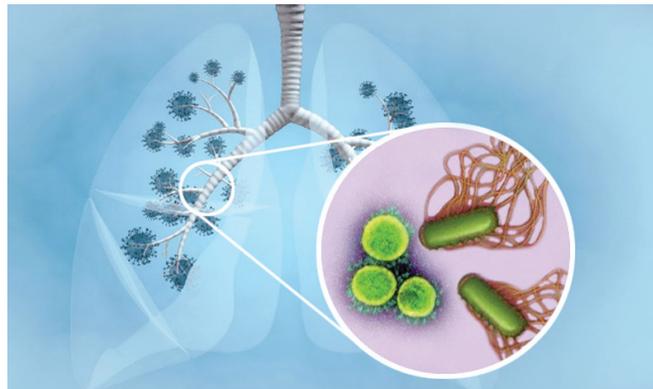


К вопросу о применении экспресс-методов выявления антибиотикорезистентности в условиях эпидемии коронавирусной инфекции

Широкое распространение устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам приобрело угрожающие размеры еще в доковидный период. С развитием эпидемии COVID-19 во всех странах мира значение резистентности существенно возросло в связи с двумя проблемами – присоединением бактериальной инфекции при поражении вирусом легочной ткани, особенно в условиях применения искусственной вентиляции легких, и появлением новых вариантов патогенов с широким спектром устойчивости при массовом применении различных антибиотиков для купирования осложнений у больных коронавирусной инфекцией. Кроме того, пока не ясны последствия перенесенной коронавирусной инфекции для пациентов, относительно их устойчивости к заражению бактериальными агентами через бронхолегочную систему.



Все эти новые проблемы требуют разработки и внедрения ускоренных методов выявления патогенов и спектра их устойчивости к антимикробным препаратам, прежде всего к антибиотикам, от чего зависит оперативность принятия решения о тактике лечения. Для определения резистентности в клиниках широко используются фенотипические методы определения чувствительности: диск-диффузионный метод, метод микроразведений в бульоне, эллипсометрический метод, а также применяются автоматические бактериологические анализаторы для определения антибиотикочувствительности: Phoenix (Becton Dickinson), VITEK 2 (bioMérieux), WalkAway (Beckman Coulter), Sensititre (Thermo Scientific) и др.

Вышеописанные методы позволяют выявить широкий спектр чувствительности возбудителя к антимикробным препаратам, являются относительно недорогими и стандартизованными. Однако в условиях необходимости применения в экстренных случаях они мало пригодны из-за длительности постановки реакций.

Недостатком фенотипического определения чувствительности является необходимость выделения чистой культуры возбудителя, на что уходит от одних до трех суток, и только после этого идет постановка теста на чувствительность. Автоматические бактериологические анализаторы в некоторых случаях способны выдать результат спустя 8 ч. Таким образом, оперативное назначение адекватной этиотропной антибиотикотерапии является невозможным. Кроме того, оборудование, реактивы и расходные материалы для данных целей в основном зарубежного производства, имеют высокую стоимость и закупаются по длительным конкурсным процедурам.

Альтернативой фенотипическому определению чувствительности бактерий является применение молекулярно-генетических методов исследований, основанных на детекции генов, ответственных за формирование устойчивости возбудителя. Основным преимуществом применения таких методов является быстрое получение результата – до 3 ч от момента постановки теста. Такие тесты могут быть поставлены и без выделения чистой культуры, что позволяет выявить весь комплекс известных генов резистентности. Однако следует иметь в виду, что наличие генов устойчивости еще не гарантирует их экспрессию (фенотипическое проявление), а присутствие в пробе сапрофитов, которые часто несут гены резистентности, делает информацию об устойчивости избыточной и не полностью достоверной.

Некоторые российские компании для определения генов резистентности предлагают ряд тест-систем в формате ПЦР-РВ, применение которых возможно на амплификаторах как зарубежного, так и отечественного производства. Однако, как правило, такие системы определяют один ген устойчивости и не имеют мультиплексного формата. При таком подходе целевые гены должны быть сгруппированы по типам, например по различным видам наиболее распространенных бета-лактамаз. Но и в этом случае широкий скрининг генов резистентности в нативном материале невозможен.

В развитии этого генодиагностического метода наиболее перспективным является создание ДНК и белковых биологических чипов с большим количеством точек считывания для эффективного скрининга. Такие работы ведутся, но нет сведений о выходе их на рынок в ближайшее время. Чипы, но с малым количеством точек, разработаны и выпускаются в нашей стране только для возбудителя туберкулеза.

Генодиагностическое направление в выявлении устойчивости получило развитие при использовании технологии мономолекулярного нанопорового секвенирования, которая позволяет приступить к анализу полученных данных в течение 10 мин после начала секвенирования. Общее время, затраченное на выполнение исследований и получение первичного результата, может составлять 4 ч. В данном случае достаточно быстро может быть проанализирован весь спектр генов устойчивости в пробе, хотя проблема экспрессии и генов сапрофитов, о которой говорилось выше, остается. Преодолеть эту проблему при данном подходе можно, если биоинформатический анализ проводить не только по генам устойчивости, но и по специфическим генам, по которым идентифицируется возбудитель с использованием соответствующей базы данных. Эту технологию можно считать наиболее перспективной для оперативного принятия решения о тактике антибиотикотерапии. Недостатки метода – отсутствие отечественных приборов для нанопорового секвенирования и трудности их получения в настоящий период от производителей, необходимость в квалифицированном персонале, высокая стоимость реагентов. Однако бурное развитие метагеномного анализа, высокая производительность миниатюрных приборов и их постоянное совершенствование, повышение эффективности биоинформатики позволяют считать, что такой подход будет иметь явное превосходство над другими в будущем.

Следует упомянуть еще один из перспективных методов, связанных с использованием масс-спектрометрии для детекции продуктов генов антибиотикорезистентности. Он уже используется при определении продуктов различных карбапенемаз и бета-лактамаз в чистой бульонной культуре с чувствительностью и специфичностью более 95%. Однако пробоподготовка к данному исследованию является достаточно трудоемкой, отсутствуют базы данных спектров для идентификации продуктов генов резистентности, стоимость приборов высока, они малодоступны для клинических лабораторий. Привлекает в этом методе то, что в пробе выявляется конкретный продукт, обеспечивающий устойчивость бактерий к определенному классу антибиотиков, что существенно облегчает выбор тактики терапии. Появление новых высокоэффективных масс-спектрометров, их миниатюризация позволяют надеяться на то, что этот метод будет доведен до практического использования.

Какие же методы, не требующие больших затрат и дополнительного дорогостоящего оборудования, могут быть использованы в настоящее время для решения проблемы ускоренного определения резистентности бактерий в пробах биологического материала?

Прежде всего это планшеты для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) антимикробных препаратов. Необходимо создание производства 96-луночных планшетов, в которых находятся антимикробные препараты в стандартных двойных разведениях для определения МПК. Эти планшеты могут быть использованы в лабораториях без автоматов, в ручном режиме: в них добавляют суспензию микроорганизма и после инкубации в течение ночи визуально проводят учет результатов. При этом в одном планшете можно разместить до 20 антимикробных препаратов. Кроме того, необходимо запланировать создание достаточно простого отечественного анализатора, позволяющего работать с планшетами в автоматическом режиме.

Еще одной реальной возможностью для решения данного вопроса является создание и организация производства ПЦР-РВ-тест-систем для детекции генов антибиотикорезистентности. Такая система позволит за одну постановку теста в стрипе (8 лунок) детектировать от 24 до 32 маркеров устойчивости к антимикробным препаратам, что, в свою очередь, даст возможность получить достаточно полную картину спектра устойчивости возбудителя и позволит клиницисту в короткие сроки назначить адекватную антибиотикотерапию или скорректировать уже назначенную. Необходимо разработать такие тест-системы отдельно для Gr- и Gr+ микроорганизмов, так как они различаются механизмами формирования резистентности. Это возможно в формате 96-луночного планшета с лиофилизированной готовой реакционной смесью, содержащей все необходимые компоненты для проведения реакции. Также необходима разработка системы выделения нуклеиновых кислот из клинического материала или выделенных культур штаммов бактерий.

Таким образом, в настоящее время существует не так много возможностей использования экспресс-тестов для выявления антимикробной резистентности. Настоятельно необходимы научные разработки в данной области, которые позволят создать линейку отечественных препаратов и приборов для решения данного вопроса, который особенно остро стоит сейчас, во время развития эпидемии нового коронавируса.

*Директор ФБУН «Государственный научный центр
прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,
академик РАН И.А.Дятлов*