

## **АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ: СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИХ КАЧЕСТВ**

Старикова Е.С., Фоминых С.Г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

### **Авторы:**

Старикова Екатерина Сергеевна, студентка 404 группы лечебного факультета ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России

Фоминых Стелла Геннадьевна, заведующая кафедрой фармакологии, клинической фармакологии ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России, д.м.н., доцент, главный внештатный клинический фармаколог МЗ ОО

### **Автор, ответственный за переписку:**

Старикова Екатерина Сергеевна, студентка 404 группы лечебного факультета ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России, 644099, г. Омск, ул. Ленина, 12. ekaterinkastarickowa@yandex.ru

DOI: 10.61634/2782-3024-2023-12-82-93

Одной из самых актуальных проблем в медицине на сегодняшний день является проблема антибиотикорезистентности. Почему эта проблема? Ведь ученые всего мира провозгласили победу над микроорганизмами в 50-60х годах прошлого века? А с 70х годов уже стали появляться сведения об устойчивых штаммах. Все оказалось не так просто. Из-за неконтролируемого и нерационального применения антибиотиков человечество все стремительнее приближается к так называемой «постантибиотической эре». Как остановить это «приближение»? Необходимо четко следовать принципам рациональной антибиотикотерапии.

Для рациональной антибиотикотерапии необходимо определить бактериальную природу заболевания, определить чувствительность микроорганизмов к антибиотику и начать лечение как можно скорее. Для соблюдения этих принципов необходимы быстрые и точные методы идентификации микроорганизмов, ведь именно на основе данных методов подбирается наиболее эффективное противомикробное средство.

Существуют стандартные методы идентификации, к которым относятся диско-диффузный метод и метод серийных разведений. Главный минус этих методов заключается в длительности получения результатов.

Какие же существуют альтернативные методы? Существует множество методов идентификации микроорганизмов, однако не все они пригодны для широкого использования в связи с высокой стоимостью, необходимостью использования дорогостоящего оборудования.

Из всех современных методов в данном обзоре подчеркивается перспективность трех методов: это секвенирование гена 16S рРНК, MALDI-TOF MS и EUCAST RAST. Секвенирование гена 16S рРНК основано на расшифровке участка гена, который у бактерий несет информацию о механизмах устойчивости и особенностях строения. MALDI-TOF MS это десорбционный метод «мягкой» ионизации, обусловленной воздействием импульсами лазерного излучения на матрицу с анализируемым веществом. Метод EUCAST RAST представляет собой ускоренный диско-диффузный метод.

В данном обзоре описаны проблема антибиотикорезистентности, механизмы устойчивости бактерий, а также современные и стандартные методы идентификации бактерий и определения из чувствительности к антибиотикам.

Целью данного обзора являлось сравнение рутинных методов идентификации видовых и качественных свойств микроорганизмов, возбудителей нозокомиальных

инфекций, с современными технологиями микробиологического тестирования как важного этапа решения задачи приоритетного выбора эффективных противомикробных средств.

Итак, главный вопрос данного обзора: смогут ли современные методы вытеснить стандартные методы идентификации микроорганизмов?

**Ключевые слова:** антибиотикорезистентность, идентификация микроорганизмов, определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, механизмы устойчивости бактерий.

## TOPICAL ISSUES OF ANTIBIOTIC RESISTANCE: MODERN METHODS OF IDENTIFICATION OF BACTERIAL PATHOGENS AND DETERMINATION OF THEIR QUALITIES

Starikova E.S., Fominykh S.G.

Omsk State Medical University

One of the most urgent problems in medicine today is the problem of antibiotic resistance. Why this problem? After all, scientists around the world proclaimed victory over microorganisms in the 50-60s of the last century? And since the 70s already began to appear information about resistant strains. Everything turned out to be not so simple. Due to uncontrolled and irrational use of antibiotics, mankind is rapidly approaching the so-called "post-antibiotic era". How to stop this "approach"? It is necessary to clearly follow the principles of rational antibiotic therapy.

Rational antibiotic therapy requires identifying the bacterial nature of the disease, determining the sensitivity of the microorganisms to the antibiotic and starting treatment as soon as possible. To comply with these principles, rapid and accurate methods of identification of microorganisms are necessary, because it is on the basis of these methods that the most effective antimicrobial agent is selected.

There are standard methods of identification, which include the disk-diffusion method and the serial dilution method. The main disadvantage of these methods is the length of time it takes to obtain results.

So what are the alternative methods available? There are many methods of microbial identification, but not all of them are suitable for widespread use due to the high cost, the need for expensive equipment.

Of all the current methods, three methods are emphasized in this review: 16S rRNA gene sequencing, MALDI-TOF MS and EUCAST RAST. Sequencing of the 16S rRNA gene is based on decoding the region of the gene, which in bacteria carries information on resistance mechanisms and structure features. MALDI-TOF MS is a desorption method of "soft" ionization caused by exposure of the matrix with the analyzed substance to pulses of laser radiation. The EUCAST RAST method is an accelerated disk-diffusion method.

This review describes the problem of antibiotic resistance, mechanisms of bacterial resistance, as well as modern and standard methods of bacterial identification and antibiotic sensitivity.

The aim of this review was to compare routine methods of identification of species and qualitative properties of microorganisms, causative agents of nosocomial infections, with modern technologies of microbiological testing as an important step in solving the problem of priority selection of effective antimicrobial agents.

So, the main question of this review is: can modern methods displace standard methods of microorganism identification?

Key words: antibiotic resistance, identification of microorganisms, determination of microorganisms sensitivity to antibiotics, mechanisms of bacterial resistance.

## **Проблема антибиотикорезистентности.**

Появление антибиотиков и их применение привело к снижению летальности при тяжело протекающих инфекционных болезнях. В 50-60-е успех первых применений антибиотиков позволил ученым сказать о полной победе человека над микроорганизмами [1]. Однако, с 1970-х годов стали появляться сведения о выделении резистентных штаммов микроорганизмов [5]. Проблема антибиотикорезистентности начала приобретать особую значимость в последние десятилетия. Так, резко возросла смертность при сепсисе, пневмониях, поскольку их возбудители приобрели резистентность к ранее распространенным АМП [10].

На фоне научного прогресса логичным было решение этой проблемы при помощи разработки новых препаратов, обладающих более широким спектром действия и способных преодолевать устойчивость микроорганизмов. Применение антибиотиков с широким спектром действия, конечно привело к победе над многими инфекционными болезнями, однако такая практика быстро привела к формированию большого количества устойчивых штаммов бактерий. А также негативным последствием стал феномен «параллельного ущерба», суть которого состоит в селекции полирезистентных МО среди бактерий, не являвшихся этиологически значимыми [5].

Эта ситуация грозит нам приближением к «постантибиотической эре».

Резистентность организмов обеспечивает ограничение эффективности препаратов. Резистентность микроорганизмов возрастает при многократном и необоснованном применении антибиотиков. Показано, что распространение антибиотикорезистентных возбудителей инфекций находится в прямой зависимости от количества назначаемых

антибиотиков и широты их антимикробного спектра [1].

Также важным фактором развития резистентности является так называемый “вторичный эффект”. Вторичное распространение является следствием того факта, что устойчивые к антибиотикам и чувствительные к ним бактерии могут передаваться от человека к человеку. Таким образом, риск развития инфекции, устойчивой к антибиотикам, у одного человека зависит от его собственного использования антибиотиков, а также от частоты использования антибиотиков среди его контактов [24].

Постоянный эпидемиологический надзор и мониторинг назначения антибиотиков и их потребления могут задержать распространение устойчивых к антибиотикам микроорганизмов. Кроме того, другими потенциальными способами снижения частоты возникновения резистентности является использование комбинаций антибиотиков или разработка альтернативных методов лечения. Поэтому необходимо сконцентрироваться на открытии новых соединений, которые нацелены на бактериальные системы, такие как передача сигнала, регуляторы вирулентности или проницаемость бактериальной мембраны, является неотложной задачей. Большинство альтернативных методов лечения не могут непосредственно убивать бактерии, нарушая процесс бактериального патогенеза, однако ослабленные вирулентностью бактерии могут быть эффективно уничтожены иммунной системой хозяина или антибиотиками [28].

Идеального антибиотика не существует, и как только определены наиболее подходящие виды применения любого нового соединения, важно, чтобы назначение антибиотика было ограничено этими видами применения. Это означает, что определенные “нишевые” антибиотики

должны разрабатываться как класс, отдельный от агентов широкого спектра действия [16]. Также можно добавить, что существуют альтернативные методы, например, создание и применение микроорганизмов, обладающих антагонистической активностью по отношению к патогенам – актуальное и развивающееся научное направление [9]. Идентификация возбудителей инфекционных заболеваний с минимальными затратами времени и сил – одна из основных задач для медицины [4].

### **Механизмы устойчивости микроорганизмов**

Какие же существуют механизмы устойчивости к антибиотикам у микроорганизмов?

Бактериальная устойчивость может быть природной и приобретенной. Природная обусловлена генетическими особенностями данного вида, а приобретенная возникает в результате генетических изменений, которые обеспечивают аномальный фенотип, обладающий резистентностью.

Генетические носители устойчивости – это структурные гены или мобильные элементы. При наличии мобильных элементов устойчивость может передаваться не только между бактериями двух видов, но и между бактериями разных видов. Однако, этот вид генетической устойчивости лучше поддается терапии, так как при отсутствии антибиотика, к которому они имеют чувствительность, мобильный элемент утрачивается.

Если говорить о приобретенной устойчивости, то существует два основных пути селекции резистентных штаммов: нерациональное использование антибактериальных средств и потребление антибиотиков с продуктами питания, произведенными в животноводстве [6].

Молекулярные механизмы подразделяются на три основные механические группы устойчивости: снижение внутриклеточных концентраций антибиотиков,

модификация мишени антибиотика и инактивация антибиотика [23].

Решение проблемы антибиотикорезистентности невозможно без динамического наблюдения за распространением устойчивости в микробной популяции в целом [6].

Появление и распространение невосприимчивых к лекарствам патогенов сильно ограничивают возможности лечения инфекций. Именно поэтому определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам приобретает все большее значение [3].

### **Методы идентификации микроорганизмов и определения антибиотикочувствительности.**

Существует множество методов идентификации бактерий и определения их чувствительности к антибиотикам.

#### **Стандартные методы**

Методы определения чувствительности, основанные на разведении бульоном или агаром, используются для определения минимальной ингибирующей концентрации [26]. AMR – это унаследованная способность микроорганизмов расти при высоких концентрациях антибиотиков. Обычно она определяется количественно путем измерения минимальной ингибирующей концентрации (MIC) конкретного антибиотика, при которой устойчивые бактерии способны размножиться и расти при концентрациях антибиотиков, которые смертельны для других штаммов того же вида [20].

Эти методы считаются эталонными, но являются трудоемкими и сложными.

Существует два широких класса технологий AST (методы определения чувствительности): генотипические и фенотипические, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. Наиболее эффективные методы определения чувствительности могут дать результат через несколько часов.

Генотипический AST направлен на определение специфических генов устойчивости, которые могут кодировать ферменты, разрушающие антибиотик

или модифицировать мишень антибиотика. Генотипические тесты не требуют чистой колонии микроорганизмов, поэтому занимает мало времени, а также может быть проведено на первичных образцах.

Минусами генотипических тестов может являться то, что они определяют то, для чего они предназначены (например, ген  $\beta$ -лактамазы) и не идентифицирует то, чего мы не знаем. Также генотипические тесты не определяют уровень пенетрантности. В целом, генотипические тесты наиболее актуальны для определения чувствительности антибиотиков к грамположительным организмам, так как у них небольшое количество элементов резистентности.

К фенотипическим тестам можно отнести быстрое фенотипическое AST на основе микроскопии. Смысл данного теста заключается в определении ингибирования репликации организма антибиотиком, то есть подсчете количества бактериальных клеток с помощью микроскопа. Фундаментальной проблемой для методов AST, основанных на прямой микроскопии, является необходимость увеличения (обычно  $\geq 400\times$ ) [26].

Обычные методы, используемые в настоящее время для идентификации микроорганизмов, основаны на культивировании микроорганизмов и определении их фенотипических характеристик. Однако эти методы трудоемки, требуют много времени (занимают до 3 дней) и часто недостаточны для дифференциации фенотипически сходных видов [14].

Стандартными методами определения чувствительности микроорганизмов к АМП (антимикробные препараты) являются диско-диффузионный и серийных разведений, они были разработаны в 60-х годах прошлого века и не претерпели особых изменений [3].

Диско-диффузионный метод используют для тестирования большинства бактериальных патогенов, в том числе со сложными питательными

потребностями. Этот метод не требует специального оборудования. Точность данного метода зависит от четкого соблюдения стандартной процедуры исследования, от качества дисков с АМП и качества питательных сред, а также необходим постоянный контроль качества.

При использовании некачественных сред и дисков может получиться ложноположительный или ложноотрицательный результат, что будет иметь негативные последствия для пациента [7].

Дисковая диффузия (DD) проста в использовании, дешева и надежна, если выполняется в соответствии с рекомендациями. Метод гибкий и быстро адаптируется к новым противомикробным препаратам. Сегодня многие лаборатории знакомы со стандартизированным методом DD EUCAST.

Необходимость сокращения сроков диагностики побудила EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) разработать метод экспресс-фенотипического тестирования на чувствительность к противомикробным препаратам (RAST), основанный на DD непосредственно из флаконов для посева крови (BC), который может быть выполнен любой лабораторией. Во время разработки во флаконы с BC добавляли клинические изоляты наиболее важных патогенов инфекции кровотока с определенными механизмами устойчивости и без них, а также добавляли разные виды антибиотиков [11].

Метод идентификации EUCAST RAST позволяет быстро определять микроорганизмы непосредственно из положительной культуры крови. Метод дисковой диффузии EUCAST RAST был разработан, чтобы предложить стандартизированный метод прямой AST с конкретными временными промежутками для каждого вида и точным временем считывания (4, 6 и 8 ч), как указано EUCAST.

Метод не сложен для внедрения в стандартные клинические микробиологические лаборатории, но потребует адаптации рабочего процесса. Он дешев в использовании, быстрее, чем другие современные методы, основан на известных и приемлемых материалах, более гибкий, чем любая другая система, и потенциально приведет к значительному сокращению времени получения результатов теста на чувствительность у постели пациента [22].

Метод серийных разведений считается информативным и точным, однако требует коммерческих наборов, тщательного контроля качества питательных сред, строгое соблюдение режимов хранения.

В настоящее время в России используют импортные тест-системы, которые весьма дорогостоящи, что диктует необходимость разработки тест-систем отечественного производителя [2].

#### **Современные методы**

Для идентификации бактерий используют ряд методов молекулярной биологии, такие как секвенирование генов 16S рибосомной РНК, полимеразная цепная реакция и другие родственные методы на основе ПЦР. Эти методы отличаются высокой чувствительностью и воспроизводимостью. Секвенирование гена 16S рРНК считается наиболее точным методом и считается золотым стандартом для идентификации микроорганизмов на видовом уровне. К сожалению, из-за высокой стоимости этого анализа, в рутинной диагностике использовать этот метод невозможно. Кроме того, такие исследования обычно проводятся внешними учреждениями, что приводит к длительному времени ожидания результатов.

Одной из стратегий сокращения времени, необходимого для идентификации микроорганизмов при рутинной диагностике, является использование полуавтоматических и автоматических систем, основанных на биохимических методах, время

ожидания их результатов может составлять до 24 часов, в случаях, когда результат нужен как можно скорее, эти методы не подходят. Альтернативой им могут быть методы масс-спектрометрии, такие как матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI-TOF MS) или методы электромиграции. Эти методы позволяют выполнять быстрые и четкие анализы микроорганизмов непосредственно из образцов инфицированной жидкости при сохранении низких удельных затрат. Самый современный подход к идентификации бактерий предполагает использование многомерных методов, таких как ионизация электрораспылением ПЦР (ESI), капиллярный электрофорез с ПЦР-микрочипом, ПЦР-капиллярный электрофорез. Такие тесты позволяют получить убедительные результаты за очень короткий промежуток времени и обладают большим потенциалом для дальнейших исследований [14].

#### **• Секвенирование гена 16S рРНК**

Одним из методов молекулярной биологии является секвенирование гена 16S рРНК. Этот метод является наиболее точным для идентификации микроорганизмов. Секвенирование гена 16S рРНК для идентификации бактерий включает ПЦР-амплификацию области гена 16S рРНК, секвенирование и анализ данных последовательности. Разнообразие последовательностей, которое обеспечивает способность различать виды бактерий, варьируется в зависимости от гена 16S рРНК [29].

Частичное или полное целевое секвенирование 16S обычно выполняется в клинической лаборатории с использованием либо обрыва цепи (Сэнгер), либо пиросеквенирующего химического анализа.

Во время процедуры Сэнгера первоначально проводят ПЦР с использованием коротких олигонуклеотидных 16S праймеров для синтеза комплементарных матрице ампликонов, далее проводят вторичное

циклическое секвенирование ампликона.

Смесь фрагментов одноцепочечной ДНК (ssDNA), полученная в результате реакции флуоресцентного циклического секвенирования, электрокинетически загружается в полиакриламид, гелевый капилляр, размещенный в автоматическом генетическом анализаторе, где фрагменты разделяются электрофорезом и последовательно считываются флуорометрическим детектором для получения электроферограммы полученной последовательности ДНК [15].

Будущее развитие методов быстрой очистки после ПЦР и циклического секвенирования с использованием микрочипа должно способствовать идентификации возбудителей бактериальных агентов в течение одного часа, что важно для раннего лечения сепсиса [17].

Пиросеквенирование определяет порядок нуклеотидов в матричной ДНК путем синтеза и обнаружения высвобожденного пирофосфата при включении нуклеотидного основания. Свет, создаваемый этой ферментативной реакцией, регистрируется камерой устройства и анализируется в пирограмме. Интенсивность света, измеренная пиросеквенсором, определяет, есть ли в последовательности несколько оснований подряд. Пиросеквенирование позволяет секвенировать только ДНК длиной от 300 до 500 нуклеотидов, что намного короче, чем у ДНК, полученной методом Сэнгера.

#### • MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS недавно в значительной степени вытеснила рутинные фенотипические тесты в качестве рутинного метода идентификации, используемого для идентификации патогенов, и произвела революцию в способности лабораторий клинической микробиологии быстро идентифицировать гораздо более

широкое разнообразие микроорганизмов [15].

MALDI-TOF MS широко используется в качестве простого, быстрого и надежного метода идентификации микроорганизмов. Идентификация микроорганизмов достигается путем поиска в базах данных, содержащих MS-спектры пептидов и белков, выделенных из микроорганизмов, с использованием алгоритмов подсчета очков для сопоставления анализируемых спектров с эталонными спектрами. О типировании микробов с помощью MS впервые сообщили Drucker (1993) и Fenselau (1993), которые идентифицировали микробы на основе анализа их клеточных липидных составляющих; с тех пор микробное типирование эволюционировало, чтобы позволить идентифицировать бактерии на видовом уровне на основе их белковых профилей, которые получены путем прямого анализа экстрактов цельноклеточных белков.

Метод MALDI-TOF MS для идентификации микробов произвел революцию в клинической лабораторной практике; он требует меньше времени выполнения работ и более низких объемы образцов, имеет меньшие затраты и обеспечивает более высокую селективность идентификации, чем классические лабораторные процедуры идентификации микроорганизмов [21].

Что касается времени получения результатов и экономической эффективности, в то время как идентификация MALDI-TOF MS выполняется за считанные минуты и стоит несколько долларов США, секвенирование гена 16S рРНК требует много времени как с точки зрения реагентов, так и технических специалистов. С учетом расходных материалов, заработной платы и износа оборудования идентификация 16S рРНК, выполняемая в нашей лаборатории, обычно стоит около 100 долларов США и доступна в течение 48 часов.

MALDI-TOF MS потенциально может уменьшить потребность в методах

молекулярной идентификации, таких как секвенирование гена 16S рРНК, и может заменить эти трудоемкие и дорогостоящие методы для большинства трудно идентифицируемых изолятов в лаборатории клинической микробиологии [13].

- **SERS**

Спектроскопия комбинационного рассеяния света с поверхностным усилением (SERS) – метод идентификации чувствительности антибиотиков к микроорганизмам.

SERS представляет собой аналитический метод, используемый для характеристики химического и биохимического состава образца. SERS основан на спектроскопии комбинационного рассеяния света, которая использует рассеяние света, возникающее при воздействии лазера на образец, для получения спектра, содержащего отчетливые пики, которые указывают на присутствие определенных химических соединений или биохимических явлений. Рамановские сигналы, как правило, довольно слабые, и для усиления интенсивности сигнала можно использовать металлические подложки, такие как шероховатые поверхности или наночастицы.

Анализ SERS часто проводится с использованием дорогостоящего настольного лабораторного оборудования, такого как рамановские микроскопы, которые не идеальны для практического применения и транспортировки в разные места [19].

- **ВЭЖХ**

Что касается методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), то эти методы требуют очень много времени с точки зрения подготовки образца и хроматографического разделения. Существует оптимизированный метод получения пептидогликана грамотрицательных бактерий и его последующего анализа с помощью сверхэффективной жидкостной хроматографии (UPLC). Использование UPLC в анализе

пептидогликанов обеспечивает значительное сокращение объема пробы и необходимого времени, а также, кроме того, позволяет проводить встроенную масс-спектрометрию (MS)

муропептидов, разрешенных UPLC, что облегчает их идентификацию. Этот метод улучшает возможности по проведению высокопроизводительного анализа для лучшего понимания биологии клеточной стенки [12].

Если углубиться в диагностику туберкулеза, то сегодня вместо традиционных трудоемких процессов предлагается ВЭЖХ-анализ миколовых кислот для идентификации видов. Изолят, полученный в культуре, может быть проанализирован в течение нескольких часов с помощью ВЭЖХ, по сравнению с неделями или дольше для обычных методов. Но пригодность метода должна быть рассмотрена до включения в лабораторию. Метод ВЭЖХ считается передовым по сравнению с другими лабораторными методами, и для этого необходим специальный, высококвалифицированный персонал. Измерительные приборы стоят дорого по сравнению с традиционными методами. Использование постоянно контролируемых систем культивирования микобактерий на жидкой основе привело к сокращению времени обнаружения положительных культур. Методы молекулярного анализа не требуют стандартизированных условий роста, однако часто требуют больше практического времени для обработки образца. Для ВЭЖХ требуется больше жизнеспособных клеток, чем для молекулярных методов. Молекулярные методы обладают большей чувствительностью к обнаружению, чем метод ВЭЖХ. Как ВЭЖХ, так и автоматизированные методы секвенирования требуют дорогостоящего и сложного оборудования. Хотя оборудование для автоматического секвенирования такое же дорогое, как и хроматографические приборы, один образец может быть обработан примерно



за 15 минут с помощью ВЭЖХ, но автоматическое секвенирование занимает часы.

Это исследование показало, что ВЭЖХ является полезным, быстрым, надежным и практичным методом диагностики и последующего правильного лечения [27].

- **ПЦР**

Для идентификации микроорганизмов используется целый комплекс молекулярно-генетических методов. Молекулярно-генетические методы отличаются длительностью, требуют для анализа чистой культуры микроорганизмов и выполняются высококвалифицированным персоналом на современном дорогостоящем оборудовании.

Выявленные особенности патогенности бактерий используются для разработки простых в применении наборов реагентов, основанных на амплификации определенного фрагмента ДНК бактерии. Такие методы позволяют получить информацию, достаточную для идентификации патогенных бактерий в пробе без особых затрат и сложных исследований. С 90-х годов прошлого века и до настоящего времени методом амплификации ДНК является полимеразная цепная реакция. Она основана на прямом выявлении нуклеотидных последовательностей микроорганизмов, не требует чистой микробной культуры, позволяет выделить фенотипически измененные формы микроорганизмов. По сути, метод ПЦР с некоторыми отступлениями имитирует естественный процесс копирования ДНК в клетке. Кардинальным отличием является ограниченное копирование, то есть копируется не вся ДНК бактерии, а только ее определенная часть, это достигается путем выбора и искусственного синтеза коротких участков ДНК – праймеров. Еще одним отличием является многократное копирование одного участка ДНК в ходе реакции, что обеспечивается использованием фермента Taq-

полимеразы и быстрой сменой температуры реакционной смеси.

Итогом ПЦР является увеличение количества вновь синтезированных нитей ДНК. Результаты ПЦР регистрируются с помощью метода электрофореза в агарном геле. В специальные лунки геля вносят реакционную смесь после проведения реакции, короткие цепи вновь синтезированных ДНК при электрофорезе отделяются от исходных. Также для идентификации короткоцепочечных ДНК используют флуорисцирующие вещества. Для повышения точности и информативности ПЦР могут использоваться модификации этого метода [4].

- **ПЦР/ESI-MS**

ПЦР/электрораспылительная ионизационно-масс-спектрометрия (ПЦР/ESI-MS) - это технология, которая сочетает амплификацию нуклеиновых кислот с использованием нескольких ПЦР-анализов широкого спектра и специфических методов с электрораспылительной ионизационно-масс-спектрометрическим детектированием и точным измерением массы амплифицированной ДНК для каждой из реакций ПЦР; точное измерение массы позволяет определить состав амплифицированной ДНК. В конечном счете информация из нескольких анализов ПЦР рассматривается вместе, определяется конечный результат, например, обнаружение одного или нескольких микроорганизмов, а также выбранных генов устойчивости [25].

- **Серологические методы**

Несмотря на развитие технологий серологических анализов, серология редко используется в качестве единственного диагностического инструмента. Только для некоторых бактериальных инфекций, таких как сифилис и диссеминированные проявления болезни Лайма, серологические анализы все еще

используются в качестве основного теста для установления диагноза [30].

Известен способ биохимической идентификации бактерий, то есть изучение способности углеводов сбраживать углеводы и разлагать белковые продукты. Для обнаружения биохимических свойств бактерий пользуются их посевом на дифференциально-диагностических средах, содержащих вещества, в отношении которых микробы могут проявлять ферментативную активность. У этого метода есть ряд недостатков: длительное проведение исследования, высокая стоимость материалов, используемых при исследовании, большая трудоемкость.

Также существует серологический способ идентификации бактерий. Его проводят с чистой культурой и диагностическими сыворотками в реакциях агглютинации, преципитации. Недостатками этого метода являются необходимость в большом количестве диагностических сывороток различных серологических вариантов, а также недоступность данного метода для идентификации стафилококка из-за обилия его серовариантов.

Еще одним методом является метод фагоидентификации бактерий. Данный метод основан на способности изучаемого микроба лизироваться определенным видом фага. Недостатками данного метода являются

необходимость содержания музея фагов, высокая стоимость, большая длительность исследования [8].

Невозможно идентифицировать антибиотикочувствительность внутриклеточных бактерий стандартным диско-диффузным методом. Основными методами диагностики микоплазменных инфекций являются серологические тесты, такие как иммуноферментный анализ, быстрая агглютинация пластинок, или специфические ПЦР-тесты [18].

### **Заключение**

Существуют стандартные методы идентификации бактерий, которые существуют с 60-х годов прошлого века и не претерпели особых изменений. Диско-диффузный метод очень гибкий, его легко приспособить к новым методам бактерий, однако его главный минус – время ожидания результата. Также в данном методе необходим четкий контроль оборудования, так как от качеств используемых материалов зависит результат исследования. Метод серийных разведений требует совершенствования тест систем, в России используются импортные системы.

Наиболее перспективным методом идентификации бактерий на сегодняшний день является MALDI-TOF MS, которая занимает малое количество времени и не требует больших затрат.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Antibiotic and antibiotic resistance. Laboratory control of antibiotic therapy: built-in remedy / E. V. Naumkina, E. V. Matushhenko, N. A. Rogatyh; Omsk Generally Accepted Medical University, 2020. (Антибиотики и антибиотикорезистентность. Лабораторный контроль антибиотикотерапии: учебное пособие / E. V. Наумкина, E. V. Матущенко, Н. А. Рогатых; Омский государственный медицинский университет, 2020.)
2. Approbation of the domestic kit "MPK-MICRO", designed to determine the antibiotic sensitivity of microorganisms by the method of serial micro-dilutions Samoylova A.A., Kraeva L.A., Likhachev I.V., Rogacheva E.V., Verbov V.N., Mikhailov N.V., Zueva E.V. FBUN "Research

Institute of Epidemiology and Microbiology named after Pasteur" Rospotrebnadzor, St. Petersburg, Russia. (Апробация отечественного набора «МПК-МИКРО», предназначенного для определения антибиотикочувствительности микроорганизмов методом серийных микроразведений. Самойлова А.А., Краева Л.А., Лихачев И.В., Рогачева Е.В., Вербов В.Н., Михайлов Н.В., Зуева Е.В. ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, Россия.)

3. Determination of antibiotic sensitivity of Streptococcus equi strains / M. K. Sarmykova, N. N. Zinina, B. A. Espembetov [et al.] // Eurasian Scientific Association. – 2021. – № 10-2(80). – Pp. 154-159. – EDN САНХВА. (Определение

антибиотикочувствительности штаммов *Streptococcus equi* / М. К. Сармыкова, Н. Н. Зинина, Б. А. Еспембетов [и др.] // Евразийское Научное Объединение. – 2021. – № 10-2(80). – С. 154-159. – EDN САНХВА.)

4. Kibirev, Ya.A. Modern molecular genetic methods of identification of pathogens of infectious diseases of bacterial nature / Ya. A. Kibirev, S. G. Isupov, D. A. Chukhlantsev // *Military Medical Journal*. - 2014. - Vol. 335. - No. 10. - pp. 50-54. – EDN SXETWX. (Кибирев, Я. А. Современные молекулярно-генетические методы идентификации возбудителей инфекционных заболеваний бактериальной природы / Я. А. Кибирев, С. Г. Исупов, Д. А. Чухланцев // *Военно-медицинский журнал*. – 2014. – Т. 335. – № 10. – С. 50-54. – EDN SXETWX.)

5. Kozlov, R. S. To stop the growth rate of antibiotic resistance of microorganisms today - to give a chance for the survival of mankind tomorrow / R. S. Kozlov, A.V. Golub // *Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy*. – 2019. – Vol. 21. – No. 4. – pp. 310-3. – DOI 10.36488/cmac.2019.4.310-315. – EDN SBVGEW. (Козлов, Р. С. Остановить темпы роста антибиотикорезистентности микроорганизмов сегодня - дать шанс на выживание человечества завтра / Р. С. Козлов, А. В. Голуб // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2019. – Т. 21. – № 4. – С. 310-3. – DOI 10.36488/cmac.2019.4.310-315. – EDN SBVGEW.)

6. Molecular and cellular mechanisms of bacterial antibiotic resistance and ways to overcome it (literature review) / S.V. Skal'skij, A.I. Pilipenko, I.S. Jurgel' et al. // *Actual problems of biochemistry of pathological processes: Dedicated. To the 80th anniversary of prof. K. N. Gruzdevoj*. - Omsk, 2002. - pp. 162-166. - (Adj. to the journal. "Omsk Scientific Bulletin"; Issue 21, Dec.). - Bibliogr.: p. 166. (Молекулярные и клеточные механизмы бактериальной антибиотикорезистентности и пути ее преодоления (обзор литературы) / С.В. Скальский, А.И. Пилипенко, И.С. Юргель и др // *Актуальные проблемы биохимии патологических процессов: Посвящ. 80-летию проф. К.Н. Груздевой*. - Омск, 2002. - С. 162-166. - (Прил. к журн. "Омский научный вестник" ; Вып. 21, дек. ). - Библиогр.: с. 166 (7 назв.).)

7. Patent No. 2087537 C1 Russian Federation, IPC C12Q 1/04. Method of identification of bacteria : No. 94017331/13 : application No. 10.05.1994 : publ. 20.08.1997 / S. D. Kolpakova, A. I. Kolpakov. – EDN LALVFR. (Патент № 2087537 C1 Российская Федерация, МПК C12Q 1/04. Способ идентификации бактерий : № 94017331/13 : заявл. 10.05.1994 : опубл. 20.08.1997 / С. Д. Колпакова, А. И. Колпаков. – EDN LALVFR.)

8. Shepelin, A. P. Modern requirements for the determination of antibiotic sensitivity of microorganisms by the disco-diffusion method / A. P. Shepelin, L. V. Domotenko // *Handbook of the head of the CDL*. – 2019. – No. 9. – pp. 20-32. – EDN КХАННҚ. (Шепелин, А. П. Современные

требования к определению антибиотикочувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом / А. П. Шепелин, Л. В. Домотенко // *Справочник заведующего КДЛ*. – 2019. – № 9. – С. 20-32. – EDN КХАННҚ.)

9. Terleckij, V. P Molecular genetic methods of identification and certification of antagonist bacteria / Terleckij, V. P // *Protection and quarantine of plants*. – 2019. – No. 1. – pp. 10-11. – EDN YUBLKH. (Терлецкий, В. П. Молекулярно-генетические методы идентификации и паспортизации бактерий-антагонистов / В. П. Терлецкий // *Защита и карантин растений*. – 2019. – № 1. – С. 10-11. – EDN YUBLKH.)

10. Zemko, V. Ju. Monitoring of antibiotic resistance of microorganisms in the intensive care unit of a multidisciplinary hospital /V. Ju. Zemko, V. K. Okulich, A. M. Dzjadz'ko// *Transplantology*. – 2018. – Vol. 10. – No. 4. – pp. 284-297. – DOI 10.23873/2074-0506-2018-10-4-284-297. – EDN YQPAZF. (Земко, В. Ю. Мониторинг антибиотикорезистентности микроорганизмов в отделении реанимации и интенсивной терапии многопрофильного стационара / В. Ю. Земко, В. К. Окулич, А. М. Дзядзько // *Трансплантология*. – 2018. – Т. 10. – № 4. – С. 284-297. – DOI 10.23873/2074-0506-2018-10-4-284-297. – EDN YQPAZF.)

11. Åkerlund, Anna et al. "EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) in blood cultures: validation in 55 European laboratories." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* vol. 75,11 (2020): 3230-3238. doi:10.1093/jac/dkaa333

12. Alvarez, Laura et al. "Analysis of Gram-negative Bacteria Peptidoglycan by Ultra-performance Liquid Chromatography." *Bio-protocol* vol. 10,19 e3780. 5 Oct. 2020, doi:10.21769/BioProtoc.3780

13. Bizzini, A et al. "Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains." *Journal of clinical microbiology* vol. 49,2 (2011): 693-6. doi:10.1128/JCM.01463-10

14. Buszewski, Bogusław et al. "Identification of Microorganisms by Modern Analytical Techniques." *Journal of AOAC International* vol. 100,6 (2017): 1607-1623. doi:10.5740/jaoacint.17-0207

15. Church, Deirdre L et al. "Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory." *Clinical microbiology reviews* vol. 33,4 e00053-19. 9 Sep. 2020, doi:10.1128/CMR.00053-19

16. Davies, Julian, and Dorothy Davies. "Origins and evolution of antibiotic resistance." *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* vol. 74,3 (2010): 417-33. doi:10.1128/MMBR.00016-10

17. Furutani, Shunsuke et al. "Rapid DNA Sequencing Technology Based on the Sanger Method

- for Bacterial Identification.” *Sensors* (Basel, Switzerland) vol. 22,6 2130. 9 Mar. 2022, doi:10.3390/s22062130)
18. Gautier-Bouchardon, Anne V. “Antimicrobial Resistance in *Mycoplasma* spp.” *Microbiology spectrum* vol. 6,4 (2018): 10.1128/microbiolspec.ARBA-0030-2018. doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0030-2018
19. Gukovsky, Joshua K. and Lily He. “Development of a portable CERS method for testing the sensitivity of foodborne bacteria to antibiotics.” *Journal of Microbiological Methods* volume 198 (2022):106496. doi: 10.1016/j.mimet.2022.106496
20. Huemer, Markus et al. “Antibiotic resistance and persistence-Implications for human health and treatment perspectives.” *EMBO reports* vol. 21,12 (2020): e51034. doi:10.15252/embr.202051034
21. Jang, Kyoung-Soon, and Young Hwan Kim. “Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications.” *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* vol. 56,4 (2018): 209-216. doi:10.1007/s12275-018-7457-0
22. Johnson, Emma, et al. “EUCAST disk rapid diffusion method for antimicrobial sensitivity testing directly from vials with positive blood culture.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 75.4 (2020):968-978. doi: 10.1093 / jac / dkz548
23. Liu, Haibing et al. “Application of mNGS in the Etiological Analysis of Lower Respiratory Tract Infections and the Prediction of Drug Resistance.” *Microbiology spectrum* vol. 10,1 (2022): e0250221. doi:10.1128/spectrum.02502-21
24. Olesen, Scott W. et al. “The role of 'secondary spread' in antibiotic resistance.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, volume 117.46 (2020):29063-29068. doi: 10.1073/pnas.2013694117
25. Özenci, Volkan et al. “Demise of Polymerase Chain Reaction/Electrospray Ionization-Mass Spectrometry as an Infectious Diseases Diagnostic Tool.” *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* vol. 66,3 (2018): 452-455. doi:10.1093/cid/cix743
26. Smith, Kenneth P, and James E Kirby. “Rapid Susceptibility Testing Methods.” *Clinics in laboratory medicine* vol. 39,3 (2019): 333-344. doi:10.1016/j.cll.2019.04.001
27. Toka Özer, Türkan et al. “Determination of antibiotic resistance and high-performance liquid chromatography profiles for *Mycobacterium* species.” *Journal of clinical laboratory analysis* vol. 32,7 (2018): e22459. doi:10.1002/jcla.22459
28. Wang, Chih-Hung et al. “Defeating Antibiotic-Resistant Bacteria: Exploring Alternative Therapies for a Post-Antibiotic Era.” *International journal of molecular sciences* vol. 21,3 1061. 5 Feb. 2020, doi:10.3390/ijms21031061
29. Watts, J.S. et al. “16S rRNA gene sequencing on a desktop sequencer: precision for identification of clinically important bacteria”. *Journal of Applied Microbiology* volume 123,6 (2017):1584-1596. doi: 10.1111 / jam.13590
30. Yusuf, Erlangga, and Franz Allerberger. “Infectious disease serology in 2021.” *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* vol. 27,9 (2021): 1204-1206. doi:10.1016/j.cmi.2021.06.020