

# МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ *Acinetobacter baumannii*, ВЫДЕЛЕННЫХ У ПАЦИЕНТОВ С ОЖГОВОЙ ТРАВМОЙ

DOI: 10.17691/stm2016.8.1.18

УДК 616–036.22–001:576.851

Поступила 17.03.2015 г.

Ю.Е. Скурихина, к.м.н., доцент кафедры эпидемиологии и военной эпидемиологии<sup>1</sup>;Т.Д. Ибрагимова, аспирант кафедры эпидемиологии и военной эпидемиологии<sup>1</sup>;Л.А. Скурихина, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории генетики<sup>2</sup>;В.Б. Туркутюков, д.м.н., профессор, зав. кафедрой эпидемиологии и военной эпидемиологии<sup>1</sup><sup>1</sup>Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, 690002, пр. Острякова, 2;<sup>2</sup>Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, 690041, ул. Пальчевского, 17

У больных с ожоговой травмой последние годы отмечается постоянный рост частоты инфекций, вызванных *Acinetobacter spp.*, особенно *A. baumannii*. Госпитальные популяции микроорганизмов, складывающиеся в условиях стационара, всегда состоят из штаммов с высокой вирулентностью и антибиотикоустойчивостью. Анализ с использованием молекулярных маркеров позволяет судить об эпидемической связи между штаммами, выявить наличие в стационаре госпитальных штаммов и определить источник инфицирования пациентов.

**Цель исследования** — при помощи молекулярно-генетических методов — полимеразно-цепной реакции (ПЦР) — оценить характер распространения эпидемически значимых штаммов *Acinetobacter baumannii* у пациентов с ожоговой травмой, выявить преобладающий генотип, определить наличие госпитальных штаммов.

**Материалы и методы.** Методом ПЦР исследованы некоторые важнейшие факторы вирулентности и резистентность к антибиотикам 60 штаммов *A. baumannii*, выделяемых в течение более двух лет от пациентов ожогового отделения. Проведен анализ генов антибиотикорезистентности и факторов вирулентности *OXA-23*, *ISAbal*, *csuE*, *tonB*. Полиморфизм генотипов оценивали с помощью теста  $\chi$ -квадратов (Raymond M., Rousset F., 1995).

**Результаты.** У исследованных штаммов выявлен высокий уровень резистентности к карбапенемам, у 40% штаммов определен ген *csuE*, который является одним из показателей склонности бактерий к формированию биопленок. Ген *tonB*, кодирующий свойства бактерий, позволяющие вызвать бактериемию в короткие сроки, выделен в 15% случаев. По исследуемым генам, кодирующим антибиотикорезистентность и факторы вирулентности, выявлен незначительный уровень генетической дифференциации штаммов (всего 9 комбинированных генотипов с преобладанием трех генотипов: А — 50%, F и I — по 10% случаев), что говорит как об экзогенном внутрибольничном инфицировании пациентов, так и о наличии госпитальных штаммов в отделении.

**Заключение.** Исследование генетической структуры штаммов *A. baumannii* с помощью ПЦР-анализа генов *OXA-23*, *ISAbal*, *csuE*, *tonB* позволяет эффективно оценить наличие эпидемической связи между штаммами, выявить преобладающий генотип и определить эпидемически важные свойства штаммов.

**Ключевые слова:** *Acinetobacter baumannii*; госпитальные штаммы; антибиотикорезистентность; биопленки; антибиотики.

**Как цитировать:** Skurikhina Yu.E., Ibragimova T.D., Skurikhina L.A., Turkutuykov V.B. Molecular epidemiological analysis of *Acinetobacter Baumannii* strains isolated in patients with burn injury. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2016; 8(1): 134–139, <http://dx.doi.org/10.17691/stm2016.8.1.18>.

## English

## Molecular Epidemiological Analysis of *Acinetobacter Baumannii* Strains Isolated in Patients with Burn Injury

Yu.E. Skurikhina, MD, PhD, Associate Professor, Department of Epidemiology and Military Epidemiology<sup>1</sup>;T.D. Ibragimova, PhD Student, Department of Epidemiology and Military Epidemiology<sup>1</sup>;L.A. Skurikhina, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Genetics<sup>2</sup>;V.B. Turkutuykov, MD, DSc, Professor, Department of Epidemiology and Military Epidemiology<sup>1</sup><sup>1</sup>Pacific State Medical University, 2 Ostryakov Avenue, Vladivostok, 690002, Russian Federation;

Для контактов: Скурихина Юлия Евгеньевна, e-mail: eesku@mail.ru

<sup>2</sup>A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences,  
17 Palchevskogo St., Vladivostok, 690041, Russian Federation

Recently, there is a steady increase of infections caused by *Acinetobacter spp.*, especially *A. baumannii* in patients with burn injury. Hospital populations of microorganisms always include highly virulent and antibiotic-resistant strains. The analysis using molecular markers enables to estimate the epidemiologic relation between strains, reveal the presence of hospital strains, and identify the infection source.

**The aim of the investigation** was to assess the nature of the spread of significant epidemic strains *Acinetobacter baumannii* in burn patients, and identify a predominant genotype to determine the presence of hospital strains using molecular genetic techniques (polymerase chain reaction (PCR)).

**Materials and Methods.** By means of PCR we investigated some major virulence factors and antibiotic resistance of 60 of *A. baumannii* strains being isolated for more than two years from the burn unit patients. The antibiotic resistance of genes and virulence factors of *OXA-23*, *ISAbal*, *csuE*, *tonB* were studied. The polymorphism of genotypes was evaluated using  $\chi$ -square test (Raymond M., Rousset F., 1995).

**Results.** The strains under study were revealed to have a high resistance level to carbapenems, *csuE* gene was identified in 40% strains, the gene being one of the film formation susceptibility factors of bacteria. *tonB* gene encoding the bacteria properties enabling to cause bacteremia promptly was isolated in 15% cases. In the genes encoding antibiotic resistance and virulent factors, we revealed a slight genetic differentiation level of strains (total, 9 combined genotypes with three genotypes predominating: A — 50% cases, F and I — 10% cases) that indicates both exogenous nosocomial infection of patients, and the presence of hospital strains in the department.

**Conclusion.** The study of the genetic structure of *A. baumannii* strains using PCR analysis of *OXA-23*, *ISAbal*, *csuE*, *tonB* genes enables to assess efficiently the epidemic relationship between strains, reveal a predominant genotype and identify epidemiologically important properties of the strains.

**Key words:** *Acinetobacter baumannii*; hospital strains; antibiotic resistance; biofilms; antibiotics.

Среди возбудителей инфекций, вызывающих осложнения, в том числе у пациентов ожоговых отделений, в последние годы все более устойчивые позиции занимают грамотрицательные неферментирующие бактерии. Отмечается постоянный рост частоты инфекций, вызванных *Acinetobacter spp.*, особенно *A. baumannii* [1–3].

*Acinetobacter spp.* — свободно живущие в окружающей среде неферментирующие бактерии, способные сохраняться и размножаться в госпитальных условиях, используя в качестве субстрата почти все природные органические соединения. Они контаминируют самые разнообразные растворы, в том числе и некоторые из дезинфектантов (фурацилин, риванол и др.), а также медицинский инструментарий и оборудование, особенно в местах скопления жидкости. Основными особенностями ацинетобактеров являются резистентность ко многим группам антибактериальных химиопрепаратов; способность к формированию биопленок (как на тканях живого организма, так и на полимерных материалах, используемых в медицине); наличие сигнальной системы «кворум-сенсинг», что позволяет усиливать защиту бактерий от антибиотиков, дезинфектантов, иммунной системы человека. Главные факторы вирулентности: полисахаридная капсула, пили, фермент, который разрушает липиды тканей макроорганизма, токсин, вызывающий гибель лейкоцитов [1, 4, 5].

Микробиологический мониторинг формирования антибиотикорезистентности является важным методом оценки эффективности антибиотикотерапии и возможности эмпирического назначения антибактериальных химиопрепаратов [6]. Устойчивость *A. baumannii* к карбапенемам все больше распространяется в стационарах по всему миру. Наиболее важный механизм устойчивости к этому классу антибиотиков — действие карбапенемаз и оксациллиназ. У ацинетобактеров описано несколько классов оксациллиназ, но, по данным

некоторых исследований [7–9], наибольшее значение имеет OXA-23 и встречается она чаще всего у мультирезистентных штаммов. Инсерционный элемент ISAbal содержит промоторы, которые играют важную роль в экспрессии генов, кодирующих OXA-23, что приводит к нарастанию устойчивости к антибиотикам в условиях среды стационара. Этот инсерционный элемент можно считать эпидемиологически значимым маркером лекарственно-резистентных госпитальных штаммов *A. baumannii*.

Белок, кодируемый геном tonB-зависимого рецептора, входит в состав наружной мембраны бактериальной клетки, отвечает за усвоение железа и является важным фактором вирулентности, поскольку необходим для выживания бактерий в крови и легких. Клоны, имеющие данный ген, способны вызвать бактериемию у пациентов в короткие сроки [10]. *CsuE* — это один из генов, участвующих в регуляции формирования биопленок. Он отвечает за наличие пилей у бактериальных клеток [11]. Для идентификации штаммов *A. baumannii* используют полимеразно-цепную реакцию (ПЦР) или ПЦР-мультиплекс с конститутивными генами *trpE*, *adk*, *mutY*, *ppa*, которые присутствуют всегда, поскольку необходимы для основных процессов жизнедеятельности бактериальной клетки [12].

Ожоговым отделениям свойственна более высокая частота появления госпитальных штаммов ацинетобактеров и их длительная циркуляция в условиях стационара [13]. Результаты исследований, проводимых в европейских странах, показывают, что происходит появление и быстрое распространение «эпидемических» клонов *A. baumannii* с высокой степенью родства, т.е. госпитальных штаммов [14]. Работ отечественных авторов по данному направлению явно недостаточно, представлены данные только по некоторым регионам европейской части России [15], в Дальневосточном регионе подобных исследований не проводилось.

Для эффективного эпидемиологического контроля необходима идентификация возбудителя по штаммам и слежение за генетической структурой госпитальной популяции, что в полной мере возможно лишь при использовании молекулярно-генетических методов. В настоящей работе проведен генотипический анализ штаммов, полученных в ожоговом отделении Дальневосточного окружного медицинского центра ФМБА России (Владивосток).

В настоящее время в мире «золотым стандартом» для генотипического анализа является метод МЛСТ (мультилокусное сиквенс-типирование, MLST). Для ацинетобактеров используются две схемы: института Пастера (Pasteur's MLST) [16] и Оксфордская (PubMLST) [17]. Несмотря на неоспоримые преимущества этого метода, такие как большая разрешающая способность и стандартизация условий, проведение МЛСТ доступно очень ограниченному числу лабораторий из-за высокой стоимости оборудования и расходных материалов. Предлагаемый метод ПЦР гораздо более доступен.

**Цель исследования** — при помощи молекулярно-генетических методов оценить характер распространения эпидемически значимых штаммов *Acinetobacter baumannii*, выявить преобладающий генотип, определить наличие госпитальных штаммов.

**Материалы и методы.** Исследовано 60 штаммов *A. baumannii*, выделенных в 2011–2013 гг. у пациентов ожогового отделения Дальневосточного окружного медицинского центра ФМБА России (Владивосток). Выделение и идентификацию микроорганизмов проводили микробиологическими методами [18] и с помощью молекулярно-генетического анализа [19]. ДНК выделяли методом кипячения: петлю суточной культуры переносили в 1,5 мл пробирку Эппендорфа со 100 мкл очищенной от нуклеаз воды, кипятили в течение 5 мин на водяной бане, после чего центрифугировали при скорости 12 000 об./мин в течение 3 мин. Надосадочную

жидкость (супернатант) переносили автоматической микропипеткой в стерильные пробирки и использовали для анализа.

Полимеразную цепную реакцию проводили в термоциклере ThermalCycler C 1000™ (Bio-Rad, США). Используемые в работе праймеры представлены в табл. 1.

Рабочая смесь содержала 1 единицу Taq ДНК-полимеразы («СибЭнзим», Россия), 1×буфер (10×: 600 ммоль Tris-HCl; 250 ммоль KCl; 15 ммоль MgCl<sub>2</sub>; 100 ммоль 2-меркаптоэтанол; 1% Тритон X-100, pH=8,5), 0,8 ммоль смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов (по 0,2 ммоль каждого), 0,25 мкмоль каждого праймера и 50 нг ДНК.

Аmplификацию гена *OXA-23* проводили при следующих условиях: предварительная денатурация при 94°C — 5 мин; последующие 35 циклов при 94°C — 30 с, при 52°C — 40 с, при 72°C — 50 с и окончательная достройка цепей при 72°C — 5 мин. Для амплификации остальных генов использовали такие условия: предварительная денатурация при 95°C — 5 мин, 8 циклов при 95°C — 30 с, начиная с 48°C при каждом цикле температуру отжига повышали на 0,9°C, при 72°C — 20 с, последующие 36 циклов при 95°C — 15 с, при 56°C — 20 с, при 72°C — 20 с и окончательная достройка цепей при 72°C — 5 мин. Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 2,0% агарозном геле (Agarose Biotechnology Grade, Amresco, США) с окраской ДНК этидиум бромидом. Маркером молекулярной массы служил стандартный набор фрагментов ДНК, кратных 100 парам нуклеотидов (п.н.) («СибЭнзим», Россия). Для определения размеров амплифицированных фрагментов использовали программу TotalLab v. 2.01.

Присутствие или отсутствие ампликонов рассматривалось как бинарный признак, в соответствии с чем для всех исследуемых изолятов *A. baumannii* и всех используемых праймерных последовательностей была создана бинарная матрица. Впоследствии каждый изолят типировался по всем парам праймеров, в результате чего были получены комбинированные генотипы. Полиморфизм генотипов оценивали с помощью теста χ-квадратов [20] для каждой пары изолятов в программе ARLEQUIN v. 3.5 [21]. Поиск оптимальной дендрограммы максимальной экономии МР (Maximum Parsimony tree) выполняли по алгоритму PENNY [22] в пакете программ PHYLIP (Phylogeny Inference Package) v. 3.67 [23]. Устойчивость кластеризации оценивали в 1000 итераций бутстреп-анализа [24]. Графическое изображение дендрограммы получено в программе TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>).

**Результаты и обсуждение.** Гены *adk*, *mutY*, *ppa* и *trpE* амплифицировались у всех исследуемых штаммов

Таблица 1

Праймеры, используемые для генотипирования изолятов *A. baumannii*

Праймер	Нуклеотидные последовательности	Литература
OXA-23	F: 5'-ACTTGCTATGTGGTTGCTTCTC-3' R: 5'-TGTC AAGCTCTAAATATTCAGC-3'	[8]
ISAbal	F: 5'-CACGAATGCAGAAGTTG-3' R: 5'-CGACGAATACTATGACAC-3'	[8]
csuE	F: 5'-TAGCGGGCCTGATGGCAATT-3' R: 5'-ACCCAGGGCTCTCAAAGAAG-3'	[11]
tonB	F: 5'-GGACTGGTGATAAAGCACTAT-3' R: 5'-GCCGCATAGAGTTATCACATC-3'	[10]
adk	F: 5'-TCAACCTGACTGCGTGAATGGTTGT-3' R: 5'-TACGTTCTACGATTTCTTCATCAGGTACATC-3'	[12]
mutY	F: 5'-TCGTGCCCGCAATTTGCATAAAGC-3' R: 5'-TAATGCCGGGTAGTGCAATCCATTCTCTAG-3'	[12]
ppa	F: 5'-TGGTTATGTACCAAATACTTTGTCTGAAGATGG-3' R: 5'-TGACGGCATCGATACCACCGTC-3'	[12]
trpE	F: 5'-TGAGATTGCTGAACATTTAATGCTGATTGA-3' R: 5'-TTGTACATTTGAAACAATATGCATGACATGTGAAT-3'	[12]

*A. baumannii*. Гены *OXA-23* и *ISAbal* амплифицировались в 70 и 80% случаев соответственно, что указывает на наличие резистентности к карбапенемам. Ген *csuE* определен у 40% штаммов. Он имеет 4 модификации с разной молекулярной массой. Есть основания полагать, что это обусловлено мутациями в гене, являющимся одним из показателей склонности бактерий к формированию биопленок. Это свойственно многим госпитальным штаммам. Ген *tonB*, кодирующий свойства бактерий, позволяющие вызвать бактериемию в короткие сроки, определен у 15% штаммов. В ходе анализа для каждого штамма объединяли все полученные данные по присутствию/отсутствию признака, получая таким образом комбинированный генотип, соответствующий определенному набору генов и являющийся

генетической характеристикой данного штамма. По исследуемым генам, кодирующим антибиотикорезистентность и факторы вирулентности, было выделено 9 комбинированных генотипов. Наиболее часто встречался генотип А (в 50% случаев). Генотипы F и I встречались в 10%, остальные — в 5% случаев (табл. 2).

Оценки генетических различий генотипов *A. baumannii*, полученные с помощью теста  $\chi$ -квадратов для каждой пары изолятов, показали, что только генотипы F и I достоверно отличаются при 95% уровне значимости (табл. 3). Существенных различий между другими генотипами не выявлено. На основании анализа генетического полиморфизма изолятов *A. baumannii* построена МР-дендрограмма (см. рисунок). Также как и данные генетической дифференциации исследуемых

Таблица 2  
Генотипирование изолятов *A. baumannii* по результатам ПЦР-анализа

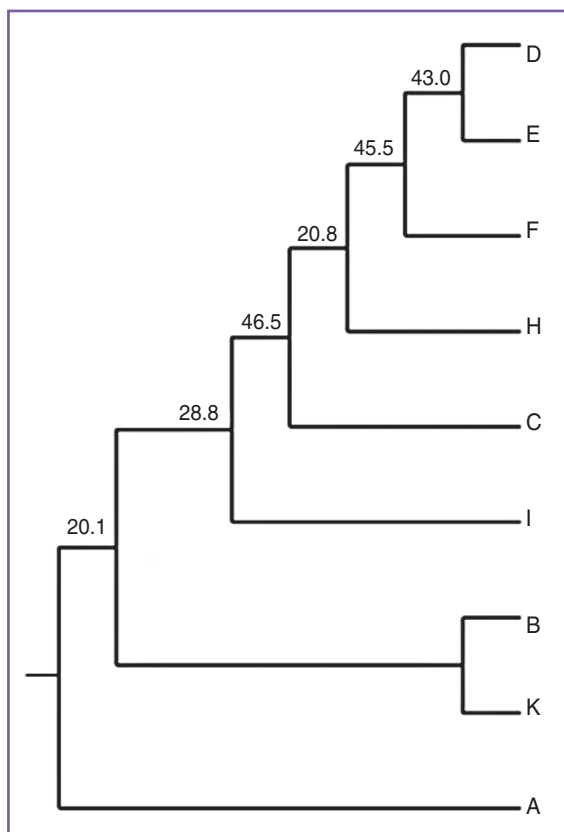
Генотип	<i>OXA-23</i>	<i>ISAbal</i>	<i>csuE*</i>				<i>tonB</i>	Частота встречаемости, %
			a	b	c	d		
A	+	+	-	-	-	-	+	50
B	+	+	+	-	-	-	+	5
C	-	+	-	-	-	-	+	5
D	-	-	-	+	-	-	+	5
E	-	-	-	+	+	-	-	5
F	-	-	-	-	-	-	-	10
H	-	+	-	+	-	-	+	5
I	+	+	-	+	-	-	+	10
K	+	+	-	-	-	+	+	5

\* — размеры амплифицированного фрагмента гена *csuE*: a — 180 п.н., b — 200 п.н., c — 220 п.н., d — 285 п.н. Здесь п.н. — пары нуклеотидов.

Таблица 3  
Генетическая дифференциация изолятов *A. baumannii*

Генотип	A	B	C	D	E	F	H	I	K
A		-	-	-	-	+	-	+	-
B	0.09066± 0.0017		-	-	-	-	-	-	-
C	0.08981± 0.0016	1.00000± 0.0000		-	-	-	-	-	-
D	0.09199± 0.0011	1.00000± 0.0000	1.00000± 0.0000		-	-	-	-	-
E	0.09165± 0.0015	1.00000± 0.0000	1.00000± 0.0000	1.00000± 0.0000		-	-	-	-
F	0.01574± 0.0006	0.33194± 0.0026	0.33358± 0.0019	0.33724± 0.0020	0.33191± 0.0015		-	-	-
H	0.09408± 0.0022	1.00000± 0.0000	1.00000± 0.0000	1.00000± 0.0000	1.00000± 0.0000	0.33340± 0.0023		-	-
I	0.01499± 0.0006	0.33328± 0.0028	0.32977± 0.0023	0.33343± 0.0027	0.33206± 0.0024	0.33073± 0.0026	0.33406± 0.0018		-
K	0.09075± 0.0007	1.00000± 0.0000	1.00000± 0.0000	1.00000± 0.0000	1.00000± 0.0000	0.33578± 0.0021	1.00000± 0.0000	0.33345± 0.0018	

Примечание. Ниже диагонали приведены оценки генетических различий, выше диагонали — достоверность различий для уровня значимости  $p=0,05$ : «-» — различия недостоверны, «+» — различия достоверны.



MP-дендрограмма, построенная на основании анализа полиморфизма генов *OXA-23*, *ISAbal*, *csuE*, *tonE* штаммов *A. baumannii*. Цифрами показаны оценки бутстреп-поддержки (процент от 1000 реплик)

изолятов (см. табл. 3), дендрограмма указывает на их тесную генетическую близость, о чем свидетельствуют низкие значения (не более 50%) бутстреп-поддержек.

Таким образом, исследование генетической структуры 60 изолятов *A. baumannii* с помощью ПЦР-анализа генов *OXA-23*, *ISAbal*, *csuE*, *tonE* свидетельствует о незначительном уровне их генетической дифференциации. Полученные данные указывают на длительное существование госпитальных штаммов в среде стационара и на высокую частоту внутрибольничного экзогенного инфицирования пациентов, поскольку эндогенное инфицирование разными штаммами давало бы гораздо большее разнообразие признаков. Данные факты говорят о необходимости соблюдения всех требований инфекционного контроля в лечебных учреждениях и использования принципов рациональной антибиотикотерапии в повседневной врачебной практике, а также о совершенствовании и унификации методов эпидемиологического надзора за формированием госпитальных штаммов.

По сравнению с методом МЛСТ предлагаемая нами методика применения ПЦР для определения спектра госпитальных штаммов является материально мало затратной, поскольку используемое для данного метода оборудование имеется в большинстве исследовательских и клинических лабораторий, а стоимость

расходных материалов существенно ниже стоимости реактивов для секвенирования. Полученные с помощью этого метода результаты легко воспроизводимы и статистически достоверны, что свидетельствует о возможности его широкого применения.

**Заключение.** Исследование генетической структуры штаммов *A. baumannii* с помощью ПЦР-анализа генов *OXA-23*, *ISAbal*, *csuE*, *tonE* позволяет эффективно оценить наличие эпидемической связи между штаммами, выявить преобладающий генотип и определить эпидемически важные свойства штаммов.

**Финансирование исследования и конфликт интересов.** Исследование не финансировалось какими-либо источниками и конфликт интересов, связанный с данным исследованием, отсутствует.

### Литература

1. Карабак В.И., Гельфанд Е.Б., Белоцерковский Б.З., Попов Т.В., Краснов В.Г. Проблемные госпитальные микроорганизмы. *Acinetobacter* spp. — возбудитель или свидетель? *Инфекции в хирургии* 2008; 1: 12–19. Karabak V.I., Gel'fand E.B., Belocerkovskij B.Z., Popov T.V., Krasnov V.G. Problematic hospital microorganisms. *Acinetobacter* spp. — pathogen or a witness? *Infektsii v khirurgii* 2008; 1: 12–19.
2. Руднов В.А., Зубарев А.С. Инфекции в отделениях реанимации и интенсивной терапии, вызванные *P. aeruginosa* и *Acinetobacter* spp. *Consilium medicum* 2008; 1: 37–44. Rudnov V.A., Zubarev A.S. Infections in the intensive care unit caused by *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *Consilium medicum* 2008; 1: 37–44.
3. Di Popolo A., Giannouli M., Triassi M., Brisse S., Zarrilli R. Molecular epidemiological investigation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in four Mediterranean countries with a multilocus sequence typing scheme. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(2): 197–201, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03254.x>.
4. Туркутюков В.Б., Ибрагимова Т.Д., Фомин Д.В. Молекулярные особенности морфологии биопленок, формируемых штаммами неферментирующих грамотригативных бактерий. *Тихоокеанский медицинский журнал* 2013; 4: 44–47. Turkutuykov V.B., Ibragimova T.D., Fomin D.V. Molecular and morphological features of biofilms developed by gram-negative non-fermentable bacterial strains. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal* 2013; 4: 44–47.
5. Сатосова Н.В. Эпидемиология и профилактика инфекций кровотока в отделении ожоговой реанимации и интенсивной терапии. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб; 2012. Satosova N.V. *Epidemiologiya i profilaktika infektsiy krovotoka v otdelenii ozhogovoy reanimatsii i intensivnoy terapii*. Avtoref. dis. ... kand. med. nauk [Epidemiology and prevention of bloodstream infections in the department of burn intensive care. PhD Thesis]. Saint Petersburg; 2012.
6. Туркутюков В.Б., Скурихина Ю.Е., Скурихина Л.А., Баян В.П. Молекулярно-генетический мониторинг за формированием резистентности к антибиотикам штаммов микроорганизмов, выделенных у пациентов специализированных стационаров. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии* 2009; 14: 46–50. Turkutuykov V.B., Skurikhina Y.E., Skurikhina L.A., Bayan V.P. Molecular and genetics monitoring for the formation of strains

resistant to antibiotics microorganisms isolated in specialized hospitals patients. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii* 2009; 14: 46–50.

7. Mugnier P.D., Poirel L., Naas T., Nordmann P. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2010; 16(1): 35–40, <http://dx.doi.org/10.3201/eid1601.090852>.

8. Carvalho K.R., Carvalho-Assef A.P., Santos L.G., Pereira M.J., Asensi M.D. Occurrence of blaOXA-23 gene in imipenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106(4): 505–506, <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000400020>.

9. Соломенный А.П. Инсерционная последовательность ISAbal1 в геноме эпидемически значимых штаммов *Acinetobacter*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2008; 5: 98–100. Solomennyi A.P. ISAbal insertion sequence in genome of epidemically relevant *Acinetobacter* strains. *Zh Mikrobiol (Moscow)* 2008; 5: 98–100.

10. Acosta J., Merino M., Viedma E., Poza M., Sanz F., Otero J.R., Chaves F., Bou G. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* Harboring OXA-24 carbapenemase, Spain. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(6): 1064–1067, <http://dx.doi.org/10.3201/eid1706.091866>.

11. Gaddy J., Actis L. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol* 2009; 4(3): 273–278, <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.09.5>.

12. Ecker J.A., Massire C., Hall T.A., Ranken R., Pennella T.T., Agasino Ivy C., Blyn L.B., Hofstadler S.A., Endy T.P., Scott P.T., Lindler L., Hamilton T., Gaddy C., Snow K., Pe M., Fishbain J., Craft D., Deye G., Riddell S., Milstrey E., Petruccielli B., Brisse S., Harpin V., Schink A., Ecker D.J., Sampath R., Eshoo M.W. Identification of *Acinetobacter* species and genotyping of *Acinetobacter baumannii* by multilocus PCR and mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2006; 44(8): 2921–2932, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00619-06>.

13. Соломенный А.П., Яфаев Р.Х., Гончаров А.Е., Асланов Б.И., Крылов К.М., Максимов А.Ю., Демаков В.А. Генетическое разнообразие *Acinetobacter baumannii* в отделении ожоговой реанимации. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2006; 2: 25–30. Solomennyi A.P., Yafaev R.Kh., Goncharov A.E., Aslanov B.I., Krylov K.M., Maksimov A.Yu., Demakov V.A. Genetic variety of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit for burn patients. *Zh Mikrobiol (Moscow)* 2006; 2: 25–30.

14. Lyytikäinen O., Kõljalg S., Härmä M., Vuopio-Varkila J. Outbreak caused by two multi-resistant *Acinetobacter baumannii* clones in a burns unit: emergence of resistance to imipenem. *J Hosp Infect* 1995; 31(1): 41–54, [http://dx.doi.org/10.1016/0195-6701\(95\)90082-9](http://dx.doi.org/10.1016/0195-6701(95)90082-9).

15. Соломенный А.П., Максимов А.Ю., Мочалова Т.И. ПЦР-генотипирование госпитальных изолятов *Acinetobacter*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 2004; 6: 26–30. Solomennyi A.P., Maksimov A.Yu., Mochalova T.I. PCR genotyping of *Acinetobacter* hospital isolates. *Zh Mikrobiol (Moscow)* 2004; 6: 26–30.

16. Diancourt L., Passet V., Nemeč A., Dijkshoorn L., Brisse S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One* 2010; 5(4): e10034, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010034>.

17. Bartual S.G., Seifert H., Hippler C., Luzon M.A., Wisplinghoff H., Rodríguez-Valera F. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2005; 43(9): 4382–4389, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.9.4382-4390.2005>.

18. Peleg A.Y., Seifert H., Paterson D.L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21(3): 538–582, <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00058-07>.

19. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 1989.

20. Raymond M., Rousset F. An exact test for population differentiation. *Evolution* 1995; 49(6): 1280–1283, <http://dx.doi.org/10.2307/2410454>.

21. Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resources* 2010; 10(3): 564–567, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>.

22. Hendy M.D., Penny D. Branch and bound algorithms to determine minimal evolutionary trees. *Math Biosci* 1982; 59(2): 277–290, [http://dx.doi.org/10.1016/0025-5564\(82\)90027-x](http://dx.doi.org/10.1016/0025-5564(82)90027-x).

23. Felsenstein J. *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.67*. University Washington, Seattle; 2007.

24. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39(4): 783–791, <http://dx.doi.org/10.2307/2408678>.