



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12Q 1/6806 (2021.08); C12Q 1/68 (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2021113954, 17.05.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.05.2021

Дата регистрации:
30.11.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.05.2021

(45) Опубликовано: 30.11.2021 Бюл. № 34

Адрес для переписки:
450008, г. Уфа, Ленина, 3,
БАШГОСМЕДУНИВЕРСИТЕТ, Патентный
отдел

(72) Автор(ы):

Мавзютов Айрат Радикович (RU),
Филиева Ксения Юрьевна (RU),
Баймиев Андрей Ханифович (RU),
Баймиев Алексей Ханифович (RU),
Хасанова Гузель Фаузавиевна (RU),
Хабирова Анастасия Дмитриевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Башкирский государственный
медицинский университет" Министерства
здравоохранения Российской Федерации
(RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: Хабирова А. Д. и др.
Экспериментальная оценка панели генно-
инженерных калибраторов для
количественной оценки антимикробной
активности химических соединений на
платформе ПЦР в режиме реального времени
в отношении *Pseudomonas*
aeruginosa, Бюллетень Оренбургского научного
центра УрО РАН, 2019, номер 3. Das M. C. et
al. Attenuation of *Pseudomonas* (см. прод.)

(54) ПРЕЦИЗИОННЫЙ СПОСОБ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ
АНТИМИКРОБНЫХ ВЕЩЕСТВ В ОТНОШЕНИИ УСЛОВНО ПАТОГЕННОГО ВИДА *Pseudomonas*
aeruginosa

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к лабораторной диагностике, и предназначено для количественной оценки эффективности антибактериальных препаратов и новых химических соединений в отношении

условно патогенного вида *Pseudomonas aeruginosa*. Использование изобретения повышает точность оценки и сокращает продолжительность исследования. 2 ил., 2 пр.

(56) (продолжение):

aeruginosa biofilm formation by Vitexin: A combinatorial study with azithromycin and gentamicin, Scientific reports, 2016, Т. 6, No. 1, С. 1-13. Askoura M. et al. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*, Libyan Journal of Medicine, 2011, Т. 6, No. 1.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)**2 760 788**⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C12Q 1/6806 (2021.08); *C12Q 1/68* (2021.08)

(21)(22) Application: **2021113954, 17.05.2021**

(24) Effective date for property rights:
17.05.2021

Registration date:
30.11.2021

Priority:

(22) Date of filing: **17.05.2021**(45) Date of publication: **30.11.2021 Bull. № 34**

Mail address:
**450008, g. Ufa, Lenina, 3,
BASHGOSMEDUNIVERSITET, Patentnyj otdel**

(72) Inventor(s):

**Mavzyutov Ajrat Radikovich (RU),
Filyaeva Kseniya Yurevna (RU),
Bajmiev Andrej Khanifovich (RU),
Bajmiev Aleksej Khanifovich (RU),
Khasanova Guzel Fauzavievna (RU),
Khabirova Anastasiya Dmitrievna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Bashkirskij gosudarstvennyj
meditsinskij universitet" Ministerstva
zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (RU)**

**(54) PRECISION METHOD FOR COMPARATIVE RAPID EVALUATION OF EFFECTIVENESS OF
ANTIMICROBIAL SUBSTANCES AGAINST THE CONDITIONALLY PATHOGENIC SPECIES PSEUDOMONAS
AERUGINOSA**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology,
in particular to laboratory diagnostics, and is intended
to quantify the effectiveness of antibacterial drugs and
new chemical compounds against the conditionally

pathogenic species *Pseudomonas aeruginosa*.

EFFECT: invention increases the accuracy of
assessment and reduces study duration.

1 cl, 2 dwg, 2 ex

RU 2 760 788 C1

RU 2 760 788 C1

Изобретение относится к области медицинской микробиологии, в частности к лабораторной диагностике, и предназначено для количественной оценки эффективности антибактериальных препаратов и новых химических соединений в отношении условно-патогенного вида *Pseudomonas aeruginosa*.

5 Инфекционные болезни на протяжении многих столетий были и остаются наиболее опасными болезнями человека из-за их способности вовлечь в процесс большое число здоровых людей в течение короткого периода времени. По данным Всемирной
Организации Здравоохранения (ВОЗ) 2013 г. в Российской Федерации зарегистрировано более 33 млн 225 тыс. инфекционных заболеваний (в 2012 г. - 31 млн 477 тыс.). В 2013
10 г. в России умерло 1,9 млн человек, от инфекционных болезней - 31 808 (1,7%), зарегистрировано 33 млн 255 тыс. случаев инфекционных болезней, летальный исход составил - 0,096%. С каждым годом число больных, страдающих инфекционными
заболеваниями, увеличивается и не имеет тенденции к снижению. В связи этим встает
15 вопрос о необходимости совершенствования методик быстрого выявления возбудителя и точного определения его чувствительности к лекарственным препаратам, что в свою очередь, необходимо для выбора адекватной антибиотикотерапии. Для этого
необходима разработка новых унифицированных, ускоренных, высокочувствительных и высокоспецифичных методов определения антибактериальной эффективности, как
оригинальных синтетических препаратов, так и новых химических соединений, и их
20 производных, получаемых в ряду уже зарекомендовавших себя классов химических соединений. Главной задачей внедрения данных методов является сокращение времени определения эффективности антимикробного препарата, повышение точности и простота процедуры исследования.

На сегодняшний день подавляющее большинство методов определения
25 эффективности химических соединений как синтетического, так и природного происхождения ориентировано на исследование фенотипических признаков, что в свою очередь предполагает высокую трудоемкость, материалоемкость и продолжительность используемых методик.

Известен способ определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным
30 препаратам путем воздействия лазерного излучения на пробы с различными антимикробными препаратами и последующим измерением интенсивности флюоресценции образцов в различные интервалы времени. В аналогичных условиях проводят воздействие лазерного излучения и измерение интенсивности флюоресценции проб без антимикробных препаратов и сравнение между собой нормированных
35 интенсивностей флюоресценции проб с антимикробными препаратами [патент RU 2321855, 2006 г.]. Недостаток указанного способа заключается в трудоемкости, высокой стоимости исследования и невозможности быстрого получения данных. Необходимо отметить, что данный способ не отличается высокой точностью и достоверностью получаемых результатов. Это связано с зависимостью результатов экспериментов от
40 многих факторов: стабильности лазерного излучения, загрязнения окружающей среды, напряжения сети, климатических условий и т.п.

Известен способ определения профиля антибиотикорезистентности бактерии для
повышения эффективности антибактериальной терапии. Способ предполагает:
получение высокоочищенной нуклеиновой кислоты бактерии, визуализацию нуклеиновой
45 кислоты бактерии, получение рестрикционной карты нуклеиновой кислоты, сравнение рестрикционной карты нуклеиновой кислоты с базой данных рестрикционных карт и определение антибиотикорезистентности бактерий путем сопоставления регионов заданной нуклеиновой кислоты с соответствующими регионами в используемой базе

данных. В дальнейшем с учетом этого подбираются оптимальные антибактериальные препараты [патент WO 137139, 2009 г.]. Описанный способ обладает рядом недостатков: трудозатратность, связанная с необходимостью выделения высокоочищенной нуклеиновой кислоты бактерий, и времязатратность, заключающаяся в
5 продолжительности процедуры составления и сравнения рестрикционных карт, трудоемкость.

Одним из основных условий для разработки новых методов оценки эффективности антибактериальных препаратов в отношении и грамположительных, и
10 грамотрицательных бактерий является возможность получения точных количественных данных (прецизионных), обладающих одновременно высокой чувствительностью и производительностью.

Прототипом изобретения является способ определения чувствительности микроорганизмов рода *Salmonella* к антибактериальным препаратам в ходе опыта, включающего инкубирование микроорганизмов определенного вида (конечная
15 концентрация около 1000 клеток/мл) с исследуемым антибактериальным препаратом в известной концентрации при температуре 37°C в течение 24-х часов. После инкубирования к образцам добавляют аптамеры (конечная концентрация 100 нМ), включающие флуоресцентную метку и специфичные тестируемым видам живых микроорганизмов. Повторно инкубируют 20 минут. Образец исследуют методом
20 проточной цитометрии по интенсивности флуоресценции аптамеров, определяемой по графикам. В результате получают значения, показывающие долю связавшихся или не связавшихся бактерий с аптамерами, и таким образом устанавливают количество живых или неживых микроорганизмов в образце [патент RU 2518372, 2012 г.]. Необходимо отметить, что для осуществления данного способа необходимо наличие дорогостоящего
25 и сложного в эксплуатации оборудования, и расходных материалов. Несмотря на снижение трудозатрат в сравнении со стандартными методиками определения, предложенная методика является времязатратной, поскольку требует более продолжительного культивирования с последующей идентификацией культуры.

Задачей настоящего изобретения является разработка унифицированного,
30 высокочувствительного и специфичного, нетрудоемкого способа для экспресс-оценки эффективности антимикробных соединений в отношении условно патогенного вида *Pseudomonas aeruginosa* с возможностью получения количественных данных.

Технический результат при использовании изобретения - повышение точности оценки за счет получения количественных критериев эффективности, сокращение
35 продолжительности исследования.

Предлагаемый способ оценки эффективности антибактериальных препаратов, а также новых химических соединений в отношении *Pseudomonas aeruginosa* осуществляется следующим образом.

Используют чистую культуру *Pseudomonas aeruginosa*, для получения которой проводят
40 взятие клинического материала у инфицированных больных и посев клинического материала на селективный агар для *Pseudomonas* spp. (*Pseudomonas* Agar (For Pyocyanin)), предназначенный для селективного выделения и подсчета всех видов *Pseudomonas* spp. Этот агар первоначально описан Кингом и соавт., а в дальнейшем был рекомендован американским фармакопейным комитетом для определения продукции псевдомонадами
45 пиоцианина - водорастворимого пигмента. На среде стимулируется выработка пиоцианина и подавляется образование флюоресцеина. Пиоцианин диффундирует в среду, обуславливая голубое окрашивание вокруг колоний псевдомонад. У некоторых штаммов вырабатывается небольшое количество пигмента, поэтому отмечается

голубовато-зеленое окрашивание.

Далее в соответствии с Клиническими рекомендациями по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, утвержденными на расширенном совещании Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (XVI международный конгресс по антимикробной химиотерапии МАКМАХ/ESCMID, 21-23 мая 2014, Москва), с использованием стерильной воды или при исследовании плохорастворимых соединений соответствующего разбавителя (дезоксиметилсульфоксида (ДМСО)) из основного раствора готовят рабочие растворы тестируемого антибактериального вещества. Концентрацию рабочего раствора рассчитывают исходя из необходимой максимальной концентрации в ряду серийных разведений, учитывая фактор разбавления препарата при последующей инокуляции. Затем рабочий раствор в количестве 0,5 мл при помощи микропипетки со стерильным наконечником вносят в первую пробирку, содержащую 0,5 мл стерильной воды или растворителя. Тщательно перемешивают и новым стерильным наконечником переносят 0,5 мл раствора антибактериального препарата во вторую пробирку, содержащую первоначально 0,5 мл стерильной воды или растворителя. Процедуру повторяют, пока не будет приготовлен весь необходимый ряд серийных двукратных разведений. Из последней пробирки 0,5 мл жидкости удаляют. Таким образом, получают ряд пробирок с растворами антибактериальных препаратов, концентрации которых отличаются в соседних пробирках в 2 раза.

Для инокуляции используют стандартную микробную взвесь чистой культуры *Pseudomonas aeruginosa*, эквивалентную 0,5 по стандарту мутности МакФарланда, приготовленную с помощью метода прямого суспендирования в стерильном изотоническом растворе или разбавителя материала колоний 18-24-часовой чистой агаровой культуры бактерий, выросшей на плотной селективной питательной среде для псевдомонад (*Pseudomonas Agar (For Pyocyanin)*). Для этого стерильной бактериологической петлей собирают 5 морфологически схожих колоний и суспендируют полученный материал в стерильном изотоническом растворе или разбавителе. Доводят бактериальную суспензию до значения оптической плотности 0,5 по стандарту мутности МакФарланда. Это соответствует концентрации $1-2 \times 10^8$ КОЕ/мл путем добавления в суспензию микробной массы или разбавления ее стерильным изотоническим раствором или разбавителем.

По 5 мкл инокулюма в течение 15 минут после приготовления вносят в каждую пробирку (или лунку полистиролового планшета), содержащую 90 мкл питательного бульона и 10 мкл соответствующего разведения антибактериального препарата, и в одну пробирку (или лунку полистеролового планшета) с 100 мкл питательного бульона без антибиотика (положительный контроль). Конечная концентрация микроорганизма в каждой пробирке достигнет необходимой - примерно 5×10^6 КОЕ/мл. Все пробирки (или лунки полистиролового планшета) с тестируемыми штаммами закрывают и инкубируют в обычной атмосфере при температуре 37°C в течение 2 ч в термостатируемом шейкере.

По истечении времени культивирования проводят экстракцию ДНК из содержимого пробирок с использованием набора для выделения ДНК из клинических образцов («Лизирующий раствор», АО «Вектор-Бест», Россия). Очищенная ДНК служит матрицей для проведения количественной ПЦР в режиме реального времени.

Для получения количественных данных методом ПЦР конструируют панель калибровочных образцов и положительный контрольный образец *Pseudomonas aeruginosa*.

Калибровочный образец конструируют с использованием в качестве ДНК-матрицы

плазмиду pAL-TA (3,0 т.п.н.) со вставкой участка гена 16S pРНК *Pseudomonas aeruginosa* (270 п.н.), в результате чего получают плазмиду pAL-TAPseudAer16S. Клонирование проводят по Маниатис Т. и соавт. [Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Перевод с англ. языка под редакцией А.А. Баева и К.Г. Скрябина / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. - Москва: Мир, 1984, - 479 с].
 5 Выделенная с помощью ионообменной смолы Chelex100 тотальная ДНК используется в качестве матрицы для проведения классической ПЦР с целью накопления участка гена 16S pРНК *Pseudomonas aeruginosa* (270 п.н.). Амплификацию проводят на термоциклере Терцик МС-2 («ДНК-Технология», Россия) с использованием пары
 10 видоспецифичных праймеров к выбранному участку следующей структуры:

5' agaaagtgggggatcttcggacctca 3'

5' tgttgtaacgtcaaacagcaaggtattaactt 3'.

Выделение искомого амплифицированного участка из реакционной смеси проводят с применением набора для очистки ДНК («Цитокин», Санкт-Петербург). Полученный
 15 фрагмент клонируют с использованием векторной плазмиды pAL-TA. Для этого в стерильной микроцентрифужной пробирке готовят реакционную смесь для лигирования, включающую ДНК-вектор и клонируемый фрагмент в эквимольном соотношении, буфер для лигирования (конечная концентрация - 66 мМ трис-НСl, рН 7,5, 5 мМ MgCl₂,
 5 мМ дитиотрейтол, 1 мМ АТФ) и ДНК - лигазу фага Т4 (1 ед/мкг ДНК) («Fermentas»,
 20 Литва). Реакцию проводят при 4-10°С в течение ночи.

Для трансформации культуру *Escherichia coli* XL1 -Blue выращивают в жидкой питательной среде LB при 37°С в течение 16-20 ч. Затем центрифугированием осаждают бактериальные клетки и полученный осадок ресуспендируют в 1/2 первоначального
 25 объема 10 мМ раствора CaCl₂. Полученный раствор выдерживают 20 мин при комнатной температуре, центрифугируют и ресуспендируют в 1/50 первоначального объема 50 мМ CaCl₂. Через 12-24 ч хранения при 2°-4°С 0,2 мл суспензии клеток смешивают с 10 мкл лигированной смеси и инкубируют 30-60 мин на льду. Далее трансформационную смесь переносят на 2 мин в водяную баню (42°С) (тепловой шок), добавляют к суспензии
 30 1 мл среды LB, инкубируют 1 ч при 37°С на шейкере или перемешивая каждые 15 минут. Затем смесь центрифугируют 2 мин (4000 об./мин), отбирают 100 мкл надосадочной жидкости, содержащей трансформированные клетки, и высевают на чашки с агаризованной средой LB, содержащей антибиотик ампициллин («Serva», ФРГ) в
 35 концентрации 100 мкг/мл, а также ИПТГ (изопропил-бета-галактопиранозид, конечная концентрация 200 мг/мл) и X-gal (5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид, конечная концентрация 20 мг/мл). Чашки инкубируют в течение 16-20 часов в термостате при 37°С. Из всего числа выросших колоний отбирают бесцветные и уже засевают на твердой питательной среде LB.

Из выросших бесцветных колоний выделяют плазмидные ДНК и, используя их в качестве матриц, проводят классическую ПЦР для подтверждения наличия вставки
 40 гена. Разделение продуктов амплификации осуществляют электрофоретически в 1,7%-ном горизонтальном агарозном геле («Sigma», США) с последующей визуализацией после окраски бромистым этидием ультрафиолетом в фотодокументационной системе. В качестве электролита для электрофореза применяют 50-кратный трис-ацетатный
 45 буфер (2 М Tris-base, рН=8,0; 1,56 М уксусная кислота, рН 7,6; 50 мМ ЭДТА, рН=8,0).

Одну из «положительных» колоний пересевают для накопления на чашки с агаризованной средой LB, содержащей антибиотик ампициллин (конечная концентрация 100 мкг/мл) и помещают в термостат при 37°С на ночь. Бактериологической петлей

снимают большую часть выросших колоний и переносят в пробирку типа Eppendorf (1,5 мл). Далее щелочным методом (лизисом) выделяют плазмиду из бактериальных клеток, используя следующие буферы: 1) для разделения клеток - 1М Tris-HCl, 1М ЭДТА, сахараза; 2) для лизиса клеток - 10% SDS, 5М NaOH; 3) для нейтрализации примесей - 5М ацетата калия, 1,56М уксусная кислота. Полученную плазмиду очищают от ферментов, ионов и РНК. Для этого препарат ДНК обрабатывают РНК-азой (конечная концентрация 50 мкг/мл) в течение 16-20 часов при 4°-10°С. Затем плазмиду растворяют в 25 мкл бидистиллированной воды и проводят препаративный электрофорез (элюцию), смешивая 25 мкл плазмиды и 20 мкл смеси красителей (бромфеноловый синий, ксиленианол, 30% глицерин). После проведения элюции экстрагируют ДНК из вырезанных фрагментов агарозного геля, содержащих ДНК необходимой длины с помощью набора для очистки ДНК («Цитокин», Санкт-Петербург).

Чистоту и концентрацию препарата ДНК определяют спектрофотометрически с помощью оптического спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США). Для проведения спектрофотометрического анализа 1 мкл образца наносят на неподвижный модуль прибора. Сверху на каплю опускают подвижный модуль прибора, в результате чего из образца формируется столбик жидкости между подвижным и неподвижным модулями. Прибор измеряет поглощение света в столбике образца. Измеренная концентрация двухцепочной ДНК составляет 88,4 нг/мкл ($2,5 \times 10^{10}$ копий ДНК/мл).

Положительный контрольный образец получают описанным выше способом путем встраивания участка гена 16S рРНК условно патогенного микроорганизма *Pseudomonas aeruginosa* в вектор рAL-ТА («Евроген», Москва) с последующей трансформацией и наработкой плазмиды в клетках *E.coli* XL1 -Blue.

Для постановки ПЦР в режиме реального времени используют подобранную и апробированную пару видоспецифичных праймеров к участкам ДНК *Pseudomonas aeruginosa*

(*Ps.aer* F_Prl 5' agaaagtgggggatcttcggacctca 3' и
Ps.aer R_Pr2 5' tgttgtaacgtcaaacagcaaggtattaactt 3')

и реакционную смесь ПЦР-Микс SYBR Green I (ООО «СИНТОЛ»). ПЦР проводят с помощью детектирующего амплификатора CFX96 Touch "REAL TIME" (Bio-Rad, США). Учет результатов проводят с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager. Прибор калибруют тремя разведениями калибровочных образцов, приготовленных путем десятикратных серийных разведений плазмиды рAL-ТАPseudAer16S известной концентрации. Реакцию амплификации проводят в 25 мкл смеси, содержащей 10 мкл 2,5× реакционной смеси ПЦР-Микс SYBR Green I, 8 мкл ddH₂O, 2 мкл каждого из пары праймеров и 3 мкл тотальной ДНК. Режим амплификации: начальная денатурация при 95°С в течение 5 мин; 35 циклов, включая денатурацию при 95°С - 10 сек, отжиг праймеров при 59°С - 25 сек, элонгацию при 72°С - 30 сек; терминальная элонгация 72°С - 30 сек.

Абсолютное определение уровня представленности транскриптов проводят с применением стандартной кривой, получаемой при использовании калибровочных образцов с различной концентрацией, и с последующим определением количества копий ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в исследуемом образце экстраполяцией на полученную стандартную кривую.

Абсолютное количество копий ДНК вычисляют по формуле:

$$N_0 = N_{or} \times (1+E)^{Ct_{or} - Ct_0},$$

где:

N_0 - концентрация матриц исследуемого образца (ГЭ/образец);

5 N_{or} - стандартная начальная концентрация (ГЭ/образец);

E - эффективность РТ-ПЦР;

Ct_{or} - пороговый цикл для стандартного образца;

Ct_0 - пороговый цикл для исследуемого образца.

10 Интерпретацию полученных данных количественного молекулярно-генетического анализа проводят с учетом начального количества копий ДНК культуры *Pseudomonas aeruginosa*. При значении количества копий ДНК, совпадающим или отличающимся не более чем в 2 раза от исходного количества копий ДНК культуры в питательном бульоне до культивирования, результат интерпретируют как «положительный», эффективность антибактериального препарата оценивают как высокую, выражающуюся в полном подавлении роста культуры в питательном бульоне. При значении количества копий ДНК, отличающимся от исходного количества копий ДНК культуры более чем в 2
15 раза, эффективность антибактериального препарата оценивают как низкую, выражающуюся в частичной или полной резистентности штамма к тестируемому соединению. Подобный количественный анализ антимикробной активности сразу
20 нескольких антибактериальных препаратов дает возможность сравнения их между собой и выбора наиболее эффективного.

Изобретение иллюстрируется следующими фигурами: на фиг. 1 изображен график амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* после
25 непродолжительного культивирования микроорганизма в рабочих растворах амикацина (концентрации антибиотика - от 256 до 1 мкг/мл); на фиг. 2 - график амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования микроорганизма в рабочих растворах гентамицина (концентрации антибиотика - от 256 до 1 мкг/мл).

30 Способ сравнительной оценки эффективности антимикробных веществ в отношении условно патогенных видов *Pseudomonas aeruginosa*. иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1.

35 С использованием предлагаемой экспресс-методики тестирования проводили количественную оценку эффективности антибактериального препарата амикацина, относящегося к фармакологической группе аминогликозидов III поколения и обладающего активностью как в отношении грамотрицательных, так и в отношении грамположительных аэробных бактерий.

40 На первом этапе исследования произвели последовательные двукратные разведения рабочего раствора антибиотика. В полученном ряде пробирок с растворами антибактериального препарата, концентрации в соседних пробирках отличались в 2 раза и составляли 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 мкг/мл соответственно. Следующим этапом было приготовление стандартной микробной взвеси чистой культуры *Pseudomonas aeruginosa*, эквивалентной 0,5 по стандарту мутности МакФарланда. Для
45 этого к стерильному изотоническому раствору добавляли несколько колоний чистой 18-24-часовой культуры бактерий, выросшей на плотной неселективной питательной среде. Таким образом, концентрация чистой культуры микроорганизма составила $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл.

Затем готовили культуральную смесь, состоящую из рабочего разведения амикацина, чистой культуры *Pseudomonas aeruginosa* и питательного бульона. Для этого по 5 мкл чистой культуры в течение 15 минут после приготовления вносили в каждую пробирку, содержащую 90 мкл питательного бульона и 10 мкл соответствующего разведения антибактериального препарата. Конечная концентрация бактерии *Pseudomonas aeruginosa* в каждой пробирке достигала необходимой концентрации - примерно $1,5 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Все пробирки с тестируемыми штаммами закрывали и инкубировали в обычной атмосфере при температуре 37°C в течение 2 ч.

По истечении времени культивирования проводили экстракцию ДНК из содержимого пробирок с использованием набора для выделения ДНК из клинических образцов («Лизирующий раствор», АО «Вектор-Бест», Россия). Далее выделенную ДНК использовали для постановки количественной ПЦР в режиме реального времени. Проведение ПЦР-анализа оптимизировали путем использования десятикратных разведений рекомбинантной плазмиды pAL-TAPseudAer16S (концентрация двухцепочной ДНК 88,4 нг/мкл ($2,5 \times 10^{10}$ копий ДНК/мл)), сконструированной путем встраивания участка гена 16S рРНК условно патогенного микроорганизма *Pseudomonas aeruginosa* в вектор pAL-TA («Евроген», Москва) с последующей трансформацией и наработкой плазмиды в клетках *E.coli* XL 1-Blue. Также при постановке количественной ПЦР в режиме реального времени использовали положительный контрольный образец для бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, сконструированный указанным выше способом.

Для постановки ПЦР в режиме реального времени использовали подобранную и апробированную пару видоспецифичных праймеров к участкам ДНК *Pseudomonas aeruginosa* (Ps.aer F_Prl 5' agaaagtgggggatcttcggacctca 3' и Ps.aer R_Pr2 5' tgttggtaacgtcaaaaca gcaaggtattaact 3') и реакционную смесь ПЦР-Микс SYBR Green I (ООО «СИНТОЛ»). ПЦР проводили с помощью детектирующего амплификатора CFX96 Touch "REAL TIME" (Bio-Rad, США). Учет результатов проводили с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager. Реакцию амплификации проводили в 25 мкл смеси, содержащей 10 мкл 2,5× реакционной смеси ПЦР-Микс SYBR Green I, 8 мкл ddH₂O, 2 мкл каждого из пары праймеров и 3 мкл тотальной ДНК. Режим амплификации: начальная денатурация при 95°C в течение 5 мин; 35 циклов, включая денатурацию при 95°C - 10 сек, отжиг праймеров при 59°C - 25 сек, элонгацию при 72°C - 30 сек; терминальная элонгация 72°C - 30 сек.

В соответствии с предлагаемым способом по формуле $N_0 = N_{or} \times (1+E)^{Ct_{or} - Ct_0}$ (N_0 - концентрация матриц исследуемого образца (ГЭ/образец), N_{or} - стандартная начальная концентрация (ГЭ/образец), E - эффективность РТ-ПЦР, Ct_{or} - пороговый цикл для стандартного образца, Ct_0 - пороговый цикл для исследуемого образца) было рассчитано количество копий ДНК в исследуемых образцах, прошедших культивирование в присутствии антибиотика в концентрациях от 256,0 до 1,0 мкг/мл, а также измерено количество копий ДНК чистой культуры до культивирования. Концентрация чистой культуры в бульоне до культивирования составила $8,50 \times 10^6$ ГЭ/образец. Были получены следующие результаты оценки эффективности рабочих растворов амикацина с различными концентрациями в отношении исследуемого клинического штамма бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, выделенного из клинического материала больных с бактериальной инфекцией: 256 мкг/мл - $8,53 \times 10^6$ ГЭ/образец, 128 мкг/мл - $9,33 \times 10^6$ ГЭ/образец, 64 мкг/мл - $1,38 \times 10^7$ ГЭ/образец, 32 мкг/мл - $1,70 \times 10^7$ ГЭ/образец, 16 мкг/мл -

2,30×10⁷ ГЭ/образец, 8 мкг/мл - 3,03×10⁷ ГЭ/образец, 4 мкг/мл - 1,79×10⁷ ГЭ/образец, 2 мкг/мл - 1,0×10⁷ ГЭ/образец, 1 мкг/мл - 3,43×10⁷ ГЭ/образец (фиг. 1).

Таким образом, предлагаемый нами способ оценки эффективности лекарственных соединений в отношении клинически значимых штаммов позволил сделать вывод о том, что применение антибиотика амикацина в концентрациях 256 мкг/мл, 128 мкг/мл, 64 мкг/мл, 32 мкг/мл способствует значительному подавлению бактериального роста *Pseudomonas aeruginosa*, чем более низкие концентрации антибиотика, т.к. количество копий ДНК, отличается не более чем в 2 раза от исходного количества копий ДНК культуры в питательном бульоне до культивирования, эффективность антибактериального препарата в данных концентрациях оцениваем как высокую, выражающуюся в полном подавлении роста культуры в питательном бульоне. Соответственно более низкие концентрации антибиотика (16 мкг/мл, 8 мкг/мл, 4 мкг/мл, 2 мкг/мл) оцениваем не эффективными в отношении выбранного штамма микроорганизмов, т.к. количество копий ДНК микроорганизмов в питательном бульоне в присутствии антибиотика после непродолжительного культивирования превышает более чем в 2 раза количество копий ДНК культуры в питательном бульоне до культивирования.

Пример 2.

Предлагаемая экспресс-методика тестирования была использована для количественной оценки эффективности антибактериального препарата гентамицина, относящегося к группе аминогликозидов и обладающего бактерицидным действием в отношении многих грамположительных и грамотрицательных бактерий.

На первом этапе исследования произвели последовательные двукратные разведения рабочего раствора антибиотика. В полученном ряде пробирок с растворами антибактериального препарата, концентрации в соседних пробирках отличались в 2 раза и составляли 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 мкг/мл соответственно. Следующим этапом было приготовление стандартной микробной взвеси чистой культуры *Pseudomonas aeruginosa*, эквивалентной 0,5 по стандарту мутности МакФарланда. Для этого к стерильному изотоническому раствору добавляли несколько колоний чистой 18-24-часовой культуры бактерий, выросшей на плотной неселективной питательной среде. Таким образом, концентрация чистой культуры составила 1,5×10⁸ КОЕ/мл.

Затем готовили культуральную смесь, состоящую из рабочего разведения гентамицина, чистой культуры *Pseudomonas aeruginosa* и питательного бульона. Для этого по 5 мкл бактериальной культуры в течение 15 минут после приготовления вносили в каждую пробирку, содержащую 90 мкл питательного бульона и 10 мкл соответствующего разведения антибактериального препарата. Конечная концентрация бактерии *Pseudomonas aeruginosa* в каждой пробирке достигла необходимой концентрации - примерно 1,5·10⁶ КОЕ/мл. Все пробирки с тестируемыми штаммами закрывали и инкубировали в обычной атмосфере при температуре 37°С в течение 2 ч.

По истечении времени культивирования проводили экстракцию ДНК из содержимого пробирок с использованием набора для выделения ДНК из клинических образцов («Лизирующий раствор», АО «Вектор-Бест», Россия). Далее выделенную ДНК использовали для постановки количественной ПЦР в режиме реального времени. Процедуру проведения ПЦР-анализа оптимизировали путем использования десятикратных разведений рекомбинантной плазмиды pAL-TAPseudAer16S (концентрация двухцепочечной ДНК 88,4 нг/мкл (2,5×10¹⁰ копий ДНК/мл)), сконструированной путем встраивания участка гена 16S рРНК условно патогенного микроорганизма *Pseudomonas*

aeruginosa в вектор pAL-TA («Евроген», Москва) с последующей трансформацией и наработкой плазмиды в клетках E.coli XL 1-Blue. Также при постановке количественной ПЦР в режиме реального времени использовали положительный контрольный образец для бактерии Pseudomonas aeruginosa, сконструированный указанным выше способом.

5 Для постановки ПЦР в режиме реального времени использовали подобранную и апробированную пару видоспецифичных праймеров к участкам ДНК Pseudomonas aeruginosa (Ps.aer F_Prl 5' agaaagtgggggatcttcggacctca 3' и Ps.aer R_Pr2 5' tgttggtaacgtcaaaaca gcaaggtattaactt 3') и реакционную смесь ПЦР-Микс SYBR Green I (ООО «СИНТОЛ»). ПЦР проводили с помощью детектирующего амплификатора CFX96 Touch "REAL
10 TIME" (Bio-Rad, США). Учет результатов проводили с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager. Реакцию амплификации проводили в 25 мкл смеси, содержащей 10 мкл 2,5× реакционной смеси ПЦР-Микс SYBR Green I, 8 мкл ddH₂O, 2 мкл каждого из пары праймеров и 3 мкл тотальной ДНК. Режим амплификации: начальная денатурация при 95°C в течение 5 мин; 35 циклов, включая денатурацию при
15 95°C - 10 сек, отжиг праймеров при 59°C - 25 сек, элонгацию при 72°C - 30 сек; терминальная элонгация 72°C - 30 сек.

В соответствии с предлагаемым нами способом по формуле $N_0 = N_{or} \times (1 + E)^{Ct_{or} - Ct_0}$ (N₀ - концентрация матриц исследуемого образца (ГЭ/образец), N_{or} - стандартная
20 начальная концентрация (ГЭ/образец), E - эффективность РТ-ПЦР, Ct_{or} - пороговый цикл для стандартного образца, Ct₀ - пороговый цикл для исследуемого образца) было рассчитано количество копий ДНК в исследуемых образцах, прошедших
культивирование в присутствии антибиотика в концентрациях от 256,0 до 1,0 мкг/мл,
25 а также измерено количество копий ДНК чистой культуры до культивирования. Концентрация чистой культуры в бульоне до культивирования составила 8,50×10⁶ ГЭ/образец. Для разведений 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 мкг/мл полученные концентрации составили 8,9×10⁶ ГЭ/образец, 16,5×10⁶ ГЭ/образец, 14,3×10⁶ ГЭ/образец, 1,3×10⁷ ГЭ/
30 образец, 1,35×10⁷ ГЭ/образец, 1,86×10⁷ ГЭ/образец, 1,67×10⁷ ГЭ/образец, 4,71×10⁷ ГЭ/образец, 3,09×10⁷ ГЭ/образец соответственно (фиг. 2).

Результаты проведения предлагаемого нами способа оценки эффективности рабочих растворов гентамицина с различными концентрациями в отношении исследуемого
35 клинического штамма бактерий Pseudomonas aeruginosa, выделенного из клинического материала больных бактериальной инфекцией, позволили удостовериться в том, что рабочие растворы антибиотика в концентрациях 256 мкг/мл, 128 мкг/мл, 64 мкг/мл и 32 мкг/мл, 16 мкг/мл проявляют достаточно высокую активность в отношении
тестируемого штамма Pseudomonas aeruginosa, поскольку количество копий ДНК, отличается не более чем в 2 раза от исходного количества копий ДНК культуры в
40 питательном бульоне до культивирования, эффективность антибактериального препарата в данных концентрациях оцениваем как высокую, выражающуюся в полном подавлении роста культуры в питательном бульоне. Соответственно более низкие концентрации антибиотика (8 мкг/мл, 4 мкг/мл, 2 мкг/мл) оцениваем не эффективными в отношении выбранного штамма микроорганизмов, т.к. количество копий ДНК
45 микроорганизмов в питательном бульоне в присутствии антибиотика после непродолжительного культивирования превышает более чем в 2 раза количество копий ДНК культуры в питательном бульоне до культивирования.

(57) Формула изобретения

Способ количественной оценки эффективности антибактериальных препаратов и новых химических соединений в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, включающий
 5 получение биологического материала от больного бактериальной инфекцией, вызванной *Pseudomonas aeruginosa*; получение чистой культуры микроорганизма *Pseudomonas aeruginosa*; непродолжительное культивирование исследуемого штамма бактерий в различных концентрациях антибактериального вещества, отличающийся тем, что
 10 проводят выделение бактериальной ДНК из культуральной жидкости; количественную ПЦР в режиме реального времени с использованием панели сконструированных калибровочных образцов с известной концентрацией, причем калибровочный образец конструируют с использованием в качестве ДНК-матрицы плазмиды рAL-ТА со вставкой участка гена 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa*, в результате чего получают плазмиду рAL-ТАPseudAer16S, после чего определяют количество копий ДНК *Pseudomonas*
 15 *aeruginosa* в исследуемом образце по формуле:

$$N_0 = N_{or} \times (1+E)^{Ct_{or} - Ct_0},$$

где N_0 - концентрация матриц исследуемого образца (ГЭ/образец),

20 N_{or} - стандартная начальная концентрация (ГЭ/образец),

E - эффективность РТ-ПЦР,

Ct_{or} - пороговый цикл для стандартного образца,

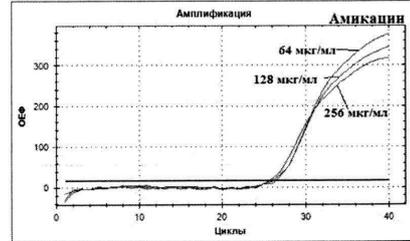
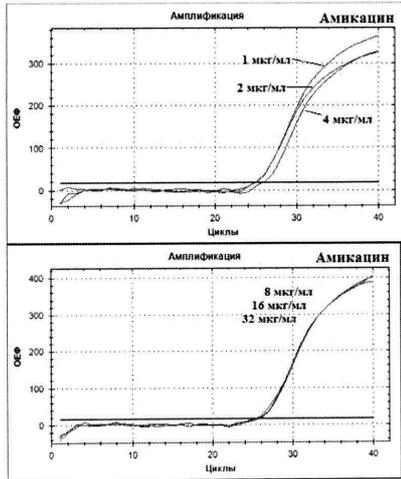
Ct_0 - пороговый цикл для исследуемого образца;

при значении количества копий ДНК, совпадающем или отличающемся не более
 25 чем в 2 раза от исходного количества копий ДНК культуры в питательном бульоне до культивирования, результат интерпретируют как «положительный», эффективность антибактериального препарата оценивают как высокую, выражающуюся в полном подавлении роста культуры в питательном бульоне; при значении количества копий ДНК, отличающемся от исходного количества копий ДНК культуры в 2 и более раз,
 30 эффективность антибактериального препарата оценивают как низкую, выражающуюся в частичной или полной резистентности штамма к тестируемому соединению.

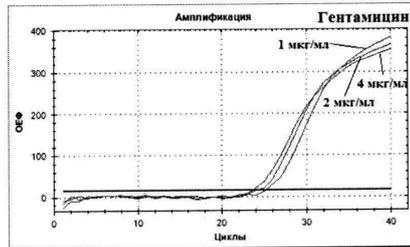
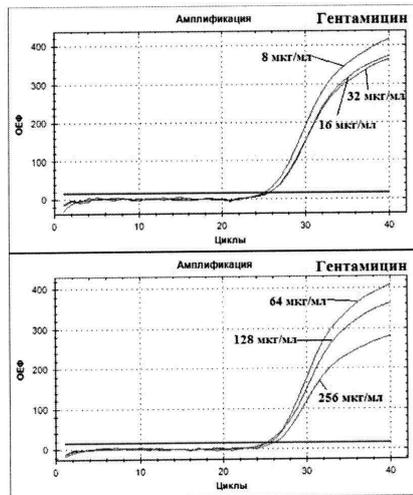
35

40

45



Фиг. 1



Фиг. 2