

важным направлением для развития и обеспечения более эффективной защиты общественного здоровья.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Тенденции в многолетней динамике заболеваемости населения острыми кишечными инфекциями и эпидемиологические особенности вспышек в последние годы / В.И. Сергеев, Е.Ж. Кузовникова, М.А. Трясолобова, Ю.И. Ладейщикова // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2015. – Т. 4, № 20. – С. 17–21.
2. Bacteria Associated with Healthcare–Associated Infections on Environmental Samples Obtained from Two Fire Departments. / K. L. Barr, R. X. Sturdivant, D. N. Williams, D. Harris // International journal of environmental research and public health. – 2021. – Vol. 18, № 22. – P 11885.
3. The lower respiratory tract microbiome of critically ill patients with COVID–19 / Gaibani P., Viciani E., Bartoletti M. [et al.] // Scientific reports. – 2021. – Т. 11, №. 1. – P. 10103.
4. SARS–CoV–2 and the role of fomite transmission: a systematic review / I.J.Onakpoya, C.J. Heneghan, E.A. Spencer [et al.] // F1000Research. – 2021. – Vol. 10. – P. 233.
5. Послова, Л.Ю. Оценка контаминации больничной среды кишечными вирусами в рамках эпидемиологического надзора за острыми кишечными инфекциями вирусной этиологии / Л.Ю. Послова, А.В. Сергеева, О.В. Ковалишена // Медицинский альманах. – 2018. – Т. 4, № 55. – С. 42–46.
6. 16S rRNA amplicon sequencing and antimicrobial resistance profile of intensive care units environment in 41 Brazilian hospitals / D.C.de Bastiani, C.V. Silva, A.P. Christoff [et al.] // Frontiers in Public Health. – 2024. – Т. 12. – С. 1378413.

Сведения об авторах

Д.Д. Авдюнин* – младший научный сотрудник

С.С. Смирнова – старший научный сотрудник

Information about the authors

D.D. Avdyunin* – Researcher

S.S. Smirnova – Senior Researcher

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

Avdyunin_dd@niivirom.ru

УДК: 615.339

ВОЗМОЖНОСТИ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ УРОПАТОГЕННЫХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Аминева Полина Геннадьевна^{1,2}, Сац Ольга Александровна¹, Ставровская Софья Александровна¹, Костенев Ярослав Алексеевич¹, Ворошилина Екатерина Сергеевна¹

¹Кафедра медицинской микробиологии и клинической лабораторной диагностики
ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

²ООО «Кволити Мед»

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Идентификация уропатогенных бактерий имеет решающее значение для подтверждения бактериальной инфекции мочевой системы и для подбора адекватной антимикробной терапии. Клиническим лабораториям становятся доступными более быстрые, экономически эффективные и надежные методы идентификации бактерий по сравнению с традиционными способами. **Цель исследования** – провести сравнительную оценку разных методов идентификации уропатогенных бактерий. **Материал и методы.** Проведена идентификация 15 штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных от пациентов с инфекциями мочевыводящих путей. Использованы несколько инструментов идентификации: посев на хромогенную среду, автоматизированная система на основе биохимических тестов, MALDI–TOF масс–спектрометрия и ПЦР. **Результаты.** При сопоставлении результатов идентификации бактерий выявлено полное совпадение идентификации всеми методами на родовом и видовом уровне в 60% случаев (9 штаммов). В 6 случаях (40%) – баканализатор выдал неверный результат идентификации или идентификация не была выполнена. Среднее время идентификации на баканализаторе составило 7,08±1,57 часов, среднее время идентификации методом масс–спектрометрии – 12,3±1,3 минут, методом ПЦР – около 2 часов. **Выводы.** Проведенное исследование показало совпадение результатов идентификации грамотрицательных уропатогенных бактерий на уровне рода/вида в 100% случаев методами масс–спектрометрии и ПЦР, результаты биохимической идентификации совпали с этими двумя методами только в 60% случаев. Использование хромогенных сред обеспечивает высокую чувствительность в случае выделения E.coli.

Ключевые слова: идентификация, MALDI–TOF масс–спектрометрия, ПЦР, хромогенные среды, биохимическая идентификация.

POSSIBILITIES OF MODERN METHODS OF IDENTIFICATION OF PATHOGENIC GRAM–NEGATIVE BACTERIA

Amineva Polina Gennadievna^{1,2}, Sats Olga Alexandrovna¹, Stavrovskaya Sofya Alexandrovna¹, Kostenev Yaroslav Alekseevich¹, Voroshilina Ekaterina Sergeevna¹

¹The Department of Medical Microbiology and Laboratory Diagnostics

Ural State Medical University

² LLC "Quality Med"

Ekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Identification of uropathogenic bacteria is crucial for confirmation of bacterial infection of the urinary system and for selection of adequate antimicrobial therapy. Faster, more cost-effective and reliable methods of bacterial identification are becoming available to clinical laboratories compared to traditional methods. **The aim of the study** is to carry out a comparative assessment of different methods of identification of pathogenic bacteria. **Material and methods.** 15 strains of gram-negative bacteria isolated from patients with urinary tract infections were identified. Several identification tools were used: chromogenic medium seeding, an automated system based on biochemical tests, MALDI-TOF mass spectrometry and PCR. **Results.** When comparing the results of bacterial identification, a complete coincidence of identification by all methods at the generic and species level was revealed in 60% of cases (9 strains). In 6 cases (40%) – the tank analyzer returned an incorrect identification result or identification was not performed. The average identification time on the bakalyzer was 7.08 ± 1.57 hours, the average identification time by mass spectrometry was 12.3 ± 1.3 minutes, and by PCR was about 2 hours. **Conclusions.** The study showed a coincidence of the results of identification of gram-negative uropathogenic bacteria at the genus/species level in 100% of cases by mass spectrometry and PCR, the results of biochemical identification coincided with these two methods only in 60% of cases. 387The use of chromogenic media ensures high sensitivity in the case of E.coli isolation.

Keywords: identification, MALDI-TOF mass spectrometry, PCR, chromogenic media, biochemical identification.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) являются значимым по распространенности типом инфекции у людей. Более 60% ИМП у амбулаторных пациентов вызваны *Escherichia coli*, среди других энтеробактерий выделяются *Klebsiella pneumoniae* в 12,3% случаев, *Proteus mirabilis* – 4,2 %, *Pseudomonas aeruginosa* – 3,6, *Enterobacter cloacae* – 1,8, *Morganella morganii* – 1%, *Klebsiella oxytoca* – 1% [1]. В тоже время возбудитель ИМП, связанных с оказанием медицинской помощи, являются менее предсказуемым. Согласно AMRmap (система мониторинга антибиотикорезистентности) в России среди нозокомиальных ИМП лидирует *Escherichia coli* – 28,5%, *Klebsiella pneumoniae* – 26,3%, *Pseudomonas aeruginosa* – 13,8%, *Acinetobacter baumannii* – 4,26%, *Proteus mirabilis* – 4,04%, *Enterobacter cloacae* – 2,47%, *Klebsiella oxytoca* – 1,17%, *Serratia marcescens* – 0,9% [1].

Идентификация уропатогенных бактерий имеет решающее значение для подтверждения бактериальной инфекции мочевой системы и для подбора адекватной антимикробной терапии. Для получения окончательных результатов при этом требуется от 24 до 36 часов после изоляции культуры с использованием традиционных подходов. Клиническим лабораториям становятся доступными более быстрые, экономически эффективные и надежные методы идентификации бактерий. Существуют автоматизированные и полуавтоматизированные системы, а также бактериологические анализаторы, принцип идентификации в которых основан на определении биохимических свойств. Также на рынке доступны современные хромогенные среды для первичного посева биоматериала, которые позиционируются как инструменты для видовой/родовой идентификации и используются взамен селективных сред предыдущего поколения (таких как среда Эндо, Мак–Конки). Хромогенные среды включают хромогенные субстраты для выявления специфических ферментативных активностей микроорганизмов, характерных для группы или отдельного вида микроорганизмов. Исследуемый микроорганизм содержит фермент, который метаболизирует бесцветный хромогенный субстрат, образуя окрашенный продукт реакции. Хромогенная среда контрастно изменяет свой цвет при обнаружении исследуемого микроорганизма.

Сравнительно новым методом идентификации является метод белкового профилирования с использованием масс-спектрометрии. Показано, что масс-спектральные паттерны уникальны для каждого микроорганизма и эти данные используются для идентификации. Основные спектральные профили, которые представляют собой

схематизированные масс– спектральные паттерны тысяч известных стандартных штаммов, регистрируются в базе данных, и полученные масс– спектры штаммов– образцов сравниваются с таковыми у известных стандартных штаммов.

Идентифицировать микроорганизмы можно применяя молекулярно– генетические методы (в частности, полимеразную цепную реакцию (ПЦР)). В основе ПЦР – амплификация консервативных генов микроорганизма, или генов рибосомальной ДНК, с последующим обнаружением видоспецифичных последовательностей в продукте амплификации.

Часто в практической практике лабораторий встает вопрос, какие методы идентификации оптимально использовать, чтобы обеспечить получение быстрого и качественного ответа для клинического врача.

Цель исследования – провести сравнительную оценку разных методов идентификации уropатогенных бактерий: с использованием хромогенных сред, автоматизированной системы, MALDI– TOF масс– спектрометрии и ПЦР.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включили 15 штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных от пациентов с ИМП. Тестирование проводили в лаборатории ООО «Кволити Мед». Пробы мочи от пациентов доставляли в лабораторию в вакуумных пробирках с борной кислотой. Посев осуществляли калиброванной стерильной петлей 10 мкл, на чашки Петри с хромогенной средой UriSelect4 (Bio– Rad, Франция) и агар с 5% кровью барана (основа колумбийского агара (Bio– Rad, Франция) и кровь барана (ООО «КволитиМикроТех», Россия). Инкубировали в термостате при температуре $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ в течении 18– 20 часов.

На второй день оценивали морфологию и цвет колоний на питательных средах, проводили тест на β – галактозидазную активность, на продукцию индола при необходимости. Проводили идентификацию при помощи баканализатора Vitek2 (BioMerieux, Франция), а также методом MALDI– TOF масс– спектрометрии (время пролетная матрично– ассоциированная лазерная десорбционная ионизационная масс– спектрометрия) на приборе Vitek MS (BioMerieux, Франция). Для этого бактериальную массу наносили на спот слайда, покрывали 1 мкл матрицы (α – циано– 3– гидроксикоричная кислота), высушивали при комнатной температуре, далее считывали прибором масс– спектры рибосомных белков и сравнивали с базой данных с использованием программного обеспечения Myla (BioMerieux, Франция).

Выделение ДНК из исследуемого материала проводили с использованием наборов реагентов «Проба– рапид» (ООО «ДНК– технология») в соответствии с инструкцией производителя. ПЦР проводили с использованием набора реагентов «БакСкринУПМ» на амплификаторах ДТ– прайм (ООО «ДНК– технология») в соответствии с инструкцией производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты идентификация штаммов уropатогенных грамотрицательных бактерий представлены в таблице (Таблица 1).

Таблица 1.

Результаты идентификация штаммов уropатогенных бактерий разными методами (n=15)

Порядковый номер штамма	Идентификация на масс– спектрометре	Морфология на хромогенной среде	Идентификация на баканализаторе	Идентификация методом ПЦР
1	<i>Enterobacter cloacae/Enterobacter asburiae</i>	Сине– фиолетовые колонии (Группа KESC)	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
2	<i>Serratia marcescens</i>	Сине– фиолетовые колонии (Группа KESC)	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Бледно– желтые колонии с	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

		металлическим оттенком		
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Сине– фиолетовые колонии (Группа KESC)	Нет идентификации	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Сине– фиолетовые колонии (Группа KESC)	Нет идентификации	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
6	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Сине– фиолетовые колонии (Группа KESC)	Нет идентификации	<i>Klebsiella pneumoniae</i> + <i>Klebsiella oxytoca</i>
7	<i>Serratia marcescens</i>	Сине– фиолетовые колонии (Группа KESC)	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
8	<i>Proteus vulgaris</i>	Оранжево– коричневые колонии (Группа PMP)	<i>Rodentibacter pneumotropicus</i>	<i>Proteus spp</i>
9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Сине– фиолетовые колонии (Группа KESC)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
10	<i>Escherichia coli</i>	Розовые колонии (<i>Escherichia coli</i>)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Сине– фиолетовые колонии (Группа KESC)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Сине– фиолетовые колонии (Группа KESC)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
13	<i>Proteus vulgaris</i>	Оранжево– коричневые колонии (Группа PMP)	<i>Proteus penneri</i>	<i>Proteus spp</i>
14	<i>Morganella morganii</i>	Оранжево– коричневые колонии (Группа PMP)	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<i>Morganella morganii</i>
15	<i>Escherichia coli</i>	Розовые колонии (<i>Escherichia coli</i>)	Нет идентификации	<i>Escherichia coli</i>

Примечание: Группа KESC – бактерии родов *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*; Группа PMP – бактерии родов *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*.

При сопоставлении результатов идентификации бактерий выявлено полное совпадение идентификации всеми методами на родовом и видовом уровне в 60% случаев (9 штаммов). В 6 случаях (40%) – баканализатор выдал неверный результат идентификации или идентификация не была выполнена. Результаты идентификации методом масс–спектрометрии и ПЦР на уровне рода/вида совпали в 100% случаев.

В исследовании идентифицированы следующие виды бактерий: 2 штамма *Escherichia coli*, 5 штаммов *Klebsiella pneumoniae*, 1 штамм *Morganella morganii*, 1 штамм *Klebsiella oxytoca*, 1 штамм *Enterobacter cloacae*, 2 штамма *Proteus vulgaris*, 1 штамм *Pseudomonas aeruginosa*, 2 штамма *Serratia marcescens*. *Morganella morganii* неверно идентифицирована на баканализаторе как *Acinetobacter haemolyticus*, *Proteus vulgaris* в одном случае неверно идентифицирован как *Rodentibacter pneumotropicus*, в другом – как *Proteus penneri*.

Среднее время идентификации на баканализаторе составило 7,08±1,57 часов, среднее время идентификации методом масс–спектрометрии – 12,3±1,3 минут, методом ПЦР – около 2 часов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Хромогенная среда для уropатогенных бактерий обладает хорошей специфичностью в отношении идентификации *Escherichia coli*. Незначительная часть штаммов *E. coli* из– за отсутствия β– галактозидазной активности образует колонии белого цвета. Дополнительное

выполнение теста на индол повышает специфичность до 100% для штаммов *E.coli* и позволяет надежно дифференцировать штаммы *E.coli* и *Citrobacter freundii*. Все протеи дают диффузное коричнево-красное окрашивание (100%). Кроме того, отрицательный тест на индол позволяет идентифицировать *P. mirabilis*. Все энтеробактерии из группы KESC (100%) образуют сине-фиолетовые колонии.

В нашем исследовании идентификация на приборе Vitek2 в 40% случаев была неудачной, вероятно, это связано с большими требованиями к приготовлению качественного инокулята для постановки (достаточная мутность, хорошее вортексирование, отсутствие неомогенных взвешенных частиц среды или культуры и др.), что требует опыта лаборанта.

Применение микробной идентификации на основе видоспецифических спектров пептидов и белковых масс с помощью масс-спектрометрии впервые было описано около 50 лет назад [2]. MALDI-TOF MS можно использовать для точной и быстрой идентификации различных микроорганизмов, таких как грамположительные бактерии, энтеробактерии, неферментирующие бактерии, микобактерии, анаэробы и дрожжи.

В одном многоцентровом исследовании [3] оценивалась точность идентификаций методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с помощью системы VITEK MS (bioMérieux, Франция) для Enterobacteriaceae, обычно встречающихся в клинической лаборатории. Результат VITEK MS совпал с идентификацией референтного метода (секвенирование 16SРНК) для 96,7% из 965 протестированных изолятов, при этом 83,8% были верны на уровне вида и 12,8% были ограничены идентификацией на уровне рода. Для 1,7% изолятов идентификация не была выполнена. Система VITEK MS ошибочно идентифицировала 7 изолятов (0,7%) как разные роды. Авторы сделали вывод о том, что VITEK MS обеспечивает надежную масс-спектрометрическую идентификацию энтеробактерий, приемлемую для клинической практики. В другом исследовании [4] идентификация с помощью MALDI-TOF MS показала значительно лучшие результаты, чем у биохимических систем (92,2% и 83,1% соответственно) и дала меньше неправильных идентификаций (0,1% и 1,6% соответственно).

Следует отметить, что MALDI-TOF MS не заменила полностью традиционные технологии, и что сочетание MALDI-TOF MS и традиционных методов также эффективно в случаях, когда нельзя провести дифференцировку близкородственных видов в связи с общим набором консервативных белков (например, у *Shigella* и *E. coli*, *Enterobacter cloacae* и *Enterobacter asburiae*).

При использовании ПЦР необходимо иметь в виду, что спектр выявленных микроорганизмов ограничен составом праймеров мультиплексной тест-системы.

ВЫВОДЫ

1. Проведенное исследование показало совпадение результатов идентификации грамотрицательных уropатогенных бактерий на уровне рода/вида в 100% случаев методами масс-спектрометрии и ПЦР, результаты биохимической идентификации совпали с этими двумя методами только в 60% случаев.

2. Использование хромогенных сред обеспечивает высокую чувствительность в случае выделения *E.coli*, в отношении других грамотрицательных микроорганизмов – обеспечивает предварительную идентификацию и облегчает работу с колониями в случаях полимикробных ассоциаций.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. AMRmap—antibiotic resistance surveillance system in Russia / K. AYU, A.G. Vinogradova, I.V Trushin [et al.] // Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. – 2021. – Т. 23. – №. 2. – С. 198– 204.
2. Anhalt, J. P. Identification of bacteria using mass spectrometry / J.P. Anhalt, C. Fenselau // Analytical chemistry. – 1975. – Vol. 47, №. 2. – P. 219– 225.
3. Identification of Enterobacteriaceae by matrix– assisted laser desorption/ionization time– of– flight mass spectrometry using the VITEK MS system/ S.S. Richter, L. Sercia, J. A. Branda [et al.] //European journal of clinical microbiology & infectious diseases. – 2013. – Т. 32. – С. 1571– 1578.
4. Van Veen, S.Q. High– throughput identification of bacteria and yeast by matrix– assisted laser desorption ionization– time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories / S.Q. Van Veen, E. C. J. Claas, E. J. Kuijper // Journal of clinical microbiology. – 2010. – Vol. 48, №. 3. – P. 900– 907.

Сведения об авторах

*П.Г. Аминева – ассистент кафедры

О.А. Сац – студент

С.А. Ставровская – студент

Я. А. Костенев – студент

Е.С. Ворошилина – доктор медицинских наук, профессор

Informations about the authors

*P.G. Amineva – Department Assistant

O.A. Sats – Student

S.A. Stavrovskaya – Student

Ya. A. Kostenev – Student

E.S. Voroshilina – Doctor of Sciences (Medicine), Professor

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

pga@qualitymed.ru

УДК: 615.339

ОЦЕНКА КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА ПРЕПАРАТОВ ПРОБИОТИКОВ КУЛЬТУРАЛЬНЫМ МЕТОДОМ И МЕТОДОМ ПЦР

Аминева Полина Геннадьевна^{1,2}, Основина Анна Алексеевна¹, Хакимова Азалия Аксановна¹, Ворошилина Екатерина Сергеевна¹

¹Кафедра медицинской микробиологии и клинической лабораторной диагностики

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

²ООО «Кволити Мед»

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. За последние два десятилетия возрос интерес к пробиотикам и их применению в клинической практике, что расширило представления о роли некоторых штаммов бактерий для профилактики и лечения ряда заболеваний и состояний. Важным вопросом является сохранение жизнеспособности штаммов пробиотиков в препарате, ведь от этого зависит эффективность. **Цель исследования** – оценить жизнеспособность, количественные характеристики, родовую и видовую принадлежность пробиотических штаммов в составе препаратов. **Материал и методы.** В исследование включены препараты: 1. Максифлор плюс (ООО "В– Мин+", РФ), 2. Аципол (АО "Отисифарм", РФ), 3. Бифидобактерии Бифидум–СМ (ООО "БиоВид", РФ), 4. Бак–Сет Бэби (ADM Protexin Ltd, Великобритания), 5. Бак–Сет Колд/Флю (ADM Protexin Ltd, Великобритания). Исследование пробиотиков проводили параллельно двумя методами: классическим бактериологическим методом и молекулярно–генетическим методом. **Результаты.** При культуральном исследовании фактическое количество КОЕ совпало с заявленным производителем только по двум пробам: препарат Аципол и Бак–Сет Бэби. В пробе Бак–Сет Колд/Флю культуральным методом не были обнаружены лактобактерии, лактококки, а фактическое снижение от заявленного КОЕ бифидобактерий составило как минимум 2 порядка, а термофильного стрептококка – 5 порядков. В пробе пробиотика Бифидум–СМ выявлено снижение жизнеспособных бактерий на 1 порядок (до 107 КОЕ). В пробе Максифлор плюс выявлено снижение КОЕ лактобактерий, бифидобактерий, термофильных стрептококков на 2 порядка. **Выводы.** Исследование молекулярно–генетическим методом показало, что во всех пробах пробиотиков присутствует ДНК заявленных микроорганизмов. При культуральном исследовании только 2 препарата показали 100% совпадение между заявленным и фактическим количеством КОЕ.

Ключевые слова: пробиотики, культуральный метод, ПЦР в реальном времени.

EVALUATION OF THE QUALITATIVE AND QUANTITATIVE COMPOSITION OF PROBIOTIC PREPARATIONS BY CULTURE AND PCR

Amineva Polina Gennadievna^{1,2}, Osnovina Anna Alekseevna¹, Khakimova Rosalia Aksanovna¹, Voroshilina Ekaterina Sergeevna¹

¹Department of Medical Microbiology and Laboratory Diagnostics

Ural State Medical University

²LLC "Quality Med"

Ekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Over the past two decades, interest in probiotics and their use in clinical practice has increased, which has expanded understanding of the role of certain bacterial strains in the prevention and treatment of a number of diseases