

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Медико-профилактический факультет с отделением биологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

На правах рукописи



Сазонова Ксения Андреевна

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК ВНЕШНЕЙ
МЕМБРАНЫ OmpA БАКТЕРИЙ РОДА *ACINETOBACTER*, И ГЕНА *stm* PR1,
КОДИРУЮЩЕГО СУБТИЛАЗУ *S. MALTOPHILIA*

Научный руководитель:
Зав. кафедрой ФГПМ
профессор, д.м.н.



Мавзютов А.Р.

Уфа – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие сведения о бактериях рода *Acinetobacter spp.*

1.1.1. История и таксономия

1.1.2. Таксономическое положение

1.2. Общая микробиологическая характеристика бактерий рода *Acinetobacter spp.*

1.2.1. Биохимические свойства

1.2.2. Экология ацинетобактерий

1.3. Эпидемиология

1.4. Роль *Acinetobacter spp.* в возникновении нозокомиальных инфекций.

1.4.1. Респираторные инфекции

1.4.2. Бактериемии

1.4.3. Менингиты

1.5. Патогенез инфекций, вызванных *Acinetobacter spp.*

1.5.1. Предрасполагающий фактор

1.5.2. Вирулентность

1.5.2.1. Белки внешней мембраны OmpA.

1.6. *Stenotrophomonas maltophilia*: общие представления.

1.6.1. Таксономия

1.6.2. Эпидемиология *S. maltophilia*

1.6.3. Факторы патогенности

1.7. Лабораторные методы исследования.

1.7.1. Бактериологическое исследование

1.7.2. Масс-спектрометрия по технологии MALDI-ToF

1.7.3. Полимеразная цепная реакция

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования.

2.2. Приготовление питательных сред для выделения микроорганизмов из клинических образцов и выделение чистой культуры.

2.3. Идентификация микроорганизмов масс-спектрометрическим анализом по технологии MALDI-ToF.

2.4. Подбор олигонуклеотидных праймеров для проведения полимеразной цепной реакции.

2.5. Выделение ДНК из клинических образцов.

2.6. Проведение полимеразной цепной реакции препаратов ДНК *Acinetobacter* spp. на выявление гена, кодирующего белок внешней мембраны OmpA.

2.7. Детекция ПЦР-продуктов методом электрофореза в агарозном геле.

ГЛАВА III РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Выделение клинических штаммов неферментирующих грамотрицательных бактерий.

3.2. Масс-спектрометрия.

3.3. Антибиотикочувствительность *A. baumannii*.

3.4. Проверка специфичности праймеров на *Acinetobacter* spp.

3.5. Интерпретация результатов проведенного ПЦР-анализа ДНК *Acinetobacter* spp. с последующим электрофорезом в агарозном геле.

ВЫВОДЫ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ПРИЛОЖЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЦНС - центральная нервная система

УПМ - условно-патогенные микроорганизмы

НКИ - нозокомиальные инфекции

ВОЗ - всемирная организация здравоохранения

ОРИТ - отделение реанимации и интенсивной терапии

НФБ - неферментирующие бактерии

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ВБИ - внутрибольничная инфекция

ИВЛ - искусственная вентиляция легких

ВБ - внутрибольничный

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ПКО - положительный контрольный образец

ОКО - отрицательный контрольный образец

МС-анализ - масс-спектрометрический анализ

OMV - наружные мембранные везикулы

М/О - микроорганизм

ЛПС - липополисахарид

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в числе серьезных возбудителей госпитальных инфекций рассматриваются бактерии родов *Acinetobacter* и *Stenotrophomonas*. Эти микроорганизмы являются условно-патогенными, но при снижении иммунитета или на фоне болезни могут усугубить ситуацию или вызвать новое заболевание. Естественным резервуаром для *Acinetobacter* и *Stenotrophomonas* является почва и природные водоемы. В госпитальных условиях эти микроорганизмы могут быть обнаружены на кухонных принадлежностях, системах вентиляции и увлажнения, на инструментах для уборки помещений, на различном медицинском оборудовании (таких, как небулайзеры, аппараты диализа, контуры аппаратов искусственной вентиляции), в субстрате комнатных растений, на коже рук персонала больницы и даже в дезинфицирующих растворах.

Ацинетобактерии обычно вызывают нозокомиальные инфекции:

- пневмонии,
- подострые и острые бактериальные эндокардиты,
- бактериемии и септицемии,
- урологические инфекции,
- менингиты (при нейрохирургических вмешательствах).
- раневые и ожоговые инфекции.

Stenotrophomonas maltophilia вызывает инфекции:

- пневмония,
- сепсис,
- раневые инфекции,
- инфекции мочевыводящих путей,

-эндокардиты,

-инфекции ЦНС.

В докладе Всемирной Организации Здравоохранения " «Противомикробные средства на стадии клинической разработки – аналитическое исследование процесса клинической разработки противомикробных средств, включая средства против туберкулеза» от 20.09.2017 указано, что существует серьезный дефицит средств для лечения инфекций, вызванных широкой лекарственной устойчивостью *Acinetobacter* и *Stenotrophomonas*. Также, 27.02.2017 ВОЗ публикует список бактерий, для борьбы с которыми требуется немедленное создание новых антимикробных лекарственных средств; бактерия *Acinetobacter baumannii* вошла в первую категорию приоритетности: критически высокий уровень приоритетности, так как она устойчива к карбапенемам.

Цель исследования

Детекция генов в клинических образцах для оценки их этиологической значимости.

Задачи исследования

1. Анализ литературных данных;
2. Подбор праймеров в генетическом банке;
3. Выделение чистой культуры из клинических образцов, создание инокулята;
4. Выделение ДНК из инокулята;
5. Проведение ПЦР-анализа и гель-электрофореза;
6. Оценка диагностической ценности.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общие сведения о бактериях рода *Acinetobacter* spp.

1.1.1 История и таксономия.

Род *Acinetobacter* претерпел обширные таксономические изменения за многие годы, после того как человечество обнаружило эти микроорганизмы. Ранее эти бактерии были классифицированы в различных родах: наиболее известном *Bacterium anitratum* [1], *Herellea vaginicola* и *Mima polymorpha* [2], *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Neisseria*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Diplococcus* и *Cytophaga* [3]. Группа бактерий, к которой относится *Acinetobacter*, была впервые выделена из почвенных образцов в 1911 году Мартином Бэйринком [4]. В то время он полагал, что работает с конкретным видом и дал название *Micrococcus calcoaceticus* изоляту, который был выделен [5]. Однако позже другие исследования привели к множественным изменениям взглядов на таксономические свойства *M. calcoaceticus*.

Родовое название "*Acinetobacter*" было предложено в 1954 году, когда Брисо и Прево отделили "вид" *Micrococcus calcoaceticus* от рода *Achromobacter* [6]. Позже у *Bacterium anitratum* было изменено название на *A. calcoaceticus*, еще позже были идентифицированы актуальные в медицине *A. johnsonii*, *A. baumannii*, *A. junii* и другие.

В 1961 году в Пастеровском институте Riéchaud описал строго аэробные, оксидазаотрицательные, грамотрицательные коккобациллы, рассмотрев которые идентифицировал как *Moraxella glucidolytica*, как штамм, окисляющий глюкозу, или *Moraxella lwoffii*. Эти микроорганизмы были стойкими к пенициллину, и идентификация штаммов была основана на фенотипических характеристиках (культуральные свойства и метаболизм) и морфологии, которая была описана в точности, включая стадии клеточного деления, используя окраску по методу Робиноу.

Только в 1971 году Подкомиссия по таксономии *Moraxella* предложила, что род *Acinetobacter* должен включать только оксидазаотрицательные штаммы. В справочнике Берджи по

бактериологической систематике (Juni, 1984) род *Acinetobacter* содержал один вид *A. calcoaceticus*, два вида: *Anitratus* (ранее *Herella vaginicola*) и вид *lwoffii* (ранее *Mima polymorpha*), сгруппированные в семейство *Neisseriaceae*.

Неустойчивая и постоянно изменяющаяся таксономия препятствовала прогрессу изучения и понимания патогенной роли *Acinetobacter spp.* в инфекционных заболеваниях человека. Промедление в изучении эпидемиологии приводило к более частым случаям заболеваний, возбудителями которых являлись *Acinetobacter spp.*.

Более чем через десятилетие была создана классификация, которая способствовала изучению эпидемиологии *Acinetobacter spp.* и детекции их патогенной роли при инфекциях, в результате стало ясно, что штамм *A. calcoaceticus* наиболее часто выявлялся при инфекциях и был самым стойким штаммом *Acinetobacter spp.*[7.]. Позднее, современные методы таксономии (трансформация генов, ДНК гибридизация, сравнение последовательностей рРНК) привели к новой классификации *Acinetobacter spp.*, которая включает 19 ДНК-ДНК гомологичных групп, некоторым из них, до настоящего времени, были даны 7 названий вида.

Были предприняты множественные, но не эффективные попытки создать серологическую таксономию по антигенным свойствам ЛПС (О-антигена) для диагностики вызванными ими заболеваний.

1.1.2. Таксономическое положение.

Согласно новейшей классификации эубактерий, род *Acinetobacter* принадлежит к типу *Proteobacteria*, классу *Gammaproteobacteria*, порядку *Pseudomonadales*, семейству *Moraxellaceae*.

1.2. Общая микробиологическая характеристика бактерий рода *Acinetobacter spp.*

Бактерии рода *Acinetobacter* - неферментирующие строго аэробные организмы, которые повсеместно распространены в природе.

Хемоорганотрофы. Оксидазанегативные и каталазоположительные неподвижные грамотрицательные бактерии - прототрофы, имеющие размер, как правило 1.0-1.5 мкм x 1.5-2.5 мкм в логарифмической фазе роста, обычно их форма зависит от фазы и условий роста, может быть коккобациллярной либо кокковидной с содержанием G+C в ДНК 39-47%. Нуклеоид имеет объем порядка 3,5-3,9 МБ и представлен единичной циркулярной хромосомой.

Это неприхотливые микроорганизмы, которые могут быть выращены на простых питательных средах и могут использовать большое разнообразие субстратов в качестве единственных источников углерода, однако, не каждый штамм может использовать глюкозу в качестве источника углерода [8].

Все виды этого рода могут вырасти в широком спектре температур, формируя гладкие, выпуклые, иногда слизистые, колонии диаметром до 2-3 мм на твердых питательных средах, некоторые штаммы могут продуцировать бледно-желтый и светло-серый пигмент [9]. Элективной средой для *Acinetobacter* является Лидс-агар, также эти микроорганизмы растут на хромогенных средах CHROMagar. Клинические изоляты вырастают при 37°C, могут вырастать в психрофильных условиях; для некоторых экологических изолятов комфортной для инкубации является температура 20-30°C. Отрицательная оксидазная реакция служит быстрым тестом для различия рода от других родов в семействе *Neisseriaceae*. Ацинетобактерии не образуют споры, могут вырабатывать слизь. Большинство штаммов неспособны восстанавливать нитраты до нитритов в обычной пробе на восстановление нитрата. Некоторые клинические изоляты, особенно те, которые принадлежат к *A. haemolyticus*, могут образовывать зону гемолиза на кровяном агаре с эритроцитами барана. Внутри рода есть значительное различие клинических штаммов и штаммов из окружающей среды.

Каждая популяция характеризуется преобладающими группами геномных разновидностей, таким образом, например, вид *A. baumannii*

найден преимущественно в клинической среде, а виды *A. johnsonii* и *A. lwoffii* найдены преимущественно в неклинической среде. В то же время генетический обмен между популяциями клинической и неклинической сред возможен, последствиями этого является распространение генов устойчивости к антибиотикам.

В наше время липополисахарид бактерий является индикатором чувствительности к колистину: у колистинустойчивых видов наблюдается полная потеря ЛПС, либо проявляются модификации входящего в состав липида [10, 11]. На внешней мембране ацинетобактерий есть поверхностные белки (Omp, Outer Membrane Proteins), молекулярная масса которых составляет до 65 КДа. Многие виды *Acinetobacter* (в первую очередь клинически значимые штаммы *A. baumannii*) образуют полисахаридные капсулы, которые являются основой для К-антигена [12].

1.2.1. Биохимические свойства.

Бактерии рода *Acinetobacter* используют огромное количество веществ для питания: от глюкозы (и других углеводов) и нефтепродуктов (используются для биоразложения нефтяных отходов) до тканей макроорганизма людей. Большинство штаммов разлагают углеводы (D-рибоза, D-глюкоза) только используя метаболизм, зависящий от кислорода, выделяя спирт. Относятся к неферментирующим бактериям (НФБ). Не способны продуцировать индол, сероводород, ацетон.

В составе ацинетобактерий имеется комплект липаз, таких как фосфолипаза D, липаза A, фосфолипаза C и другие), некоторые из них могут обозначаться как фактор патогенности; благодаря им у ацинетобактерий имеется большая липолитическая активность [13-15]. Для действия большинства липаз необходима щелочная pH, а вот разброс температуры имеет широкий диапазон (есть липазы, устойчивые к низким температурам)[16].

Некоторые виды *Acinetobacter* имеют в своем арсенале особенные ферменты, которые не присущи абсолютно всем ацинетобактериям. Например, *Acinetobacter radioresistens* благодаря ферменту полиуретаназа, который расщепляет полиуретан, и с помощью фермента фенолгидроксилаза может использовать фенол в качестве единственного источника энергии и углерода [17].

2.2. Экология ацинетобактерий.

Acinetobacter spp. - убиквитарные почвенные и водные сапрофиты, но могут загрязнять различные объекты окружающей среды и материалы, могут колонизировать разнообразные биотопы. В исследованиях почв и воды штаммы ацинетобактерий выявлялись в 100% образцов, обнаруживали в посевах с кожи, слизистой (верхние дыхательные пути) здоровых людей [18]. Любопытно, что некоторые виды ацинетобактер нейтральны к действию моющих средств [19].

Acinetobacter найдены в составе пыли, т.е. они способны переживать условия обезвоживания [20, 21].

1.3. Эпидемиология ацинетобактерий.

Естественный резервуар и источник инфекции: почвенная и водная среда. Чаще всего инфицирование происходит посредством попадания микроорганизмов в поврежденные участки кожи человека. В госпитальных условиях эти микроорганизмы могут быть выявлены на кухонных принадлежностях, в системах вентиляции и увлажнения, на инструментах для уборки помещений, на разнообразном медоборудовании (таких, как небулайзеры, аппараты диализа, контуры аппаратов искусственной вентиляции), в субстрате комнатных растений, на коже рук персонала больницы и даже в дезинфицирующих растворах [22-24].

В лечебных организациях источниками инфекций являются больные пациенты и/или носители, медицинский персонал, а также бытовые и

медицинские приборы. В период с 2000 по 2010 гг. *Acinetobacter* были причастны к 1-3 % нозокомиальным инфекциям [25]. Данные российских исследователей (РНЦХ им. Б.В. Петровского) ведут о том, что в 2012 году процент ацинетобактерий среди всех возбудителей послеоперационных воспалительных инфекций составил 3,4 % [26].

Множество исследований внутрибольничных инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, показали, что *Acinetobacter* являются виновниками многих случаев заболеваний нижних отделов дыхательных путей и заболеваний мочевых путей [27-30]. Разновидности ацинетобактер появились в качестве особо важных организмов в ОРИТ [31-37], и это, вероятно связано, к все более и более агрессивным диагностическим и терапевтическим процедурам, используемым в ОРИТ за прошлые два десятилетия.

Истинную частоту внутрибольничной инфекции, вызванной *Acinetobacter spp.*, не легко оценить, в частности потому что изоляция этих организмов от клинических экземпляров может отразить инфекцию [38]. Разновидности ацинетобактерий составляли 1,4 % всех ВБИ в 10-летний период (1971 - 1981) в университетской клинике в Соединенных Штатах [39], с основными местами и типами инфекции включая дыхательные пути, бактериемии, брюшины, инфекции мочевых путей, хирургических ран, менингита, и кожи или глазной инфекции. Более свежее исследование в университетской клинике обнаружило, что госпитализация в ОРИТ и предыдущая антибиотикотерапия была связаны с колонизацией *Acinetobacter* в различных локализациях на теле в 3.2 к 10.8 на 1000 пациентов, составляющей 0.3 % местных ВБИ в критическом состоянии пациента и 1 % внутрибольничной бактериемии во всей больнице [40]. Одно исследование сообщило о сезонной заболеваемости инфекцией ацинетобактерий [41] с увеличением зараженности в конце летнего периода и в начале зимы - может быть связано с изменениями температуры и влажности; но это исследование еще не было подтверждено другими изучениями.

Acinetobacter spp., особенно в регионах с влажным климатом, могут быть частью бактериальной флоры кожи, таких как подмышечные впадины, пах, пальцы ног, по крайней мере 25 % здоровых людей являются носителями ацинетобактерий на коже [42, 43]. *Acinetobacter spp.* также иногда находились в полости рта и дыхательных путях здоровых людей [44, 45]. Уровень носительства может быть намного выше у госпитализированных пациентов, особенно во время вспышек инфекции. В мазках с горла находили ацинетобактерий у 7-18 % пациентов, в то время как мазки после трахеостомии у 45 % госпитализированных пациентов [46].

Было зарегистрировано несколько вспышек инфекций различных степеней важности горла, дыхательной системы, пищеварительного тракта. В частности эпидемические вспышки механически вентилируемых пациентов ОРИТ, связанные с высоким темпом колонизации дыхательных путей [47-50], которые могут указывать на загрязнение оборудования для искусственной вентиляции. Кроме того, во время таких вспышек бактерии могут быть колонизированы на коже рук. Это, в свою очередь, ведет к загрязнению кожи рук больничного персонала, таким образом способствуя распространению бактерий в госпитальных условиях [51]. Также, стойкие штаммы находили в пищеварительном тракте [52, 53].

Несколько выводов относительно колонизации бактерий у госпитализированных пациентов могут быть сделаны из опубликованных исследований:

- 1) Высокий показатель микробной обсемененности может быть у госпитализированных пациентов с истощенной иммунной системой, особенно во время эпидемиологических вспышек;

- 2) Преобладающее место колонизации - кожа, но в определенных случаях также могут быть другие места, например, дыхательные пути и пищеварительный тракт.

- 3) Наблюдаемые несоответствия между уровнем носительства у амбулаторных больных и госпитализированных пациентов означают, что

инфицирование и обсемененность бактериями при ВБИ можно получить чаще в контакте с медицинским персоналом и больничным оборудованием, чем из эндогенных источников у пациента.

1.4. Роль *Acinetobacter spp.* в возникновении нозокомиальных инфекций.

1.4.1. Респираторные инфекции.

Многочисленные вспышки внутрибольничной легочной инфекции, вызванной *Acinetobacter spp.* в ОРИТ [54-61], и роль ацинетобактерий в возникновении пневмонии, связанной с искусственной вентиляцией легких (ИВЛ), увеличиваются. Независимо от бактериологического метода, используемого, чтобы определить причину пневмонии, несколько исследований сообщили, что приблизительно 3-5 % внутрибольничных пневмоний вызваны ацинетобактериями [62, 63]. У пациентов с пневмонией, зарегистрированных в Национальном Внутрибольничном Исследовании Инфекций [64], этот микроорганизм составил 4 % общего количества легочных инфекций с 1990 по 1992. Используя определенные диагностические методы несколько недавних исследователей продемонстрировали увеличивающуюся роль, которую играет ацинетобактер (*A. baumannii*) при внутрибольничных пневмониях для множества пациентов ОРИТ, требующих искусственную вентиляцию легких. Интересно, что этот уровень увеличивается несмотря на то, что дыхательное оборудование тщательно дезинфицируется.

Множество факторов выявлялись как увеличение риска пневмонии или колонизации ацинетобактериями нижних дыхательных путей: преклонный возраст, хронические заболевания легких, иммунодепрессия, хирургическое вмешательство [65-70]. Было изучено 159 пациентов за 13-месячный период, получившие ИВЛ в течение 72 часов [71] для определения связи между использованием вентиляции и пневмонией, вызванной *A. baumannii*. По критериям, используемым в исследовании, ВБ пневмония, связанная

непосредственно с *A. baumannii*, возникла у 19 (12 %) из 159 пациентов исследования, в то время как, микроорганизм присутствовал в 27 % случаев пневмонии. Смертность составляла 30-75 % пациентов с ВБ пневмонией, вызванной *Acinetobacter spp.* [72-74].

1.4.2. Бактериемии.

Несмотря на проблемы дифференцирования между загрязнением проб крови жителями кожи и истинной бактериемией, наиболее распространенная разновидность, вызывающая бактериемию, идентифицирована как *A. baumannii* в большей части серии исследования взрослых пациентов [75]. Штаммы ацинетобактерий могут быть найдены или как единственный болезнетворный микроорганизм, или как часть полимикробной бактериемии. Пациенты с ослабленным иммунитетом составляют самую многочисленную группу взрослых пациентов. У этих пациентов источник бактериемии чаще всего - инфекция дыхательных путей с самым высоким уровнем внутрибольничной бактериемии, появляющейся в течение второй недели госпитализации. Предрасположения к этому - смертельная болезнь, травмы и ожоги. Вторая группа риска - новорожденные. В одном отчете в Японии было описано 19 новорожденных с сепсисом, вызванным *Acinetobacter* в неонатальном ОРИТ в течение 30 месяцев. Все случаи имели сепсис с поздним началом у младенцев, госпитализированных в течение многих длительных периодов, со смертностью 11 из них [76]. Факторами риска предрасположения для сепсиса был низкий вес при рождении, предыдущее лечение антибактериальными препаратами, ИВЛ и присутствие неонатальных конвульсий. Во втором отчете [77] была описана вспышка сепсиса в неонатальном учреждении у семи младенцев, получающих парентеральную пищу. У всех младенцев были серьезные клинические признаки и симптомы септического шока; пяти младенцам требовалась ИВЛ, но все они выздоровели после соответствующего лечения антибактериальными препаратами. Исходя из результатов этих отчетов

Acinetobacter spp. должен быть добавлен к списку организмов, способных к порождению тяжелой внутрибольничной инфекции в неонатальном ОРИТ.

1.4.3. Менингиты.

Вторичный менингит является преобладающей формой менингита *Acinetobacter*, хотя сообщалось о спорадических случаях первичного менингита, особенно после нейрохирургических процедур или травмы головы [78]. До 1967 года было около 60 случаев менингита, вызванного ацинетобактериями, большинство из них были внебольнично приобретенными инфекциями. Однако с 1979 года подавляющее большинство случаев были ВБИ, почти все вызванные *A. baumannii*. Показатели смертности колеблются от 20 до 27 %. Большинство пациентов было взрослыми мужчинами, которые перенесли люмбальные проколы, миелографию, вентрикулографию и другие нейрохирургические процедуры, хотя у одного пациента была посттравматическая оторрея без вмешательства хирургов [79]. Был описан случай менингита *Acinetobacter spp.*, который был связан с вентрикулоперитонеальным шунтированием с сопутствующей туннельной инфекцией, в котором *A. baumannii* был выделен из спинно-мозговой жидкости [80].

1.5. Патогенез инфекций, вызванных *Acinetobacter spp.*

1.5.1. Предрасполагающий фактор.

Различное предрасположение факторов риска к тяжелому заражению *Acinetobacter spp.* было определено, некоторые из них также относятся к организмам, вызывающим другие ВБИ. Восприимчивые пациенты - недавно перенесшие обширное хирургическое вмешательство, с тяжелой основной болезнью (например, злокачественные новообразования, ожоги или иммуносупрессия), пожилые люди.

Наиболее детальные исследования факторов риска были связаны с исследованием инфекций дыхательных путей, а также ряд факторов подозревались или выявлялись как увеличение риска развития пневмонии или колонизации нижних дыхательных путей, инфекциями, вызванными *Acinetobacter spp.* (вероятно, *A. baumannii* в большинстве случаев) в ОРИТ; к ним относятся пожилой возраст, хронические заболевания легких, иммуносупрессия, хирургическое вмешательство, использование антимикробных препаратов, наличие инвазивных устройств, таких как эндотрахеальные и трубки в желудке, а также тип дыхательного оборудования [81-86]. Хотя многие из этих переменных, вероятно, взаимосвязаны, лишь в нескольких исследованиях потенциальных факторов риска использовались соответствующие статистические модели для определения независимых детерминант риска [87].

1.5.2. Вирулентность.

Хотя *Acinetobacter spp.* считаются бактериями с низкой патогенностью [88-90], определенные характеристики этих микроорганизмов могут увеличить вирулентность штаммов, вовлеченных в инфекции. Эти факторы включают:

- присутствие полисахаридной капсулы, сформированной из L-рамнозы, D-глюкозы, глюкуроновой кислоты и D-маннозы [91], что, вероятно, делает поверхность штаммов более гидрофильной [91, 92];
- свойство сцепления к клеткам эпителия человека в присутствии фимбрий и/или капсульного полисахарида [92-94];
- производство ферментов, которые могут повредить липиды ткани;
- потенциально токсическая роль липополисахаридного компонента клеточной стенки и наличие липида А [95].

Вместе с другими грамотрицательными бактериями *Acinetobacter spp.* производят липополисахарид, ответственный за летальную токсичность у мышей, пирогенность у кроликов и положительный лизат-тест. Производство эндотоксина в естественных условиях, вероятно, ответственно за симптомы болезни, наблюдаемые во время сепсиса, вызванного ацинетобактериями.

По-видимому, у *A. baumannii* имеется только ограниченная вирулентность у мышей (50 % летальная доза, 10⁶-10⁸ КОЕ на мышь) при инокуляции внутрибрюшинно даже у нейтропных мышей. Однако экспериментальные исследования в мышинной модели пневмонии *Acinetobacter* показал, что эта пневмония очень похожа на пневмонию у человека [96]. Экспериментально, смешанные инфекции, объединяющие другие бактерии с ацинетобактериями, являются более патогенными, чем инфекции, вызванные только *Acinetobacter spp.* Слизь, продуцируемая штаммом ацинетобактер, считалась основным фактором, ответственным за усиление вирулентности при смешанных инфекциях, но немногие штаммы *Acinetobacter spp.* могут производить слизь; из 100 испытанных изолятов [97], только 14 имели эту способность. Это же исследование показало, что слизь ассоциируется с цитотоксичностью по отношению к нейтрофилам и ингибированием миграции нейтрофилов в перитонеальный экссудат мышей. Корреляция между количеством вырабатываемой слизи и степенью вирулентности не наблюдалась. Способность бактерии получать необходимое железо для роста в организме человека также является важным определяющим фактором вирулентности, и было показано, что некоторые штаммы *Acinetobacter* продуцируют сидерофоры, такие как аэробактин и железо-репрессивные внешние мембранные рецепторные белки [98-100].

Капсульный экзополисахарид является одним из основных факторов патогенности, полагается, что он действует как защита бактериальной клетки от защитных механизмов антител макроорганизма; Вызывает токсичное действие на фагоциты и приводит к смертности мышей. Действует

одновременно с липополисахаридами. Экзополисахарид продуцируют около 30 % штаммов *Acinetobacter spp.*

1.5.2.1. Белки внешней мембраны OmpA.

Важную роль в бактериальной патогенности и иммунном уклонении в хозяине играют белки внешней мембраны OmpA. *A. baumannii* индуцирует воспалительные реакции легких при пневмонии, придерживаясь эпителиальных клеток [101-103] и впоследствии индуцируя гибель клеток посредством активации каспазы-3 [104, 105]. Эти наблюдения показывают, что *A. baumannii* OmpA способствует образованию биопленки на эпителиальных клетках и опосредует бактериальную приверженность эпителиальным клеткам легких путем взаимодействия с фибронектином на поверхности клеток [106, 107]. Более того, *A. baumannii* OmpA транслоцирует митохондрии и ядро клеток-хозяев и индуцирует апоптоз в этих клетках [108-110]. Эти исследования показывают, что OmpA имеет жизненно важное значение для патогенности инфекции *A. baumannii*. Также, OmpA связан с резистентностью к кабапенемным антибиотикам (имипенем и меропенем) [111,112] и модулируют аутофагию в эпителиальных клетках человека [113].

Дальнейшие исследования показали, что Omps доставляются в клетки-хозяева с помощью наружных мембранных везикул (OMV) и функционируют как эффекторные молекулы, продуцируемые грамотрицательными бактериями [114-116]. Другие исследования показали, что *A. baumannii* выделяет OMV во время роста [117] и индуцирует гибель клеток-хозяев и производство цитокинов через эти OMV [117, 118]. В частности, OMV из OmpA-дефицитного штамма *A. baumannii* не индуцировали гибель клеток [117], что указывает на то, что OmpA играет важную роль в цитотоксичности к клеткам-хозяевам. Однако большинство лабораторных штаммов и клинических изолятов *A. baumannii* демонстрируют низкую патогенность *in vivo*, поскольку эти штаммы не

вызывают высокой смертности и бактериальной нагрузки в тканях [105, 119-122].

1.6. *Stenotrophomonas maltophilia*: общие представления.

S. maltophilia - аэробная, грамотрицательная, подвижная палочка, ранее известна как *Pseudomonas maltophilia* или *Xanthomonas maltophilia*. Изначально была отнесена к роду *Xanthomonas*, а затем к роду *Stenotrophomonas* в 1993 году. Относится к неферментирующим бактериям. Стала известна как оппортунистический лекарственно-устойчивый патоген, который отвечает за все большее число нозокомиальных инфекций и особенно поражает пациентов с ослабленным иммунитетом. Хотя *S. maltophilia* известна своим применением в биотехнологии, в последние десятилетия она все чаще ассоциируется с кистозным фиброзом и нозокомиальными инфекциями [123]

S. maltophilia является космополитической и вездесущей бактерией, которая встречается в различных средах обитания, включая экстремальные, хотя в природе она в основном связана с растительностью. *S. maltophilia* выполняет важные функции экосистемы в циклах серы и азота, в деградации сложных соединений и загрязняющих веществ, а также в содействии росту и здоровью растений. *Stenotrophomonas* также может колонизировать экстремальные искусственные ниши в больницах, космических челноках и чистых комнатах; может обитать в воде, почве, сточных водах и колонизировать медицинское оборудование [124, 125].

Размеры бактерии $0.7\text{--}1.8 \times 0.4\text{--}0.7$ мкм, намного меньше, чем другие представители рода *Stenotrophomonas*. Подвижность обусловлена полярными жгутиками. Облигатные аэробы. Каталазоположительные и оксидазоотрицательные, имеют положительную реакцию на внеклеточные ДНК-азы. Не способны ферментировать глюкозу и другие углеводы (НФБ),

но могут ферментировать мальтозу. Бактерии *S. maltophilia* хорошо растут на агаре Мак-конки, продуцируя пигмент.

1.6.1. Таксономия.

Stenotrophomonas maltophilia относится к царству *Procaryotae*, к отделу *Gracilicutes*, семейству *Xanthomonadeaceae*, роду *Stenotrophomonas*.

1.6.2. Эпидемиология *S. maltophilia*.

S. maltophilia является оппортунистическим патогеном, вызывая бактериемию, пневмонию, внутрибрюшную и слизисто-кожную инфекции. Пациенты с более высоким риском заражения *S. maltophilia* являются ослабленными, иммуносупрессированными и нейтропеническими пациентами [126-129].

Идеальная мишень - диализированные пациенты, так как они иммуносупрессированы из-за уремии, старости, недоедания, имеют сопутствующие заболевания и им необходимо использование, например, протезных трансплантатов, центральных венозных или перитонеальных катетеров.

Лечение инфекций, вызванных *S. maltophilia* может стать тяжелым, поскольку бактерия обладает внутренней резистентностью к нескольким классам антибиотиков, за счет продуцирования бета-лактамаз, эффлюксных насосов препарата и снижения проницаемости, эта резистентность также может возникать в ходе терапии [130, 131].

Большинство штаммов *S. maltophilia*, как правило, устойчивы к пенициллину широкого спектра действия, цефалоспорином третьего поколения и карбапенемам [132; 133], но чувствительны к новейшему

поколению хинолонов, аминогликозидов и триметроприму /сульфаметоксазолу [134; 135].

1.6.3. Факторы патогенности.

Ранее этот микроорганизм считался малопатогенным или непатогенным вовсе. Но в последние 10-15 лет произошел резкий скачок этиологического значения при гнойных инфекциях.

1.7. Лабораторные методы исследования.

В зависимости от места течения патологического процесса материалом для исследования может служить мокрота, моча, раневое отделяемое и ожоговое отделяемое.

Взятие биоматериала должно осуществляться до начала приема химиопрепаратов и местных манипуляций с обязательным соблюдением правил асептики и антисептики в профильных отделениях стационара у пациентов. Необходимо произвести отбор культур неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных при микробиологическом исследовании биоматериала (мокроты, мочи, раневого отделяемого).

Мокрота - собирается утренняя мокрота, выделяющаяся у больных во время приступа кашля. Далее мокроту собирают в стерильную емкость с завинчивающейся крышкой. Перед откашливанием пациент должен почистить зубы и прополоскать рот кипяченой водой с целью механического удаления остатков пищи, слущенного эпителия и микрофлоры ротовой полости, чтобы избежать контаминации материала для исследования.

Раневое отделяемое собирается медицинской сестрой у пациентов ОРИТ. Кожу вокруг раны предварительно обрабатывают антисептическими

веществами, материал берут стерильным ватным тампоном круговыми вращательными движениями от центра к периферии поверхности раны. При этом используется два тампона: один используется для микроскопии, второй - для посева на питательную среду. Материал доставляют в лабораторию в течение одного часа.

Моча. Собирается средняя порция утренней мочи в количестве 5-10 мл в стерильную емкость с закручивающейся крышкой. Перед забором необходим тщательный туалет наружных половых органов.

1.7.1. Бактериологическое исследование.

Мокрота. Посев мокроты осуществляется на твердые питательные среды: кровяно-сывороточный агар, желточно-солевой агар, 5% кровяной агар, шоколадный агар, среда Эндо, среда Сабуро. Перед посевом производится гомогенизация мокроты и ее разведение. Чашки с кровяным агаром, шоколадным агаром и кровяно-сывороточным агаром инкубируются при анаэробных условиях 24-48 часов при 37°C. Чашки с желточно-солевым агаром, средой Сабуро и средой Эндо инкубируются в термостате при 37°C в течение 24-48 часов.

Посев раневого отделяемого проводится качественным методом на желточно-солевой агар и 5% кровяной агар.

Посев мочи проводится по методу Гольда на 5% кровяной агар и среду Сабуро. Инкубируются в термостате при 37°C в течение 24-48ч.

Идентификация бактериологическим методом не может дать достоверной информации, так как бактерии рода *Acinetobacter* и *S. maltophilia* являются неферментирующими. Отбираются подозрительные колонии для выделения чистой культуры. Далее чистую культуру можно идентифицировать методами масс-спектрометрического анализа по технологии MALDI-ToF и классической полимеразной цепной реакции. Эти

методы значительно превосходят бактериологический по количеству затрачиваемого времени на анализ.

1.7.2. Масс-спектрометрия по технологии MALDI-ToF.

В основе МС-анализа лежит способ белкового профилирования - идентификация по спектру микробных белков. Каждый вид микроорганизмов имеет свой уникальный набор белков. С помощью лазерных импульсов органическое вещество м/о преобразуется в заряженные частицы - ионы. После чего молекулы исследуемого м/о и вспомогательной матрицы переходят в газовую фазу, молекулы α -циано-4-гидроксикоричной кислоты связываются с белками и переносят на них "+" заряд. Далее с помощью электрического поля ионы переходят в вакуумную часть масс-спектрометра, где белки движутся от источника ионизации к детектору, скорость зависит от их атомной массы - происходит сортировка по времени пролета определенного расстояния. После, детектор оцифровывает результат, строится график - масс-спектр, который сверяет по базе данных со спектрами всех микроорганизмов и программа выдает результат.

2 этапа идентификации:

- подготовка чистой культуры исследуемого микроорганизма;
- собственно идентификация.

Перед помещением в анализатор культуру смешивают с раствором матрицы на подложке масс-спектрометра. После культура подвергается ионизации (действие лазерных импульсов) и идентификация продолжается автоматически. Время зависит от количества культур.

1.7.3. Полимеразная цепная реакция.

К числу наиболее часто используемых методов молекулярной биологии относится полимеразная цепная реакция (ПЦР). Метод ПЦР изобрел в 1983 г. американский ученый Кэри Мюллис, получивший впоследствии за это изобретение Нобелевскую премию. Сущность метода заключается в том, что

он имитирует естественную репликацию нуклеиновых кислот и позволяет получать фрагменты последовательности ДНК, характерные для того или иного микроорганизма, в количествах, достаточных для их распознавания. В соответствии с этим принципом проведение ПЦР-анализа включает в себя три основных этапа: пробоподготовка (выделение нуклеиновых кислот ДНК/РНК из клинического материала), амплификация (экспоненциальное увеличение количества целевых участков ДНК), регистрация и интерпретация полученных результатов. Детекция продуктов амплификации осуществляется путем проведения электрофореза в агарозном геле [136].

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

2.1. Объекты исследования.

Сбор коллекции проводился на базе микробиологической лаборатории отделения клинической лабораторной диагностики Клиники БГМУ. Отбор клинического материала от больных проводили в период с января 2017 по январь 2018 года.

Отбирались культуры неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных при микробиологическом исследовании биоматериала (мокроты, мочи, раневого отделяемого). Взятие биоматериала осуществлялось до начала приема химиопрепаратов и местных манипуляций с соблюдением правил асептики и антисептики в профильных отделениях стационара у пациентов.

Идентификация микроорганизмов проводилась с помощью масс-спектрометрии.

Хранение культур осуществлялось при температуре 4-8 °С в пробирках с полужидким питательным агаром, залитые стерильным вазелиновым маслом.

Материал для исследования:

- Утренняя мокрота, выделяющаяся у больных во время приступа кашля, собиралась в стерильную емкость с завинчивающейся крышкой. Перед откашливанием больной чистил зубы и полоскал рот кипяченой водой с целью механического удаления остатков пищи, слущенного эпителия и микрофлоры ротовой полости;
- Содержимое гнойных ран – забор проводился медицинской сестрой у больных хирургического профиля.

- Моча – собиралась средняя порция утренней мочи в количестве 5-10 мл в стерильную емкость с закручивающейся крышкой, с предварительным тщательным туалетом наружных половых органов.

Материал доставляли в лабораторию в течение 0,5-1 часа со времени его получения.

Образцы биологического материала исследовали с помощью бактериологического посева, методом масс-спектрометрии, классической постановки ПЦР.

2.2. Бактериологическое исследование

Посев мокроты производился в тех случаях, когда полученные образцы удовлетворяли известным цитологическим критериям при микроскопии нативного материала: более 25 полиморфно-ядерных лейкоцитов и больше 10 эпителиальных клеток в поле зрения при большом увеличении или менее 25 эпителиальных клеток - при малом увеличении [[Приказ Минздрава СССР от 22.04.1985 N 535 "Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических]].

Посев содержимого мокроты осуществляли на твердые питательные среды: 5% кровяной агар, кровяно-сывороточный агар, желточно-солевой агар, агар с гретой кровью (шоколадный агар), среда Эндо, среда Сабуро (Приложение 1). Перед посевом на плоские питательные среды проводилась гомогенизация мокроты добавлением муколитика («Хай Медиа», Индия). Далее мокрота разводилась до 10^{-7} . Разведения 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} рассеивали на чашки с кровяным агаром, шоколадным агаром и кровяно-сывороточным агаром. Чашки помещали в CO₂-инкубатор для создания анаэробных условий и инкубировали при 37°C в течение 24-48ч. Из разведения 10^{-1}

делали посевы на селективные среды: желточно-солевой агар, среда Сабуро, среда Эндо и инкубировали при 37°C в течение 24-48ч.

Посев мочи проводился по методу Гольда на 5% кровяной агар и агар Сабуро. Инкубировали при 37°C в течение 24-48ч.

Посев раневого отделяемого проводили качественным методом на 5% кровяной агар и желточно-солевой агар.

Посев проводили на среды, предварительно пройденные контроль стерильности и контроль качества и подсушенные в термостате при 37°C.

Далее идентификацию бактерий проводили с помощью определений морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств микроорганизмов и масс-спектрометрии.

2.3. Идентификация микроорганизмов масс-спектрометрическим анализом по технологии MALDI-ToF.

В связи с тем, что *Acinetobacter* spp и *S. maltophilia* являются неферментирующими бактериями, их идентификация затруднена. Методики молекулярной диагностики все больше используются в клинической лабораторной диагностике. Основы генной инженерии и молекулярной биологии, заложенные во второй половине XX столетия, привели к созданию методической базы для проведения молекулярно-биологических исследований микроорганизмов, являющихся возбудителями инфекционных заболеваний. Используемый метод масс-спектрометрического анализа является высокоспецифичным, так как базируется на детекции молекулярных составляющих микроорганизмов.

Масс-спектрометрия по технологии MALDI-TOF основывается на определении аминокислотной последовательности, на лазерной десорбции и ионизации макромолекул, опосредованной матриксом и детекторами ионов, которые позволяют определять время их пролета. Одной из трудноразрешимых задач масс-спектрометрии является стандартизация

пробоподготовки образца при прямом анализе бактерий в биологическом материале. Наличие тканевых белков или метаболитов подавляет сигналы биомаркеров, сгенерированных из клеток бактерий во время масс-спектрометрического анализа. Этим объясняется необходимость выделения чистой культуры перед проведением масс-спектрометрического анализа.

2.4. Подбор олигонуклеотидных праймеров для проведения полимеразной цепной реакции.

2.4.1. Оптимальные условия для подбора праймеров:

1. Оптимальная длина праймера составляет от 18-30 нуклеотидов;
2. Праймер должен иметь уникальную последовательность, находящуюся внутри матричной ДНК, которую предполагается амплифицировать;
3. Праймеры не должны образовывать между собой стабильные димеры и не должны формировать шпильчатые структуры;
4. Различия температуры отжига между двумя праймерами должно быть минимально;
5. Оптимальная температура отжига находится в диапазоне от 55°C до 70°C;
6. Идеально когда праймер состоит из 20 нуклеотидов, содержит почти случайную смесь нуклеотидов и содержание GC составляет 50%.

2.4.2. Поиск заданной последовательности ДНК в GenBank.

1. Открыть в Интернете сайт <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
2. В окошке Search открыть вкладку Nucleotide и ввести в поле название искомого микроорганизма, например, *Acinetobacter OmpA* и осуществить поиск.

3.Скопировать данную нуклеотидную последовательность в буфер обмена и вставить в окно программы EditSeq пакета Lasergene.

4 Сохранить файл.

2.4.3. Подбор олигонуклеотидных праймеров в программе PrimerSelect

1.Для начала необходимо запустить программу PrimerSelect. Открыть меню File и выбрать Enter sequence, выбрать нужный файл с нуклеотидной последовательностью.

2.Для настройки основных характеристик праймеров и ампликонов необходимо запустить меню Conditions. В подменю Primer Characteristics можно установить желаемую температуру плавления праймеров, а так же длину и размеры шпилек и димеров. В подменю Primer Locations можно установить размер ампликона.

3.Для автоматического подбора праймеров по указанным характеристикам необходимо перейти в меню Locate и выбрать Primers&Probes.

4.Для копирования нуклеотидной последовательности праймера нужно снова открыть последовательность, используя программу EditSeq и скопировать указанные участки цепи ДНК.

2.5. Выделение ДНК из клинических образцов.

Выделение ДНК производилось из 28 клинических образцов с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-В»

1.Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 прогрели при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

2.Отобрали необходимое количество одноразовых пробирок. Промаркировали пробирки. Внесли в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора.

3.Тщательно ресуспендировали сорбент универсальный на вортексе. В каждую пробирку добавили по 25 мкл ресуспендированного сорбента универсального.

4.В пробирки с лизирующим раствором и сорбентом внесли по 100 мкл проб, используя наконечники с фильтром. Пробы тщательно перемешали на вортексе и прогрели 5 мин при температуре 65 °C .Перемешали на вортексе и поставили в штатив на 2 мин.

5.Осадили сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 30 с. Удалили надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

6.Добавили в пробы по 300 мкл раствора для отмывки 1, перемешали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осадили сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге в течение 30 с. Удалили надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

7.Добавили в пробы по 900 мкл раствора для отмывки 2, перемешали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалили надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

8.Поместили пробирки в термостат при температуре 65 °C на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

9. Для элюции ДНК в пробирки добавили по 70 мкл ТЕ-буфера. Перемешали на вортексе. Поместили в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.

10. Процентрифугировали пробирки при 12 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

2.6. Проведение полимеразной цепной реакции препаратов ДНК *Acinetobacter spp.* на выявление гена, кодирующего белок внешней мембраны OmpA.

Амплификацию участков ДНК осуществляли с использованием стандартных наборов на амплификаторе "Терцик МС-2", "ДНК-технология", г. Москва.

Ход работы:

1. Перед началом работы необходимо вынуть штатив с пробирками, в которых находится выделенная ранее ДНК. Вынуть компоненты, необходимые для проведения ПЦР для разморозки. После размораживания ресуспендировали на вортексе. Таq-полимеразу необходимо хранить в морозильнике, чтобы избежать долгого нахождения на рабочем месте при комнатной температуре.

2. Расположили в штативе образцы с выделенной ДНК: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 16, 18, 21, 25, 26, 27, 28, 33, 36, 37, 43, 56, 66, 69, 70, 71, 74, 76.

3. Отобрали 28 одноразовых пробирок типа эппендорф для ПЦР-анализа. Промаркировали в соответствии с образцами ДНК.

4. Развели праймер для 28 образцов.

$$R\text{-праймер } \frac{100+x}{100} = 22,7 \text{ (концентрация праймера)}$$

$$100+x = 2270$$

$$x = 2170$$

$$100 \text{ мкл праймера} + 2170 \text{ мкл mQ} = 22,70$$

Необходимое количество праймера для 28 образцов 10 мкл праймера + 217 mQ.

$$\text{F-праймер} \frac{100+x}{100} = 18,8 \text{ (концентрация праймера)}$$

$$100+x = 1880$$

$$x = 1780$$

$$100 \text{ мкл праймера} + 1780 \text{ мкл mQ}$$

Необходимое количество праймера для 28 образцов 10 мкл праймера + 178 мкл mQ.

5. Подготовили амплификационную смесь для общего количества анализируемых проб в пробирке на 1,5 мл и разлили по 22 мкл в каждую пробирку для амплификации на 0,6 мл.

Состав реакционной смеси для 1 пробирки:

10xTaq-буфер - 2,5 мкл;

Раствор dNTP - 2,5 мкл;

Высокоочищенная вода для инъекций (mQ) - 14,5 мкл;

Праймер Acinet1 R - 1 мкл;

Праймер Acinet1 F - 1 мкл;

Taq-полимераза - 0,5 мкл.

6. В каждую пробирку внесли сначала праймер (R) по 1 мкл, затем праймер (F) по 1 мкл.

7. Внесли в каждую пробирку по 22 мкл исследуемого образца ДНК, используя отдельный наконечник с фильтром для каждой пробирки.

8. Пробирки закрыли, центрифугировали на вортексе.

9. Во избежание испарения реакционной смеси во время проведения ПЦР-анализа, добавили в каждую пробирку по капле минерального масла.

10. Пробирки установили в ячейки амплификатора, прогретого до 94°C.

11. Выбрали и запустили необходимую программу со следующими параметрами:

I. Денатурация: 94°C - 5 мин, 1 цикл

II. Денатурация: 94°C - 15 сек
Отжиг: 62,5 °C - 15 сек } 35 циклов

Элонгация: 72 °C - 20 сек

III. Достаивание цепей ДНК: 72°C - 2 мин, 1 цикл

12. Провели амплификацию.

2.7. Детекция ПЦР-продуктов методом электрофореза в агарозном геле.

Электрофоретический анализ продуктов амплификации проводили в 1,7% агарозном геле с использованием стандартных наборов.

Электрофорез в агарозном геле проводили по следующей схеме:

1. В каждую пробирку с амплификатом добавляли по 4 мкл красителя и откручивали на вортексе.

2. Готовили 1 л 5х-ного ТАЕ буфера. Для этого к 100 мл 50х-ного ТАЕ буфера добавляли 900 мл дистиллированной воды. Перемешивали.

3. Взвешивали 1,7 г агарозы. К 1,7 г агарозы добавляли 100 мл 5х-ного ТАЕ буфера, перемешивали. Полученную смесь расплавляли в

микроволновой печи в течение 2-3 минут, периодически перемешивая, довели до кипения. Полученная смесь должна быть прозрачной, без крупинок. Затем дали смеси остыть до 50-60°C.

4.Разливали агарозу по 25 мл в специальную форму с двумя гребенками. Дали гелю застыть в течение 25-30 минут. Толщина геля не должна была быть менее 2 мм, но не более 5 мм.

5.После застывания геля, аккуратно удалили гребенки.

6. Наносили по 10 мкл каждого образца в лунки в определенной последовательности. Исследовали 28 проб.

7. В камеру для электрофореза наливали необходимое количество 5х-ного ТАЕ буфера и помещали в него гель. Буфер должен был полностью покрывать гель сверху на 2-10мм.

8.Подключали клеммы прибора к источнику питания, так что бы на старте находился (-), а на финише (+). Запустили электрофорез, используя источник питания (Эльф-4, ДНК-Технология) с заданными параметрами: сила тока 400 мА, мощность 80 Вт, напряжение 120 В. На старте пузырей должно было быть больше, чем на финише. Визуально по движению полосы красителя осуществляли контроль за электрофоретическим разделением.

9.Электрофоретическое разделение проводили в течение 15 минут, затем вынимали гель из формы и помещали в специальную плашку для окрашивания. Наливали в плашку раствор бромистого этидия и окрашивали в течение 2-3 минут.

10.Сливали краситель обратно в колбу. Гель промывали под проточной водой. Помещали его на стекло УФ-трансиллюминатора. Включили прибор и проанализировали результаты исследования. Сфотографировали гель при помощи цифрового фотоаппарата и сохранили фотографию.

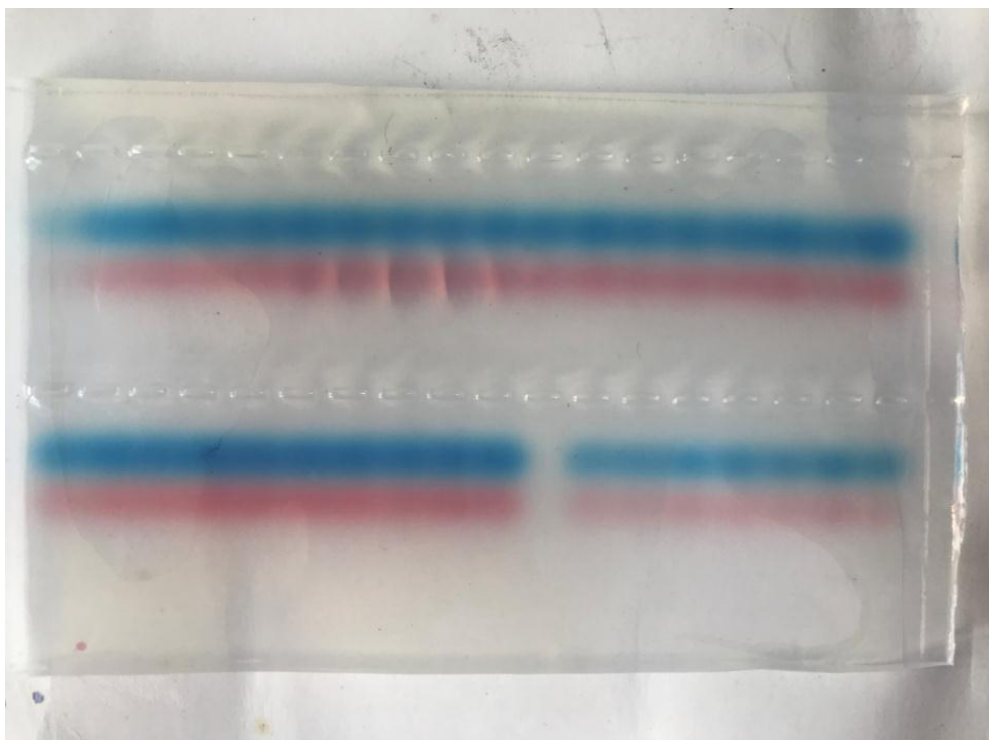


Рисунок 1. Фотография геля



Рисунок 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК *Acinetobacter* spp.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

3.1. Выделение клинических штаммов неферментирующих грамотрицательных бактерий.

В результате проведенных исследований установлено, что за 2017 год гг. исследовано 39913 проб различного клинического материала. Выделено 16880 клинических штаммов микроорганизмов, из которых неферментирующие грамотрицательные микроорганизмы составили 366 штаммов (2,1%).

3.2 Масс-спектрометрия.

В связи со сложностью идентификации неферментирующих бактерий обычными бактериологическими методами все выделенные культуры были исследованы на масс-спектрометре Vitek MS MALDI-ToF (BioMerieux, Франция). База данных Vitek MS включала 755 клинически значимых вида (бактерий, дрожжей, плесневых грибов/дерматофитов, микобактерий) встречающихся в практике микробиологических лабораторий.

В результате проведения масс-спектрометрического анализа выделенных микроорганизмов было идентифицировано 151 вид *Acinetobacter spp.*

Наименование микроорганизмов	Количество штаммов
Всего выделено микроорганизмов	16880
НФБ	366
<i>Acinetobacter spp.</i>	151
<i>A. baumannii</i>	136
<i>A. haemolyticus</i>	1
<i>A. yunii</i>	7
<i>A. hydrophilic</i>	1

<i>A. ursingii</i>	1
<i>A. lwoffii</i>	4
<i>A. calcoaceticus</i>	1

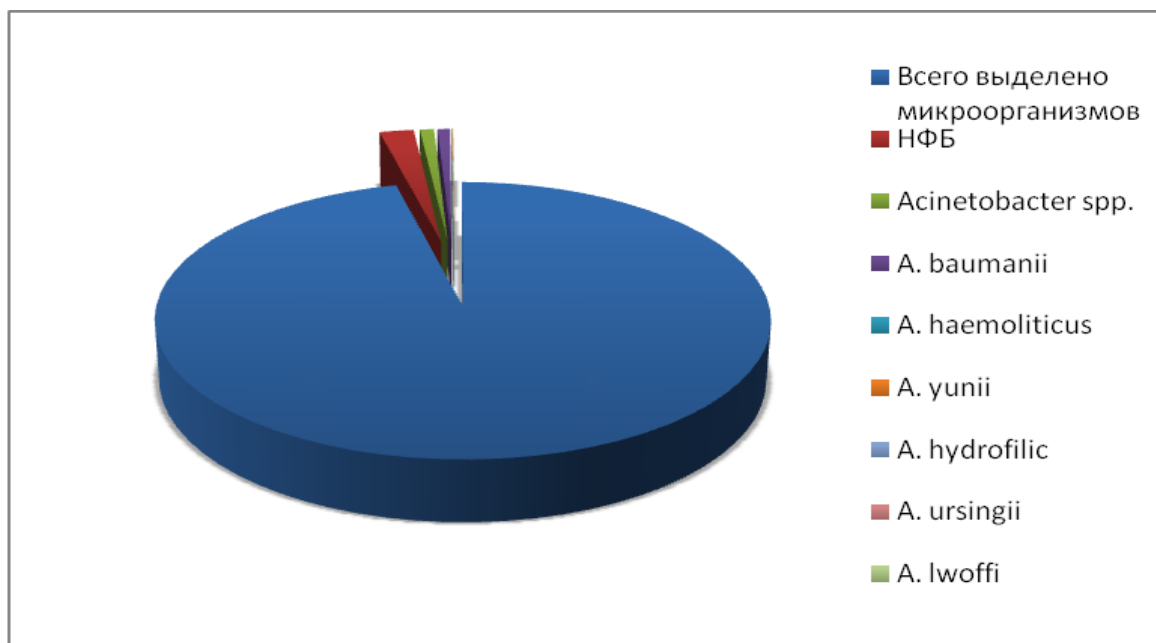


Диаграмма 1. Результаты исследования выявленных штаммов бактерий рода *Acinetobacter spp.*

Для дальнейшей работы были отобраны 28 культур *A. baumannii*.

3.3. Антибиотикочувствительность *A. baumannii*.

Спектр антибиотикорезистентных штаммов *A. baumannii* непрерывно изменяется, что обуславливает необходимость внедрения в практику системы непрерывного мониторингирования указанных параметров. Определение антибиотикочувствительности идентифицируемых культур проводили на автоматическом бактериологическом анализаторе Vitek 2 Compact («BioMerieux», Франция). Оборудование было синхронизировано с помощью пакета прикладного программного обеспечения MYLA.

В результате тестирования антибиотикочувствительности клинических штаммов *Acinetobacter spp.* было выявлено: чувствительность к меропенему

показали 77% культур, к тобрамицину - 52%, к нетилмицину - 70%, цефепиму – 65% и к амикацину - 30%.

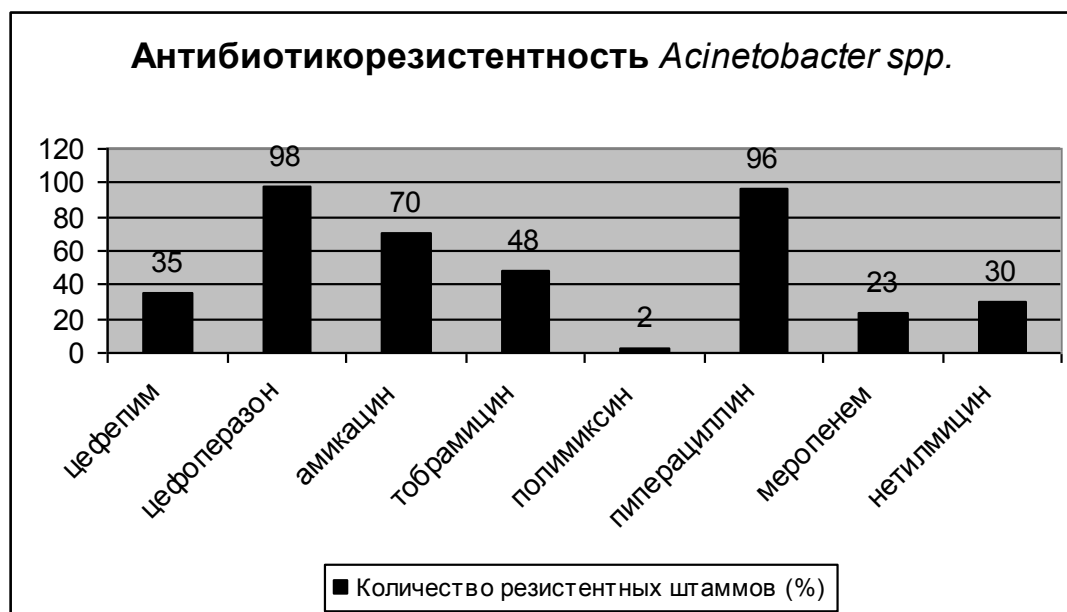
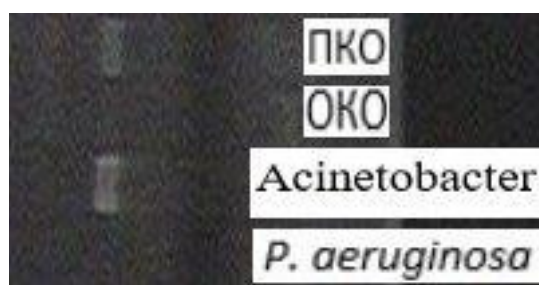


Рисунок 9. Частота встречаемости антибиотикорезистентных штаммов *Acinetobacter spp.*, выделенных за 2017 гг.

3.3. Проверка специфичности праймеров на *Acinetobacter spp.*

Важнейшей характеристикой праймеров, используемых для клинической идентификации ДНК микроорганизмов-возбудителей тех или иных заболеваний, является их специфичность. Произвели проверку отжига праймеров на ДНК других бактерий. Для этого использовали ДНК музейной культуры бактерии *Pseudomonas aeruginosa*. Для положительного контроля использовали музейную культуру *Acinetobacter spp.*, для отрицательного контроля - 0,9% физиологический раствор. В результате подобранные праймеры не сработали на образце ОКО и *Pseudomonas aeruginosa*. Таким образом, можно сказать, что подобранные нами праймеры обладают специфичностью и не будут показывать ложноположительный результат.



3.4. Интерпретация результатов проведенного ПЦР-анализа ДНК *Acinetobacter spp.* с последующим электрофорезом в агарозном геле.

В ходе классической полимеразной цепной реакции амплифицировали участок молекулы ДНК бактерий рода *Acinetobacter spp.*, содержащий ген, кодирующий белок внешней мембраны OmpA. В результате обнаружили, что из 28 исследуемых образцов положительными оказались 24 образца, отрицательными - 4 образца.

1	2	3	4	5	6	7
<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>
8	9	10	16	18	21	25
<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>
26	27	28	33	36	37	43
<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>
56	66	69	70	71	74	76
<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>

Таблица №1. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа на обнаружение в образцах ДНК гена OmpA *Acinetobacter spp.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schaub and all, 1948
2. Debord, 1939
3. Juni, 1972
4. Beijerinck M.W. Pigmenten als oxydatieproducten door bacterien gevormd. Versl. Koninklijke Akad. Wetensch. Amsterdam. 1911; 19: 1092–1103.
5. И.В. Чеботарь и др. *Acinetobacter*: микробиологические, патогенетические и резистентные свойства. Москва, Вестник РАМН. 2014.
6. Brisou J., Prevot A.R. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. Ann. Inst. Pasteur. 1954; 86 (6): 722–728.
7. Glew and all, 1977; Vieu and all, 1979; Godineau-Gauthey and all, 1988; Bergogne-Berezin and Joly-Guillou, 1991.
8. Baumann, P., M. Doudoroff, and R. Y. Stanier. 1968. A study of the *Moraxella* group. II. Oxidase-negative species (genus *Acinetobacter*). J. Bacteriol. 95:1520–1541.
9. Visca P., Seifert H., Towner K.J. *Acinetobacter* infection — an emerging threat to human health. *IUBMB Life*. 2011; 63 (12): 1048–1054.
10. Pelletier M.R., Casella L.G., Jones J.W., Adams M.D., Zurawski D.V., Hazlett K.R., Doi Y., Ernst R.K. Unique structural modifications are present in the lipopolysaccharide from colistinresistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2013; 57 (10): 4831–4840.
11. Beceiro A., Llobet E., Aranda J., Bengoechea J.A., Doumith M., Hornsey M., Dhanji H., Chart H., Bou G., Livermore D.M., Woodford N. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the pmrAB two-component regulatory system. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2011; 55 (7): 3370–3379.

12. Kenyon J.J., Hall R.M. Variation in the complex carbohydrate biosynthesis loci of *Acinetobacter baumannii* genomes. *PLoS One*. 2013; 8 (4): 62160.

13. Snellman E.A., Colwell R.R. *Acinetobacter* lipases: molecular biology, biochemical properties and biotechnological potential. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2004; 31 (9): 391–400.

14. Jacobs A.C., Hood I., Boyd K. L., Olson P. D., Morrison J. M., Carson S., Sayood K., Iwen P.C., Skaar E.P., Dunman P.M. Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infect. Immun.* 2010; 78: 1952–1962.

15. Camarena L., Bruno V., Euskirchen G., Poggio S., Snyder M. Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. *PLoS Pathog.* 2010; 6: 1000834.

16. Aehle W. Enzymes in Industry. Production and Applications. *Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*. 2007. 517 p.

17. I.V. Chebotar, A.V. Lazareva, Ya.K. Masalov, V.M. Mikhailovich, N.A. Mayanskiy *Acinetobacter*: Microbiological, Pathogenetic and Resistant Properties. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2014; 39-50.

18. Seifert H., Dijkshoorn L., Gerner-Smidt P., Pelzer N., Tjernberg I., Vaneechoutte M. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 2819–2825.

19. Шагинян И.А., Чернуха М.Ю. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2005; 7 (3): 271–285.

20. Jawad A., Seifert H., Snelling A.M., Heritage J., Hawkey P.M. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36 (7): 1938–1341.

21. Bhargava N., Sharma P., Capalash N. Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen. *Crit. Rev. Microbiol.* 2010; 36 (4): 349–360.

22. Bernards A.T., Harinck H.I., Dijkshoorn L., van der Reijden T.J., van den Broek P.J. Persistent *Acinetobacter baumannii*? Look inside your medical equipment. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 2004; 25: 1002–1004.

23. Wilks M., Wilson A., Warwick S., Price E., Kennedy D., Ely A., Millar M.R. Control of an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*-calcoaceticus colonization and infection in an intensive care unit (ICU) without closing the ICU or placing patients in isolation. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 2006; 27 (7): 654–658.

24. Weernink A., Severin W.P., Tjernberg I., Dijkshoorn L. Pillows, an unexpected source of *Acinetobacter*. *J. Hosp. Infect.* 1995; 29 (3): 189–199.

25. Russo T.A., Luke N.R., Beanan J.M., Olson R., Sauberman S.L., MacDonald U., Schultz L.W., Umland T.C., Campagnari A.A. The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infect. Immun.* 2010; 78 (9): 3993–4000.

26. Богомолова Н.С., Большаков Л.В., Кузнецова С.М. Проблема лечения гнойно-воспалительных осложнений, обусловленных *Acinetobacter*. *Анестезиология и реаниматология.* 014; 1: 26–32.

27. Glew, R. H., R. C. Moellering, and L. J. Kunz. 1977. Infections with *Acinetobacter calcoaceticus* (*Herellea vaginicola*). Clinical and laboratory studies. *Medicine* 56:79–87.

28. Joly-Guillou, M. L., and E. Bergogne-Be're'zin. 1992. In vitro activity of sparfloxacin, pefloxacin, ciprofloxacin and temafloxacin against clinical isolates of *Acinetobacter* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* 29:466–468.
29. Joly-Guillou, M. L., D. Decre', and E. Bergogne-Be're'zin. 1992. Infections nosocomiales a` *Acinetobacter*: surveillance e'pide'miologique hospitalie`re. *Bull. Epidemiol. Hebd.* vl:211–212. 102.
30. Joly-Guillou, M. L., D. Decre', M. Wolff, and E. Bergogne-Be're'zin. 1992. *Acinetobacter* spp: clinical epidemiology in 89 intensive care units. A retrospective study in France during 1991, abstr. CJ1. In Abstracts of the 2nd International Conference on the Prevention of Infection.
31. Bergogne-Be're'zin, E., and M. L. Joly-Guillou. 1991. Hospital infection with *Acinetobacter* spp.: an increasing problem. *J. Hosp. Infect.* 18(Suppl. A): 250–255.
32. Gerner-Smidt, P. 1987. Endemic occurrence of *Acinetobacter calcoaceticus* biovar anitratus in an intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 10:265–272.
33. Hartstein, A. I., A. L. Rashad, J. M. Liebler, L. A. Actis, J. Freeman, J. W. Rourke, T. B. Stibolt, M. E. Tomarsky, G. R. Ellis, and J. H. Croser. 1988. Multiple intensive care unit outbreak of *Acinetobacter calcoaceticus* subspecies anitratus respiratory infection and colonisation associated with contaminated, reusable ventilator circuits and resuscitation bags. *Am. J. Med.* 85: 624–631.
34. Ng, P. C., R. A. Herrington, C. A. Beane, A. T. Ghoneim, and P. R. Dear. 1993. Nosocomial colonisation and infection with multiresistant *Acinetobacter baumannii*: outbreak delineation using DNA macrorestriction analysis and PCR-fingerprinting. *J. Hosp. Infect.* 25:15–32.
35. Sherertz, R. J., and M. L. Sullivan. 1985. An outbreak of infections with *Acinetobacter calcoaceticus* in burn patients: contamination of patients' mattresses. *J. Infect. Dis.* 151:252–258.

36. Siegman-Igra, Y., S. Bar Yosef, A. Gorea, and J. Avram. 1993. Nosocomial *Acinetobacter* meningitis secondary to invasive procedures: report of 25 cases and review. *Clin. Infect. Dis.* 17:843–849.
37. Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., A. J. H. Kerver, J. H. Rommes, R. Jansen, C. den Dekker, and J. Verhoef. 1988. Endemic *Acinetobacter anitratus* in a surgical intensive care unit: mechanical ventilators as reservoir. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7:485–489.
38. Struelens, M. J., E. Carlier, N. Maes, E. Serruys, W. G. V. Quint, and A. van Belkum. 1993. Nosocomial colonisation and infection with multiresistant *Acinetobacter baumannii*: outbreak delineation using DNA macrorestriction analysis and PCR-fingerprinting. *J. Hosp. Infect.* 25:15–32.
39. Larson, E. 1984. A decade of nosocomial *Acinetobacter*. *Am. J. Infect. Control* 12:14–18.
40. Struelens, M. J., E. Carlier, N. Maes, E. Serruys, W. G. V. Quint, and A. van Belkum. 1993. Nosocomial colonisation and infection with multiresistant *Acinetobacter baumannii*: outbreak delineation using DNA macrorestriction analysis and PCR-fingerprinting. *J. Hosp. Infect.* 25:15–32.
41. Retailliau, H. F., A. W. Hightower, R. E. Dixon, and J. R. Allen. 1979. *Acinetobacter calcoaceticus*: a nosocomial pathogen with an unusual pattern. *J. Infect. Dis.* 139:371–375.
42. Somerville, D. A., and W. C. Noble. 1970. A note on the gram-negative bacilli of human skin. *Eur. J. Clin. Biol. Res.* 40:669–670.
43. Taplin, D., G. Rebell, and N. Zaias. 1963. The human skin as a source of *Mima-Herellea* infections. *JAMA* 186:952–954.
44. Glew, R. H., R. C. Moellering, and L. J. Kunz. 1977. Infections with *Acinetobacter calcoaceticus* (*Herellea vaginicola*). Clinical and laboratory studies. *Medicine* 56:79–87.

45. Rosenthal, S., and I. B. Tager. 1975. Prevalence of Gram-negative rods in the normal pharyngeal flora. *Ann. Intern. Med.* 83:355–357.
46. Rosenthal, S. L. 1974. Sources of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species found in human culture materials. *Am. J. Clin. Pathol.* 62:807–811.
47. Allen, K. D., and H. T. Green. 1987. Hospital outbreak of multi-resistant *Acinetobacter anitratus*: an airborne mode of spread. *J. Hosp. Infect.* 9: 110–119.
48. Buxton, A. E., R. L. Anderson, D. Werdegard, and E. Atlas. 1978. Nosocomial respiratory tract infection and colonization with *Acinetobacter calcoaceticus*: epidemiologic characteristics. *Am. J. Med.* 65:507–513.
49. Gerner-Smidt, P. 1987. Endemic occurrence of *Acinetobacter calcoaceticus* biovar *anitratus* in an intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 10:265–272.
50. Peacock, J. E., L. Sorrell, F. D. Sottile, L. E. Price, and W. A. Rutala. 1988. Nosocomial respiratory tract colonization and infection with aminoglycoside-resistant *Acinetobacter calcoaceticus* var *anitratus*: epidemiologic characteristics and clinical significance. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 9: 302–308.
51. Getschell-White, S. I., L. G. Donowitz, and D. H. M. Groschel. 1989. The inanimate environment of an intensive care unit as a potential source of nosocomial bacteria: evidence for long survival of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 10:402–406.
52. Sakata, H., K. Fujita, S. Maruyama, H. Kakehashi, Y. Mori, and H. Yoshioka. 1989. *Acinetobacter calcoaceticus* biovar *anitratus* septicaemia in a neonatal intensive care unit: epidemiology and control. *J. Hosp. Infect.* 14: 15–22.
53. Wise, K. A., and F. A. Tosolini. 1990. Epidemiological surveillance of *Acinetobacter* species. *J. Hosp. Infect.* 16:319–329.

54. Bergogne-Be're'zin, E., and M. L. Joly-Guillou. 1991. Hospital infection with *Acinetobacter* spp.: an increasing problem. *J. Hosp. Infect.* 18(Suppl. A): 250–255.
55. Buxton, A. E., R. L. Anderson, D. Werdegard, and E. Atlas. 1978. Nosocomial respiratory tract infection and colonization with *Acinetobacter calcoaceticus*: epidemiologic characteristics. *Am. J. Med.* 65:507–513. 31.
56. Castle, M., J. H. Tenney, M. P. Weinstein, and T. C. Eickhoff. 1978. Outbreak of a multiply resistant *Acinetobacter* in a surgical intensive care unit: epidemiology and control. *Heart Lung* 7:641–644. 32.
57. Cefai, C., J. Richards, F. K. Gould, and P. McPeake. 1990. An outbreak of *Acinetobacter* respiratory tract infection resulting from incomplete disinfection of ventilatory equipment. *J. Hosp. Infect.* 15:177–182.
58. Cunha, B. A., J. J. Klimek, J. Gracewski, J. C. McLaughlin, and R. Quintiliani. 1980. A common source outbreak of *Acinetobacter* pulmonary infections traced to Wright respirometers. *Postgrad. Med. J.* 56:169–172.
59. Hartstein, A. I., A. L. Rashad, J. M. Liebler, L. A. Actis, J. Freeman, J. W. Rourke, T. B. Stibolt, M. E. Tomarsky, G. R. Ellis, and J. H. Croser. 1988. Multiple intensive care unit outbreak of *Acinetobacter calcoaceticus* subspecies *anitratus* respiratory infection and colonisation associated with contaminated, reusable ventilator circuits and resuscitation bags. *Am. J. Med.* 85: 624–631.
60. Stone, J. W., and B. C. Das. 1985. Investigation of an outbreak of infection with *Acinetobacter calcoaceticus* in a special care baby unit. *J. Hosp. Infect.* 6:42–48.
61. Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., A. J. H. Kerver, J. H. Rommes, R. Jansen, C. den Dekker, and J. Verhoef. 1988. Endemic *Acinetobacter anitratus* in a surgical intensive care unit: mechanical ventilators as reservoir. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7:485–489.

62. Centers for Disease Control. 1987. Nosocomial infection surveillance 1984. CDC Summ. 35:17SS–29SS.

63. Craven, D. E., T. W. Barber, K. A. Steger, and M. A. Montecalvo. 1990. Nosocomial pneumonia in the 1990s: update of epidemiology and risk factors. *Semin. Respir. Infect.* 5:157–172.

64. Schaberg, D. S., D. Culver, and R. Gaynes. 1991. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infections. *Am. J. Med.* 91:72S–75S.

65. Bergogne-Be're'zin, E., and M. L. Joly-Guillou. 1991. Hospital infection with *Acinetobacter* spp.: an increasing problem. *J. Hosp. Infect.* 18(Suppl. A): 250–255.

66. Buxton, A. E., R. L. Anderson, D. Werdegard, and E. Atlas. 1978. Nosocomial respiratory tract infection and colonization with *Acinetobacter calcoaceticus*: epidemiologic characteristics. *Am. J. Med.* 65:507–513.

67. Castle, M., J. H. Tenney, M. P. Weinstein, and T. C. Eickhoff. 1978. Outbreak of a multiply resistant *Acinetobacter* in a surgical intensive care unit: epidemiology and control. *Heart Lung* 7:641–644.

68. Lortholary, O., J. Y. Fagon, A. Buu Hoi, M. A. Slama, J. Pierre, P. Giral, R. Rosenzweig, L. Gutmann, M. Safar, and J. Acar. 1995. Nosocomial acquisition of multiresistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors and prognosis. *Clin. Infect. Dis.* 20:790–796.

69. Peacock, J. E., L. Sorrell, F. D. Sottile, L. E. Price, and W. A. Rutala. 1988. Nosocomial respiratory tract colonization and infection with aminoglycoside-resistant *Acinetobacter calcoaceticus* var *anitratus*: epidemiologic characteristics and clinical significance. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 9: 302–308.

70. Struelens, M. J., E. Carlier, N. Maes, E. Serruys, W. G. V. Quint, and A. van Belkum. 1993. Nosocomial colonisation and infection with multiresistant

Acinetobacter baumannii: outbreak delineation using DNA macrorestriction analysis and PCR-fingerprinting. *J. Hosp. Infect.* 25:15–32.

71. Trouillet, J. L., A. Vuagnat, S. Calvat, M. L. Joly-Guillou, M. C. Dombret, H. Clavier, C. Gibert, and J. Chastre. 1995. Ventilator-associated pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*: prospective analysis of 22 episodes, abstr. A474. In *Abstracts of the American Thoracic Society International Conference*.

72. Bergogne-Be're'zin, E., and M. L. Joly-Guillou. 1991. Hospital infection with *Acinetobacter* spp.: an increasing problem. *J. Hosp. Infect.* 18(Suppl. A): 250–255.

73. Fagon, J. Y., J. Chastre, Y. Domart, J. L. Trouillet, J. Pierre, C. Darne, and C. Gibert. 1989. Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation. Prospective analysis of 52 episodes with use of a protected specimen brush and quantitative culture techniques. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139:877–884.

74. Torres, A., R. Aznar, J. M. Gatell, P. Jiminez, J. Gonzalez, A. Ferrer, R. Celis, and R. Rodriguez-Roisin. 1990. Incidence risk and prognosis factors of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142:522–528.

75. Seifert, H., R. Baginsky, A. Schulze, and G. Pulverer. 1993. The distribution of *Acinetobacter* species in clinical culture materials. *Zentralbl. Bakterirol.* 279:544–552.

76. Sakata, H., K. Fujita, S. Maruyama, H. Kakehashi, Y. Mori, and H. Yoshioka. 1989. *Acinetobacter calcoaceticus* biovar anitratus septicaemia in a neonatal intensive care unit: epidemiology and control. *J. Hosp. Infect.* 14: 15–22

77. Ng, P. C., R. A. Herrington, C. A. Beane, A. T. Ghoneim, and P. R. Dear. 1989. An outbreak of *Acinetobacter* septicaemia in a neonatal intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 14:363–368.

78. Berk, S. L., and W. R. McCabe. 1981. Meningitis caused by *Acinetobacter calcoaceticus* var *anitratus*: a specific hazard in neurosurgical patients. *Arch. Neurol.* 38:95–98.

79. Siegman-Igra, Y., S. Bar Yosef, A. Gorea, and J. Avram. 1993. Nosocomial *Acinetobacter* meningitis secondary to invasive procedures: report of 25 cases and review. *Clin. Infect. Dis.* 17:843–849.

80. Seifert, H., W. Richter, and G. Pulverer. 1995. Clinical and bacteriological features of relapsing shunt-associated meningitis due to *Acinetobacter baumannii*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14:130–134.

81. Bergogne-Be're'zin, E., and M. L. Joly-Guillou. 1991. Hospital infection with *Acinetobacter* spp.: an increasing problem. *J. Hosp. Infect.* 18(Suppl. A): 250–255.

82. Buxton, A. E., R. L. Anderson, D. Werdegard, and E. Atlas. 1978. Nosocomial respiratory tract infection and colonization with *Acinetobacter calcoaceticus*: epidemiologic characteristics. *Am. J. Med.* 65:507–513.

83. Castle, M., J. H. Tenney, M. P. Weinstein, and T. C. Eickhoff. 1978. Outbreak of a multiply resistant *Acinetobacter* in a surgical intensive care unit: epidemiology and control. *Heart Lung* 7:641–644.

84. Lortholary, O., J. Y. Fagon, A. Buu Hoi, M. A. Slama, J. Pierre, P. Giral, R. Rosenzweig, L. Gutmann, M. Safar, and J. Acar. 1995. Nosocomial acquisition of multiresistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors and prognosis. *Clin. Infect. Dis.* 20:790–796.

85. Peacock, J. E., L. Sorrell, F. D. Sottile, L. E. Price, and W. A. Rutala. 1988. Nosocomial respiratory tract colonization and infection with aminoglycoside-resistant *Acinetobacter calcoaceticus* var *anitratus*: epidemiologic characteristics and clinical significance. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 9: 302–308.

86. Struelens, M. J., E. Carlier, N. Maes, E. Serruys, W. G. V. Quint, and A. van Belkum. 1993. Nosocomial colonisation and infection with multiresistant *Acinetobacter baumannii*: outbreak delineation using DNA macrorestriction analysis and PCR-fingerprinting. *J. Hosp. Infect.* 25:15–32.

87. Townsend, T. R. 1987. New aspects of case-control studies and clinical trials, p. 578–590. In R. P. Wenzel (ed.), *Prevention and control of nosocomial infections*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

88. Juni, E. 1978. Genetics and physiology of *Acinetobacter*. *Annu. Rev. Microbiol.* 32:349–371.

89. Pedersen, M. M., E. Marso, and M. J. Pickett. 1970. Non-fermentative bacilli associated with man. III. Pathogenicity and antibiotic susceptibility. *Am. J. Clin. Pathol.* 54:178–192.

90. Smego, R. A. 1985. Endemic nosocomial *Acinetobacter calcoaceticus* bacteremia. Clinical significance, treatment and prognosis. *Arch. Intern. Med.* 145:2174–2179.

91. Kaplan, N., E. Rosenberg, B. Jann, and K. Jann. 1985. Structural studies of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4. *Eur. J. Biochem.* 152:453–458.

92. Rosenberg, E., N. Kaplan, O. Pines, M. Rosenberg, and D. Gutnick. 1983. Capsular polysaccharides interfere with adherence of *Acinetobacter calcoaceticus* to hydrocarbon. *FEMS Microbiol. Lett.* 17:157–160.

93. Pines, O., and D. Gutnick. 1984. Alternate hydrophobic sites on the cell surface of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. *FEMS Microbiol. Lett.* 22: 307–311.

94. Rosenberg, M., E. A. Bayer, J. Delarea, and E. Rosenberg. 1982. Role of thin fimbriae in adherence and growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:929–937.

95. Avril, J. L., and R. Mesnard. 1991. Factors influencing the virulence of *Acinetobacter*, p. 77–82. In K. J. Towner, E. Bergogne-Be're'zin, and C. A. Fewson (ed.), *The biology of Acinetobacter*. Plenum Publishing Corp., New York.
96. Joly-Guillou, M. L., M. Wolff, F. Walker, and E. Valle'e. 1994. A mouse model of *Acinetobacter baumannii* pneumonia, abstr. 19, p. 44. In *Abstracts of the 3rd International Symposium on the Biology of Acinetobacter*.
97. Obana, Y. 1986. Pathogenic significance of *Acinetobacter calcoaceticus*: analysis of experimental infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 30:645–657.
98. Actis, L. A., M. E. Tolmasky, L. M. Crosa, and J. H. Crosa. 1993. Effect of iron-limiting conditions on growth of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 31:2812–2815.
99. Echenique, J. R., H. Arienti, M. E. Tolmasky, R. R. Read, R. J. Staneloni, J. H. Crosa, and L. A. Actis. 1992. Characterization of a high-affinity iron transport system in *Acinetobacter baumannii*. *J. Bacteriol.* 174:7670–7679.
100. Smith, A. W., S. Freeman, W. G. Minett, and P. A. Lambert. 1990. Characterization of a siderophore from *Acinetobacter calcoaceticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 70:29–32.
101. Choi CH, Lee JS, Lee YC, Park TI, Lee JC. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiol* 2008;8:216.
102. Lee JC, Koerten H, van den Broek P, Beekhuizen H, Wolterbeek R et al. Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. *Res Microbiol* 2006;157:360–366.
103. Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC et al. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:49–54.

104. Lee JC, Oh JY, Kim KS, Jeong YW, Park JC et al. Apoptotic cell death induced by *Acinetobacter baumannii* in epithelial cells through caspase-3 activation. *APMIS* 2001;109:679–684.

105. Smani Y, Docobo-P_erez F, Mcconnell MJ, Pachón J. *Acinetobacter baumannii*-induced lung cell death: role of inflammation, oxidative stress and cytosolic calcium. *Microb Pathog* 2011;50:224–232.

106. Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect Immun* 2009;77:3150–3160.

107. Smani Y, Mcconnell MJ, Pachón J. Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. *PLoS One* 2012;7: e33073.

108. Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ et al. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol* 2005; 7:1127–1138.

109. Choi CH, Hyun SH, Lee JY, Lee JS, Lee YS et al. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cell Microbiol* 2008;10:309–319.

110. Lee JS, Choi CH, Kim JW, Lee JC. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A induces dendritic cell death through mitochondrial targeting. *J Microbiol* 2010;48:387–392.

111. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:538–582.

112. del Mar Tom_as M, Beceiro A, P_erez A, Velasco D, Moure R et al. Cloning and functional analysis of the gene encoding the 33- to 36-kilodalton outer membrane protein associated with carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:5172–5175.

113. Rumbo C, Tom_as M, Fern_andez Moreira E, Soares NC, Carvajal M et al. The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. *Infect Immun* 2014;82:4666–4680.

114. Beveridge TJ. Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* 1999;181:4725–4733.

115. Kwon SO, Ghoo YS, Lee JC, Kim SI. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS Microbiol Lett* 2009;297:150–156.

116. Li ZT, Zhang RL, Bi XG, Xu L, Fan M et al. Outer membrane vesicles isolated from two clinical *Acinetobacter baumannii* strains exhibit different toxicity and proteome characteristics. *Microb Pathog* 2015;81:46–52.

117. Jin JS, Kwon SO, Moon DC, Gurung M, Lee JH et al. *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. *PLoS One* 2011;6:e17027.

118. Jun SH, Lee JH, Kim BR, Kim SI, Park TI et al. *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles elicit a potent innate immune response via membrane proteins. *PLoS One* 2013;8:e71751.

119. Knapp S, Wieland CW, Florquin S, Pantophlet R, Dijkshoorn L et al. Differential roles of CD14 and Toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter pneumonia*. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:122–129.

120. Qiu H, Kuolee R, Harris G, Chen W. High susceptibility to respiratory *Acinetobacter baumannii* infection in A/J mice is associated with a delay in early pulmonary recruitment of neutrophils. *Microbes Infect* 2009;11:946–955.

121. Renckens R, Roelofs JJ, Knapp S, de Vos AF, Florquin S et al. The acute-phase response and serum amyloid A inhibit the inflammatory response to *Acinetobacter baumannii pneumonia*. *J Infect Dis* 2006;193:187–195.

122. van Faassen H, Kuolee R, Harris G, Zhao X, Conlan JW et al. Neutrophils play an important role in host resistance to respiratory infection with *Acinetobacter baumannii* in mice. *Infect Immun* 2007; 75:5597–5608.

123. Ryan et al., 2009

124. Marshall et al., 1989.

125. Passerini de Rossi et al., 2007.

126. Looney et al., 2009

127. Brooke, 2012.

128. Samonis et al., 2012.

129. Khardori.N, Elting L.,Wong E., et al. Nosocomial infections due to *Xanthomonas maltophilia* (*Pseudomonas maltophilia*) in patients with cancer, *Rev Infect Dis*, 1990, vol. 12 (pg. 997-1003).

130. Garrison et al. , 1996.

131. Vila & Marco, 2002.

132. Pankuch et al., 1994.

133. Vartivarian et al., 1994.

134. Nicodemo & Paez, 2007.

135. Samonis et al., 2012.

136. Патрушев Л.И., 2005.

ОТЗЫВ НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

Сазонова Ксения Андреевна выполнила выпускную квалификационную работу на тему « ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ OmpA БАКТЕРИЙ РОДА *ACINETOBACTER*, И ГЕНА *stm* PR1, КОДИРУЮЩЕГО СУБТИЛАЗУ *S. MALTOPHILIA*».

Представленная работа посвящена проблеме разработки новых подходов к детекции в клиническом материале основных неферментирующих грамотрицательных бактерий, рассматриваемых в качестве частой причины гнойно-воспалительных процессов различной локализации. Традиционные культуральные способы их обнаружения отличает невысокая эффективность. В этой связи перспективной представляется цель данной ВКР – экспериментальная оценка для детекции и идентификации в клиническом материале *Acinetobacter spp.* и *Stenotrophomonas maltophilia* молекулярно-генетических методов.

За время обучения в БГМУ Сазонова К.А. освоила учебную программу в достаточном объеме. Все годы училась на «хорошо».

В процессе выполнения ВКР Сазонова К.А. приобрела необходимые навыки работы с микроорганизмами, включая неферментирующие грамотрицательные условно-патогенные бактерии. Освоила приемы их идентификации методом ПЦР. Полученные в ходе выполнения результаты были апробированы в виде устных сообщений на конференциях, включая международные (БГМУ-2018 и др.).

В ходе выполнения ВКР Сазонова К.А. продемонстрировала компетенции, которыми должен обладать обучающийся по окончании учебы по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (профиль – микробиология).

Таким образом, выпускная квалификационная работа Сазоновой К.А. ДОПУСКАЕТСЯ К ЗАЩИТЕ и рекомендуется для положительной оценки.

Научный руководитель:
д.м.н., профессор, зав.кафедрой
фундаментальной и прикладной
микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России



А.Р.Мавзютов

ОТЗЫВ

внешнего рецензента доктора биологических наук, профессора Шамратовой Валентины Гусмановны на выпускную квалификационную работу Сазоновой Ксении Андреевны «ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ OmpA БАКТЕРИЙ РОДА *ACINETOBACTER*, И ГЕНА *stm* PR1, КОДИРУЮЩЕГО СУБТИЛАЗУ *S. MALTOPHILIA*».

В настоящее время в числе серьезных возбудителей госпитальных инфекций рассматриваются бактерии родов *Acinetobacter* и *Stenotrophomonas*. Эти микроорганизмы являются условно-патогенными, но при снижении иммунитета или на фоне болезни могут усугубить ситуацию или вызвать новое заболевание. Естественным резервуаром для *Acinetobacter* и *Stenotrophomonas* является почва и природные водоемы. В госпитальных условиях эти микроорганизмы могут быть обнаружены на кухонных принадлежностях, системах вентиляции и увлажнения, на инструментах для уборки помещений, на различном медицинском оборудовании (таких, как небулайзеры, аппараты диализа, контуры аппаратов искусственной вентиляции), в субстрате комнатных растений, на коже рук персонала больницы и даже в дезинфицирующих растворах. Однако для решения вопроса об этиологии указанных заболеваний факта выделения этих условно-патогенных бактерий недостаточно.

В этой связи разработка способа молекулярно-генетической оценки патогенного потенциала этих бактерий является актуальной. В ходе проведения данного исследования автором были освоены все необходимые для решения этой задачи методы, включая ряд достаточно редких.

Структурно в работе представлены разделы введение, литературный обзор, описание объектов и методов исследований, собственные данные и их обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы, приложения. Сформулированные в работе выводы достаточно обоснованы и могут быть использованы в практической деятельности.

Таким образом, выпускная квалификационная работа Сазоновой Ксении Андреевны «ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ OmpA БАКТЕРИЙ РОДА *ACINETOBACTER*, И ГЕНА *stm* PR1, КОДИРУЮЩЕГО СУБТИЛАЗУ *S. MALTOPHILIA*», выполненная под руководством зав. кафедрой ФПМ, доктора медицинских наук, профессора Мавзютова Айрата Радиковича является завершенной и соответствует требованиям ФГОС ВО (приказ Минобрнауки РФ №944 от 07.08.2014 г.) по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (бакалавриат), а соискатель заслуживает положительной оценки.

доктор биологических наук, профессор
кафедры физиологии и общей биологии
ФГБОУ ВО Башгосуниверситет
Минобрнауки России

Валентина Гусмановна Шамратова



АНТИПЛАГИАТ
ТВОРИТЕ СОБСТВЕННЫМ УМОМ

Башкирский государственный
медицинский университет

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Сазонова К.А.
Факультет, кафедра, номер группы	Б-401Б
Тип работы	Дипломная работа
Название работы	ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ OmpA БАКТЕРИЙ РОДА ACINETOBACTER, И ГЕНА Stm Pr1, КОДИРУЮЩЕГО СУБТИЛАЗУ S. MALTORPHICA
Название файла	ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ OmpA БАКТЕРИЙ РОДА ACINETOBACTER, И ГЕНА Stm Pr1, КОДИРУЮЩЕГО СУБТИЛАЗУ S.
Процент заимствования	6,84%
Процент цитирования	0,92%
Процент оригинальности	92,25%
Дата проверки	12:30:01 22 июня 2018г.
Модули поиска	Кольцо вузов; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска переводных заимствований; Цитирование; Коллекция РГБ; Сводная коллекция ЭБС; Модуль выделения библиографических записей; Модуль поиска "БГМУ"
Работу проверил	Кобзева Наталья Рудольфовна ФИО проверяющего
Дата подписи	22.06.2018г. <div>ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА Подпись проверяющего</div>

Чтобы убедиться
в подлинности справки,
используйте QR-код, который
содержит ссылку на отчет.



Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.
Предоставленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.