIS* BACTERIA**

Sivolodskii E. P.^{a,b}

Zueva E. V.^b

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

^b Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg,
Russian Federation

Резюме. Цель исследования – разработка способа идентификации бактерий вида *Acinetobacter nosocomialis* по совокупности фенотипических признаков с использованием признака уреазной активности. Объектами исследования были 116 штаммов бактерий группы *Acinetobacter baumannii* (*Ab*) и 2 штамма *Acinetobacter calcoaceticus*. Клинические штаммы были выделены в 2018-2019 годах в бактериологической лаборатории Военно-медицинской академии им.С.М. Кирова (Санкт-Петербург), из них *A. baumannii* – 85 штаммов, *A. nosocomialis* – 12 штаммов, *A. pittii* – 10 штаммов. Кроме того, девять штаммов *A. nosocomialis* были выделены из проб воды, взятой из реки Невы в городской черте Санкт-Петербурга. Два штамма *A. calcoaceticus* из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера были изолированы из цианобактериальных матов Антарктиды. Принадлежность штаммов к группе *A. baumannii* (*Ab*) устанавливали по совокупности фенотипических признаков: грамотрицательные коккобактерии, неподвижные, аэробы, растут при 37⁰С, 41⁰С или 44⁰С, не дают гемолиз на среде с кровью барана; не имеют цитохромоксидазы и нитратредуктазы, имеют каталазу; не ферментируют, но окисляют D-глюкозу на среде Хью-Лейфсона и микрометодом; утилизируют этанол, L-арабинозу, L-аргинин, L-гистидин, путресцин, трикарбаллиловую кислоту на плотной минимальной солевой среде с 0,2% субстрата в качестве единственного источника углерода; не утилизируют D-глюкозу. Штаммы бактерий культивировали на Колумбийском агаре. Уреазную активность бактерий определяли микрообъемным методом. Использовали среду с мочевиной рН=7,0±0,1 следующего состава: Na₂HPO₄ - 1,1 г; KH₂PO₄ - 1,1 г; NaCl - 5,0 г; 0,4% водно-щелочной раствор фенолового красного - 5 мл; мочевины 10,0÷15,0 г; вода дистиллированная - 1л. Ингредиенты, кроме мочевины, растворяли в дистиллированной воде, разливали во флаконы, стерилизовали 20 мин при 121⁰С, затем добавляли во флаконы мочевины 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 °С. Результаты реакции на уреазу быстрой активности учитывали через 3 часа по изменению исходной окраски среды. Для выявления уреазы слабой активности реакцию учитывали через 7 - 24 часа. Полученные данные уреазной активности сравнивали с результатами видовой идентификации всех исследуемых штаммов методом матрично-ассоциированной лазерной десорбции/ионизации время пролетной (MALDI-TOF) масс-спектрометрии. 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%). У бактерий видов *A. pittii* и *A. calcoaceticus* уреазы как быстрой, так и слабой активности не была выявлена. Следовательно, уреазы высокой активности имеет таксономическое значение как маркер бактерий вида *A. nosocomialis* отличающий этот вид от других видов группы *A. baumannii*. Чувствительность и специфичность способа идентификации штаммов *A. nosocomialis*, основанного на определении уреазы быстрой активности в совокупности с фенотипическими признаками группы *Ab*, относительно идентификации методом MALDI-TOF масс-спектрометрии исследуемых штаммов составили 100% и 98,83% ($\chi^2=103,2$; $P<0,0001$) соответственно.

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

Abstract. The study's purpose was the developing of the method for *Acinetobacter nosocomialis* species the bacteria identification by the totality of phenotypic characters using the urease activity trait. The research's objects were 116 strains of *Acinetobacter baumannii* (*Ab*) group bacteria and two *Acinetobacter calcoaceticus* strains. Clinical strains of *A. baumannii* (n = 85), *A. nosocomialis* (n = 12), *A. pittii* (n = 10) were isolated in 2018-2019 in the bacteriological laboratory of Military Medical Academy named S.M. Kirov (St. Petersburg). In addition, nine strains of *A. nosocomialis* were isolated from water samples taken from the Neva River within the city of St. Petersburg. Two strains of *A. calcoaceticus* from the St. Petersburg Pasteur Research Institute collection were isolated from the cyanobacterial Antarctica mats. The belonging of the strains to *Ab* group was determined by the combination of the following phenotypic criteria: Gram-negative cocco-bacteria, motionless, aerobes, grow at 37°C, 41°C or 44°C, do not give hemolysis on a sheep blood medium; do not have cytochrome oxidase and nitrate reductase, have catalase; do not ferment, but oxidize D-glucose on a Hugh-Leifson medium and by micromethod; do not ferment, but oxidize D-glucose on a Hugh-Leifson medium and by micromethod; utilizes ethanol, L-arabinose, L-arginine, L-histidine, putrescine, tricarballic acid on a dense minimal salt medium with 0.2% substrate as the sole carbon source; do not utilizes of D-glucose. Bacterial strains were cultured on the agar Columbia media. The urease activity of bacteria was determined using the microvolume method. To prepare the medium, used sodium phosphate buffer with pH=7.0 ± 0.1 and the salts concentrations of 1.1 g/L Na₂HPO₄, 1.1 g/L KH₂PO₄, 5.0 g/L NaCl with adding the 5 ml of 0,4% alkaline solution phenol red per 1L of buffer. The solution was dispensed to vials and was sterilized for 20 min at t=121°C, then, 10-15 g/L urea was added to the vials. Culture medium with urea was added 0.1 ml per well 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 t = 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 of a low activity urease. The obtained urease activity data were compared with the species identification results of studied strains by the matrix-associated laser desorption / ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. It was found that in the *Ab* group, 100% of *A. nosocomialis* strains and $18.82 \pm 2,9\%$ 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*. The urease of both high and low activity was not detected in bacteria of *A. pittii* and *A. calcoaceticus* species. 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 *A. baumannii* group. The sensitivity and specificity of the identifying *A. nosocomialis* strains method, based on the determination of the urease's rapid activity in combination with the *Ab* group phenotypic characteristics, in relation to by MALDI-TOF mass spectrometry of the studied strains were 100% and 98.83% ($\chi^2=103,2$; $P<0,0001$), respectively.

Key words: Acinetobacter nosocomialis identification; bacteria of Acinetobacter baumannii group; bacterial ureas; rapid activity urease; glucose utilization.

1 Введение

2 Ацинетобактеры относятся к приоритетным возбудителям инфекций,
3 связанных с оказанием медицинской помощи, и раневых инфекций. Еще в
4 1991 году ведущие возбудители этих инфекций геновиды 1, 2, 3, 13 TU были
5 объединены в комплекс *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii*
6 (комплекс АСВ), ввиду невозможности дифференцировать эти виды
7 фенотипическими тестами [6]. Так как бактерии *A. calcoaceticus* очень редко
8 находятся в клиническом материале, в настоящее время эта группа включает
9 три вида *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* под названием группа *A.*
10 *baumannii* (*Ab*). Выявлением ацинетобактеров группы *A. baumannii* (*Ab*)
11 обычно завершается лабораторная диагностика ацинетобактер инфекции
12 рутинными фенотипическими тестами. Наиболее точным методом
13 идентификации видов ацинетобактеров группы *Ab* является метод
14 секвенирования участков гена *rpo B* [8,10]. Метод матрично-активированной
15 лазерной десорбции-ионизации время пролетной масс-спектрометрии
16 (MALDI-TOF MS) также обеспечивает достоверную и быструю
17 идентификацию видов этой группы, но требует, иногда, коррекции протокола
18 исследования для *A. nosocomialis* [5,9]. В связи с возможностью видового
19 контроля штаммов методом MALDI-TOF MS представляет интерес
20 дальнейший поиск надежных и доступных фенотипических тестов
21 идентификации видов бактерий группы *Ab*. Наше внимание привлек уреазный
22 тест, ввиду отсутствия сведений об уреазном признаке в таксономических
23 описаниях видов бактерий комплекса АСВ [4, 6, 7].

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

27

28 **Материалы и методы**

29 *Штаммы бактерий.* Объектами исследования были 116 штаммов
30 бактерий группы *Acinetobacter baumannii* (*Ab*) и 2 штамма *Acinetobacter*
31 *calcoaceticus*. Все клинические штаммы были выделены в бактериологической
32 лаборатории Военно-медицинской академии в 2018-2019 гг., из них 85
33 штаммов *A. baumannii*, 10 штаммов *A. pittii*, 12 штаммов *A. nosocomialis*. Еще
34 9 штаммов *A.nosocomialis* были выделены нами из реки Невы. Два штамма *A.*
35 *calcoaceticus* из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии имени
36 Пастера, изолированных из цианобактериальных матов, были предоставлены
37 д.м.н. Краевой Л.А. Видовая принадлежность всех указанных штаммов была
38 идентифицирована методом MALDI-TOF масс-спектрометрии в НИИ
39 эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Все указанные штаммы
40 находятся в рабочей коллекции культур Е.П. Сиволодского на кафедре
41 микробиологии Военно-медицинской академии.

42 *Питательные среды и реактивы.* Для культивирования бактерий
43 использовали «Колумбийский агар» (НИЦФ, Санкт-Петербург).
44 Гемолитическую активность бактерий изучали на Колумбийском агаре с 5%
45 крови барана. Утилизацию субстратов в качестве единственного источника
46 углерода осуществляли на минимальном солевом агаре, г/л: NH_4Cl -5; NH_4NO_3
47 - 1; Na_2SO_4 -2; K_2HPO_4 - 3; KH_2PO_4 - 1; MgSO_4 - 0,1; агар - 15; 1,6%-ный
48 водный раствор бромтимолового синего - 4 мл, дистиллированная вода - 1 л;
49 рН=7,2; стерилизация при 121°C 20 мин. Каждый субстрат вносили по 0,1 г в
50 отдельную колбу с 50 мл стерильной горячей среды, устанавливали рН = 7,2,
51 в одну колбу субстрат не вносили (контроль среды), разливали в чашки Петри.
52 Использовали субстраты: этанол, L-Arabinose, D-Dexthrose, L-Histidine
53 hydrochloride, L-Arginine hydrochloride, Putrescine dihydrochloride, Tricarballic
54 acid (Sigma-Aldrich, Швейцария).

55 *Отношение бактерий к окраске по Граму.* Использовали тест «тяжа» с
56 3%- ным раствором КОН и/или микроскопию чистой культуры бактерий,
57 окрашенных по методу Грама. Рост бактерий при 37°C, 41°C, 44°C изучали
58 посевом суточных бульонных культур бактерий на сектора Колумбийского
59 агара с учетом через 48 ч. Наличие каталазы выявляли тестом с 3% раствором
60 пероксида водорода.

61 *Тест на цитохромоксидазу бактерий.* Наносили на фильтровальную
62 бумагу в чашке Петри несколько капель «1%-ного водного раствора
63 тетраметил-парафенилендиамина» (BioMerieux, Франция). Запаянным концом
64 пастеровской пипетки отбирали часть колонии или газона исследуемых
65 бактерий и наносили их на влажную бумагу с реактивом. Появление синей
66 окраски комочка бактерий в течение до 20 секунд указывало на наличие
67 цитохромоксидазы. Отсутствие окраски или появление ее в более поздние
68 сроки указывало на отрицательный результат.

69 *Методика определения нитратредуктазы бактерий [2].* Использовали
70 питательную среду с 0,1% KNO₃. Состав среды г/л: пептон ферментативный
71 0,5 ; NaCl 0,5; KNO₃ 0,1; вода дистиллированная 100 мл; стерилизация при
72 121°C 20 мин. Вносили по 0,1 мл среды в лунки полимерного планшета, затем
73 засеивали в лунки по 1 полной петле суточной агаровой культуры исследуемых
74 бактерий, одну из лунок не засеивали (контроль среды). Посевы инкубировали
75 при 37°C аэробно в течение 3 часов, после чего вносили в каждую лунку
76 реактивы на нитриты – 0,05 мл 0,2% -ного водного раствора риванола, затем
77 0,05 мл 12%-ного раствора соляной кислоты (приготовленной из
78 концентрированной 36,5% -ной соляной кислоты). Мгновенное появление
79 красной окраски среды в лунке с посевом указывало на наличие
80 нитратредуктазы бактерий, желтая окраска указывала на отсутствие
81 нитратредуктазы, в контрольной среде без посева сохранялась желтая окраска
82 реактива.

83 *Методика пероксидводородного микрообъемного ОФ-теста для*
84 *экспрессного (1 ч) определения окисления и ферментации глюкозы*
85 *грамотрицательными бактериями [1].* Использовали «Набор для
86 определения ферментации и окисления глюкозы (ОФ-теста)
87 пероксидводородным микрообъемным методом» (НИИЭМ имени Пастера,
88 Санкт – Петербург), содержащий среду № 1 (для ферментации глюкозы) – 100
89 мл 1% раствора D-глюкозы в фосфатно-буферной основе рН=7,6 с
90 индикатором фенол-рот и 5мл пергидроля (30% раствор пероксида водорода).
91 Среду № 2 (для окисления глюкозы) готовили путем внесения 10 мл среды №
92 1 в отдельный флакон, добавления 0,2 мл пергидроля до 0,6% конечной
93 концентрации пероксида водорода. Среду № 2 использовали в течение 12
94 часов. В лунки полимерного планшета вносили отдельно по 0,1 мл среды №
95 1 (для ферментации глюкозы) и среды № 2 (для окисления глюкозы).
96 Исследуемую культуру вносили полную петлю диаметром 2 мм (не
97 платиновую) в лунку со средой № 1 и перемешивали. Таким же образом
98 засекали культуру в лунку со средой для окисления глюкозы, в которой при
99 перемешивании наблюдается бурное выделение пузырьков газа (кислорода)
100 вследствие действия каталазы бактерий на пероксид водорода в среде. Посевы
101 инкубировали аэробно при 37°C в течение 1 ч. Изменение исходного красного
102 цвета среды № 1 в желтый цвет означало ферментацию глюкозы; переход
103 окраски в желтый цвет и газообразование в лунке со средой № 2 указывало на
104 окисление глюкозы. Отсутствие изменения окраски среды в обеих лунках при
105 газообразовании в среде № 2 указывало на отсутствие ферментации и
106 окисления глюкозы. Контроли – те же среды без посева бактерий.

107 *Методика утилизации субстратов в качестве единственного*
108 *источника углерода.* Суточные агаровые культуры бактерий по полной петле
109 (диаметром 2 мм) суспендировали в 0,2 мл стерильного 0,85% раствора NaCl
110 в лунках стерильного полимерного планшета. Чашки сред с субстратами

111 (состав сред указан выше) и контрольную среду без субстрата разделяли на 8
112 секторов и маркировали по номерам штаммов. Засевали исследуемые
113 культуры по полной петле взвеси бактерий из лунки радиальным штрихом на
114 сектор чашки с субстратом и чашки без субстрата (контроль). Посевы
115 выращивали при 37°C в течение 3 суток, просматривая ежедневно.
116 Положительным результатом утилизации субстрата считали наличие четко
117 выраженного газона бактерий по следу посева при отсутствии роста бактерий
118 на контрольной среде без субстрата.

119 *Методика определения уреазы быстрой активности микробъемным*
120 *методом в планшетах [3].* Состав и приготовление среды с мочевиной.
121 Использовали среду с мочевиной (рН=7,0±0,1) следующего состава: Na₂HPO₄
122 - 1,1 г; KH₂PO₄ - 1,1 г; NaCl - 5,0 г; 0,4% водно-щелочной раствор фенолового
123 красного - 5 мл; мочевина (CAS по. 57-13-6) 10,0÷15,0 г; вода
124 дистиллированная - 1л. Для приготовления среды ингредиенты, кроме
125 мочевины, растворяли в 1 л дистиллированной воды, разливали по 50 мл во
126 флаконы, стерилизовали 20 мин при 121°C, затем добавляли во флаконы по 0,5
127 ÷ 0,75 г самостерилизованной мочевины. Прозрачную, желтой окраски среду
128 использовали в течение 30 суток при хранении от 4°C до 8°C. Для постановки
129 теста среду с мочевиной вносили по 0,1 мл в лунки стерильного полимерного
130 планшета, суточную агаровую культуру исследуемых штаммов бактерий
131 засевали полной петлей диаметром 2 мм в лунку со средой и перемешивали.
132 Таким же образом засевали в отдельные лунки суточные культуры
133 контрольных штаммов уреазопозитивного *A. nosocomialis* (положительный
134 контроль) и уреазонегативного *A. baumannii* (отрицательный контроль), одну
135 лунку со средой не засевали (один контроль использовали для всех штаммов,
136 исследуемых в данный день). Посевы выращивали аэробно при 37°C в течение
137 3 ч, после чего учитывали результат: изменение исходной желтой окраски
138 среды в красную в лунке с посевом исследуемого штамма указывало на

139 выявление уреазы быстрой активности, при наличии таково же результата в
140 лунке положительного контроля. В лунках отрицательного контроля и без
141 посева бактерий среда сохраняла исходную желтую окраску. Выявление
142 уреазы после более длительной инкубации посевов указывала на наличие
143 уреазы слабой активности.

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

153 *Методика статистической обработки.* Статистический анализ
154 выполняли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6,0
155 (GraphPad Software Inc). Определение согласия между результатами
156 идентификации *A. nosocomialis* методом с выявлением уреазы быстрой
157 активности и методом MALDI-TOF масс-спектрометрии осуществляли
158 анализом таблицы сопряженности 2×2 бинарных величин с вычислением
159 критерия χ^2 с поправкой Йэйтса.

160 **Результаты**

161 Изучение распределения штаммов бактерий группы *A. baumannii* (*Ab*) и
162 *A. calcoaceticus* по времени выявления уреазы микрообъемным методом при
163 аэробном культивировании показало, что у всех 21 штаммов *A. nosocomialis*
164 уреазы выявляется быстро – в течение 3 ч, преимущественно через 1-2 ч
165 (табл.1). У 15 из 85 штаммов *A. baumannii* уреазы была обнаружена через 24 ч
166 культивирования и только у 1 штамма - через 2 ч (табл.1). У всех 10 штаммов

167 *A. pittii* уреазы не выявлена, у одного из двух штаммов *A. calcoaceticus*
168 обнаружена через 18 ч (табл.1). Всего имели уреазу $18 \pm 2,9\%$ штаммов *A.*
169 *baumannii* и 100% штаммов *A. nosocomialis*, при этом уреазы быстрой
170 активности, выявляемую через 3 ч, имели 100% штаммов *A. nosocomialis* и
171 только 1 штамм (1,17%) *A. baumannii* (табл.2). Бактерии видов *A. pittii* и *A.*
172 *calcoaceticus* не имели уреазы быстрой активности (табл.2). Результаты были
173 полностью воспроизводимы при трехкратных повторях. Определение уреазы
174 микрообъемным методом в условиях ограничения доступа воздуха
175 (культивирования посевов на среде с мочевиной под слоем вазелинового
176 масла) выявило уреазы быстрой активности (через 3 ч) у 16 из 21 штамма *A.*
177 *nosocomialis* ($76,2 \pm 2,7\%$) и 1 штамма *A. baumannii*.

178 Все исследуемые штаммы ацинетобактеров были изучены
179 фенотипическими тестами по указанной выше методике для выявления их
180 принадлежности к группе *A. baumannii* (*Ab*). Было установлено, что все
181 штаммы имели фенотипические признаки: грамотрицательные кокко-
182 бактерии, неподвижные, растут при 37⁰С, 41⁰С и/или 44⁰С, не имеют гемолиза
183 крови барана, не имеют цитохромоксидазы и нитратредуктазы, имеют
184 каталазу; не ферментируют, но окисляют D-глюкозу, утилизируют этанол, L-
185 арабинозу, L-аргинин, L-гистидин, путресцин, трикарбаллиловую кислоту, не
186 утилизируют D-глюкозу. Штаммы *A. nosocomialis*, *A. pittii* имели одинаковые
187 признаки по всем тестам. Штаммы *A. baumannii* имели варианты по
188 утилизации L- гистидина. Штамм *A. baumannii*, имевший уреазы быстрой
189 активности, отличался отсутствием утилизации L- арабинозы.

190 Исследование методом MALDI-TOF масс-спектрометрии выявило
191 принадлежность изученных штаммов к видам *A. baumannii*, *A. nosocomialis*, *A.*
192 *pittii*, *A. calcoaceticus* с показателями баллов $2.05 \div 2.85$. Статистическая
193 обработка результатов видовой идентификации 116 штаммов бактерий группы
194 *A. baumannii* (*Ab*) по совокупности фенотипических тестов с применением

195 теста на уреазу быстрой активности относительно результатов видовой
196 идентификации методом MALDI-TOF масс-спектрометрии показала что
197 чувствительность и специфичность идентификации штаммов вида *A.*
198 *nosocomialis* составили 100% и 98,83% ($\chi^2=103,2$; $P < 0,0001$) соответственно.
199 Обсуждение

200 В данном исследовании впервые был обнаружен фенотипический
201 признак, отличающий бактерии *A. nosocomialis* от других видов группы *Ab* (*A.*
202 *baumannii*, *A. pittii*) и *A. calcoaceticus*. С 1991 года считали невозможной
203 надежную идентификацию этих видов фенотипическими тестами и
204 лабораторную диагностику завершали определением группы *Ab* или
205 комплекса АСВ [6]. Этот признак – наличие уреазы быстрой активности,
206 выявляемой в течение 3 часов, был обнаружен у всех штаммов *A. nosocomialis*
207 (100%), одного штамма *A. baumannii* (1,17%) и отсутствовал у всех изученных
208 штаммов *A. pittii*, *A. calcoaceticus*. Следовательно, уреазы быстрой активности
209 имеет таксономическое значение как маркер бактерий вида *A. nosocomialis*
210 отличающий этот вид от других видов группы *A. baumannii*.

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

217 Для определения принадлежности исследуемых бактерий к группе *A.*
218 *baumannii* (*Ab*) был определен и апробирован минимальный набор тестов,
219 изложенных выше в разделе «Материалы и методы», который позволял
220 надежно идентифицировать бактерии группы *Ab* в течение 24-48 часов.

221 Идентификация штаммов ацинетобактеров, выделенных нами летом 2019 года
222 из реки Невы, показала, что по совокупности фенотипических признаков
223 бактерий группы *A. baumannii* (*Ab*) и уреазы быстрой активности были
224 выявлены 9 штаммов вида *A. nosocomialis*. Контрольная идентификация этих
225 штаммов методом MALDI-TOF масс-спектрометрии подтвердила
226 принадлежность всех штаммов к виду *A. nosocomialis*, что указывает на
227 надежность разработанного метода идентификации в лабораторной практике.
228 На данный способ идентификации бактерий вида *A. nosocomialis* получен
229 патент РФ на изобретение № 2712895 от 2020 года [3].

230 **Благодарности**

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

ТАБЛИЦЫ

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

Table 1. Distribution of *A. baumannii* group (*Ab*) and *A. calcoaceticus* bacterial strains by time of urease detection

| Вид Бактерий Bacterial species | Число штаммов Number of strains | Число выявленных штаммов с уреазой по интервалам времени (ч)* Number of detected strains with urease at time intervals (h)* | | | | | | | |
|-----------------------------------|------------------------------------|--|----|----|----|-----|-----|-------|-------|
| | | 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: *the total number of stains on each accounting interval

Таблица 2. Характеристика бактерий группы *A. baumannii* (*Ab*) и *A. calcoaceticus* по уреазной активности

Table 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 with the rapid urease activity* | |
| | | 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: *the urease detection after 3 hours

МЕТАДАННЫЕ

Сиволодский Е.П., д.м.н., профессор, профессор кафедры микробиологии
ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия им. 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
телефон: +7 911 78027 85

Sivolodskii Evgeny P, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of
microbiology, Military Medical Academy named S.M. Kirov, St.Petersburg,
Russian Federation; Senior researcher, Laboratory of molecular biological
technologies, Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St.
Petersburg, Russian Federation.

Зуева Елена Викторовна, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории
молекулярной иммунологии ФБУН «Научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия.
Адрес для переписки: 197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира 14
Телефон : 8-921-382-50-07 e-mail: elenazueva9@gmail.com

Zueva Elena V, PhD (Biology), Senior researcher, Laboratory of Molecular
Immunology, Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St.
Petersburg, Russian Federation.

For correspondence: 197101, Russian Federation, St.Petersburg , Mira str. 14
Phone: +7-921-382-50-07 e-mail: elenazueva9@gmail.com

**СПОСОБ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ
*ACINETOBACTER NOSOCOMIALIS***

Текст 9 страниц, раздел Методы»

Дата отправления: 28.03.2020 г.

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ

СПОСОБ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *ACINETOBACTER NOSOCOMIALIS*

METHOD FOR PHENOTYPIC IDENTIFICATION OF *ACINETOBACTER* *NOSOCOMIALIS* BACTERIA

Сиволодский Евгений Петрович, 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 «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия.

Зуева Елена Викторовна, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия.

Sivolodskii Evgeny P, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of microbiology, Military Medical Academy named S.M. Kirov, St.Petersburg, Russian Federation; Senior researcher, Laboratory of molecular biological technologies, Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation.

Zueva Elena V, PhD (Biology), Senior researcher, Laboratory of Molecular Immunology, Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation.

Сокращенные слова для верхнего колонтитула: Идентификация
A.nosocomialis / Identification of *A. nosocomialis*

Ключевые слова: *идентификация Acinetobacter nosocomialis, бактерии группы Acinetobacter baumannii, уреазы бактерий, уреазы быстрой активности, утилизация глюкозы*

Key words: *Acinetobacter nosocomialis identification, bacteria of Acinetobacter baumannii group, bacterial urease, rapid activity urease, glucose utilization.*

Адрес для переписки: Зуева Елена Викторовна,

ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»

197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.

Тел.: 8 (921) 382-50-07.

e-mail: elenazueva9@gmail.com

Address for correspondence: Zueva Elena V.

Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology

197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14.

Phone: 7 (921) 382-50-07.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

| Порядковый номер ссылки | Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные | ФИО, название публикации и источника на английском языке | Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи |
|-------------------------|---|---|--|
| 1. | Сиволодский Е.П. Пероксидводородный микрообъемный метод ОФ-теста: экспрессное определение окисления и ферментации глюкозы грамотрицательными бактериями // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1991. № 1. С. 14-17. | Sivolodskii E.P. Hydrogen peroxide microvolume metod of the of test the rapid determination of the oxidation and fermentation of glucose by gram-negative bacteria. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii, 1991, no.1, pp.14-17. (In Russ.). | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1950255 |
| 2. | Сиволодский Е.П., Кудакаев М.Т. Ускоренное определение нитратредуктазы неферментирующих грамотрицательных бактерий// Лабораторное дело.1991. № 1. С. 61-63. | Sivolodskii E.P., Kudakaev M.T. | PMID: 1715001 |
| 3. | Сиволодский Е.П., Способ идентификации бактерий <i>Acinetobacter nosocomialis</i> . Патент РФ. № 2712895 ; 2020. | Sivolodskii E.P. The metod of identification of bacteria <i>Acinetobacter</i> | www1.fips.ru/registers doc view/fips-serviette |

| | | | |
|----|---|--|--|
| | | nosocomialis. Patent RF, no. 2712895 (In Russ.). | |
| 4. | Bouvet P.J., Grimont P.A. Identification and biotyping of clinical isolates of <i>Acinetobacter</i> . <i>Ann. Inst.Pasteur Microbiol.</i> , 1987,Sep-Oct; vol. 138, no. 2, pp. 569-578 | — | PMID: 3440090 |
| 5. | Espinal P., Seifert H., Dijkshoorn L, Vila J.,Roca I. Rapid and accurate identification of genomic species from the <i>Acinetobacter baumannii</i> (Ab) group by MALDI-TOF MS. <i>Clin. Microbiol. Infect.</i> 2012, vol.18, no. 11, pp. 1097-1103 | — | [https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03696.x] PMID:22085042 |
| 6. | Gerner-Smidt P., Tjernberg I., Ursing J. Reliability of phenotypic tests for identification of <i>Acinetobacter</i> species. <i>J. Clin. Microbiol.</i> , 1991, vol. 29, no.2, pp. 277-282. | — | [https://jcm.asm.org/content/jcm/29/2/277.full.pdf] |
| 7. | Nemec 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 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> – <i>Acinetobacter baumannii</i> complex with the proposal of <i>Acinetobacter pittii</i> sp. nov. (formerly <i>Acinetobacter genomic species 3</i>) | — | [https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.02.006] |

| | | | |
|-----|--|---|--|
| | and <i>Acinetobacter nosocomialis</i> sp. nov. (formerly <i>Acinetobacter</i> genomic species 13 TU). <i>Research in microbiology</i> , 2011, vol. 162, pp. 393-404. | | |
| 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 <i>Acinetobacter</i> spp. complex obtained from hospitalized patients in Busan, Korea. <i>Biomed Sci Letters</i> ; 2019.vol.25,no.1, pp. 40-53 | — | [https://doi.org/10.15616/bsl.2019.25.1.40] |
| 9. | Sedo O., Nemeč A., Krizová L., Kacalová M., Zdrahal Z. Improvement of MALDI-TOF MS profiling for the differentiation of species within the <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> – <i>Acinetobacter baumannii</i> complex. <i>Syst. Appl. Microbiol.</i> 2013, vol.36, no. 8, pp. 572-578 | — | [https://doi.10.1016/j.syapm.2013.08.001] PMID:24054697 |
| 10. | Wang J., Ruan Z., Feng Y., Fu Y., Jiang Y., Wang H., Yu Y. Species distribution of clinical <i>Acinetobacter</i> isolates revealed by different identification techniques. 2014. <i>PLOS ONE</i> vol.9 no.8.e 104882 | — | [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104882] |

| | | | |
|--|--|--|--|
| | | | |
|--|--|--|--|