

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Институт фундаментальной медицины и биологии

Кафедра генетики

Е. Ю. Трizza, Д.Р. Ярулина, А.Р. Каюмов

**ПРАКТИКУМ ПО ГЕНЕТИЧЕСКИМ ОСНОВАМ УСТОЙЧИВОСТИ
К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ**

Учебно-методическое пособие

Казань - 2020

УДК 577.21
ББК 28

Печатается по решению редакционно-издательского совета ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Учебно-методической комиссии Института фундаментальной медицины и биологии К(П)ФУ, протокол № 4 от 22 января 2020 заседания кафедры генетики Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, протокол № 5 от 21 января 2020,

Рецензенты:

Старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории
«Маркеры патогенеза»

В.В. Ульянова

Старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории
по разработке лекарственных средств НОЦ Фармацевтики КФУ

Е.В. Никитина

Тризна Е.Ю. Практикум по генетическим основам устойчивости к антибактериальным препаратам. Учебно-методическое пособие / Е.Ю. Тризна, Д.Р. Яруллина, А.Р. Каюмов – Казань: Казань, КФУ, 2020. -42 с.

В учебно-методическом пособии содержатся описания и протоколы стандартных методов исследования активности антимикробных препаратов, оценки жизнеспособности микроорганизмов. Приводятся наиболее распространенные и общепринятые методики, не требующие дорогостоящих или редких реактивов и материалов, либо коммерческих наборов реагентов. Каждый метод содержит теоретическое описание и краткую характеристику, назначение метода, наиболее важные аспекты его практического использования, целевое назначение необходимых реактивов и оборудования, подробное последовательное описание стадий лабораторных операций.

© Тризна Е.Ю., Яруллина Д.Р., Каюмов А.Р. 2020
© Казанский федеральный университет, 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИЗУЧЕНИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ	5
1.1 Определение минимальной подавляющей концентрации.....	7
1.2 Определение минимальной бактерицидной концентрации	8
1.3 Анализ кривой эрадикации от времени (Time-kill curve assay).....	9
1.4 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом	10
1.5 Анализ антимикробного эффекта при комбинированном применении антимикробных агентов (метод шахматной доски, den Hollander, 1998).....	14
1.6 Определение чувствительности к комбинациям антибиотиков модифицированным методом градиентной диффузии (кросс-тест).....	16
1.6.1. Определение индивидуальных минимальных подавляющих концентраций (МПК) антибиотиков.....	16
1.7 Оценка развития устойчивости к антимикробным препаратам	18
1.7.1 Получение устойчивых штаммов на чашках с градиентным агаром.....	18
1.7.2 Получение устойчивых штаммов на жидкой питательной среде в планшетах.....	19
1.8 Подсчет количества жизнеспособных бактерий методом DropPlate анализа [Herigstad <i>et al.</i> , 2001, Sharafutdinov <i>et al.</i> , 2017].....	20
ГЛАВА 2. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ	21
2.1 Выделение геномной ДНК из клеток бактерий методом фенол- хлороформной экстракции	24
2.2 Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток. Классический MiniPrep [Sambrook <i>et al.</i> , 1989].....	25
2.3 Выделение ДНК из крови с помощью смолы Chelex	25
2.4 Полимеразная цепная реакция	26
2.5 Горизонтальный электрофорез в агарозном геле.....	29
2.6 Окрашивание ДНК.....	30
Приложение 1. Составы питательных сред и растворы.....	31
Приложение 2. Растворители и разбавители, используемые для приготовления основных растворов антибактериальных препаратов.....	35
ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА	41

ВВЕДЕНИЕ

Современные антибиотики и синтетические антимикробные препараты занимают ведущее место в лечении бактериальных инфекций. Они применяются при различных инфекционно-воспалительных заболеваниях у 70–100% больных хирургического, урологического, гинекологического стационаров, отделений реанимации и интенсивной терапии и в детской практике, у 50–60% терапевтических больных. На долю антибактериальных препаратов приходится около 25–30% расходов многопрофильной больницы на лекарственную терапию. Номенклатура средств антимикробной терапии огромна и непрерывно пополняется за счет внедрения в клиническую практику новых поколений антибиотиков, новейших антибактериальных препаратов, получаемых путем химического синтеза. Побудительной причиной, стимулирующей развитие исследований по созданию новых антибактериальных препаратов, является возникновение и широкое распространение антибиотикорезистентности и как следствие — снижение эффективности антимикробной химиотерапии. Принято считать, что основным путем преодоления резистентности является создание новых антимикробных препаратов. Применение стандартных и достоверных методов оценки антимикробной активности новых антимикробных препаратов на этапах доклинического изучения должно служить ограничительным механизмом, позволяющим отбирать и рекомендовать для широкого медицинского применения лишь препараты, кардинально превосходящие существующие по показателям эффективности, фармакокинетическим, фармакологическим свойствам, скорости формирования устойчивости. Поэтому все новые антибактериальные соединения должны тестироваться по унифицированным методикам оценки спектра антимикробной активности и химиотерапевтического действия с использованием комплекса стандартных методов. По результатам исследования должна быть установлена активность нового препарата в отношении определенных групп возбудителей, рекомендованы показания к применению, ориентировочные режимы лечения на период клинических исследований [Миронов *с соавт.*, 2012].

ГЛАВА 1. МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИЗУЧЕНИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Оценка спектра действия и степени антибактериальной активности *in vitro* новых антибиотиков и синтетических антибактериальных веществ производится в отношении определенного набора штаммов (чувствительных и устойчивых к антибиотикам). Отбирают вещества, характеризующиеся широким или узконаправленным спектром антибактериального действия, используя высокочувствительные эталонные штаммы (из международных и региональных коллекций) и свежесделанные клинические штаммы грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Каждый вид должен быть представлен 4–5 штаммами с различным набором маркеров антибиотикорезистентности.

Новые антибактериальные препараты должны быть оценены на наличие активности в отношении таких проблемных возбудителей, как метициллинрезистентные стафилококки; устойчивые к бензилпенициллину *Streptococcus pneumoniae*, устойчивые к ванкомицину *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., множественноустойчивые энтеробактерии (*Escherichia coli*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp. и др.); устойчивые к амикацину и другим аминогликозидам *Pseudomonas aeruginosa*, другие виды псевдомонад (*Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* и др.) и неферментирующих грамотрицательных бактерий (*Acinetobacter* spp.). Эти микроорганизмы выделяют из клинического материала, идентифицируют и оценивают по структуре и уровням антибиотикоустойчивости.

Определение спектра антибактериального действия и чувствительности к антибиотикам проводят методом двукратных серийных разведений на жидкой или плотной питательной средах или диско-диффузионным методом. Условия определения (питательная среда, число и характеристика штаммов, особенности культивирования, сроки учета результатов и др.) зависят от вида возбудителя.

Детальное изучение степени антибактериальной активности соединений проводят в отношении штаммов грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов из международных коллекций с известными механизмами резистентности.

Исследование активности новых соединений в отношении набора множественноустойчивых и клинических штаммов условно-патогенных и патогенных микроорганизмов оценивают в сравнении с известными препаратами близкой химической группы или аналогичными по антимикробному эффекту. В случае преимущественной активности испытуемого вещества в отношении грамположительных микроорганизмов контролем служат природные пенициллины, полусинтетические пенициллиназоустойчивые пенициллины;

цефалоспорины I–II поколений, макролиды, линкозамиды и др. При активности соединений в отношении грамотрицательных возбудителей в качестве контроля можно использовать азтреонам, полимиксин В. Для препаратов широкого спектра действия контролем могут быть аминогликозиды, тетрациклины, хлорамфеникол, полусинтетические пенициллины и цефалоспорины III–IV поколений [Миронов *с соавт.*, 2012].

Сравнительную степень антибактериальной активности препаратов оценивают величиной МПК или МБК. Минимальная подавляющая концентрация (МПК) – это показатель действия вещества на бактериальную культуру, равный его минимальной концентрации, при которой происходит полное угнетение роста бактерий в течение 24 часов инкубации. Минимальная бактерицидная концентрация (МБК) – концентрация вещества, которая при исследовании *in vitro* вызывает гибель микроорганизмов в течение 48 часов. По рекомендациям EUCAST (Европейский комитет по тестированию антимикробной чувствительности) МБК рассматривается как концентрация антибактериального вещества, снижающая количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1000 раз через 24 часа экспозиции. Также, снижение количества КОЕ в 1000 раз за 24 часа рекомендуется рассматривать как наличие терапевтического эффекта вещества [EUCAST definitive document E.Def 1.2].

Сравнительную степень антибактериальной активности препаратов оценивают величиной МПК или МБК, определяемых не менее чем при двух значениях посевной дозы: минимальной (10^4 – 10^5 КОЕ/мл) и максимальной (10^6 – 10^9 КОЕ/мл) в зависимости от вида возбудителя. По разнице значений МПК и МБК, установленных при максимальной и минимальной величинах инокулума, можно:

а) прогнозировать химиотерапевтическую эффективность соединений в условиях генерализованной инфекции;

б) судить о возможности достижения бактерицидного действия веществ в условиях макроорганизма (с учетом их переносимости), условно классифицировать новый препарат по типу действия на бактериальную клетку (бактериостатическое или бактерицидное действие);

в) устанавливать наличие (или отсутствие) перекрестной устойчивости испытуемых микроорганизмов к новому соединению;

г) выявлять преимущества нового соединения перед известными по широте спектра действия, активности в отношении различных микроорганизмов («проблемных» возбудителей, внутриклеточных патогенов, анаэробных микроорганизмов и др.), а также по сравнительной степени антимикробной активности, бактерицидности и др.

При соотношении МБК/МПК равным 4 и менее вещество принято считать бактерицидным, при соотношении МБК/МПК более чем в 4 раза вещество является бактериостатическим.

Новые препараты рассматриваются перспективными для дальнейшего изучения, если значения их МПК *in vitro* для тест-штаммов не превышают 10–20 мг/л.

1.1 Определение минимальной подавляющей концентрации

1. Культуру бактерий растить ночь на богатой среде (LB, МН, TSB, питательный бульон БТН или МПБ) с качанием, 3 мл в пробирке.

2. Развести ночную культуру для получения бактериальной суспензии с концентрацией $2-8 \times 10^5$ КОЕ/мл, согласно требованиям EUCAST или 10^3 , 10^5 , 10^7 , 10^9 КОЕ/мл в соответствии с руководством по проведению доклинических исследований (МУК под ред. Миронова А.Н.). Выбор питательной среды должен быть обусловлен модельными микроорганизмами. Согласно рекомендациям EUCAST, а также руководству по проведению доклинических исследований Миронова А.Н. общепринятой средой является бульон Мюллера-Хинтона. В случае гемолитических стрептококков в среду вносят дефибрированную кровь (15% об/об). Для лабораторных исследований необходимо использовать среду, которая будет использоваться в дальнейших экспериментах.

3. В 96-луночном планшете приготовить серии двухкратных разведений исследуемого антимикробного соединения в концентрациях от 0.5 до 256 мкг/мл (или диапазон меньших концентраций).

3.1. Внести во вторую и 11-ю лунку 100 мкл среды.

3.2. В первую лунку внести 200 мкл среды с концентрацией вещества 256 мкг/мл.

3.3. Перенести 100 мкл среды из первой лунки во вторую, интенсивно перемешать.

3.4. Перенести 100 мкл среды из второй лунки в третью, интенсивно перемешать.

3.5. Повторить действия пунктов 3.3 – 3.4 до предпоследней лунки. Из предпоследней лунки после перемешивания отбросить 100 мкл.

3.6. Внести во все лунки 100 мкл приготовленную суспензию микроорганизмов (из пункта 2).

4. Культуры инкубировать при 35-37 °С в течение 20 часов.

5. Минимальная подавляющая концентрация определяется, как самая низкая концентрация вещества, при которой не наблюдается видимого роста бактерий после 20 часов инкубации (рисунок 1).

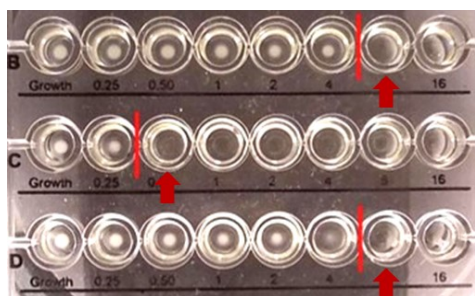


Рисунок 1 – Пример определения минимальной подавляющей концентрации путем серии двукратных разведений в 96-луночном планшете. Стрелками указаны лунки, которым соответствует МПК.

1.2 Определение минимальной бактерицидной концентрации

Для определения минимальной бактерицидной концентрации (МБК), необходимо дополнительно определить количество КОЕ в культуральной жидкости из лунок без видимого роста. За МБК принимается концентрация антимикробного соединения, снижающая количество жизнеспособных клеток более чем на 3 порядка (в 1000 раз), или, другими словами, происходит гибель более чем 99.9% клеток возбудителя. Существует несколько способов определения МБК.

Способ 1.

Из лунок, в которых не наблюдается рост бактерий после определения МПК, провести посев 10 мкл на чашки с LB-агаром и инкубировать 24 часа. Принимают за МБК концентрацию в тех лунках, при инокуляции из которых не происходит роста.

Недостатками метода является то, что требуется значительное количество среды и чашек, что ограничивает применимость метода при посеве более чем 15-20 проб и более. Вариантом снижения затрат является посев капли (3-5 мкл) в виде точки. При этом, если МПК и МБК отличаются незначительно, за счет малой диффузии вещества в агар происходит образование высокой локальной концентрации антимикробного вещества и есть риск получить заниженные данные.

Способ 2.

Из лунок, в которых не наблюдается рост бактерий после определения МПК, перенести 10 мкл в 3 мл богатой среды (МН, LB) и инкубировать 24 часа. Принимают за МБК концентрацию в тех лунках, при инокуляции из которых не происходит роста.

Недостатком метода также является необходимость значительного количества среды и пробирок, что ограничивает применимость метода при посеве более чем 2-3 проб и более. При этом выявляется концентрация, приводящая к полной гибели бактерий в пробе.

Способ 3.

Данный метод исходит из рекомендаций EUCAST, согласно которым МБК рассматривается как концентрация антибактериального вещества, снижающая количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1000 раз через 24 часа экспозиции. Для этого из лунок, в которых не наблюдается рост бактерий после определения МПК, готовят 1000-кратные разведения культуры в стерильных планшетах (повторяют 3 раза разведение 20 мкл культуры + 180 мкл среды) и инкубируют 24 часа. Принимают за МБК концентрацию в тех лунках, при инокуляции из которых не происходит роста.

При этом точность определения теряется (возможна ошибка в 2-4 раза), однако возможен автоматизированный тест с использованием 96-луночных планшетов. Минимальное рентабельное количество проб – 32 штуки.

1.3 Анализ кривой эрадикации от времени (Time-kill curve assay)

Анализ зависимости эрадикации бактериальных клеток от времени проводится путем культивирования бактерий в жидкой питательной среде (подбор среды осуществляется в зависимости от тест-микроорганизма) в присутствии исследуемого соединения в концентрациях $0.5 \times \text{МПК}$ – $8 \times \text{МПК}$. При этом с определенным временным интервалом отбирают пробы и определяют в них количество КОЕ (см. Раздел 2.1).

1. Культуру растить в течение ночи на богатой среде (LB, МН, TSB, питательный бульон БТН или МПБ) с качанием, 3 мл в пробирке.

2. Бактериальную культуру развести до концентрации 10^6 КОЕ/мл в питательной среде, содержащей исследуемые соединения, высеять в культуральный планшет, после чего инкубировать при 37°C без качания.

3. Отбор образцов проводить на 0, 2, 4, 6, 8, 12 и 24 часа после начала культивирования с последующим определением количества КОЕ.

В случае бактерицидного действия наблюдается прямая зависимость снижения КОЕ от времени, при этом скорость снижения количества КОЕ зависит от концентрации вещества. Для бактериостатических соединений наблюдается снижение КОЕ с течением времени независимо от концентраций вещества выше его МПК (рисунок 2).

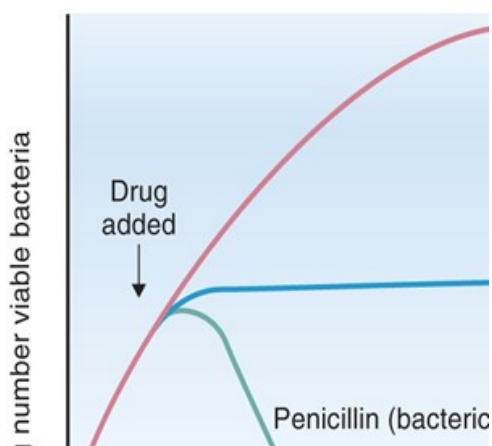


Рисунок 2 – Пример бактерицидного и бактериостатического действия различных антимикробных препаратов в зависимости от времени инкубации

1.4 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом

Диско-диффузионный метод определения чувствительности основан на способности антибактериального препарата диффундировать в питательную среду из носителя, в качестве которого используют бумажный диск. В результате образуется зона подавления роста посеянных на поверхности агара микроорганизмов, по диаметру которой микроорганизм относят к одной из категорий чувствительности: чувствительный, промежуточный (умеренно чувствительный) или резистентный (устойчивый). Отметим, что диско-диффузионный метод также позволяет косвенно судить о величине МПК, поскольку в определенных пределах величина диаметра зоны подавления роста обратно пропорциональна МПК.

1.4.1 Приготовление питательных сред для определения чувствительности

Питательный агар Мюллера-Хинтон готовится из сухой среды промышленного производства в соответствии с инструкцией изготовителя. После стерилизации питательную среду сразу же разливают в стерильные чашки Петри. Поскольку размер и форма зоны подавления роста микроорганизмов зависят от глубины и равномерности агарового слоя, агар разливается по чашкам Петри слоем толщиной 4.0 ± 0.5 мм. Для этого на чашку диаметром 150 мм требуется 65 мл агара, на чашку диаметром 100 мм – 25 мл агара, на чашку диаметром 90 мм – 20 мл. Перед заполнением расплавленной средой чашки Петри устанавливают на строго горизонтальную поверхность (выверенную по уровню, без впадин и выпуклостей). Чашки оставляют при комнатной температуре для застывания. Приготовленные указанным образом чашки предпочтительно использовать немедленно. Допускается хранение в запаянных полиэтиленовых пакетах в холодильнике при 4-8 °С в течение 7-10 суток. При использовании свежеприготовленных чашек или чашек после хранения в холодильнике их необходимо подсушить перед инокуляцией, что достигается инкубацией при 35 °С с приоткрытой крышкой в течение 10-20 мин. Перед инокуляцией конденсат жидкости на внутренней поверхности крышек должен отсутствовать.

1.4.2 Приготовление суспензии исследуемых микроорганизмов (инокулюма)

Концентрация суспензии исследуемого микроорганизма должна составлять 1.5×10^8 КОЕ/мл. Практически наиболее приемлемым методом оценки концентрации бактериальной суспензии является измерение ее оптической

плотности. Оптическая плотность бактериальной суспензии с концентрацией 1.5×10^8 КОЕ/мл при визуальном контроле соответствует стандарту мутности 0.5 по МакФарланду.

Бактериальную суспензию можно готовить из бульонной или агаровой культуры. Инокулюм следует использовать в течение 15 минут после приготовления.

Способ 1. Приготовление инокулюма из агаровой культуры

Для приготовления инокулюма используют чистую суточную культуру микроорганизмов, выросших на неселективных плотных питательных средах. Отбирают несколько однотипных, четко изолированных колоний, петлей переносят незначительное количество материала с вершущек колоний в пробирку со стерильным физиологическим раствором или питательным бульоном, доводя плотность инокулюма точно до 0.5 по стандарту МакФарланда.

Способ 2. Приготовление инокулюма из бульонной культуры

В случае большинства быстро растущих бактерий с обычными питательными потребностями для приготовления инокулюма можно использовать 5-6-часовую бульонную культуру микроорганизма.

Отбирают несколько однотипных изолированных колоний, петлей переносят незначительное количество материала в пробирку с 5 мл жидкой неселективной питательной средой. Инкубируют при 35 °С. Через 5-6 часов инкубации плотность микробной суспензии приблизительно соответствует необходимой, и ее точно доводят до 0.5 по МакФарланду путем добавления стерильного бульона или физиологического раствора.

1.4.3 Инокуляция

Для инокуляции приготовленных чашек с агаром можно использовать два способа.

Способ 1

Наиболее удобным способом инокуляции является использование стерильных ватных тампонов. Тампон необходимо погрузить в стандартную суспензию микроорганизма, затем избыток инокулюма удалить, отжав тампон о стенки пробирки. Инокуляцию проводят штриховыми движениями в трех направлениях, поворачивая чашку Петри на 60°С.

Способ 2

При использовании этого способа стандартный инокулюм наносят пипеткой на поверхность чашки Петри с питательной средой в объеме 1-2 мл, равномерно распределяют по поверхности покачиванием, после чего удаляют избыток инокулюма пипеткой. Приоткрытые чашки подсушивают при комнатной температуре в течение 10-15 мин.

1.4.4 Аппликация дисков с антибиотиками

Не позднее чем через 15 мин после инокуляции на поверхность питательной среды наносят диски с антибактериальными препаратами.

Для определения чувствительности диско-диффузионным методом следует использовать только стандартизированные качественные коммерческие диски.

Для получения правильных результатов определения чувствительности диско-диффузионным методом необходимо строго соблюдать правила хранения и использования коммерческих дисков, в противном случае содержание в них антибиотиков может снизиться ниже допустимого уровня (прежде всего в результате увлажнения) еще до истечения срока годности.

Долговременное хранение дисков с антибактериальными препаратами осуществляют в герметичной упаковке в морозильной камере при температуре -18 °С и ниже. Небольшие партии дисков, используемые при повседневной работе, можно хранить в холодильнике при температуре 4-8 °С, плотно укупоренными так, чтобы гарантировать невозможность попадания во флакон влаги, кроме того для дополнительной защиты от влаги во флаконах (картриджах) с дисками содержится специальный влагопоглотитель (силикагель).

Флаконы (картриджи) с дисками следует извлекать из холодильника за 1 ч до начала работы и выдерживать герметично закрытыми до достижения ими комнатной температуры, что предотвращает образование конденсата на дисках после открывания флаконов.

Аппликацию дисков проводят с помощью стерильного пинцета или автоматического диспенсера. Расстояние от диска до края чашки и между дисками должно быть 15-20 мм. Таким образом, на одну чашку диаметром 100 мм следует помещать не более 6 дисков с антибактериальными препаратами. Чтобы диски равномерно контактировали с поверхностью агара, их следует аккуратно прижать пинцетом.

1.4.5 Инкубация

Непосредственно после аппликации дисков чашки Петри помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре 35 °С в течение 18-24 ч (в зависимости от вида тестируемого микроорганизма). Увеличение интервала времени между нанесением дисков на поверхность среды и началом инкубации (а соответственно - началом роста исследуемой культуры микроорганизма) приводит к «преддиффузии» антибактериального препарата в агар и к увеличению диаметра зоны подавления роста.

1.4.6 Учет и интерпретация результатов, формулировка рекомендаций по лечению

После окончания инкубации чашки помещают кверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом в 45° (учет в отраженном свете). Диаметр зон задержки роста (рисунок 3) измеряют с точностью до 1 мм, предпочтительнее пользоваться штангенциркулем или кронциркулем.

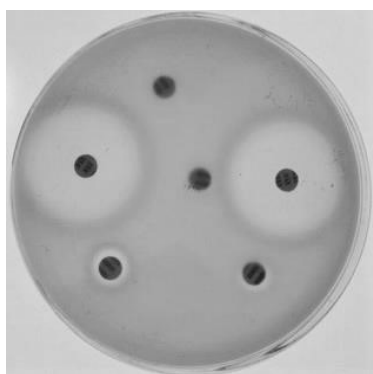


Рисунок 3 – Определение чувствительности бактерий к антибиотикам диско-диффузионным методом.

При измерении зон задержки роста следует ориентироваться на зону полного подавления видимого роста. Не следует обращать внимания на очень мелкие колонии, выявляемые в пределах зоны задержки роста только при особых условиях освещения или увеличении, и едва заметный налет у края зоны. Исключение составляют случаи учета результатов определения чувствительности стафилококков к оксациллину, когда необходимо учитывать и самые мелкие колонии, выявляемые в пределах четкой зоны подавления роста.

При определении чувствительности роящихся штаммов протей, зона подавления роста может быть затянута тонкой вуалеобразной пленкой, которая не мешает установлению границы зоны и не учитывается при регистрации результатов.

При определении чувствительности к сульфаниламидам и их комбинации с триметопримом границу зоны подавления роста следует учитывать на уровне подавления роста на 80%. Это связано с тем, что под действием этих препаратов перед полным подавлением роста возможно завершение 1-2 циклов пролиферации микроорганизма.

Крупные колонии, выявляемые в пределах четкой зоны подавления роста, свидетельствуют о наличии посторонней микрофлоры или о гетерорезистентности популяции микроорганизмов, в этом случае необходимо повторить идентификацию микроорганизма, формирующего эту колонию, и определение чувствительности этого штамма.

Для интерпретации полученных результатов используют таблицы (Приложение 3), в которых приведены пограничные значения зон подавления

роста, позволяющие отнести исследуемую культуру микроорганизма к одной из трех категорий:

- «чувствительный» – S,
- «промежуточный» – I или «умеренно чувствительный» – MS,
- «устойчивый» или «резистентный» – R.

При интерпретации результатов необходимо обратить внимание на то, что для различных микроорганизмов критерии чувствительности к одним и тем же антибиотикам могут различаться.

При отнесении штамма к категории «чувствительный» предполагается, что лечение вызванной данным микроорганизмом инфекционной болезни соответствующим антибиотиком в обычных терапевтических дозах будет, скорее всего, успешным.

При отнесении штамма к категории «промежуточный» предполагается, что лечение вызванной данным микроорганизмом инфекционной болезни соответствующим антибиотиком может быть успешным лишь при использовании повышенных доз препарата или при локализации инфекции в тех локусах человеческого организма, где антибиотик способен концентрироваться в силу его фармакокинетических особенностей (например, моча).

При отнесении штамма к категории «резистентный» предполагается, что лечение вызванной данным микроорганизмом инфекционной болезни соответствующим антибиотиком даже в повышенных дозах будет, скорее всего, неудачным.

1.5 Анализ антимикробного эффекта при комбинированном применении антимикробных агентов (метод шахматной доски, den Hollander, 1998)

При комбинированном назначении нескольких веществ с разным механизмом действия нарушают одновременно несколько звеньев метаболизма у возбудителей болезней, поэтому надежнее и быстрее вызывают их гибель. Усилить действие можно при сочетании вещества сильно, но кратковременно действующего, с умеренным по силе, но долго действующим. При этом первое вещество если не убивает, то переводит возбудителя болезни в анабиотическое состояние, а второе вещество мешает выйти ему из такого состояния. Кроме того, назначение комбинированных препаратов часто преследует цель улучшить резорбцию антибиотика микробной клеткой, ослабить выработку ферментов, инактивирующих антибиотик, продлить период пребывания антибиотика в микробной клетке или в организме животного, ослабить местное неблагоприятное влияние, понизить вирулентность микроба, повысить защитные реакции организма и т. д. При правильно составленной комбинации действие

химиотерапевтических веществ на возбудителя болезни обычно усиливается, а неблагоприятное влияние на организм ослабевает.

При правильной комбинации двух и более веществ возможен синергизм (суммарное действие в одном направлении) или потенцирование (значительное повышение химиотерапевтического эффекта). При неправильной комбинации чаще всего бывает тот или иной антагонизм, сопровождающийся ослаблением лечебного действия препарата. Поэтому любые комбинации должны быть хорошо обоснованы экспериментально. Лучшими являются те, которые хорошо апробированы и часто используются.

Для оценки возможности сочетанного применения антимикробных агентов обычно используют метод шахматной доски. Методология эксперимента аналогична определению МПК в 96-луночных планшетах.

1. Культуру бактерий растить ночь на богатой среде (LB, МН, TSB, питательный бульон БТН или МПБ) с качанием, 3 мл в пробирке.

2. Развести ночную культуру для получения бактериальной суспензии с концентрацией $2-8 \times 10^5$ КОЕ/мл согласно требованиям EUCAST или 10^3 , 10^5 , 10^7 , 10^9 КОЕ/мл в соответствии с руководством по проведению доклинических исследований (МУК под ред. Миронова А.Н.).

3. Провести серию двукратных разведений исследуемых веществ в шахматном порядке (рисунок 4). Одно из антимикробных веществ [А] двукратно развести по горизонтали, а другое [Б] – по вертикали 96-луночного планшета. В результате получается комбинацию из 77 концентраций антимикробных соединений [А] и [Б].

4. Крайние линия и столбец должны содержать лишь одно из рассматриваемых веществ, что позволяет определять их МПК непосредственно в эксперименте.

5. Начальная концентрация каждого из исследуемых антимикробных агентов составляет $4 \times \text{МПК}$.

6. Планшеты инкубировать в термостате при $35-37^\circ\text{C}$ в течение 20 часов.

7. Измерить оптическую плотность при длине волны 600 нм на планшетном спектрофотометре.

8. Показателем характера совместного антимикробного действия веществ [А] и [Б] является индекс фракционной ингибирующей концентрации (иФИК), который рассчитывают следующим образом:

$$\text{иФИК}_{\text{А/Б}} = \frac{\text{МПК}_{[\text{А}] \text{ в комбинации с [Б]}}}{\text{МПК}_{[\text{А}]}} + \frac{\text{МПК}_{[\text{Б}] \text{ в комбинации с [А]}}}{\text{МПК}_{[\text{Б}]}}$$

Интерпретацию полученных значений иФИК проводят согласно [Odds, 2003; den Hollander *et al.*, 1998]:

иФИК ≤ 0.5 соответствует синергизму,
 $0.5 < \text{иФИК} \leq 4$ – аддитивный эффект,
иФИК > 4 соответствует антагонизму.

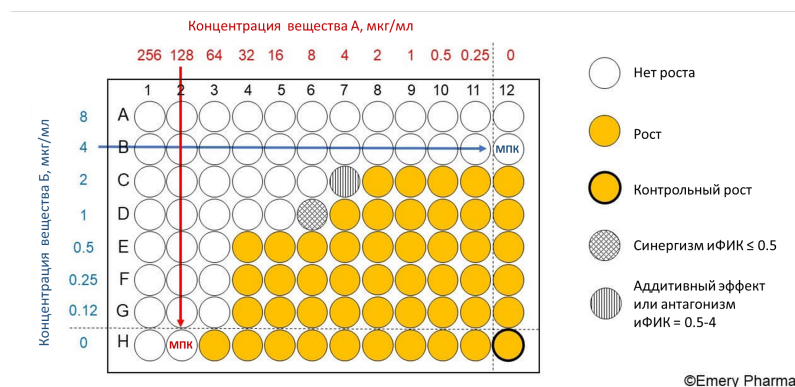


Рисунок 4 – Пример определения антимикробного эффекта при комбинированном применении антимикробных агентов методом шахматной доски.

1.6 Определение чувствительности к комбинациям антибиотиков модифицированным методом градиентной диффузии (кросс-тест)

1.6.1. Определение индивидуальных минимальных подавляющих концентраций (МПК) антибиотиков.

1. Культуру бактерий растить ночь на богатой среде (LB, МН, TSB, питательный бульон БТН или МПБ) с качанием, 3 мл в пробирке.

2. Приготовить гомогенную суспензию бактериальных клеток в физиологическом растворе, соответствующую стандарту 0.5 ЕД мутности по МакФарланду (что соответствует бактериальной суспензии, содержащей 10^8 КОЕ/мл).

3. Бактериальную взвесь нанести стерильным тампоном на поверхность питательного агара в трех различных направлениях.

4. С помощью пинцета поместить тест-полоску антибиотиком (Е-тест, МІС-тест, М.І.С.Е.-тест) на поверхность среды. Допускается нанесение двух полосок на одну 90-миллиметровую чашку.

5. Чашки инкубировать 18-24 часов при 35 ± 2 °С.

6. Учесть МПК для каждого антибиотика в месте пересечения эллипсоидной зоны подавления роста с тест-полоской в соответствии с инструкцией производителя.

1.6.2. Определение антибактериальной активности комбинаций из двух антибиотиков.

1. Приготовление бактериальных суспензий и инокуляция чашек с питательным агаром проводится так же, как и для определения индивидуальных МПК.

2. С помощью пинцета расположить две тест-полоски с антибиотиками под углом 90° непосредственно на предварительно инокулированной чашке с питательным агаром (рекомендуется МН или TSB, но также возможны LB, питательный агар БТН или МПБ в зависимости от цели эксперимента), при этом не допускается перемещение уже наложенных полосок по поверхности среды таким образом, чтобы место их пересечения приходилось на предварительно установленные значения МПК каждого из антибиотиков в отношении исследуемого изолята.

3. Чашки инкубировать 18–24 часов при 35±2 °С.

4. Зарегистрировать значения МПК антибиотика А в присутствии антибиотика Б и МПК антибиотика Б в присутствии антибиотика А (рисунок 5).

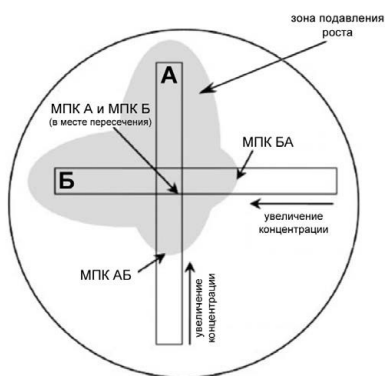


Рисунок 5 – Схема постановки и учета результатов кросс-теста.

5. Рассчитать индекс фракционной подавляющей концентрации по формуле:

$$\Sigma\text{ФПК} = \text{МПКАБ} / \text{МПКА} + \text{МПКБА} / \text{МПКБ},$$

где МПКА – МПК антибиотика А, установленная предварительно;

МПКБ – МПК антибиотика Б, установленная предварительно;

МПКАБ – МПК антибиотика А в присутствии антибиотика Б;

МПКБА – МПК антибиотика Б в присутствии антибиотика А;

ФПК – фракционная подавляющая концентрация;

$\Sigma\text{ФПК}$ – индекс фракционной подавляющей концентрации.

6. Интерпретировать результаты в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 – Интерпретация результатов определения чувствительности к комбинации из двух антибиотиков

Индекс	Интерпретация
≤ 0.5	Синергизм
> 0.5 и ≤ 1.0	Аддитивный эффект
> 1.0 и ≤ 4.0	Нейтральный эффект
> 4.0	Антагонизм

1.7 Оценка развития устойчивости к антимикробным препаратам

1.7.1 Получение устойчивых штаммов на чашках с градиентным агаром

1. Питательный агар объемом 10 мл с исследуемым соединением в нужной концентрации залить в стерильные чашки Петри.

2. Чашки оставить застывать при наклоне, чтобы получить скошенный агар.

3. Затем, чашки с застывшим агаром поставить горизонтально и залить в них по 10 мл питательного агара, не содержащего антимикробных веществ.

4. Для формирования градиента концентраций исследуемых соединений в агаре, чашки инкубировать в течение двух дней при комнатной температуре. Таким образом, получался градиент концентраций исследуемого соединения от 0 мкг/мл на одной стороне чашки до максимальной концентрации на другой стороне чашки.

5. Культуры бактерий выращивать до середины логарифмической фазы роста в жидкой питательной среде.

6. Произвести высеив по 0.1 мл на поверхность питательного агара с градиентом концентрации исследуемого соединения.

7. Инкубацию чашек с культурами проводить при 37 °С в течение 24 часов, после чего произвести отбор колоний, выросших на участке агара с максимальной концентрацией исследуемого антимикробного вещества.

8. Для отобранных колоний затем определить минимальную подавляющую концентрацию методом двойных серийных разведений в жидкой питательной среде в 96-луночных планшетах.

9. Из колоний, для которых определены максимальные МПК, снова посеять на агаризованную среду с градиентом антимикробного вещества (см. пункты 2-4) и далее определить МПК методом двойных серийных разведений в жидкой питательной среде в 96-луночных планшетах. Данную операцию повторить не менее 15 раз.

В случае превышения МПК для тест-культуры в начале и в конце эксперимента более чем в 4 раза (2 двух-кратных разведения), можно говорить о развитии резистентности. Однако, может развиваться как генетическая

резистентность (обусловленная изменением генетического аппарата микробной клетки) и фенотипическая резистентность (обусловленная перестройкой физиологии микробной клетки). При этом наибольшие опасения вызывает первая, так как мутации в геноме могут передаваться как потомству клетки, так и за счет горизонтального переноса генов как внутри вида, так и близкородственным бактериям. Поэтому важно также оценить вид развившейся устойчивости.

Для этого проводят не менее 7 пересевов изолятов, для которых зафиксированы максимальные значения МПК, на среды без антимикробных соединений. В случае снижения МПК после 7 пересевов на 2 и более разведения делают вывод о фенотипической резистентности клеток (рисунок 6). В случае неснижения МПК следует говорить о развитии генетической резистентности.

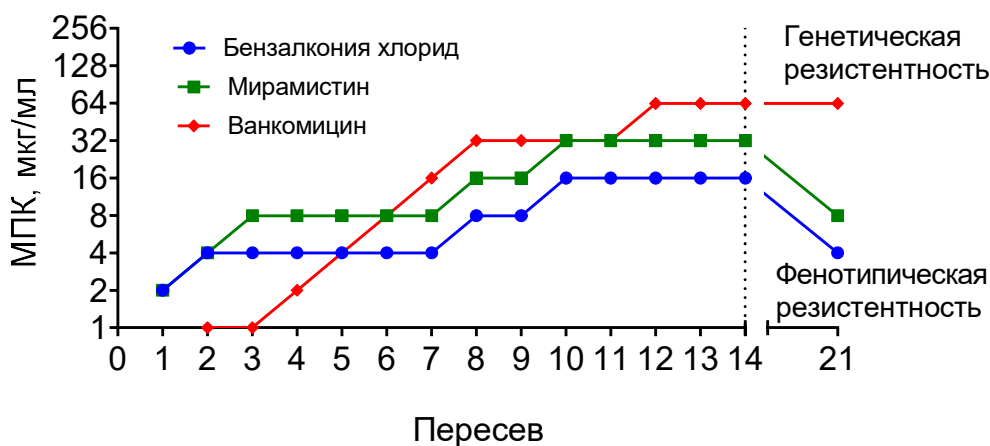


Рисунок 6 – Пример развития устойчивости у бактерий при воздействии исследуемыми соединениями

1.7.2 Получение устойчивых штаммов на жидкой питательной среде в планшетах

Другим подходом для оценки развития резистентности бактерий является подход последовательных пассажей в среды с сублетальными концентрациями антимикробных соединений, как описано в [Locher *et al.*, 2014] с модификациями.

1. Стерильные 96-луночные планшеты засеять тест штаммом в жидкую питательную среду с различными концентрациями исследуемого вещества (аналогично определению МПК, см. раздел 1.1).

2. Планшеты инкубировать 20 часов при 37 °С.

3. Далее микроорганизмы из последней лунки с видимым ростом использовать как ночную культуру для посева в новый планшет с различными концентрациями исследуемого вещества.

4. Процедуру повторить для получения 14 циклов пассажей и определить МПК соединений.

5. Затем провести серию из 7 пассажей на питательном агаре без исследуемых веществ и снова определить МПК.

Интерпретацию развития резистентности проводят аналогично, как описано в разделе 1.7.1.

1.8 Подсчет количества жизнеспособных бактерий методом DropPlate анализа [Herigstad *et al.*, 2001, Sharafutdinov *et al.*, 2017]

1. Для приготовления серии 10-кратных разведений разлить в 96-луночный планшет по 180 мкл стерильного физиологического раствора.

2. В первую лунку внести 20 мкл суспензии клеток и тщательно перемешать. Таким образом мы получаем разведение культуры в 10 раз.

3. Из первой лунки перенести 20 мкл во вторую лунку и интенсивно перемешать. Продолжить разведение до шестой лунки включительно.

4. Отбросить 20 мкл из шестой лунки.

5. После серии разведений перенести по 5 мкл суспензии на чашки с агаризованной средой.

6. Чашки инкубировать сутки при 30-37 °С.

7. КОЕ подсчитать из капель, содержащих 5-10 колоний, умножив на соответствующее разведение.

Для оценки количества клеток в биопленке:

1. Лунки дважды промыть физиологическим раствором для удаления неадгезированных клеток.

2. Биопленки ресуспендировать в физиологическом растворе путем механического сдираания пленки.

3. Обработать клетки ультразвуком в течение 2 мин, что способствует распаду бактериальной пленки.

4. Произвести серию десятикратных разведений, как описано в разделе 2.1 в пунктах 1-4.

5. Перенести на чашки с агаризованной средой.

6. Жизнеспособные клетки подсчитать аналогичным образом.

ГЛАВА 2. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Резистентность бактерий к антимикробным препаратам может природной или приобретенной.

Природная резистентность обусловлена генетически. Чувствительность к антимикробным препаратам при этом снижена благодаря различным механизмам. Так, может наблюдаться низкая проницаемость бактериальной оболочки, происходит ферментативная инактивация антибиотика, мишень действия либо отсутствует, либо модифицирована в результате мутации, может происходить удаление антибиотика из клетки за счет эффлюкс систем. Природная резистентность является постоянным видовым признаком микроорганизмов и может легко прогнозироваться, при наличии таковой у бактерий антибактериальные препараты становятся неэффективны. Примерами природной резистентности являются резистентность *P.aeruginosa* к ампициллину и тетрациклам в силу низкой проницаемости клеточной стенки, или резистентность микоплазм к бета-лактамам вследствие отсутствия активного транспорта.

Приобретенная устойчивость - свойство отдельных штаммов бактерий оставаться жизнеспособными при тех концентрациях антимикробных препаратов, которые подавляют основную часть популяции. Приобретенная резистентность бывает перекрестной (в пределах одной группы антибиотиков) и ассоциированной (между различными группами). Например, MRSA как правило резистентны ко всем бета-лактамам, макролидам, аминогликозидам, линкосамидам [Клец *с соавт.*, 2013, Schroeder *et al.*, 2017].

Во всех случаях формирование чувствительности обусловлено генетически: либо за счет приобретения новой генетической информации, либо вследствие изменения уровня экспрессии собственных генов.

В основе механизмов приобретенной резистентности лежат следующие факторы:

- Горизонтальная передача генов (обмен генетической информацией) и последующая рекомбинация способствуют появлению устойчивых штаммов;

а) Перенос плазмид резистентности (R - плазмид), которые как правило кодируют перекрестную устойчивость к нескольким группам антимикробных препаратов;

б) Перенос мигрирующих (мобильных) генетических элементов: IS-элементов (инсерционные последовательности), интегронов, транспозонов, генных кассет и др.

- Повышение скорости генетической рекомбинации вследствие хромосомных мутаций. (тем самым обеспечивается разнообразие механизмов резистентности к антимикробным препаратам) [Schroeder *et al.*, 2017, Hughes *et al.*, 2017].

Важную роль в формировании резистентности к антибактериальным препаратам играют биопленки. В их составе бактерии обладают свойством множественной антибиотико-устойчивости, что весьма затрудняет терапию и приводит к росту летальности от инфекционных заболеваний. При наличии биопленок традиционные механизмы резистентности не являются ведущими в микробных сообществах. В таких случаях актуальны несколько иные механизмы устойчивости:

- Обмен генетической информацией и мутации внутри биопленки протекают с более высокой скоростью. На эту скорость влияют недостаток питательных веществ и кислорода, микроокружение, сигналы Quorum sensing.

- Имеется так называемый «молекулярный фильтр», роль которого выполняет матрикс. В связи с этим диффузия антибиотика внутрь биопленки затрудняется.

- Биоплёнки состоят из бактерий, при этом более «сильные» бактерии защищают «слабых». Кроме того имеются клетки-персистеры, резистентные к антибиотикам за счет их метаболической инертности [Сидоренко *с соавт.*, 2014, Munita *et al.*, 2016].

Механизмы приобретенной устойчивости:

1. Модификация мишени действия.

Затрагивает практически все группы антибактериальных препаратов и является одним из наиболее распространенных механизмов резистентности среди бактерий. Изменения мишени могут быть ферментативными и мутационными. Также мишень может быть заменена (или могут появиться метаболические шунты).

2. Низкая проницаемость бактериальной оболочки.

Данный механизм широко распространен среди грам-отрицательных бактерий (толстая клеточная стенка, состоящая из ЛПС и других компонентов, играет роль естественного барьера). Снижение количества или утрата пориновых каналов, изменение их функции или структуры снижают эффективность транспорта антибиотика, что проявляется в формировании резистентности в основном к гидрофильным антимикробным препаратам: тетрациклинам, некоторым фторхинолонам, бета-лактамам (у *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*).

3. Ферментативная инактивация АБ.

На сегодняшний день известны 4 класса ферментов, которые участвуют в модификации или разрушении антибактериальных препаратов:

- Лиазы (фермент Vgb разрушает С-О связи и инактивирует стрептограмин В)

- Трансферазы (фосфо-,гликозил-, аденил-, ацетил- и АДФ-рибозилтрансфераза) чаще всего модифицируют хлорамфеникол, стрептограмин и аминогликозиды.

- Редокс-ферменты участвуют в модификации и инактивации антибиотиков сравнительно редко (известен лишь фермент TetX, инактивирующий тетрациклины).

- Гидролазы (бета-лактамы) [Steven *et al.*, 2015].

4. Эффлюкс-системы.

Данный механизм резистентности осуществляется за счет эффлюксных насосов (интегральных мембранных транспортеров), предотвращающих накопление АБ внутри бактериальной клетки.

5. Защита мишени.

Является наименее изученным механизмом антибиотикорезистентности. Известно лишь, что некоторые бактерии синтезируют белки, изменяющие мишень и тем самым предотвращающие связывание АБ с мишенью. Одним из механизмов резистентности к фузидиевой кислоте является защита от нее фактора элонгации G (EF-G). Фузидиевая кислота (FA) образует комплекс с EF-G, блокируя трансляцию. Белки семейства FusB взаимодействуют с комплексом EF-G+FA, что приводит к его разрушению с последующим возобновлением трансляции [Vandenesch *et al.*, 2009].

С клинической точки зрения важно дифференцировать штаммы, имеющие генетически обусловленную резистентность к антибактериальным препаратам от штаммов с фенотипической устойчивостью, поскольку именно от этого будет зависеть тактика лечения. К примеру, при стафилококковых инфекциях, вызванных штаммами, характеризующимися наличием гена *tesA*, терапия бета-лактамами антибиотиками (пенициллинами, цефалоспорины, карбапенемами) неэффективна, ген *msr* обуславливает резистентность к макролидам, а гены *vanA* и *vanB* к гликопептидам (VISA и VRSA) [Otto *et al.*, 2014]. Ген *erm* (*erythromycin ribosomal methylation*) кодирует метилазы, деметилирующие аденин в 23S рРНК 50S-субъединицы рибосомы, вследствие чего нарушено связывание макролидов с большой субъединицей. Поскольку мишени для линкозамидов, стрептограмина В и макролидов частично перекрываются, метилирование формирует перекрёстную устойчивость к этим антибиотикам.

Полимеразная цепная реакция является простым и эффективным инструментом для идентификации геном антибиотикорезистентности у бактериального изолята. Общие действия при этом сводятся к следующему классическому алгоритму:

- 1) Получение чистой культуры изолята;
- 2) Выделение геномной и плазмидной ДНК;

3) Проведение ПЦР с использованием праймеров, специфичным к различным генам, определяющим резистентность бактерий

4) Оценка наличия ПЦР продукта с помощью электрофореза.

В настоящее время возможно проведение ПЦР в реальном времени, что позволяет избежать процедуры электрофореза продуктов ПЦР, однако, в этом случае необходимо быть уверенным в строгой специфичности праймеров. Также в отдельных случаях можно провести ПЦР с колоний, не выделяя ДНК.

2.1 Выделение геномной ДНК из клеток бактерий методом фенол-хлороформной экстракции

1. Культуру бактерий растить ночь на богатой среде (LB, питательный бульон БТН или МПБ) с качанием, 5 мл в пробирке.

2. Осадить клетки из 5 мл культуры в эппендорф: 1.5 мл культуры перенести в эппендорф, центрифугировать 1-2 мин при 13000 об/мин, надосадочную жидкость вылить, снова добавить 1.5 мл культуры и центрифугировать. Удалить дозатором всю надосадочную жидкость.

3. Ресуспендировать клетки в 500 мкл 10 mM Трис HCl pH 8.0.

Для грам-положительных бактерий:

3.1. Для разрушения клеточной стенки бактерий внести 25-50 мкл раствора лизоцима с концентрацией 20 мг/мл, инкубировать 20-60 мин при 37°C, осторожно перемешивать переворачивая пробирку, суспензия должна стать более прозрачной и коричневатее. В случае лактобацилл внести 100 мкл лизоцима с концентрацией 20 мг/мл, инкубировать 1-2 часа при 37°C.

4. Вносить 10%-ный раствор SDS, осторожно перемешивать, переворачивая пробирку до достижения прозрачного раствора вязкой субстанции.

С ЭТОГО МОМЕНТА ВСЕ ДЕЛАТЬ В ПЕРЧАТКАХ И ПОД ТЯГОЙ

5. Внести 500 мкл смеси фенола, хлороформа и изоамилового спирта (25:24:1) и интенсивно потрясти.

6. Центрифугировать 10 мин на максимальной скорости

7. Перенести верхнюю фазу 450 мкл (НЕ ТРОГАЯ БЕЛЫЙ ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ СЛОЙ) в 1 мл изопропанола.

Для получения высокоочищенной ДНК повторить пункты 5-7 2-3 раза.

8. Осторожно намотать ДНК (которая будет выглядеть как вата) на наконечник на 200 мкл или стеклянную палочку. Если ДНК выпало мало, осторожно перемешать содержимое эппендорфа и повторить наматывание ДНК.

9. Опустить наконечник/палочку с ДНК в раствор 96% этанола, затем подсушить. Пересушивать осадок нельзя, в полностью высушенном виде он становится практически нерастворим в воде. Далее намотанную ДНК опустить в эппендорф с 200-400 мкл деионизованной воды или буфера TE для растворения ДНК.

2.2 Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток. Классический MiniPrep [Sambrook *et al.*, 1989]

1. Культуру растить в течение ночи на богатой среде (LB, питательный бульон БТН или МПБ) с качанием, 3 мл в пробирке.

2. Осадить клетки из 3 мл культуры в эппендорф. Удалить дозатором всю надосадочную жидкость.

3. Клетки ресуспендировать в 200 мкл раствора I.

Для грам-положительных бактерий:

3.1. Для разрушения клеточной стенки бактерий внести 25-50 мкл лизоцима с концентрацией 20 мг/мл, инкубировать 20-60 мин при 37°C, осторожно перемешивая, суспензия должна стать более прозрачной и коричневой. В случае лактобацилл внести 100 мкл лизоцима с концентрацией 20 мг/мл, инкубировать 1-2 часа при 37°C.

4. Клетки перенести в ледяную баню и внести 400 мкл свежеприготовленного раствора II.

5. Добавить 300 мкл охлажденного раствора 3 М ацетата калия (раствор III), осторожно перемешать переворачиванием и инкубировать при температуре -20°C в течение 20-30 мин.

6. Смесь центрифугировать на холоду при 12 тыс. об/мин в течение 15 мин для удаления преципитированной геномной ДНК.

7. Супернатант перенести дозатором в чистый эппендорф. Добавить 600 мкл изопропанола, перемешать и центрифугировать в течение 10 мин при 12 тыс. об/мин.

8. Супернатант вылить. Осадок промыть 96% этанолом, высушить при 65°C в твердотельном термостате и ресуспендировать в 20 мкл деионизованной воды или буфера TE.

2.3 Выделение ДНК из крови с помощью смолы Chelex

Основная процедура выделения включает в себя очистку от металлосодержащих соединений и белков с последующим кипячением образца в присутствии Chelex 100, затем супернатант непосредственно добавляют в ПЦР смесь.

1. В центрифужную пробирку на 2 мл вносят 1 мл стерильной дистиллированной воды и добавляют бактериальные клетки. Тщательно перемешивают.

2. Инкубируют при тщательном перемешивании 20 мин при комнатной температуре (лучше всего использовать ротатор для центрифужных пробирок).

3. Центрифугируют при 10 000 g 3 мин и удаляют супернатант, оставляя (чтобы не взмутить осадок клеток или ткань) 20-30 мкл.

4. Добавляют 5% раствор Chelex-100 до конечного объема 200 мкл (Chelex в натриевой форме, 5% раствор в стерильной дистиллированной воде). Перед добавлением смолу перемешивают до гомогенного состояния пипеткой с широким отверстием.

5. Инкубируют при 56 °С 30 мин и встряхивают в течение 10 сек.

6. Кипятят образец 8 мин при 95 °С, встряхивают в течение 10 сек. и центрифугируют при 10 000 g 3 мин.

7. Для ПЦР берут из полученного супернатанта 10 мкл.

2.4 Полимеразная цепная реакция

Для проведения ПЦР необходимо наличие в реакционной смеси ряда основных компонентов.

Праймеры – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 нуклеотидов, идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени.

1. Длина праймера 16-25 нуклеотидов.

2. Разница в температуре плавления праймеров - не более 6 градусов.

Упрощенный расчет оптимальной температуры отжига праймера ведут по формулам $T_m = [(A+T) \times 2^\circ\text{C}] + [(G+C) \times 4^\circ\text{C}]$, если суммарная длина олигонуклеотида не превышает 20 оснований, или $T_m = 22 + 1.46 \times ([2 \times (G+C)] + (A+T))$, если суммарная длина олигонуклеотида составляет 20-30 оснований. Также можно воспользоваться сервисом от New England Biolabs <http://tmcalculator.neb.com/>

3. Количество остатков цитозина и гуанина должно быть 50-60 %. Последние несколько нуклеотидов 3'-конца праймера должны содержать GC-основания.

4. Отсутствие внутренней вторичной структуры (праймеры не должны быть само- и взаимнокомплиментарными) и отсутствие комплементарности между 3'-концами (чтобы не образовывалось праймер-димеров).

Полимераза – термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности. В настоящее время существует множество различных полимераз. Первый такой фермент - Taq-полимераза до сих пор активно используется в лабораториях, так как он относительно дешевый, неприхотлив к контаминации ДНК, обладает высокой процессивностью. Однако при синтезе данный фермент имеет низкую точность – в среднем наблюдается 1-2 мутации на 1000 нуклеотидов.

В настоящее время на рынке предложены высокоточные полимеразы, такие как Phi полимеразы, Phusion полимеразы, Q-5 полимеразы. Эти ферменты обладают 5'-3' экзонуклеазной активностью, за счет которой способны «исправлять» собственные ошибки путем удлинения неправильно встроенных нуклеотидов.

При их использовании точность синтеза составляет около 1 мутации на 10000 пар оснований.

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) – дезоксиаденозинтрифосфата (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфата (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфата (дТТФ) – «строительный материал», используемый полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.

Буфер – смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающей оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение рН.

ДНК-матрица – подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомым ДНК, например, ДНК микроорганизмов, служащую мишенью для последующего многократного копирования. При отсутствии ДНК-мишени специфический продукт амплификации не образуется.

Циклический температурный режим

В процессе реакции амплификации ДНК с ней происходит ряд событий, которые обеспечиваются определенными температурными циклами.

Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов:

1. Денатурация – это переход ДНК из двухнитевой формы в однонитевую при разрыве водородных связей между комплементарными парами оснований под воздействием высоких температур (95 °С).

2. Отжиг – это присоединение праймеров к одноцепочечной ДНК-мишени. Праймеры подбирают так, что они ограничивают искомым фрагмент и комплементарны противоположным цепям ДНК. Температуру отжига подсчитывают для каждого праймера отдельно, а затем устанавливают наиболее низкую из пары праймеров.

3. Элонгация (синтез). После отжига праймеров ДНК-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера. Температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы фермента, которая с максимальной эффективностью начинает синтез второй цепи ДНК от 3'-конца праймера, связанного матрицей, и движется в направлении от 3' к 5' концу (как правило 72 °С). Эти три этапа многократно повторяются – 25 и более раз, в зависимости от количества ДНК матрицы.

Иногда в случае близкого значения температуры отжига праймеров и температуры оптимума работы фермента, становится возможным использовать двухэтапный ПЦР, совместив отжиг и элонгацию.

Проведение реакции

- 1) Приготовить ПЦР смесь:
 - 10x буфер для полимеразы (поставляется вместе с ферментом) – 2.5 мкл
 - ДНК полимеразы – 1 ед.активности
 - Смесь дНТФ (10 mM раствор каждого) – 0.5 мкл
 - Праймер прямой (for) (5 мкМ раствор) – 2 мкл
 - Праймер обратный (rev) (5 мкМ раствор) – 2 мкл
 - ДНК-матрица – 0.01 мкг
 - H₂O – до 25 мкл
- 2) Смесь смешать, сбросить на центрифуге, и поставить в амплификатор.
- 3) Примерная программа амплификации выглядит следующим образом:
 1. 95 °C – 4 мин (первичное плавление ДНК)
 2. 95 °C – 30 сек (плавление ДНК)
 3. 50* °C – 30 сек (отжиг праймеров, *-температура отжига рассчитывается по последовательности праймера)
 4. 72 °C – 60 сек** (синтез ДНК, ** - время элонгации рассчитывается исходя из длины синтезируемого фрагмента, 1000 п.о. в минуту).
 Повторять пункты 2-4 35 раз
5. 72 °C – 5 мин (достройка незаконченных цепей ДНК)

Таблица 4 – Последовательность праймеров для ряда генов антибиотикорезистентности

Названия праймеров	Последовательность	Устойчивость к антибиотику
Праймеры для генов антибиотикорезистентности <i>Staphylococcus aureus</i>		
mecA1 for mecA1 rew	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG CCACTTCATATCTTGTAAC	Бета-лактамы - пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы
ermA2 for ermA2 rew	TATCTTATCGTTGAGAAGGGATT CTACACTTGGCTTAGGATGAAA	Эритромицин (макролиды)
vanA3 for vanA3 rew	CATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA	Ванкомицин (гликопептиды)
msr(A/B)4 for msr(A/B)4 rew	GCAAATGGTGTAGGTAAGACAACCT ATCATCATGTGATGTAAACAAAAT	Эритромицин (макролиды)
Праймеры для генов антибиотикорезистентности <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
mexB for mexB rew	GTGTTCCGGCTCGCAGTACTC AACCGTCGGGATTGACCTTG	Бета-лактамы - пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы, фторхинолоны
mexD for mexD rew	CGAGCGCTATTTCGCTGC GGCAGTTGCACGTCGA	Карбапенемы, фторхинолоны

mexY for mexY rew	CCGCTACAACGGCTATCCCT AGCGGGATCGACCAGCTTTC	Аминогликозиды
ampC for ampC rew	CTGTTCGAGATCGGCTC CGGTATAGGTCGCGAG	Цефалоспорины IV поколения
aac(3)-IIa for aac(3)-IIa rew	ACTGTGATGGGATACGCGTC CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA	Аминогликозиды
aphA1 for aphA1 rew	ATGGGCTCGCGATAATGTC CTCACCGAGGCAGTTCCAT	Аминогликозиды III поколения
aadB for aadB rew	CGTCATGGAGGAGTTGGACT CGCAAGACCTCAACCTTTC	Аминогликозиды

2.5 Горизонтальный электрофорез в агарозном геле

1. Готовят 1×TBE в объеме, достаточном для заполнения камеры для электрофореза и приготовления геля.

2. Добавляют к 1×TBE агарозу в количестве, необходимом для получения 0.8 – 2% раствора, и нагревают в микроволновой печи до полного расплавления агарозы. 1% гель является относительно универсальным.

3. Охлаждают смесь до +/- 50 °С. За время охлаждения агарозы, подготавливают заливочный столик и кювету для электрофореза.

4. Добавляют к раствору агарозы краситель (см. пункт 2.3) и осторожно перемешивают, избегая появления в геле пузырьков воздуха.

5. Теплую агарозу выливают в кювету для геля и равномерно распределяют ее по кювете. Вертикально вставляют гребенку так, чтобы ее зубцы не доставали до дна примерно 1-1.5 мм.

6. Оставляют кювету с агарозным гелем на 30 мин, затем осторожно удаляют гребенку и липкую ленту. Кювету с гелем помещают в электрофорезную камеру, содержащую необходимое количество 1xTBE.

7. Подготавливают к электрофорезу образцы исследуемой и маркерной ДНК, для чего смешивают их с буфером для нанесения (5:1). Чтобы получить четкий сигнал при окрашивании бромистым этидием-EtBr, в лунку шириной 5 мм достаточно внести 200 нг маркерной ДНК. Для построения стандартной кривой необходимо использовать маркерные фрагменты, длина которых примерно равна длине исследуемой ДНК.

8. Осторожно вносят в лунки исследуемую и маркерную ДНК. Для повышения точности определения размера маркерную ДНК наносят по обе стороны от исследуемой.

9. Проводят электрофорез при градиенте напряженности 1–10 В на 1 см геля.

10. Просматривают гель в УФ-свете на трансиллюминаторе и фотографируют.

2.6 Окрашивание ДНК

При электрофорезе используется два типа красителей (лидирующие и флуоресцентные).

В качестве лидирующих красителей используют бромфеноловый синий, оранжевый G, крезоловый красный, ксиленцианол. Эти красители движутся в том же направлении что и ДНК, но с разной скоростью. Зная размер ДНК продукта, можно оценить его положение в геле по положению индикаторных красителей.

Для детекции ДНК в геле используются различные флуоресцентные красители, которые способны связываться с двуцепочечной ДНК и светиться в ультрафиолетовом свете. На сегодняшний день используются разные красители, которые различаются по чувствительности, стоимости и безопасности. Эти красители могут быть добавлены непосредственно в гель, и тогда гель сразу можно просматривать в трансиллюминаторе. Альтернативно, гель можно окрашивать после проведения электрофореза в водном растворе красителя. Так как все красители способны связываться с ДНК, они являются канцерогенами, и при работе с ними используются перчатки.

Бромистый этидий образует с фрагментами ДНК устойчивое соединение внедрения, проявляющееся в виде светящихся полос при облучении геля УФ-излучением с длиной волны 290-330 нм. Это вещество способно встраиваться в двухцепочечные молекулы ДНК и флуоресцировать под ультрафиолетовыми лучами. Бромистый этидий – сильный канцероген, способный проникать через кожу в организм, поэтому следует уделять особое внимание при работе с ним.

SYBR Green I является одним из наиболее чувствительных красителей, применяемых для детекции двуцепочечных молекул ДНК при электрофорезах в агарозных и полиакриламидных гелях. Чувствительность этого красителя приблизительно в 25 раз выше, по сравнению с бромистым этидием (EtBr). При использовании трансиллюминатора с длиной волны 300 нм, с помощью SYBR Green I может быть детектировано 60 пг двуцепочечной ДНК.

Midori Green относится к новому безопасному классу красителей, применяемых для визуализации двухцепочечных и одноцепочечных молекул ДНК, а также молекул РНК в агарозном геле. Эти красители нового поколения пришли на смену токсичному бромистому этидию. Modori Green используется с голубым светом в гельдокументирующих системах, а также с обычными ультрафиолетовыми трансиллюминаторами. Пики длины волны возбуждения при этом получаются 290 нм и 490 нм, пик эмиссии – 530 нм. Краситель Midori Green Direct не является канцерогеном и в гораздо меньшей степени обладает мутагенными свойствами, чем бромистый этидий.

Приложение 1. Составы питательных сред и растворы

LB питательная среда – Лизогенная среда [Sambrook *et al.*, 1989]

Компоненты, г	100 мл	150 мл	200 мл	500 мл	1000 мл
Триптон	1	1.5	2.0	5.0	10.0
Дрожжевой экстракт	0.5	0.75	1.0	2.5	5.0
NaCl	0.5	0.75	1.0	2.5	5.0
H ₂ O	95.3	143	190.7	476.5	953.0

Среда BM (BM-medium) [Каюмов *et al.*, 2015]

Компоненты, г	100 мл	500 мл	1000 мл
Пептон	0.7	3.5	7
Глюкоза	0.5	2.5	5
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.2	1	2
CaCl ₂	0.005	0.025	0.05

Среда MH (Мюллера-Хинтона)

Компоненты, г	100 мл	500 мл	1000 мл
Мясной настой	8.92	44.6	89.2
Гидролизат казеина	0.52	2.6	5.2
Крахмал	0.04	0.2	0.4

pH 7.4±0.2

Среда TSB (Триптон соевая)

Компоненты, г	100 мл	500 мл	1000 мл
Гидролизат казеина	5.67	28.35	56.7
Папаиновый перевар соевой муки	1.0	5.0	10.0
Натрия хлорид	1.67	8.35	16.7
Калия гидрофосфат	0.83	4.15	8.3
Глюкоза	0.83	4.15	8.3

pH 7.3 ± 0.2

ЭНДО агар (питательная среда для выделения энтеробактерий)

ВФС - 42-3110-98, 2015:

Компоненты, г	100 мл	500 мл	1000 мл
Сухой питательный агар	2.65	13.25	26.5
ЭКДА	0.122	0.61	1.22
Фуксин основной	0.023	0.115	0.23
Сахар молочный	1.07	5.35	10.7
Динатрия фосфат	0.048	0.24	0.48
Натрия сульфат безводный	0.083	0.415	0.83
Натрий углекислый	0.003	0.015	0.03

pH 7.3 ± 0.2

- 1) Компоненты растворить в воде
- 2) Кипятить 3-5 мин, не допуская пригорания, с закрытой пробкой
- 3) Фильтровать через ватно-марлевый фильтр
- 4) Довести до кипения
- 5) Среду остудить до 45-50 °С и разлить в стерильные чашки Петри слоем 4-5 мм.
- 6) Энтеробактерии, сбраживающие лактозу, в процессе брожения выделяют муравьиную кислоту, которая даёт цветную реакцию с реактивами на альдегиды, в том числе и с фуксинсернистой кислотой с образованием свободного фуксина, в результате чего их колонии окрашиваются в малиново-красный цвет с металлическим блеском или без него. Колонии бактерий, не сбраживающих лактозу, имеют белый или слабо-розовый цвет (цвет питательной среды).

Маннитол-солевая среда (Среда для культивирования стафилококков)

Компоненты, г	100 мл	500 мл	1000 мл
Пептон	1	5	10
Дрожжевой экстракт	0.1	0.5	1
NaCl	7.5	37.5	75
D-маннитол	1	5	10
Агар-агар	2	10	20

Цетримидный агар (среда для селективной идентификации *P. aeruginosa*)

Компоненты, г	100 мл	500 мл	1000 мл
Пептон из желатина	2	10	20
Хлористый магний	0.14	0.7	1.4
Сульфат калия	1	5	10
N-цетил-N,N,N-триметил-аммониум-бромид (цетримид)	0.03	0.15	0.3
Агар-агар	1.5	7.5	15

Селективный агар для энтерококков (ВАА)

Компоненты, г	100 мл	500 мл	1000 мл
Триптон	2	10	20
Дрожжевой экстракт	0.5	2.5	5
NaCl	0.5	2.5	5
Цитрат железа аммония	0.05	0.25	0.5
Эскулин	0.1	0.5	1
Азид натрия	0.055	0.275	0.55
Цитрат натрия	0.1	0.5	1
Бычья желчь	2	10	20
Агар-агар	1	5	10

Растворы

1. Буфер ТЕ. 10мМ Tris–HCl, pH 8.0; 1мМ ЭДТА.
2. Насыщенный буфером фенол. В большинстве случаев фенол высокой степени чистоты можно использовать без дополнительной перегонки. Расплавляют фенол при 65 °С в присутствии равного объема 0.1 М трис-HCl, pH 7.8-8.0, содержащего 0.2% 2- меркаптоэтанола (2-МЭ) (ядовит, летуч!, работать под тягой!). Когда фенол полностью расплавится, тщательно перемешивают смесь, отбирают насыщенный фенол (жидкий, нижняя фаза). В таком виде фенол может храниться при 4 °С до 1 месяца, замороженный при -20 °С - в течение нескольких месяцев.
3. Смесь фенол–хлороформ-изоамиловый спирт. Водонасыщенный фенол, хлороформ и изоамиловый спирт смешивают в пропорции 25:24:1 по объему.

4. 10% SDS
5. 2M NaCl
6. 10 mM Трис HCl pH 8.0
7. Раствор I: 50 mM глюкозы, 10 mM ЭДТА, 25 mM трис-HCl, pH 8.0, РНКаза А
8. Раствор II: 0.2M NaOH и 1% SDS, смешать 1 мл 2M NaOH, 1 мл 10% SDS и 8 мл деионизованной воды
9. Раствор III: 3 M ацетат калия, 5M уксусная кислота (29 г ацетата калия, 11 мл ледяной уксусной кислоты и 60 мл воды)
10. Раствор лизоцима в 10mM Tris-HCl, 20 мг/мл, хранить при -18 °С.
11. 10-кратный буфер для «внесения» в лунку геля: 1 мл 2х-кратный TBE или TAE буфер, 200 мкл 10% SDS, 600 мкл глицерина, 200 мкл воды, крупинка бромфенолового синего
12. 10×TBE буфер (Tris-Borate-EDTA): 108 г Трис основного, 55 г борной кислоты, 9.3 г ЭДТА натриевой соли, довести до 1 литра деионизованной водой. pH 8.3 и не требует доведения.
13. 50×TAE , (Tris-Acetate-EDTA): 242 г Трис основного, 57.1 мл ледяной уксусной кислоты, 100 мл 0.5M EDTA, довести до 1 литра деионизованной водой. Довести pH до 8.5. TAE буфер при нагревании (в отличие от TBE) "неустойчив" и чтобы все было в порядке, следует агарозу растворять в воде, а потом в этот раствор добавлять TAE (50×).
14. Агароза: для 1% геля - смешать 100 мл воды и 1 грамм агарозы в стеклянной посуде. Доведите раствор до кипения в микроволновой печи при высокой мощности. Вытащите сосуд из печи и размешайте до ресуспендирования осевшей агарозы. Охладите до температуры, комфортной для дальнейшей работы. В мерном цилиндре доведите объем дистиллированной водой до 100 мл. В форму для геля установите гребенку под будущие лунки. Влейте охлажденную агарозу в форму.
15. 6x буфер для внесения в лунку геля: 0.25% бромфеноловый синий, 0.25% ксиленцианол, 40% сахара или 40% глицерин в 1x TBE.
16. Бромистый этидий EtBr: для внесения в гель 10 мг/мл в стерильной дистиллированной воде. Для окрашивания гелей 0.1 мг/мл в дистиллированной воде.

Приложение 2. Растворители и разбавители, используемые для приготовления основных растворов антибактериальных препаратов

Антибиотик	Растворитель	Разбавитель
Ампициллин	Фосфатный буфер 0.1 моль/л рН 8.0	Фосфатный буфер 0.1 моль/л рН 6.0
Амоксициллин	Фосфатный буфер 0.1 моль/л рН 6.0	Фосфатный буфер 0.1 моль/л рН 6.0
Азитромицин	95%-ный этанол или ледяная уксусная кислота	Питательная среда
Азтреонам	Натрия бикарбонат насыщенный раствор	Вода
Цефазолин	Фосфатный буфер 0.1 моль/л рН 6.0	Фосфатный буфер 0.1 моль/л рН 6.0
Цефалотин	Фосфатный буфер 0.1 моль/л рН 6.0	Вода
Цефуроксим	Фосфатный буфер 0.1 моль/л рН 6.0	Вода
Цефтазидим	Натрия карбонат	Вода
Цефепим	Фосфатный буфер 0.1 моль/л рН 6.0	Фосфатный буфер 0.1 моль/л рН 6.0
Имипенем	Фосфатный буфер 0.01 моль/л рН 7.2	Фосфатный буфер 0.01 моль/л рН 7.2
Азитромицин	95%-ный этанол или ледяная уксусная кислота	Питательная среда
Эритромицин	95%-ный этанол или ледяная уксусная кислота	Вода
Кларитромицин	95%-ный этанол или ледяная уксусная кислота	Фосфатный буфер 0.1 моль/л рН 6.5
Хлорамфеникол	95%-ный этанол	Вода
Налидиксовая кислота Эноксацин Норфлоксацин Офлоксацин Левифлоксацин	1/2 объема воды. затем добавлять по каплям 0.1 моль/л раствор NaOH до растворения	Вода
Нитрофурантоин	Фосфатный буфер 0.1 моль/л рН 8.0	Фосфатный буфер 0.1 моль/л рН 8.0
Рифампин	Метанол	Вода
Сульфаниламиды	1/2 объема горячей воды и минимальное количество 2.5 моль/л раствора NaOH	Вода
Триметоприм	0.05 N раствор соляной к-ты до 10% от конечного объема	Вода

Приложение 3. Интерпретация значений диаметров зон задержки роста при определении чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам диско-диффузионным методом на среде Мюллера-Хинтон, согласно рекомендации CLSI, 2005 и EUCAST, 2020

№ п/п	Антимикробный препарат и его концентрация в диске	Диаметры (в мм) зон подавления роста культур		
		уст-ойч. R	про-межут. I	чув-ствит. S
1.	Азитромицин 15 мкг	≤13	14-17	≥18
2.	Азлоциллин 75 мкг (для <i>P. aeruginosa</i>)	≤17	-	≥18
3.	Азтреонам 30 мкг	≤15	16-21	≥22
4.	Амикацин 30 мкг	≤14	15-16	≥17
5.	Амоксициллин 20 мкг для энтеробактерий для энтерококков для стафилококков	- - -	- - -	- - -
6.	Амоксициллин 20 мкг с клавул. к-той 10 мкг для стафилококков для др. микроорг-мов	≤19	-	≥20
		≤13	14-17	≥18
7.	Ампициллин 10 мкг для стафилококков для энтеробактерий для энтерококков	≤28	-	≥29
		≤13	14-16	≥17
		≤16	-	≥17
8.	Ампициллин с сульбактамом 10 мкг/10 мкг	≤11	12-14	≥15
9.	Бензилпенициллин 10ЕД для стафилококков ¹ для энтерококков	<26	-	≥26
		≤14	-	≥15
10.	Ванкомицин 30 мкг для энтерококков ² для стафилококков	<12	-	≥12
		≤15	-	≥16
11.	Гатифлоксацин 5 мкг	≤14	15-17	≥18

12.	Гентамицин 10 мкг	≤12	13-14	≥15
13.	Гентамицин 120 мкг для энтерококков	-	7-9	≥10
14.	Доксициклин 30 мкг	≤12	13-15	≥16
15.	Имипенем 10 мкг	≤13	14-15	≥16
16.	Канамицин 30 мкг	≤13	14-17	≥18
17.	Карбенициллин 100 мкг для <i>P. aeruginosa</i>	≤11	12-14	≥15
18.	Кларитромицин 15 мкг	≤13	14-17	≥18
19.	Клиндамицин 2 мкг	≤14	15-20	≥21
20.	Левомецетин 30 мкг	≤12	13-17	≥18
21.	Левофлоксацин 5 мкг	≤13	14-16	≥17
22.	Линезолид 30 мкг для стафилококков	≤20	-	≥21
23.	Ломефлоксацин 10 мкг	≤18	19-21	≥22
24.	Меропенем 10 мкг	≤13	14-15	≥16
25.	Моксифлоксацин для стафилококков	≤20	21-23	≥24
26.	Моксифлоксацин для <i>S. pneumoniae</i> *	≤14	15-17	≥18
27.	Налидиксовая кислота 30 мкг	≤13	14-18	≥19
28.	Неомицин 30 мкг	≤13	14-18	≥19
29.	Нетилмицин 30 мкг	≤12	13-14	≥15
30.	Норфлоксацин 10 мкг	≤12	13-16	≥17
31.	Оксациллин 1 мкг для <i>S. aureus</i>	≤10	11-12	≥13
32.	Офлоксацин 5 мкг	≤12	13-15	≥16
33.	Пефлоксацин 10 мкг	≤18	19-21	≥22
34.	Пиперациллин 100 мкг для <i>P. aeruginosa</i> для энтеробактерий и ацинетобактеров	≤17 ≤17	- 18-20	≥18 ≥21

35.	Рифампицин 5 мкг для стафилококков	≤16	17-19	≥20
36.	Рокситромицин 30 мкг	≤14	15-18	≥19
37.	Спарфлоксацин 5 мкг для стафилококков	≤15	16-18	≥19
38.	Спарфлоксацин для <i>S. pneumoniae</i> *	≤15	16-18	≥19
39.	Стрептомицин 30 мкг для энтеробактерий	≤11	12-14	≥15
40.	Стрептомицин 300 мкг для энтерококков	-	7-9	≥10
41.	Тетрациклин 30 мкг	≤14	15-18	≥19
42.	Тикарциллин 75 мкг для <i>P. aeruginosa</i> для грамотрицательных бактерий	≤14 ≤14	- 15-19	≥15 ≥20
43.	Тикарциллин 75 мкг с клавулановой кислотой 10 мкг для <i>P. aeruginosa</i> , для энтеробактерий и ацинетобактеров, для стафилококков	≤14 ≤14 ≤22	- 15-19 -	≥15 ≥20 ≥23
44.	Тилозин 15 мкг для стафилококков	≤13	14-20	≥21
45.	Тобрамицин 10 мкг	≤12	13 -14	≥15
46.	Триметоприм / сульфаметоксазол 1.25 мкг / 23.75 мкг	≤10	11 -15	≥16
47.	Фосфомицин 200 мкг для энтеробактерий	≤12	13-15	≥16
48.	Фурадонин 300 мкг (нитрофурантоин)	≤14	15-16	≥17
49.	Цефазолин 30 мкг	≤14	15-17	≥18
50.	Цефаклор 30 мкг	≤14	15-17	≥18
51.	Цефалотин 30 мкг	≤14	15-17	≥18
52.	Цефамандол 30 мкг	≤14	15-17	≥18
53.	Цефепим 30 мкг	≤14	15-17	≥18

54.	Цефиксим 5 мкг	≤15	16-18	≥19
55.	Цефоперазон 75 мкг	≤15	16-20	≥21
56.	Цефоперазон/ сульбактам для энтеробактерий	≤16	17-19	≥20
57.	Цефоперазон/ сульбактам для <i>P.aeruginosa</i>	≤15	16-19	≥20
58.	Цефоперазон/ сульбактам для <i>S. aureus</i> (для метициллинчувствительных штаммов)	≤12	13-17	≥18
59.	Цефокситин	≤14	15-17	≥18
60.	Цефотаксим 30 мкг	≤14	15-22	≥23
61.	Цефтазидим 30 мкг	≤14	15-17	≥18
62.	Цефтибутен 30 мкг	≤17	18-20	≥21
63.	Цефтриаксон 30 мкг	≤13	14-20	≥21
64.	Цефуроксим 30 мкг	≤14	15-17	≥18
65.	Ципрофлоксацин 5 мкг	≤15	16-20	≥21
66.	Энрофлоксацин 5 мкг	≤17	18-21	≥22
67.	Эритромицин 15 мкг для стафилококков	≤13	14-22	≥23
68.	Эртапенем 10 мкг	≤15	16-18	≥19
69.	Гемифлоксацин 5 мкг	≤15	16-19	≥20

* Данные для среды Мюллера-Хинтон с добавлением 5% дефибринированной бараньей крови.

¹ Для *S. aureus* диско-диффузионный метод является более надежным способом определения продуцентов пенициллиназы по сравнению с определением МПК. Если диаметр зоны подавления роста <26 мм, штамм считается устойчивым. Если диаметр зоны ≥26 мм и край зоны четкий, то штамм считается устойчивым. Если край размытый, то штамм относят к чувствительным (Рисунок S1).

² Чувствительные к ванкомицину энтерококки образуют зоны с четкими контурами и не формируют колонии в зоне подавления роста. Если диаметр зоны ≥ 12 мм, но при этом край зоны расплывчатый, имеются колонии в зоне подавления роста, то либо нужно уточнить результат методом ПЦР, либо отнести штамм к устойчивым. Оценку результатов нужно проводить не ранее чем через 24 часа после инокуляции (Рисунок S2).

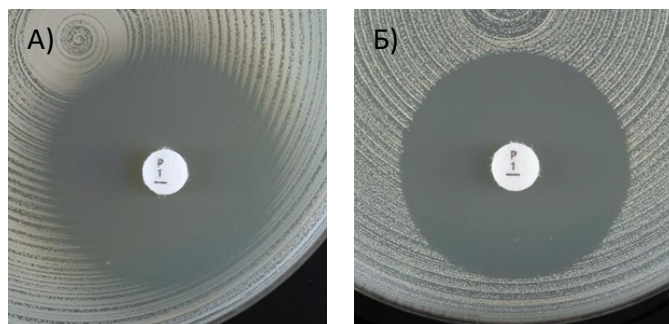


Рисунок S1 – Интерпретация результатов определения отношения *Staphylococcus aureus* к бензилпенициллину диско-диффузионным методом. А) Размытый край зоны и диаметр ≥ 26 мм – заключение «чувствительный». Б) Четкий край зоны и диаметр ≥ 26 мм – заключение «устойчивый».

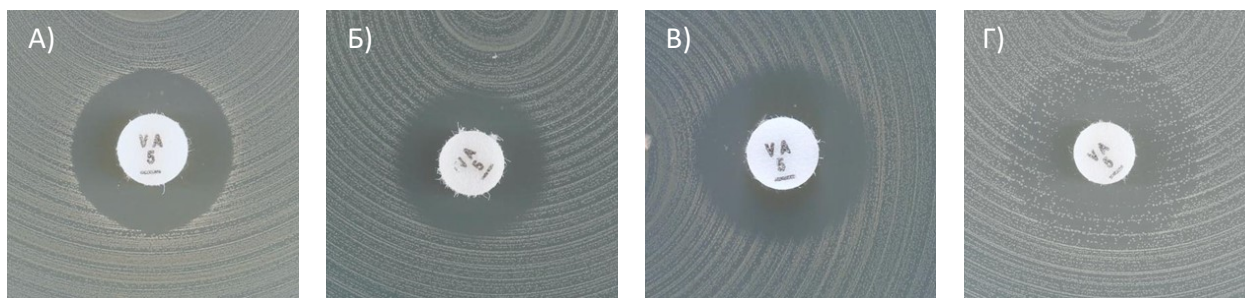


Рисунок S2 – Интерпретация результатов определения отношения *Enterococcus* spp. к ванкомицину диско-диффузионным методом. А) Четкий край зоны и диаметр ≥ 12 мм – заключение «устойчивый». Б-Г) но при этом Край зоны расплывчатый или имеются колонии в зоне подавления роста, даже если при этом диаметр зоны подавления роста ≥ 12 мм, результат следует уточнить методом ПЦР или отнести штамм к устойчивым.

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Клец, О.П. Антибиотики: учебное пособие для студентов всех факультетов / О.П. Клец, Л.Н. Минакина // –2013. –С.43-72.
2. Коржевский, Д.Э. Молекулярная морфология. Методы флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии / Д. Э. Коржевский, О. В. Кирик, Е. Г. Сухорукова [и др.]; под ред. Д. Э. Коржевского // Санкт-Петербург : СпецЛит. – 2014. — 111 с.
3. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова // М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
4. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (МУК 4.2.1890-04). Клинический Микробиологический Журнал Антимикробной Химиотерапии 2004; 6: 4: 306–359.
5. Основы электрофореза. Режим доступа http://www.ibmc.msk.ru/content/Education/w-o_pass/ММoB/18a.pdf
6. Сидоренко, С. В. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам [Текст] / С. В. Сидоренко, В. И. Тишков // Успехи биологической химии. –2014. – Т. 44. – №. 2. –С.263-330.
7. den Hollander, J.G. Use of pharmacodynamic parameters to predict efficacy of combination therapy by using fractional inhibitory concentration kinetics / J.G. den Hollander, J.W. Mouton, H.A. Verbrugh // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. — 1998. — V. 42(4). — P.744-748.
8. Herigstad B. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria / B. Herigstad, M. Hamilton, J. Heersink // Journal of Microbiological Methods. – 2001. – V. 44. – P. 121-129.
9. Hughes D. Environmental and genetic modulation of the phenotypic expression of antibiotic resistance [Text] / Hughes D., Andersson D. I. // FEMS Microbiology Reviews. – 2017. – Т.41. – №. 3. – С. 374-391.
10. Kapuscinski, J. DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe // Biotechnic & Histochemistry. – 1995. – V. 70. – P. 220—233.
11. Kayumov A.R. Inhibition of biofilm formation in *Bacillus subtilis* by new halogenated furanones / A.R. Kayumov, E. Khakimullina, I. Sharafutdinov, E. Trizna, L. Latypova, Thi Lien, A. Margulis, M.Bogachev, A. Kurbangalieva // J. Antibiotics. – 2015. – V.68, №5. – P.297-301.
12. Locher, H.H. Investigations of the Mode of Action and Resistance Development of Cadazolid, a New Antibiotic for Treatment of *Clostridium difficile* Infections / H.H. Locher, P. Caspers, T. Bruyere, S. Schroeder, P. Pfaff, A. Knezevic, W. Keck, D. Ritz // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. — 2014. — V.58(2). — P.901-908.
13. Munita J. M. Mechanisms of Antibiotic Resistance [Text] / Munita J. M., Arias C. A. //Microbiology spectrum. – 2016. –Т.4. – №.2.

14. Neto, B. A. D. Selective mitochondrial staining with small fluorescent probes: importance, design, synthesis, challenges and trends for new markers / B. A. D. Neto, J. R. Correa, R. G. Silva, // RSC Advances. – 2013. – V. 3. – P. 5291-5301.
15. Odds, F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them / F.C. Odds // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. — 2003. — T.52(1). — C.1-1.
16. Sambrook J., Russel D. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. (v.1), Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
17. Schroeder M. The Complex Relationship between Virulence and Antibiotic Resistance / Schroeder M., Brooks B. D., Brooks A. E // J Genes. – 2017. –T.8. – №. 1. – C. 39-67.
18. Sharafutdinov I.S. Antimicrobial Effects of Sulfonyl Derivative of 2 (5H)-Furanone against Planktonic and Biofilm Associated Methicillin-Resistant and Susceptible *Staphylococcus aureus* [Text] / I.S. Sharafutdinov, E.Y. Trizna, D.R. Baidamshina, M.N. Ryzhikova, R.R. Sibgatullina, A.M. Khabibrakhmanova, L.Z. Latypova, A.R. Kurbangalieva, E.V. Rozhina, M. Klinger-Strobel, R.F. Fakhrullin, M.W. Pletz, M.I. Bogachev, A.R. Kayumov, O. Makarewicz // Frontiers in microbiology. – 2017. – V.8. – P. 2246.
19. Steven Y. C. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management [Text] / Steven Y. C., Tonga S., Joshua D., Eichenberger E., Thomas L., Hollandband T. // J Microbiol. Rev. –2015.
20. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents / European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) // EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.Def 1.2. – 2000. – P. 1-6.
21. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020. <http://www.eucast.org>
22. Vandenesch F. The end of the controversy: Panton Valentine is the culprit [Text] / Vandenesch F., Lina G., Gillet Y. // J Med. Sci (Paris). –2009. –P.984–996.
23. Yarmoluk, S. M. Symmetric cyanine dyes for detecting nucleic acids / S. M. Yarmoluk, V. B. Kovalska, M. Y. Losytsky // Biotechnic & Histochemistry. – 2008. – V. 83. – P. 131–145.