

Тема: Молекулярно-генетические методы детекции антибиотической устойчивости.

Хрипко Юрий Иванович

генеральный директор и основатель ООО "АЛСИГЕМ",
г. Новосибирск. Инженер-биотехнолог.



Устойчивость к антибиотикам. Актуальность



Всемирная
организация
здравоохранения



NATFORLAB
2026



По данным Всемирной организации здравоохранения, устойчивость к противомикробным препаратам остается одной из наиболее серьезных **глобальных угроз общественному здоровью.**



1 из 6

В 2023 году каждый шестой лабораторно подтвержденный случай распространенных бактериальных инфекций в мире характеризовался **устойчивостью к антибиотикам.**



> 40%

В период с 2018 по 2023 год рост устойчивости продемонстрировали более 40% отслеживаемых комбинаций «патоген-антибиотик», при ежегодном увеличении их доли в среднем на **5–15%.**



7,7 млн

смертей в 2021 году

4,7 млн — ассоциированы с лекарственной устойчивостью.

> 1,1 млн — непосредственно обусловлены ею.



Антибиотикорезистентность — не только клиническая, но и важнейшая лабораторно-диагностическая задача.



Устойчивость к антибиотикам.

Способы противодействия



NATFORLAB
2026



1

Оптимизация дозирования антибактериальных препаратов



- Правильный выбор дозы, режима и длительности лечения.
- Соблюдение клинических рекомендаций.

2

Разработка новых препаратов



- Поиск новых классов антибиотиков.
- Разработка препаратов с новыми механизмами действия.
- Исследование альтернативных подходов (например, бактериофаги, антимикробные пептиды).

3

Комбинирование антибактериальных препаратов



- Применение комбинаций синергичных препаратов.
- Снижение риска развития резистентности.
- Расширение спектра антибактериального действия.

4

Контроль распространения и применения препаратов



- Рациональное и ответственное применение антибиотиков.
- Профилактика внутрибольничных инфекций.
- Использование препаратов резерва только по строгим показаниям.

5

Эпидемиологический контроль устойчивости и персонализация терапии



- Мониторинг распространения резистентных штаммов.
- Анализ локальных данных по чувствительности.
- Индивидуальный подход к терапии с учетом данных диагностики.



**Ключевое условие рациональной терапии —
своевременное выявление возбудителя
и механизмов его антибиотикорезистентности.**

Механизмы устойчивости к антибиотическим препаратам

1

Разрушение или инаktivация антибиотика

Например, β -лактамазы антибиотиков могут разрушаться бактериальными β -лактамазами.



2

Модификация молекулы антибиотика

Ферментативное изменение структуры препарата приводит к снижению или утрате его биологической активности.



3

Изменение мишени действия антибиотика

Изменения рибосомальных белков, РНК-полимеразы, пенициллин-связывающих белков и других структур могут снижать чувствительность бактерий к препарату.



Бактериальная устойчивость — результат различных механизмов, которые могут сочетаться у одного микроорганизма.

4

Формирование альтернативных путей («обходных») метаболических путей

Бактерии могут использовать альтернативные пути метаболизма, что позволяет им обходить блокирующее действие антибиотика.



5

Активное выведение антибиотика из бактериальной клетки — эффлюкс

Специальные транспортные белки (эффлюксные насосы) активно выводят антибиотик из клетки, снижая его внутриклеточную концентрацию.



6

Снижение проницаемости клеточной мембраны для антибиотика

Изменение структуры и состава клеточной стенки и мембраны приводит к уменьшению поступления антибиотика внутрь бактериальной клетки.



Многие механизмы устойчивости имеют генетическую основу — приобретенные гены резистентности или мутации, которые могут быть выявлены молекулярно-генетическими методами.

Лабораторные методы диагностики антибиотикорезистентности



Бактериологические

Определение фенотипической чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

- Диско-диффузионный метод
- Определение МПК
- Градиентная диффузия (E-test)
- Автоматизированные системы



Биохимические

Выявление ферментов и других продуктов, связанных с механизмами резистентности.

- Хромогенные и ферментативные тесты
- Тесты на β -лактамазы
- Иммуоферментные и иммунохроматографические методы



Молекулярно-генетические

Выявление генов и мутаций, ассоциированных с антибиотикорезистентностью.

- ПЦР / ПЦР в реальном времени
- Мультиплексная ПЦР
- Секвенирование
- ДНК-гибридизация / микрочипы
- Полногеномное секвенирование (WGS)



Микроскопические

Оценка морфологических и функциональных изменений микроорганизмов под воздействием препаратов.

- Световая и флуоресцентная микроскопия
- Микрофлюидная покадровая микроскопия
- Цитоморфологический анализ
- Оптическая наномеханическая микроскопия



Другие современные методы

Новые технологии расширяют возможности выявления и мониторинга антибиотикорезистентности.

- MALDI-TOF MS
- NGS
- Микрочипы
- Биосенсоры
- Искусственный интеллект



Различные методы дают разную информацию
и **могут дополнять друг друга.**

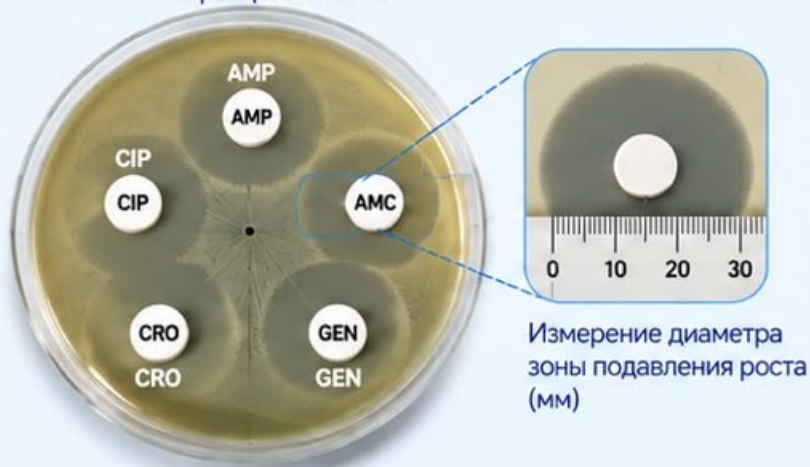
Бактериологические методы

Классические методы определения чувствительности к антибактериальным препаратам

1

Диско-диффузионный метод

Бумажные диски с антибиотиками помещают на агар с исследуемой культурой. По диаметру зоны подавления роста оценивают чувствительность микроорганизма.



2

Метод серийных разведений в агаре или бульоне

Позволяет определить минимальную подавляющую концентрацию антибиотика — МПК.



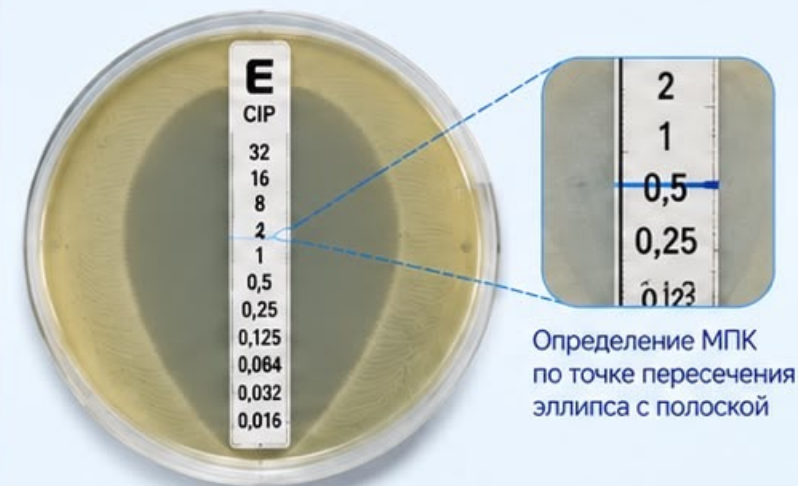
МПК

Минимальная концентрация, подавляющая видимый рост

3

Градиентная диффузия (E-test)

Полоска с градиентом концентрации антибиотика позволяет определить значение МПК.



Преимущество:

определение фенотипической чувствительности.



Ограничение:

необходимость культивирования микроорганизма и дополнительное время до получения результата.



Биохимические методы диагностики антибиотикорезистентности

1 Окрашивание и хромогенные тесты

Используют специальные цветные субстраты. Если бактерия вырабатывает фермент (например, бета-лактамазу), цвет раствора или среды меняется за несколько минут или часов.



Изменение цвета среды — признак ферментативной активности

2 Тест на бета-лактамазы

Метод выявляет ферменты, которые расщепляют пенициллины и цефалоспорины. Пример — масс-спектрометрия (MALDI-TOF) или кислотопродуцирующие тесты, фиксирующие изменение pH при гидролизе антибиотика.

Отрицательный Положительный



Кислотопродуцирующий тест (изменение pH)



MALDI-TOF MS

3 Иммуноферментный анализ (ИФА)

Обнаружение специфических белков резистентности (например, пенициллин-связывающего белка PBP2a у метициллин-резистентного золотистого стафилококка — MRSA) с помощью моноклональных антител.



ИФА для выявления белков резистентности (например, PBP2a)

4 Ферментативные экспресс-тесты (Carba NP)

Определяют карбапенемазы — ферменты, разрушающие сильнейшие антибиотики-карбапенемы. Изменение цвета индикатора указывает на кислоту, образующуюся при расщеплении антибиотика.

Отрицательный Положительный



Тест Carba NP (изменение цвета индикатора)



Биохимические методы выявляют проявление отдельных механизмов резистентности, тогда как молекулярные методы позволяют исследовать их генетическую основу.

Микроскопические методы

диагностики антибиотикорезистентности

1

Микрофлюидная покадровая микроскопия

Позволяет наблюдать рост, деление и гибель отдельных микробных клеток в микроканалах при воздействии антибиотика.



Динамическое наблюдение за жизненным циклом бактерий в реальном времени

2

Цитоморфологический анализ

Регистрирует изменения формы, размера и целостности оболочки бактерий под воздействием антибактериального препарата.



Оценка морфологических изменений бактерий под действием антибиотика (электронная микроскопия)

3

Оптическая наномеханическая микроскопия

Позволяет регистрировать изменения механической активности бактериальных клеток на наноуровне.



Измерение механических свойств бактериальных клеток методом атомно-силовой микроскопии

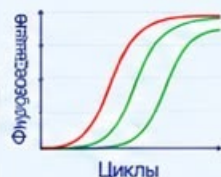


Перспективное направление — быстрое фенотипическое определение ответа микроорганизма на антибиотик без длительного ожидания видимого роста культуры.

Молекулярно-генетические методы диагностики антибиотикорезистентности

1 ПЦР / ПЦР в реальном времени

Быстрое выявление известных генов или мутаций, ассоциированных с антибиотикорезистентностью.



Примеры мишеней:

- *mecA* (MRSA)
- *blaKPC*, *blaNDM* (карбапенемазы)
- *vanA/vanB* (VRE)
- и др.

2 Мультиплексная ПЦР

Одновременное определение нескольких генетических мишеней в одной постановке.

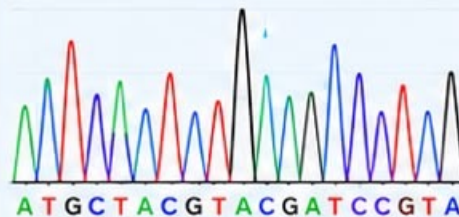


Преимущества:

- одновременная детекция нескольких генов/мутаций
- экономия времени и материала
- широкий спектр возбудителей и маркеров резистентности

3 Секвенирование

Определение последовательности ДНК и выявление мутаций, связанных с устойчивостью.

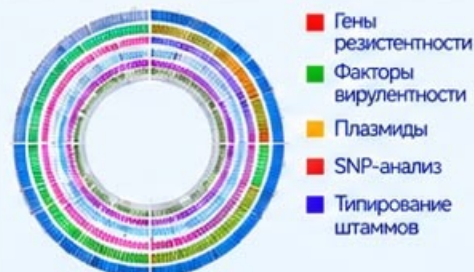


Позволяет:

- выявлять известные и новые мутации
- анализировать гены-мишени (например, *gyrA*, *groB* и др.)
- уточнять механизмы резистентности

4 Полногеномное секвенирование (WGS)

Комплексный анализ генома микроорганизма, включая потенциальные детерминанты резистентности и эпидемиологические маркеры.



Возможности:

- полная характеристика генома
- выявление известных и новых генов резистентности
- эпидемиологический анализ и отслеживание распространения штаммов

5 ДНК-чипы и микрочипы

Одновременный поиск множества известных генетических последовательностей.



Преимущества:

- одновременный анализ большого числа мишеней
- высокая пропускная способность
- применение в эпидемиологических исследованиях



Молекулярные методы выявляют генетические детерминанты резистентности еще до получения полного фенотипического результата.

Генетические маркеры антибиотикорезистентности

Молекулярные методы позволяют выявлять гены резистентности и определенные мутации, связанные с устойчивостью к антибактериальным препаратам.

Примеры:

mecA / mecC

Метициллинорезистентность стафилококков



- Staphylococcus aureus (MRSA)
- Коагулазонегативные стафилококки (MRCoNS)

Изменение пенициллин-связывающих белков (PBP2a), снижение чувствительности к β -лактамам

vanA / vanB

Приобретенная устойчивость энтерококков к гликопептидам



- Enterococcus faecium
- Enterococcus faecalis

Изменение мишени действия антибиотика (модификация конечного D-Ala-D-Ala на D-Ala-D-Lac или D-Ala-D-Ser)

blaKPC, blaNDM, blaVIM, blaIMP, blaOXA-48-like

Различные типы карбапенемаз



- Enterobacterales (Klebsiella pneumoniae, E. coli и др.)
- Pseudomonas aeruginosa
- Acinetobacter baumannii

Продукция карбапенемаз — гидролиз карбапенемов и других β -лактамов

gyrA / parC

Определенные мутации, ассоциированные с устойчивостью к фторхинолонам



- Escherichia coli
- Klebsiella pneumoniae
- Pseudomonas aeruginosa
- и другие грамотрицательные бактерии

Мутации в генах ДНК-гиразы (gyrA) и топоизомеразы IV (parC) — снижение чувствительности к фторхинолонам



Возбудитель
(вид/штамм)



Ген / мутация
(например, mecA, vanA, blaKPC, gyrA и др.)



Механизм резистентности
(инактивация, изменение мишени, эффлюкс и др.)



Информация для интерпретации антибиотикочувствительности
(выбор терапии, эпидемиологический контроль)

ПЦР: от клинического материала до результата

Современный подход к быстрой и точной диагностике антибиотикорезистентности



Преимущества ПЦР:



Высокая специфичность при корректно выбранной мишени



Быстрое получение результата



Возможность выявления нескольких мишеней в формате multiplex



Возможность одновременной идентификации возбудителя и отдельных маркеров резистентности в некоторых диагностических системах



Главное преимущество — **скорость получения информации** о наличии известных генетических механизмов резистентности.

Генотипическая ≠ фенотипическая резистентность

Разные методы — разная информация — более точные клинические решения



Молекулярные методы (генотипическая резистентность)

Выявляют ген или мутацию, ассоциированные с определенным механизмом резистентности.

Примеры:

- ПЦР / ПЦР в реальном времени
- Мультиплексная ПЦР
- Секвенирование
- Полногеномное секвенирование (WGS)
- ДНК-гибридизация и микрочипы



Фенотипические методы (фенотипическая резистентность)

Показывают фактическую способность микроорганизма расти при воздействии конкретного антибиотика и позволяют определить чувствительность / МПК.

Примеры:

- Диско-диффузионный метод
- Метод серийных разведений в агаре или бульоне
- Градиентная диффузия (E-test)



Важно:

- **Наличие гена** не во всех ситуациях полностью определяет фенотип.
- **Отсутствие** исследуемого гена не исключает другие механизмы устойчивости.
- **ПЦР** выявляет только те генетические мишени, которые включены в конкретную тест-систему.



Молекулярная диагностика **не отменяет культуральные методы** — эти технологии **дополняют друг друга**.

Какой метод выбрать?

Выбор зависит от диагностической задачи.



Скорость

Насколько быстро
необходим
результат?



Информативность

Необходимо
определить фенотип
чувствительности
или конкретный
генетический
механизм?



Спектр исследования

Один маркер,
панель маркеров
или расширенный
анализ?



Стоимость

Соответствует ли
объем получаемой
информации
затратам?



Целесообразность

Повлияет ли результат
исследования
на клиническое
или эпидемиологическое
решение?



Оптимальный подход определяется не технологией
как таковой, а **клинической и лабораторной задачей.**

Как правильно выполнять исследования?

Качество на каждом этапе — основа достоверного результата

1

Лабораторный менеджмент качества



Комплекс организационных мероприятий, обеспечивающих качество исследования на всех этапах.

2

Внутренний и внешний лабораторный контроль качества



Использование стандартных панелей и контрольных образцов.

3

Стандартизация и валидация оборудования и диагностических тест-систем



Обеспечение соответствия оборудования и тест-систем установленным требованиям, проведение валидации методик.

4

Использование реагентов от проверенных производителей



Применение качественных реагентов, сертифицированных и зарекомендовавших себя в клинической практике.

5

Для молекулярных исследований дополнительно:



Контроль качества выделения нуклеиновых кислот.



Положительный и отрицательный контроль.



Контроль контаминации.



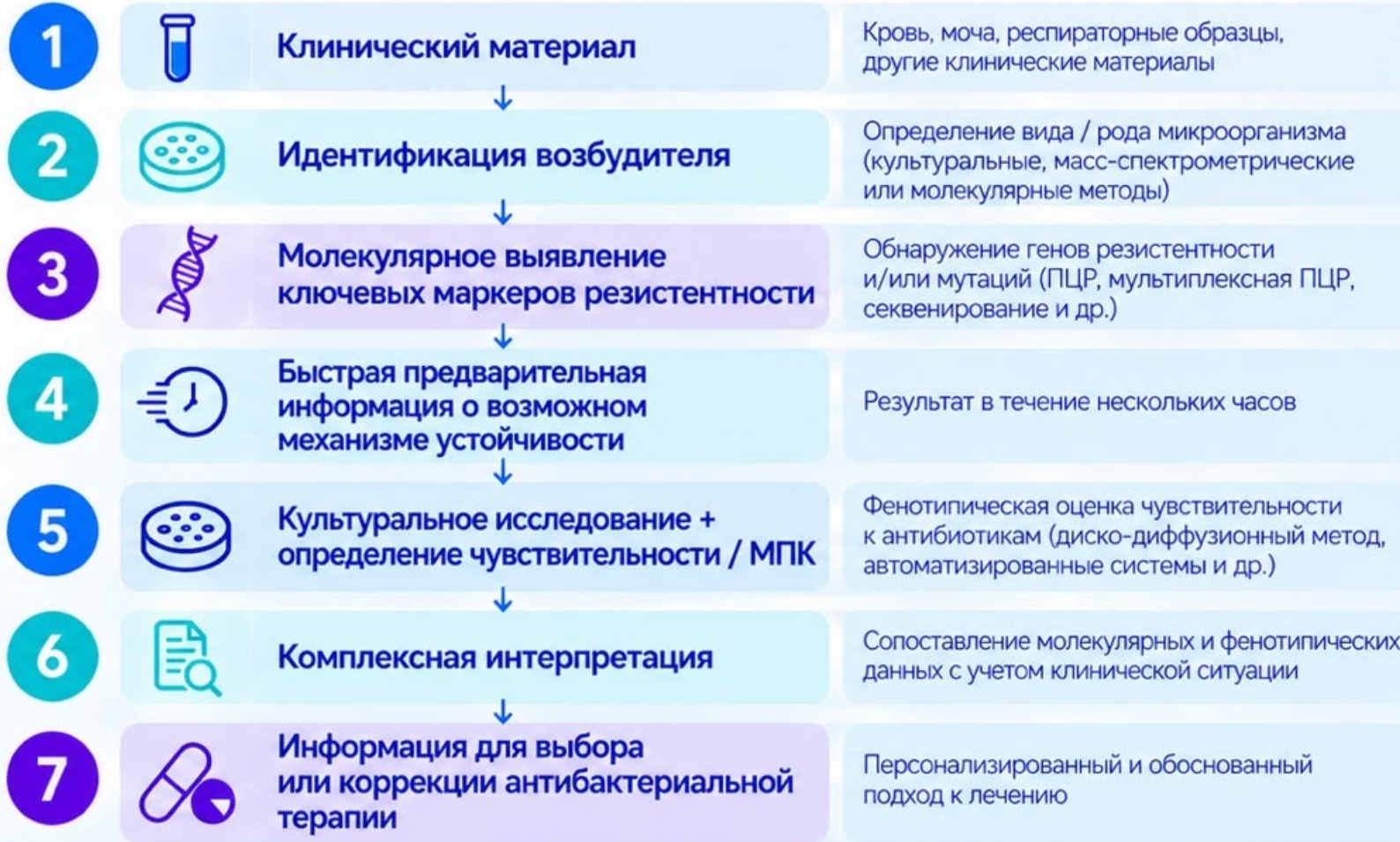
Соблюдение требований к организации ПЦР-лаборатории.



Достоверность молекулярного результата **определяется** не только тест-системой, но и **качеством всего лабораторного процесса.**

Место молекулярных методов в лабораторном алгоритме

Современный подход к диагностике антибиотикорезистентности



Молекулярные методы

- ✓ быстрый результат
- ✓ выявление генетических механизмов резистентности
- ✓ дополняют фенотипические методы



Фенотипические методы

- ✓ определяют реальную чувствительность / МПК
- ✓ выявляют дополнительные механизмы устойчивости
- ✓ остаются «золотым стандартом» для выбора терапии



Комплексный подход

- ✓ более полная характеристика антибиотикорезистентности
- ✓ повышение точности диагностики
- ✓ оптимизация выбора терапии



Скорость молекулярной диагностики + фенотипическая оценка чувствительности = **более полная характеристика антибиотикорезистентности.**

Перспективы развития молекулярной диагностики антибиотикорезистентности



NATFORLAB
2026

От отдельных генов — к комплексной характеристике резистентности

1



Расширение мультиплексных панелей

Одновременное выявление возбудителей и нескольких ключевых генетических маркеров резистентности в одном исследовании.

2



Секвенирование и WGS

Расширенная характеристика генетических детерминант резистентности, выявление мутаций и эпидемиологическое типирование микроорганизмов.

3



Метагеномные технологии

Исследование генетического материала непосредственно в клиническом образце с потенциальной возможностью выявления широкого спектра возбудителей и генов резистентности.

4



Автоматизация и сокращение времени анализа

Интеграция этапов пробоподготовки, амплификации, детекции и интерпретации результатов.

5



Интеграция молекулярных и фенотипических данных

Комплексная оценка генотипа и фактической чувствительности микроорганизма для более точной интерпретации антибиотикорезистентности.



Будущее — переход от поиска отдельных маркеров к комплексной и быстрой характеристике антибиотикорезистентности.

От базовых лабораторных технологий — к развитию молекулярной диагностики

Каз-Диа-Тест

Алматы

В Казахстане
развивается
локальное
производство
диагностических
решений,
охватывающих
разные этапы
микробиологического
исследования.



Каз-Диа-Тест развивает два взаимодополняющих направления:

Каз-Диа-Тест



КУЛЬТУРАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

Зарегистрированная линейка
готовых питательных сред
в чашках Петри

- ✓ Выделение и культивирование микроорганизмов
- ✓ Основа для дальнейшего фенотипического исследования



МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Начато локальное производство
ПЦР-наборов

- ✓ На сегодняшний день зарегистрирована линейка из **14 ПЦР-наборов**
- ✓ Формируется собственная технологическая платформа молекулярной диагностики

ДВЕ ТЕХНОЛОГИИ —
ЕДИНАЯ ЦЕЛЬ



Наличие культурального и молекулярного направлений создает основу для дальнейшего развития **комплексной диагностики инфекций и антибиотикорезистентности.**



Зарегистрированная линейка ПЦР

Наборы реагентов для выявления возбудителей инфекций методом ПЦР (in vitro), зарегистрированные в Республике Казахстан

Каз-Диа-Тест



№	Номер РУ	Торговое название
1	ПК МИ (in vitro)-ОН№031432	«ВПГ-1,2-КДТ-ПЦР»
2	ПК МИ (in vitro)-ОН№031384	«NEISSERIA GONORRHOEAE-КДТ-ПЦР»
3	ПК МИ (in vitro)-ОН№031383	«TRICHOMONAS VAGINALIS-КДТ-ПЦР»
4	ПК МИ (in vitro)-ОН№031382	«ЦМВ-КДТ-ПЦР»
5	ПК МИ (in vitro)-ОН№031381	«MYCOPLASMA GENITALIUM-КДТ-ПЦР»
6	ПК МИ (in vitro)-ОН№030877	«MYCOPLASMA HOMINIS-КДТ-ПЦР»
7	ПК МИ (in vitro)-ОН№031380	«CHLAMYDIA TRACHOMATIS-КДТ-ПЦР»
8	ПК МИ (in vitro)-ОН№030876	«CANDIDA ALBICANS-КДТ-ПЦР»
9	ПК МИ (in vitro)-ОН№030669	«UREAPLASMA UREALYTICUM-КДТ-ПЦР»
10	ПК МИ (in vitro)-ОН№030668	«UREAPLASMA PARVUM-КДТ-ПЦР»
11	ПК МИ (in vitro)-ОН№030667	«GARDNERELLA VAGINALIS-КДТ-ПЦР»
12	ПК МИ (in vitro)-ОН№031379	«КДТ-МАГ-ДНК» набор для выделения ДНК из биологического материала человека
13	ПК МИ (in vitro)-ОН№030824	«КДТ-РНК/ДНК» набор для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала человека

<https://www.ndda.kz/>



Зарегистрированные готовые питательные среды

Каз-Диа-Тест



№	Номер РУ	Торговое название
1	PK МИ (in vitro)-ON№029532	Стерильный одноразовый агар МакКонки с сорбитом готовый, в чашке Петри 90 мм
2	PK МИ (in vitro)-ON№029500	Стерильный одноразовый колумбийский агар с ДК, готовый, в чашке Петри 90 мм
3	PK МИ (in vitro)-ON№029499	Стерильный одноразовый агар Мюллера-Хинтона, готовый, в чашке Петри 90 мм
4	PK МИ (in vitro)-ON№029498	Стерильный одноразовый триптиказо-соевый агар с ДК, готовый, в чашке Петри 90 мм
5	PK МИ (in vitro)-ON№029479	Стерильный одноразовый агар МакКонки с лактозой, готовый, в чашке Петри 90 мм
6	PK МИ (in vitro)-ON№029472	Стерильный одноразовый триптиказо-соевый агар, готовый, в чашке Петри 90 мм
7	PK МИ (in vitro)-ON№029471	Стерильный одноразовый триптиказо-соевый агар с твином 80 и лецитином, готовый, в чашке Петри 90 мм
8	PK МИ (in vitro)-ON№029470	Стерильный одноразовый шоколадный агар с ростовыми добавками, готовый, в чашке Петри 90 мм
9	PK МИ (in vitro)-ON№029469	Стерильный одноразовый агар Сабуро с декстрозой, готовый, в чашке Петри 90 мм
10	PK МИ (in vitro)-ON№029467	Стерильный одноразовый SS-агар (сальмонеллезно- шигеллезный агар), готовый, в чашке Петри 90 мм
11	PK МИ (in vitro)-ON№029437	Стерильный одноразовый агар Сабуро с декстрозой, твином-80 и лецитином, готовый, в чашке Петри 90 мм
12	PK МИ (in vitro)-ON№029436	Стерильный одноразовый агар Байрда-Паркера, готовый, в чашке Петри 90 мм
13	PK МИ (in vitro)-ON№029435	Стерильный одноразовый агар Эндо, готовый, в чашке Петри 90 мм
14	PK МИ (in vitro)-ON№029434	Стерильный одноразовый агар Сабуро с декстрозой и хлорамфениколом, готовый, в чашке Петри 90 мм
15	PK МИ (in vitro)-ON№029433	Стерильный одноразовый колумбийский CNA агар с ДК, готовый, в чашке Петри 90 мм

<https://www.ndda.kz/>





Благодарю за внимание!

НОВОСИБИРСК

