

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Медико-профилактический факультет с отделением биологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

На правах рукописи

Бахтиева Альфира Рустамовна

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ
НОВЫХ СИНТЕЗИРОВАННЫХ ХИМИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИИ В
ОТНОШЕНИИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Научный руководитель:

зав. кафедрой ФПМ,
доктор медицинских наук, профессор



А.Р. Мавзютов

научный консультант

К.Ю. Швец

Уфа – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений	4
ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1. Методы определения чувствительности к антимикробным препаратам	8
1.1.1. Методы серийных разведений	9
1.1.2. Метод серийных разведений в бульоне	11
1.1.3. Метод серийных разведений в агаре	16
1.1.4. Дisko-диффузионный метод (ДДМ)	19
1.1.5. Е-тест (эпсилометрический метод)	23
1.1.6. Метод пограничных концентраций	24
1.1.7. ДНК-ДНК гибридизация	24
1.1.8. Референтный метод количественного определения минимальных подавляющих концентраций антимикробных препаратов	27
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	29
2.1. Объекты исследования	29
2.2. Приготовление селективных и дифференциально диагностических питательных сред	29
2.3. Условия культивирования микроорганизмов	37
2.4. Метод длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов	37
2.5. Определение антимикробной активности химических соединений	38
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	40
3.1. Определение антимикробной активности химических соединений на основе дитерпиноидов диско-диффузионным методом	40
3.2. Определение величины минимальной ингибирующей концентрации (МИК) новых химических соединений	48
ВЫВОДЫ	56
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	57

ПРИЛОЖЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений

АБП – Антибактериальный препарат

МИК – Минимальная ингибирующая концентрация

МПК - Минимальная подавляющая концентрация

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ДДМ – Дisko-диффузионный метод

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота

Е-тест – Эпсилометрический тест

КОЕ – Колониеобразующая единица

ДМСО – Диметилсульфоксид

СПИД– синдром приобретенного иммунодефицита

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Несмотря на эпидемиологический переход, который состоялся в конце XX века в структуре заболеваемости населения мира в пользу хронических неинфекционных заболеваний, проблемы инфекционной патологии и сегодня не потеряли своей актуальности. Инфекционные болезни, в том числе и новые, составляют угрозу развития человечества, поскольку являются причиной трети общего ежегодного количества смертей в мире. По данным Всемирного банка (2008) 50% случаев смерти детей в возрасте до 5 лет в мире вызваны инфекционными заболеваниями (патология органов дыхания, кишечные инфекции, корь, малярия, СПИД и другие), а в структуре заболеваемости в данной возрастной группе инфекционные болезни составляют 80% (Turcutyuisov, Martynova, 2003; Куракин, 2011).

В последние годы получила широкое распространение устойчивость возбудителей инфекционных заболеваний к существующим лекарственным препаратам, что повлекло за собой высокую потребность в производстве новых антибиотиков. В большинстве регионов мира, в том числе и в России, получили широкое распространение нозокомиальные штаммы микроорганизмов, характеризующиеся полирезистентностью - устойчивостью сразу к нескольким антибактериальным препаратам и даже панрезистентностью — устойчивостью «супербактерий» практически ко всем антибиотикам вследствие продукции металло-бета-лактамазы NDM (Zn^{2+}) (Freire-Moran et al., 2011).

Современный фармацевтический рынок предлагает широкий спектр противомикробных, антисептических, дезинфицирующих средств и препаратов как синтетического, так и природного происхождения. В настоящее время создаются методологические подходы к созданию антибиотиков — возможностью их получения химическим синтезом или

путём поиска биологически активных природных соединений, главным образом среди продуктов микробного вторичного метаболизма (Ланчини, 2012).

Важным направлением в создании новых антимикробных препаратов является тестирование новых синтетических препаратов, относящихся к ранее изученным классам химических веществ, а также производные, получаемые в ряду уже зарекомендовавших себя классов химических соединений. Для возможности получения объективных и воспроизводимых результатов в течение многих лет проводится работа по стандартизации методов и средств определения антимикробной активности антибактериальных препаратов. Значимость этой работы трудно переоценить, поскольку клиническая эффективность антибиотиков будет зависеть не только от правильно определенной *in vitro* чувствительности, но и от ряда других, иногда трудно прогнозируемых факторов: фенотипической и генотипической изменчивости возбудителя, особенностей фармакокинетики и фармакодинамики препарата, а также состояния антиинфекционной защиты больного.

В качестве перспективных источников получения соединений с антимикробной активностью рассматриваются природные соединения, в частности, природные дитерпеноиды, синтезируемые различными растениями (Старцева и др., 2009), бактериями и грибами (Reynolds, 1996). Лечебные свойства природных дитерпеноидов чаще всего связывают со способностью ингибировать синтез бактериальных белков посредством взаимодействия с жизненно важным для бактериальной клетки белком, участвующим в процессе транслокации на рибосоме при образовании пептидной связи – фактором элонгации G (Cundliffe, 1972). Однако стоит отметить, что выделение природных дитерпеноидов в настоящее время затруднено в связи со сложностью идентификации новых классов антибиотиков на фоне известных веществ, поэтому все более актуальным представляется осуществление химических модификаций существующих

антибактериальных препаратов, позволяющих усилить или изменить их нативную активность (Страчунский, 2014).

Цель исследования. Поиск новых высокоэффективных соединений с противомикробной активностью среди продуктов органического синтеза и изучение биологической активности перспективных соединений.

Задачи исследования

1. Подбор питательных сред и условий для выделения и культивирования тестируемых микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sobrinus* и *Candida albicans*.

2. Приготовление рабочих растворов с одинаковой концентрацией для 20 тестируемых веществ дитерпеноидной природы.

3. Приготовление дисков, пропитанных химическими соединениями, для экспериментального определения антибиотикочувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом.

4. Определение степени чувствительности исследуемых микроорганизмов к тестируемым химическим соединениям диско-диффузионным методом.

Практическая значимость.

Протестировано 20 химических соединений, представляющих собой модификации дитерпеноидов, которые могут быть использованы для создания антибактериальных препаратов, эффективных в лечении заболеваний бактериальной этиологии.

Область применения результатов исследования.

Новые химические соединения, синтезированные на основе дитерпеноидов в перспективе могут быть использованы как в лечении системных и местных стафилококковых инфекций, так и в лечении ряда инфекций нестафилококковой этиологии.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Методы определения чувствительности к антимикробным Препаратам

В последние годы существенно растёт значимость изучения микроорганизмов, способных вызывать патологические изменения в организме человека. Актуальность темы определяется все большим возрастанием внимания к проблеме резистентности микроорганизмов к антибиотикам. Разрабатываются различные подходы к практическому применению лекарственных средств, способствующие снижению возникновения устойчивых форм. Потеря эффективности антибиотиков подрывает способность бороться с инфекционными заболеваниями и управлять инфекционными осложнениями.

Основной целью оценки антибиотикочувствительности микроорганизмов является прогнозирование эффективности антибактериальной терапии инфекций у конкретных пациентов. Оценка антибиотикочувствительности также проводится при эпидемиологических исследованиях по наблюдению за распространением резистентности и при сравнительной оценке новых антибактериальных препаратов (Егоров, 2014).

Методы определения чувствительности микроорганизмов к АБП подразделяются на фенотипические и генотипические. Генотипические методы основаны на прямой детекции генов, кодирующих детерминанты устойчивости к АБП. Фенотипические методы предполагают оценку влияния АБП на жизнедеятельность микроорганизмов по скорости роста и биохимической активности. К данной группе методов относят методы серийных разведений (в бульоне/агаре) и диффузионные (диско-диффузионный и эпсилотрический (Е-тест)), основанные на детекции роста исследуемых культур.

Генотипический метод является доминирующим в полифазной таксономии. Он основан на изучении Ц+Г состава ДНК, на исследовании ДНК-рРНК гомологии, на установлении родственных отношений между микроорганизмами, которые закодированы в нуклеотидных последовательностях генов 16S или 23S р-РНК. Например, при определении принадлежности микроорганизма к определенному виду уровень сходства нуклеотидных последовательностей ДНК около 70% играет первостепенную роль. Поэтому генотипический метод часто называют методом геномной дактилоскопии (Spelman D).

Фенотипические исследования используются чаще всего в различных схемах идентификации микроорганизмов, для формального описания таксона, от разновидности и подвида до рода и семейства. В то время как генотипические данные необходимы для размещения таксона на филогенетическом древе и в системе классификации, фенотипическая характеристика дает описательную информацию, позволяющую идентифицировать тот или иной вид микроорганизма. Классические фенотипические характеристики включают в себя морфологические, физиологические, биохимические, хемотаксономические и серологические особенности микроорганизмов (Гусев, Минеева, 2012).

1.1.1. Методы серийных разведений

Общим и крайне важным этапом для всех методов серийных разведений является приготовление растворов АПБ. Различают "основные" растворы АБП (пригодные для хранения) и "рабочие" - те, которые необходимо использовать "ex tempore" для приготовления питательных сред.

Для приготовления основных растворов АБП необходимо использовать субстанции АБП с известной активностью, лекарственные формы не пригодны. Для взвешивания субстанций необходимо

использовать электронные лабораторные весы с точностью до 4 знака, для измерения объемов - калиброванные дозаторы и пипетки.

Основные растворы АБП готовят в концентрации 1000,0 мкг/мл и выше. Навески АБП для приготовления базовых растворов готовят с учетом их активности. Расчет навески АБП для приготовления базового раствора проводят по формуле:

$$m_{AB_{теор.}} (мг) = \frac{C(мкг/мл) \times V_{теор.} (мл)}{A(содержание АПБ в мкг/мг)},$$

где:

$m_{AB_{теор.}}$ - расчетная (теоретическая) навеска АБП;

C - необходимая концентрация АБП;

$V_{теор.}$ - объем растворителя для растворения теоретической навески;

A - активность АБП (количество активного вещества, содержащегося в субстанции).

Взвесить точно расчетное количество порошка практически невозможно. Поэтому готовят близкую к расчетной навеску, а затем пересчитывают количество необходимого растворителя.

$$V_{практик.} (мл) = \frac{m_{AB_{практик.}} (мг) \times V_{теор.} (мл)}{m_{AB_{теор.}} (мг)},$$

где:

$V_{практик.}$ - объем растворителя для растворения практической навески;

$m_{AB_{практик.}}$ - полученная навеска АБП;

$m_{AB_{теор.}}$ - расчетная (теоретическая) навеска АБП;

$V_{теор.}$ - объем растворителя для растворения теоретической навески.

В связи с тем, что АБП существенно различаются по растворимости, в ряде случаев возникает необходимость использовать различные вещества для первичного растворения (солюбилизации) препаратов (растворители) и для доведения их до заданной концентрации (разбавители). В тех случаях, когда растворители и разбавители являются разными веществами, для

растворения АБП необходимо использовать минимально возможное количество растворителя.

Основные растворы необходимо хранить при температуре не выше -20°C (сроки хранения отдельных АБП при этой температуре существенно различаются). Оптимальными условиями для хранения основных растворов АБП является температура -60 °C и ниже, длительность не более 6 месяцев. При этом необходимо иметь в виду, что основные растворы бета-лактамов АБП могут терять активность и в более ранние сроки.

После извлечения из холодильника перед открыванием флаконов с основными растворами их необходимо довести до комнатной температуры для предотвращения конденсации влаги. Размороженные основные растворы должны быть использованы для приготовления рабочих растворов, повторное замораживание не допускается. Для приготовления рабочих растворов используется дистиллированная вода.

Из рабочих растворов готовят двукратные разведения АБП. При расчетах за основу берется конечная концентрация АБП в питательной среде равная 1,0 мкг/мл (более высокие - 2, 4, 8, и т.д.; более низкие - 0,5; 0,25; 0,125 и т.д.). При этом реальные концентрации растворов должны учитывать фактор разбавления раствора АБП при приготовлении чашек с плотной питательной средой или при инокуляции. Диапазон двукратных серийных разведений АБП зависит от вида тестируемого микроорганизма, предполагаемой активности АБП и целей исследования.

1.1.2. Метод серийных разведений в бульоне

Различают два основных варианта метода серийных разведений в бульоне: макрометод (пробирочный) и микрометод (при величине конечного объема 0,2 мл и меньше). Область применения макрометода из-за низкой производительности ограничивается случаями необходимости оценки чувствительности единичных штаммов.

1. Макрометод. Тестирование проводится в объеме 1 мл каждого разведения АБП с конечной концентрацией исследуемого микроорганизма примерно 5×10^5 КОЕ/мл.

Питательный бульон для определения чувствительности разливают по 0,5 мл в каждую пробирку (рисунок 1). Количество пробирок определяется необходимым диапазоном разведений АБП и увеличивается на одну для постановки «отрицательного» контроля. Рабочий раствор АБП готовят из основного раствора с использованием жидкой питательной среды. 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 бульона. Тщательно перемешивают и новым стерильным наконечником переносят 0,5 мл раствора АБП в бульоне во вторую пробирку, содержащую первоначально 0,5 мл бульона. Эту процедуру повторяют, пока не будет приготовлен весь необходимый ряд разведений. Из последней пробирки 0,5 мл бульона удаляют.

Таким образом, получается ряд пробирок с растворами АБП, концентрации которых отличаются в соседних пробирках в 2 раза. Одновременно готовятся дополнительные ряды серийных разведений АБП для тестирования контрольных штаммов. Серия разведений обязательно должна включать в себя пограничные концентрации и допустимые диапазоны МПК для контрольных штаммов.

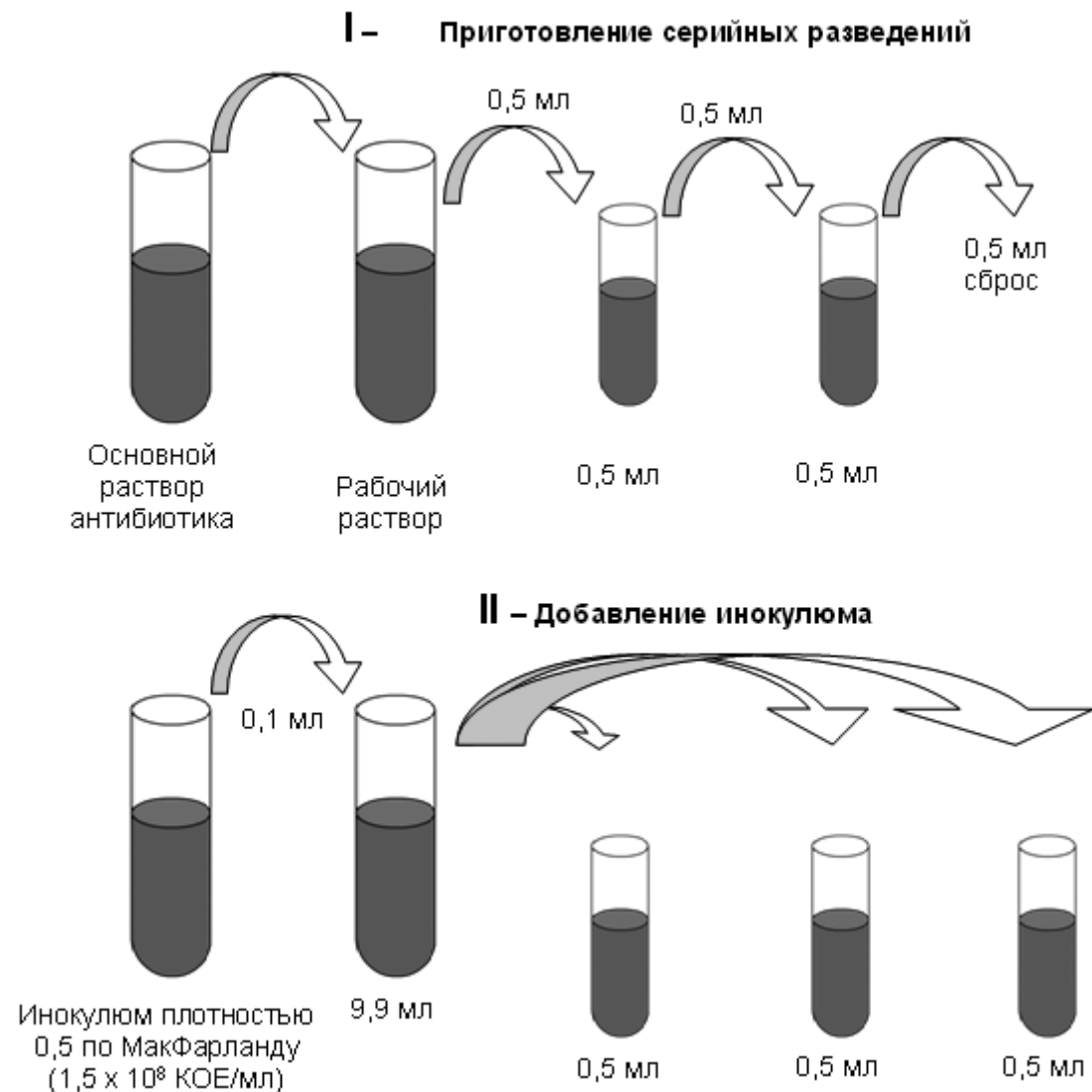


Рисунок 1 - Алгоритм определения чувствительности одной исследуемой культуры к одному АБП методом разведений в жидкой питательной среде

Для инокуляции используют стандартную микробную взвесь, эквивалентную 0,5 по стандарту МакФарланда, разведенную в 100 раз на питательном бульоне, после чего концентрация микроорганизма в ней составит примерно 10^6 КОЕ/мл.

По 0,5 мл инокулюма вносят в каждую пробирку, содержащую по 0,5 мл соответствующего разведения АБП, и в одну пробирку с 0,5 мл питательного бульона без антибиотика («отрицательный» контроль). Конечная концентрация микроорганизма в каждой пробирке достигнет необходимой – примерно 5×10^5 КОЕ/мл. Инокулюм должен быть внесен в

пробирки с разведениями АБП не позднее 15–30 мин с момента приготовления.

Затем пробирки закрывают стерильными ватно-марлевыми пробками или металлическим колпачками, и все пробирки с тестируемыми штаммами, кроме пробирки с «отрицательным» контролем, инкубируются в обычной атмосфере при температуре 35 °С в течение 16–20 или 20–24 ч (в зависимости от вида тестируемого микроорганизма). Пробирка с «отрицательным» контролем помещается в холодильник при 4 °С, где хранится до учета результатов.

Учет результатов. Для определения наличия роста микроорганизма пробирки с посевами просматриваются в проходящем свете. Рост культуры в присутствии АБП сравнивается с референтной пробиркой («отрицательный» контроль), содержащей исходный инокулюм и хранившейся в холодильнике. МПК определяется по наименьшей концентрации АБП, которая подавляет видимый рост микроорганизма.

2. Микрометод. Преимуществами микрометода является высокая производительность и возможность длительного хранения заранее приготовленных планшет. Тестирование проводится при величине конечного объема 0,2 мл и меньше, что позволяет значительно сократить количество расходных материалов. Методика не имеет отличий от макрометода, за исключением используемых объемов питательного бульона с разведениями антибиотиков и инокулюма, но требует дополнительного оснащения лаборатории многоканальными пипетками, 96-луночными планшетами для иммунологических исследований (с плоским дном) со стерильными крышками.

Первым этапом является подготовка планшет, пригодных для хранения. После внесения рабочих растворов антибиотиков в лунки запаянные в полиэтилен планшеты могут храниться при температуре ниже –60° С до момента использования. Повторное замораживание – оттаивание не допускается.

Для проведения исследования планшеты после извлечения из холодильника выдерживают до достижения ими комнатной температуры, после чего их инокулируют приготовленной суспензией исследуемого микроорганизма. При проведении инкубации планшет обязательно должен быть закрыт крышкой для предотвращения высыхания содержимого лунок.

Учет результатов проводят визуально или спектрофотометрически, сравнивая рост микроорганизма в присутствии АБП с ростом культуры в ячейке без АБП. За МПК принимают минимальную концентрацию, обеспечивающую полное подавление видимого роста исследуемого штамма.

Метод серийных микроразведений в бульоне легко поддается модификациям для разработки тест-систем. При использовании тест-систем, разрешенных к применению в Российской Федерации в установленном порядке, следует пользоваться инструкциями изготовителей.

Контроль качества. При постановке методов серийных разведений в бульоне необходимо проводить контроль роста культуры в среде без АБП. Необходимо также контролировать чистоту суспензии микроорганизма, использованной для инокуляции, путем посева на неселективные среды. Каждая партия тестируемых штаммов сопровождается внутренним контролем качества исследования с использованием соответствующих контрольных (референтных) штаммов (Лабинская, 2004; Меньшиков, 2009).

1.1.3. Метод серийных разведений в агаре

Метод серийных разведений в агаре позволяет одновременно определить МПК партии штаммов (от 15 до 30 клинических штаммов + контрольные штаммы (в зависимости от используемой модели инокулятора)).

Принцип метода заключается в посеве тестируемых микроорганизмов на чашки Петри с агаром, содержащим последовательные двойные разведения антибиотиков. Одновременно проводится тестирование партии клинических штаммов и соответствующих контрольных штаммов, а также контроль роста микроорганизмов на чашках без АБП и контроль чистоты культуры путем высева образцов инокулята на неселективные питательные среды.

Приготовление серийных разведений АБП. Из основного раствора исследуемого АБП готовят рабочий раствор в концентрации, в 10 раз превосходящей максимальную из используемых в конкретном исследовании. Затем готовят серию двукратных разведений рабочего раствора. Таким образом, концентрация в АБП в каждом последующем разведении должна быть в 2 раза меньшей чем в предыдущем. Для приготовления серии разведений используются любые стерильные химически инертные лабораторные ёмкости с закручивающимися крышками объёмом не менее 10 мл (для удобства размешивания).

Питательная среда. Сухая агаризованная питательная среда растворяется и автоклавируется в соответствии с инструкцией изготовителя. После автоклавирования колбы с питательной средой помещаются на водяную баню при 48–50 °С, где выдерживаются до достижения указанной температуры, после чего в них асептически вносят рабочие растворы антибиотиков (1 часть рабочего раствора АБП на 9 частей расплавленного агара) и, при необходимости, термолабильные питательные добавки. Затем среду тщательно перемешивают и разливают

по чашкам Петри, толщина слоя питательной среды в которых должна быть 3–4 мм.

Вторым способом приготовления чашек Петри с агаром, содержащим разведения АБП, является смешивание питательной среды и раствора АБП непосредственно в чашке Петри. Для приготовления стандартных пластиковых чашек диаметром 90 мм необходимо к 2 мл раствора АБП добавить 18 мл разогретого до 50 °С жидкого агара. Чашки предварительно маркируются с указанием препарата и его концентрации. Очень важно тщательно перемешивать агар до того, как он начнёт застывать для равномерного распределения АБП по всей толще питательной среды. Перемешивание производится на горизонтальной поверхности последовательно плавными разнонаправленными круговыми движениями чашки. После приготовления чашек агар должен затвердеть в горизонтальном положении. Нельзя резко передвигать, переносить чашки до полного застывания агара.

Параллельно с чашками Петри, содержащими растворы антибиотиков, для контроля роста готовят чашки Петри без антибиотиков. Чашки оставляют при комнатной температуре для застывания и подсушивания на 10–12 ч. Приготовленные указанным образом чашки Петри предпочтительнее использовать немедленно, однако допускается хранение в запаянных полиэтиленовых пакетах при 4–8 °С в течение 5 сут. При этом необходимо иметь в виду, что некоторые беталактамы антибиотики (прежде всего, ампициллин, цефаклор, имипенем), особенно при низких концентрациях не выдерживают даже указанный срок хранения. В этой связи стабильность антибиотиков в приготовленных в лаборатории чашках Петри целесообразно устанавливать экспериментально с использованием референтных штаммов.

Приготовление инокулюма и инокуляция. Конечная посевная доза исследуемого микроорганизма на поверхности питательной среды должна составлять 10^4 КОЕ. Поскольку коммерческие инокуляторы или

стандартная бактериологическая петля диаметром 3,0 мм переносят 1–2 мкл жидкости, концентрация микроорганизмов в исходной суспензии должна быть 10^7 КОЕ/мл. Такую концентрацию можно получить при разведении стандартной микробной суспензии, соответствующей стандарту 0,5 по МакФарланду в 10 раз. Полученную суспензию необходимо инокулировать на поверхность агара в течение 15 мин после приготовления, при этом образуется пятно диаметром 5–8 мм.

Для контроля качества приготовления суспензий периодически рекомендуется проводить подсчет реальных КОЕ путем высева образца приготовленного инокулюма на неселективные питательные среды.

Инкубация. После инокуляции чашки оставляют при комнатной температуре для подсыхания, далее переворачивают и инкубируют при температуре 35 °С в течение 18–24 ч (в зависимости от вида тестируемого микроорганизма).

Учет результатов. Учет результатов проводят, поместив чашку на темную не отражающую свет поверхность. За МПК принимают концентрацию, вызвавшую полную ингибицию видимого роста. Для дифференцировки нежного роста от налета, оставшегося после инокулята, в ряде случаев целесообразно использовать увеличение. Появление единственной колонии на чашке с концентрацией на 1 разведение выше, чем явная МПК, можно не учитывать. Результат оценки антибиотикочувствительности имеет смысл учитывать только при подтверждении чистоты культуры.

Контроль качества. При постановке методов серийных разведений в агаре необходимо проводить контроль роста культуры на чашке Петри с питательной средой, не содержащей АБП. Важнейшим требованием контроля качества является высев использованной для инокуляции суспензии на плотную неселективную среду для подтверждения чистоты культуры. Каждая партия тестируемых штаммов сопровождается внутренним контролем качества исследования с использованием

соответствующих контрольных (референтных) штаммов (Лабинская, 2004; Меньшиков, 2009).

1.1.4. Диско-диффузионный метод (ДДМ)

Диско-диффузионный метод является одним из старейших и остается наиболее распространенным методом оценки антибиотикочувствительности в обычных бактериологических лабораториях. Он подходит для исследования большинства бактериальных патогенов, в том числе и для наиболее распространенных бактерий со сложными питательными потребностями. Метод является универсальным для широкого круга антимикробных препаратов и не требует обязательного использования специального оборудования.

Принцип метода. ДДМ определения чувствительности основан на способности АБП диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности агара.

Питательная среда. Для определения чувствительности ДДМ используют такую же, как и для метода разведений в агаре. К качеству питательных сред для постановки диско-диффузионного метода выдвигаются те же требования, что и к плотным питательным средам для постановки метода серийных разведений в агаре, соответственно используются и те же методы контроля качества.

Приготовление чашек Петри с плотной питательной средой связано с некоторыми особенностями. Плотную питательную среду готовят в соответствии с инструкцией изготовителя. Важным моментом при определении чувствительности ДДМ является толщина слоя агара в чашке. Она должна составлять $4,0 \pm 0,5$ мм, что достигается при внесении в чашку Петри диаметром 90 мм строго 20 мл агара, диаметром 100 мм – 25 мл агара, а диаметром 150 мм – 60 мл агара. Перед заполнением

расплавленной средой чашки Петри устанавливают на строго горизонтальную поверхность (выверенную по уровню, без впадин и выпуклостей). Соблюдение указанных предосторожностей необходимо в связи с тем, что размер и форма зоны подавления роста зависят от глубины и равномерности агарового слоя.

После заполнения чашки оставляют при комнатной температуре для застывания. Хранить чашки можно запаянными в полиэтиленовые пакеты 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 необходимо проконтролировать отсутствие конденсата жидкости на внутренней поверхности крышек.

Диски с антибиотиками. Для определения чувствительности ДДМ следует использовать только стандартизированные качественные диски. Изготовление дисков с АБП, необходимых для определения чувствительности диско-диффузионным методом, в лабораторных условиях нецелесообразно. Это связано с жесткими требованиями к исходным материалам (субстанциям АБП, картону) и со значительной трудоемкостью методов контроля качества дисков (Борисов Л.Б.).

Для получения правильных результатов определения чувствительности ДДМ 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 АБП осуществляется в герметичной упаковке в морозильной камере при температуре –18 °С и ниже. Небольшие партии дисков, используемые в повседневной работе, можно хранить в холодильнике при температуре 4–8 °С, плотно укупороенными так, чтобы гарантировать невозможность попадания во флакон влаги,

кроме того для дополнительной защиты от влаги во флаконах (картриджах) с дисками коммерческого изготовления 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.

Приготовление бактериальной суспензии и инокуляция. При определении чувствительности ДДМ используют стандартный инокулюм, соответствующий по плотности 0,5 по стандарту МакФарланда и содержащий примерно $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Инокулюм следует использовать в течение 15 минут после приготовления. Для инокуляции приготовленных чашек с агаром можно использовать два способа.

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° .

2. При использовании второго 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. Аппликация дисков и инкубация. Не позднее, чем через 15 мин после инокуляции на поверхность питательной среды наносят диски с АБП. 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 АБП. Диски должны

равномерно контактировать с поверхностью агара, для чего их следует аккуратно- но прижать пинцетом.

Непосредственно после аппликации дисков чашки Петри помещают в термостат кверху 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» АБП в агар и к увеличению диаметра зоны подавления роста.

Учет результатов. 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 измеряют с точностью до 1 мм, предпочтительнее пользоваться штангенциркулем или кронциркулем.

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.

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.

При определении чувствительности ДДМ 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 (Лабинская, 2004; Меньшиков, 2009).

1.1.5. Е-тест (эпсилOMETрический метод)

Метод Е-тестов занимает промежуточное положение между двумя вышеописанными методами. Е-тесты, как и диски при диско-диффузионном методе, укладывают на поверхность стандартного питательного агара, засеянного испытуемой культурой в виде «газона». После инкубирования вокруг полоски формируется эллипсовидная зона задержки роста, которая, сужается в области малых концентраций и «пересекает» полосу на уровне, соответствующем величине МИК (Лабинская, 2004).

В эпсилOMETрическом методе в качестве носителя используется узкая полоска полимера (0,5х6,0 см), пропитанная различными концентрациями антибиотика (от минимальных до максимальных). Ингибция роста микроорганизма вокруг полоски-носителя происходит только в той зоне, где концентрация антибиотика, диффундирующего из носителя, выше МПК.

Результатом диффузии антибиотика в питательную среду является образование вокруг носителя каплевидной зоны ингибции роста. Величины концентрации антибиотика в каждом участке носителя типографским способом нанесены на соответствующем отрезке наружной (обращённой к исследователю) поверхности носителя. Величину МПК

учитывают в том месте, где граница зоны ингибиции роста вплотную подходит к носителю (Лабинская, 2004).

1.1.6. Метод пограничных концентраций

Метод пограничных концентраций можно считать усеченным методом серийных разведений. В соответствии с ним испытываемую культуру вносят только в две лунки (пробирки), где находятся высокая (С) и низкая (с) концентрации антибиотика. Концентрация С соответствует границе между устойчивыми и умеренно-устойчивыми штаммами, а концентрация с - границе между умеренно-устойчивыми и чувствительными штаммами. Если после инкубирования рост отсутствует в обеих лунках, штамм относят к чувствительным, если только в лунке с концентрацией С - к умеренно-устойчивым штаммам, а если в обеих лунках имеется рост, штамм относят к устойчивым.

Важными условиями являются:

- использование только чистых культур и соблюдение правил асептики;
- применение стандартных питательных сред, соответствующих питательным потребностям испытываемого микроорганизма (среда Миеллера-Хинтона, агар АГВ, среда НТМ и др.);
- внесение испытываемой культуры в стандартной дозе и соблюдение установленного соотношения инокулюм/среда;
- правильный режим инкубирования и метод учета (Харкевич Д.А.).

1.1.7. ДНК-ДНК-гибридизация

Метод ДНК-ДНК-гибридизации используется таксономистами с 1960-х годов для определения взаимосвязи между штаммами и по-

прежнему является важным методом в определении бактериальных видов (Резван, Грудина, 2001).

Гибридизация ДНК — соединение *in vitro* комплементарных одноцепочечных нуклеиновых кислот в одну молекулу. При полной комплементарности объединение происходит легко и быстро, а в случае частичной некомплементарности слияние цепочек замедляется, что позволяет оценить степень комплементарности. Возможна гибридизация ДНК-ДНК и ДНК-РНК.

Многие этапы анализа рекомбинантной ДНК основаны на комплементарности взаимодействия цепей нуклеиновых кислот - необходимом условии синтеза ДНК и РНК. Путем нагревания или обработки щелочью двухцепочечную ДНК разделяют на отдельные цепи (денатурированная ДНК). Денатурированную ДНК инкубируют в условиях, обеспечивающих гибридизацию нуклеиновых кислот, то есть повторное образование двухцепочечных молекул путем спаривания нуклеотидов комплементарных цепей. Эта реакция настолько специфична, что гибрид одноцепочечной молекулы ДНК с комплементарной цепью (РНК или ДНК) можно выявить, даже если ДНК составляет лишь одну десятитысячную часть от общего количества ДНК.

Метод позволяет различить полностью и частично гомологичные последовательности.

Специфичность гибридизации нуклеиновых кислот, часто в сочетании с фракционированием или амплификацией, позволяет выявить нужный ген среди десятков тысяч других или нуклеиновую кислоту возбудителя инфекции даже тогда, когда единственная ее копия приходится на несколько клеток человека (Воробьев А.А.).

Для выявления гибридизационных зондов используют радиоактивную метку или нерадиоактивные методы.

Часто применяется гибридизация нуклеиновых кислот с аллельспецифическими зондами. Такой зонд представляет собой синтетический одноцепочечный олигонуклеотид, обычно длиной 15-20 нуклеотидов. Синтезируют два зонда, различающиеся одним нуклеотидом. Один из них точно соответствует нормальной последовательности, а другой - мутантной; в последнем замещенный нуклеотид расположен в средней части зонда. Условия гибридизации подбирают таким образом, что олигонуклеотид связывается только с идеально комплементарной ему последовательностью. Аллель-специфические олигонуклеотидные зонды можно использовать в сочетании с блоттингом по Саузерну, но сейчас их чаще используют в сочетании с амплификацией ДНК.

Метод ДНК-ДНК гибридизации основан на том факте, что стабильность ДНК-ДНК дуплексов при определенной температуре зависит от числа нуклеотидов образующих комплементарные пары. Очевидно, что число комплементарных нуклеотидов в дуплексе где обе нити происходят из одной и той же молекулы ДНК (в гомодуплексах) равно 100%. Если же обе нити имеют разное происхождение (гетеродуплекс), то, в зависимости от числа произошедших мутаций, число комплементарных пар будет меньше 100%. Соответственно гетеродуплексы должны распадаться (плавится) при более низкой температуре, чем гомодуплексы. Причем, чем ниже температура плавления, тем больше различия в двух последовательностях.

Температурная стабильность гибридной ДНК определяется температурой при которой 50% гибридной ДНК диссоциировалось в одноцепочечную форму. Затем эта температура сравнивается со средней температурой 50%-го плавления гомодуплексов обоих типов последовательностей участвующих в образовании гетеродуплекса, эта температура обычно обозначается T_m . Разница между медианной температурой плавления гетеро- и гомодуплексов обозначается как dT_m . Показана линейная зависимость dT_m от числа неспаренных оснований

(Britten, 1974): $p=cdT_m$. Константа c обычно определяется условиями проведения эксперимента и обычно варьирует от 0.01 до 0.015. Определение dT_m требует большого числа повторений, поскольку велика экспериментальная (Картель, 2011).

1.1.8. Референтный метод количественного определения минимальных подавляющих концентраций антимикробных препаратов

Референтным считается метод последовательных микроразведений регламентированный международным стандартом ISO 20776-1:2006 ("Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices - Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases"), а также ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010 «Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы in vitro. Исследование чувствительности инфекционных препаратов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. (Comite de l'Antibiogramme de la Societe Francaise de Microbiologie, 1966).

Референтный метод лабораторного исследования активности антимикробных препаратов против быстрорастущих аэробных бактерий, вызывающих инфекционные болезни». Метод основан на принципах, описанных Ericsson и Sherris, широко применяется в различных странах и в зависимости от используемого метода.

Референтный метод микроразведений в бульоне предназначен для определения МПК. МПК отражает активность препарата в описанных условиях проведения теста и может быть использована для целей оптимизации лечения, принимая в расчет другие факторы, такие как фармакология препарата или механизмы резистентности бактерий. Это

позволяет осуществить классификацию бактерий как "чувствительную" (Ч), "умеренно-резистентную" (УР) и "резистентную" (Р) формы. Кроме того, распределения МПК могут использоваться для определения «дикого» или «не дикого» типов бактериальной популяции. Хотя клиническая интерпретация значения МПК не является предметом настоящего раздела, для определенных антибактериальных препаратов или комбинации бактерия/антибиотик для облегчения клинической интерпретации результатов необходимы модификации основного метода (Маянский А.Н., Чеботарь И.В., Руднева Е.И., Чистякова В.П.).

Для получения сопоставимых и надежных результатов рутинные методы или диагностические системы желательно сравнить с данным референтным методом. рекомендован Европейским комитетом по оценке антибиотикочувствительности (EUCAST). Указанный метод, предназначен для количественного определения МПК антибактериальных препаратов в отношении чистых культур аэробных бактерий, растущих в бульоне Мюллера-Хинтон, с добавками, либо без них.

В повседневной практике большинства лабораторий референтный метод определения МПК применяют достаточно редко. Этот метод используют в исследованиях по надзору за распространением резистентности, при сравнительных испытаниях новых антибактериальных препаратов, в тех случаях, когда рутинные исследования антибиотикочувствительности дают сомнительные результаты, а также при необходимости получить количественные результаты для обоснования рациональной этиотропной терапии. Величина МПК служит руководством для клинициста при оценке чувствительности организма к антибактериальному препарату и помогает в принятии решений о проведении лечения. Необходимы тщательный контроль и стандартизация внутри- и межлабораторной воспроизводимости, поскольку результаты могут значительно различаться (Murray I.A., Cann P.A., Day P. J.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования были 20 химических соединений (TEV-001, TEV-002, TEV-006, TEV-012, TEV-016, TEV-102, TEV-103, TEV-104, TEV-105, TEV-106, TEV-108, TEV-200, TEV-201, TEV-202, TEV-240, TEV-3096, TEV-3097, TEV-3099, TEV-320, TEV-326), полученных путем органического синтеза на основе дитерпеноидов.

В качестве тест-штаммов для определения антимикробной активности использовали 6 коллекционных штаммов бактерий:

Escherichia coli №25922 (Коллекция Клиники БГМУ),

Staphylococcus aureus №966 (Коллекция Клиники БГМУ),

Streptococcus oralis №27417 (Коллекция кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии БГМУ),

Streptococcus sobrinus №28417 (Коллекция кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии БГМУ),

Streptococcus mitis №29417 (Коллекция кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии БГМУ),

Candida albicans №24433 (Коллекция Клиники БГМУ).

2.2. Приготовление селективных и дифференциально-диагностических питательных сред

1) Селективный агар для стрептококков (Streptococcus Selection Agar, «HiMedia», Индия).

- Применение: питательная среда предназначена для селективного выделения и подсчета всех типов стрептококков, включая бета-гемолитические стрептококки группы А.
- Состав среды:

Ингредиенты	Вес, грамм/литр
Гидролизат казеина	15,00
Папаиновый перевар соевой муки	5,00
Глюкоза	5,00
Натрия хлорид	4,00
Натрия цитрат	1,00
Натрия сульфит	0,20
L-Цистин	0,20
Натрия азид	0,20
Кристаллический фиолетовый	0,0002
Агар-агар	15,00
Конечное значение pH (при 25°C) $7,4 \pm 0,2$	

- **Ход приготовления питательной среды:**

Размешивали 45,6 г питательной среды в 1000 мл дистиллированной воды. Подогревали до кипения для полного растворения частиц. Если предполагалось использовать среду в тот же день, автоклавирование не требовалось. В противном случае стерилизовали автоклавированием при 0,9 атм (118°C) в течение 15 мин., не допуская перегревания среды.

- **Культивирование в течение 18-24 ч при 35-37°C.**
- **Принцип и оценка результата:**

Папаиновый перевар соевой муки, гидролизат казеина, соли и глюкоза служат источником необходимых питательных веществ для роста стрептококков. Азид и сульфит натрия подавляют рост грамположительных палочек, а кристаллический фиолетовый – рост стафилококков. Вместе с тем указанные ингибиторы в данных концентрациях не подавляют рост стрептококков, именно поэтому нами были использованы именно эти среды для выделения и культивирования стрептококков. Также на этой среде активно подавляется рост

колиформных бактерий, протеев, псевдомонад и бацилл, но некоторые стафилококки и пневмококки могут давать на ней рост. Все колонии стрептококков, выросшие на данной среде, отправлялись на дальнейшую идентификацию.

2) Основа стрептококкового агара (Mitis Salivarius Agar Base, «HiMedia», Индия).

- Применение: для выделения из смешанных культур стрептококков, особенно *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis*, которые дают на кровяном агаре альфа-гемолиз или относятся к негемолитическим.
- Состав среды:

Ингредиенты	Вес, грамм/литр
Гидролизат казеина	15,00
Пептический перевар животной ткани	5,00
Глюкоза	1,00
Сахароза	50,00
Калия гидрофосфат	4,00
Трипановый синий	0,075
Кристаллический фиолетовый	0,0008
Агар-агар	15,00
Конечное значение pH (при 25°C) $7,4 \pm 0,2$	

- Ход приготовления питательной среды:

Размешивали 90,0 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды. Кипятили для полного растворения частиц. Затем разливали в соответствующие емкости. Стерилизовали автоклавированием при 1,1 атм (121°C) в течение 15 мин. Остужали до 50-55°C и асептично добавляли 1 мл 1%-ного

раствора теллурита калия. После добавления теллурита калия питательную среду не нагревали.

- Культивирование в течение 18-48 ч при 35-37°C.
- Принцип и оценка результата:

Эта среда готовится по прописи Чепмен (1) для выделения из смешанных культур стрептококков, которые дают альфа-гемолиз или относятся к негемолитическим. На этой высокоселективной среде (при добавлении 1% теллурита калия) можно выделять стрептококки из обильно загрязненного материала, например, различных экссудатов, фекалий и пр. На ней подавляется рост широкого круга бактерий.

Гидролизат казеина и пептический перевар животной ткани служат источником азотистых питательных веществ (аминокислот, пептидов), витамина B1, микроэлементов и других веществ, необходимых для роста микроорганизмов. Глюкоза и сахароза являются источником ферментируемых углеводов. Фосфат обеспечивает буферные свойства среды. Трипановый синий является кислым синим диазокрасителем, кристаллический фиолетовый – щелочным красителем и бактериостатическим средством, которое подавляет рост многих грамположительных микроорганизмов.

3) Основа колумбийского кровяного агара (Columbia Blood Agar Base, «HiMedia», Индия).

- Применение: в качестве эффективной основы для приготовления кровяного, шоколадного агаров, а также различных селективных и дифференциальных сред.
- Состав среды:

Ингредиенты	Вес, грамм/литр
Пептон (специальный)	23,00
Крахмал кукурузный	1,00
Натрия хлорид	5,00
Агар-агар	15,00

Ингредиенты	Вес, грамм/литр
Конечное значение pH (при 25°C) 7,3 ± 0,2	

- Ход приготовления питательной среды:

Размешивали 44,0 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды. Кипятили для полного растворения частиц. Стерилизовали автоклавированием при 1,1 атм (121°C) в течение 15 мин. Остужали до 40-50°C и асептично вносили стерильную дефибрированную кровь барана (до 5% об/об).

- Культивирование в течение 40-48 ч при 35-37°C.
- Принцип и оценка результата:

Присутствие специального пептона обеспечивает быстрый и обильный рост на ней даже прихотливых микроорганизмов. Кроме того, на ней вырастают типичные колонии, лучше проявляется пигментообразование и более четкие гемолитические реакции.

Кукурузный крахмал служит источником энергии и одновременно нейтрализует токсические метаболиты. Баранья кровь позволяет оценить способность микробов к гемолизу и обеспечивает их гемином (X фактором), который необходим для роста многих бактерий. Вместе с тем в среде нет фактора V (никотинамидадениндинуклеотида), поэтому *Haemophilus influenzae*, имеющие потребность в обоих факторах (X и V), на этой среде расти не будут.

4) Агар Мюллера-Хинтона (Mueller Hinton Agar, «HiMedia», Индия).

- Применение: для культивирования нейссерий и для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным средствам.
- Состав среды:

Ингредиенты	Вес, грамм/литр
Мясной настой	300,00
Гидролизат казеина	17,50

Ингредиенты	Вес, грамм/литр
Крахмал	1,50
Агар-агар	17,00
Конечное значение pH (при 25°C) $7,3 \pm 0,2$	

- **Ход приготовления питательной среды:**

Размешивали 38,0 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды. Кипятили для полного растворения частиц. Стерилизовали автоклавированием при 1,1 атм (121°C) в течение 15 мин. Тщательно перемешивали и разливали в стерильные чашки Петри.

- **Культивирование в течение 18-24 ч при 37°C.**

- **Принцип и оценка результата:**

Гидролизат казеина и мясной настой источником углерода, азота, серы, витаминов и других важных факторов для роста микроорганизмов. Крахмал выступает в роли защитного коллоида, нейтрализующего токсические вещества, образуемые в среде при культивировании. Гонококки и менингококки растут на этой среде очень хорошо. Ввиду высокой воспроизводимости результатов агар Мюллера-Хинтона рекомендован экспертами ВОЗ для проведения тестов антибиотикочувствительности микроорганизмов.

5) Среда АГВ (ФГУП «НПО «Микроген», Махачкала).

- **Применение:** для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.
- **Состав среды:**

Ингредиенты	Вес, грамм/литр
Основа питательная для АГВ сухая	41,0
Крахмал растворимый	0,5
Динатрия фосфат обезвоженный	3,5

- **Ход приготовления питательной среды:**

Размешивали 45 г сухой питательной среды в 1000 мл дистиллированной воды. Кипятили 3 мин до полного расплавления агара, фильтровали через ватный фильтр (вата медицинская гигроскопическая), стерилизовали автоклавированием в течение 15 мин при температуре $(121 \pm 2)^\circ\text{C}$. Среду после стерилизации разливали по 20 мл в стерильные чашки Петри. После застывания среды, открытые чашки со средой подсушивали в течение 50-60 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, соблюдая правила асептики. Готовая среда использовалась в течение 7 суток при условии хранения при температуре 2-8 $^\circ\text{C}$.

- **Культивирование в течение 18-24 ч при 37 $^\circ\text{C}$.**

6) Агар Айерса и Джонсона (Ayers & Johnson Agar (Stock Culture Agar), «HiMedia», Индия).

- **Применение:** для поддержания культур стрептококков и других условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

- **Состав среды:**

Ингредиенты	Вес, грамм/литр
Настой бычьего сердца	500,0
Протеозопептон	10,0
Желатин	10,0
Глюкоза	0,5
Казеин (очищенный)	5,0
Натрия гидрофосфат	4,0
Натрия цитрат	3,0
Агар-агар	7,5
Конечное значение pH (при 25 $^\circ\text{C}$) $7,5 \pm 0,2$	

- **Ход приготовления питательной среды:**

Размешивали 50,0 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды. Подогревали до кипения для полного растворения частиц. Разливали в пробирки и стерилизовали автоклавированием при 1,1 атм (121°C) в течение 15 мин. Тщательно перемешивали и разливали в стерильные пенициллиновые флаконы.

- **Культивирование в течение 18-48 ч при 37°C.**
- **Принцип и оценка результата:**

Питательная среда помимо отличного бактериального роста еще обеспечивает возможность сохранить жизнеспособность стрептококков и различных других микроорганизмов в течение длительного периода времени. Стрептококки сохраняют свою жизнеспособность в течение четырех месяцев после инкубирования в питательной среде. Хорошо забуференная среда и присутствие казеина и декстрозы служит главным источником энергии. Особенно хорошо подходит для поддержания стрептококков добавление настоя из бычьего сердца, а протеозопептон, желатин и казеин, в свою очередь, служат источниками азота, витаминов и аминокислот. Декстроза используется в качестве дополнительного источника энергии, а динатрийфосфат служит в качестве буферного агента, тогда как цитрат натрия действует как консервант.

Многие привередливые микроорганизмы, такие как *Mycobacterium species*, *S. pneumoniae*, демонстрируют хороший рост на этой среде

2.3. Условия культивирования микроорганизмов

Посевы инкубировали в течение 18-48 часов (в зависимости от питательной среды) при температуре 37°C в анаэробных или микроаэрофильных условиях в зависимости от типа дыхания тестовых микроорганизмов. Для создания анаэробии использовали CO₂-Инкубатор серии 8000 WJ («Thermo Scientific», США), а для поддержания

микроаэрофильных условий (концентрация O_2 – не более 5%) применяли метод «горящей свечи» (Егоров Н.С.).

2.4. Метод длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов

Поддержание штаммов в рабочем состоянии, сохранение их ценных свойств являются важными условиями практически любой работы с микроорганизмами – от первичного изучения до использования их в производстве различных биопрепаратов. Одним из самых нетрудоемких, не требующих дорогостоящего оборудования и в то же время незаменимого в повседневной работе с микроорганизмами является метод хранения культур под минеральным маслом. С помощью этого сравнительно простого и дешевого метода удастся весьма успешно сохранять месяцами или даже годами многие виды бактерий.

Для этого метода использовали стерильное минеральное масло медицинского назначения - вазелиновое масло с удельной плотностью 0,865–0,890 г/см³.

Техника проведения:

- 1) Масло стерилизовали в сушильном шкафу при температуре 170 °С в течение 1–2 ч, поскольку автоклавирование для этой цели применять не рекомендуется.
- 2) Культуры выращивали в толще агаризованной среды (столбиках).
- 3) Во флаконы с выросшими микроорганизмами стерильно наливали слой минерального масла высотой не менее 2 см. Слой масла служил защитой культур от высыхания, одновременно понижая их метаболизм. Покрытые маслом культуры хранили в вертикальном положении в холодильнике.
- 4) Для проверки сохранности культур следует периодически определять их жизнеспособность. Обычно культуры пересевают 1–2

раза в год на свежую среду. Для этого используют инокуляционные иглы или петли. При обжиге иглы (петли) следует позаботиться о том, чтобы брызги масла не попали на окружающие предметы и персонал.

- 5) Пересеянные культуры снова покрывают стерильным маслом, а исходные материалы хранят до тех пор, пока не станет ясно, что заложенный на хранение штамм не загрязнен и не изменен.

2.5. Определение антимикробной активности химических соединений

Противомикробную активность химических соединений оценивали полуколичественным диско-диффузионным методом. Для этого готовили рабочие растворы из имевшихся навесок тестируемых веществ в стерильных флаконах, которые растворяли в 1 мл диметилсульфоксида (ДМСО) с вычислением процентной концентрации ($C_{\%}$, %). Перед исследованием готовили диски из фильтровальной бумаги диаметром 5 мм, стерилизовали в сухожаровом шкафу, пропитывали рабочим раствором тестируемого вещества и высушивали в термостате.

В качестве тестовых микроорганизмов использовали музейные штаммы:

Escherichia coli №25922 (Коллекция Клиники БГМУ),

Staphylococcus aureus №966 (Коллекция Клиники БГМУ),

Streptococcus oralis №27417 (Коллекция кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии БГМУ),

Streptococcus sobrinus №28417 (Коллекция кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии БГМУ),

Streptococcus mitis №29417 (Коллекция кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии БГМУ),

Candida albicans №24433 (Коллекция Клиники БГМУ).

Перед исследованием тестовые культуры микроорганизмов суспендировали в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия и готовили стандартный инокулюм, соответствующий значению 0,5 по стандарту мутности МакФарланда и содержащий $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл бактерий. По 0,1 мл инокулюма в течение 15 минут после приготовления засеивали «сплошным газоном» на среду АГВ («Микроген», Россия). Подсушивали, после чего на поверхность питательной среды с соблюдением правил асептики укладывали диски с исследуемыми соединениями, диск с диметилсульфоксид (ДМСО) (отрицательный контроль) и диск с левофлоксацином (положительный контроль) (5 мкг/мл; «HiMedia», Индия) – не более 6 на 1 чашку Петри.

Посевы инкубировали в течение 16-18 часов при температуре 37°C в аэробных или микроаэрофильных условиях в зависимости от типа дыхания тестовых микроорганизмов. Для создания микроаэрофильных условий (концентрация O_2 – не более 5%) использовали метод «горящей свечи». Антибактериальную активность исследуемых химических соединений полуколичественно оценивали по диаметру зон задержки роста микроорганизмов (мм).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Определение антимикробной активности химических соединений на основе дитерпеноидов диско-диффузионным методом

Противомикробную активность химических соединений оценивали полуколичественным диско-диффузионным методом. Для этого готовили рабочие растворы из имевшихся навесок тестируемых веществ в стерильных флаконах, которые растворяли в 1 мл диметилсульфоксида (ДМСО) с вычислением процентной концентрации (С%, %). Перед исследованием готовили диски из фильтровальной бумаги диаметром 5 мм, стерилизовали в сухожаровом шкафу, пропитывали рабочим раствором тестируемого вещества и высушивали в термостате.

В качестве тестовых микроорганизмов использовали музейные штаммы:

Escherichia coli №25922 (Коллекция Клиники БГМУ),

Staphylococcus aureus №966 (Коллекция Клиники БГМУ),

Streptococcus oralis №27417 (Коллекция кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии БГМУ),

Streptococcus sobrinus №28417 (Коллекция кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии БГМУ),

Streptococcus mitis №29417 (Коллекция кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии БГМУ),

Candida albicans №24433 (Коллекция Клиники БГМУ).

На протяжении всего эксперимента музейные культуры хранились в толще агаризованной среды Айерса и Джонсона (Ayers & Johnson Agar (Stock Culture Agar), «HiMedia», Индия) под слоем минерального масла в соответствии с методикой, описанной нами ранее. Перед исследованием тестовые культуры микроорганизмов суспендировали в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия и готовили стандартный

инокулюм, соответствующий значению 0,5 по стандарту мутности МакФарланда и содержащий $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл бактерий. По 0,1 мл инокулюма в течение 15 минут после приготовления засеивали «сплошным газом» на среду Мюллера-Хинтона («HiMedia», Индия). Подсушивали, после чего на поверхность питательной среды с соблюдением правил асептики укладывали диски с исследуемыми соединениями, диск с ДМСО (отрицательный контроль) и диск с левофлоксацином (положительный контроль) (5 мкг/мл; «HiMedia», Индия) – 5 дисков на 1 чашку Петри.

Непосредственно после аппликации дисков чашки Петри помещали в термостат кверху дном и инкубировали в течение 16-18 часов при температуре 37°C в аэробных или микроаэрофильных условиях в зависимости от типа дыхания тестовых микроорганизмов. Для создания микроаэрофильных условий использовали метод «горящей свечи». Антибактериальную активность исследуемых химических соединений полуколичественно оценивали по диаметру зон задержки роста микроорганизмов (мм) (Lacey R.W., Rosdahl V.T.).

Исследование антимикробной активности синтезированных химических соединений с помощью диско-диффузионного метода позволило получить представление о чувствительности тестовых культур *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sobrinus* и *Streptococcus mitis* к химическим соединениям TEV-001, TEV-002, TEV-006, TEV-012, TEV-016, TEV-102, TEV-103, TEV-104, TEV-105, TEV-106, TEV-108, TEV-200, TEV-201, TEV-202, TEV-240, TEV-3096, TEV-3097, TEV-3099, TEV-320, TEV-326. В частности было установлено, что растворы дитерпеноидов обладают различной степенью антимикробной активности в отношении тестовых штаммов микроорганизмов. Анализ значений диаметров зон задержки роста микроорганизмов на агаризованной среде позволил среди всех веществ выделить группу с повышенной активностью в отношении трех и более микроорганизмов - TEV-001, TEV-006, TEV-102, TEV-3096, TEV-

3099. Результаты определения антибиотикочувствительности исследуемых штаммов к тестируемым химическим соединениям представлены на рисунках 2-9.



Рисунок 2 – Зоны ингибирования роста колоний *Staphylococcus aureus* под действием химических соединений SER-036, SER-002, SEV-196, SEV-154 и SER-043 на питательной среде АГВ



Рисунок 3 – Зоны ингибирования роста колоний *Staphylococcus aureus* под действием химических соединений SEV-206, SEV-150, SEV-226,31, SEV-182,3 и SER-066 на питательной среде АГВ

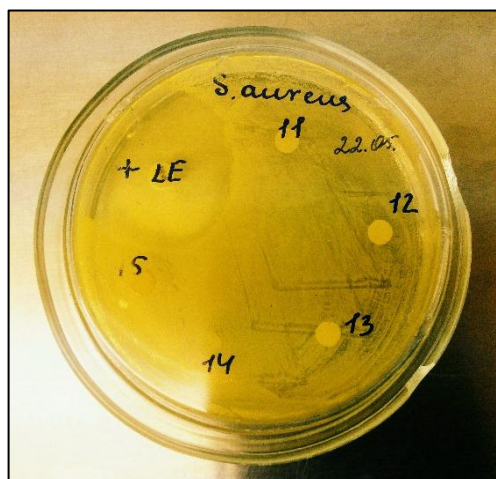


Рисунок 4 – Зоны ингибирования роста колоний *Staphylococcus aureus* под действием химических соединений SEV-151, SEV-225,22, SER-003, TEV-106 и TEV-601 на питательной среде АГВ



Рисунок 5 – Зоны ингибирования роста колоний *Staphylococcus aureus* под действием химических соединений TEV-201, SEV-158, TEV-012, TEV-240 и TEV-103 на питательной среде АГВ

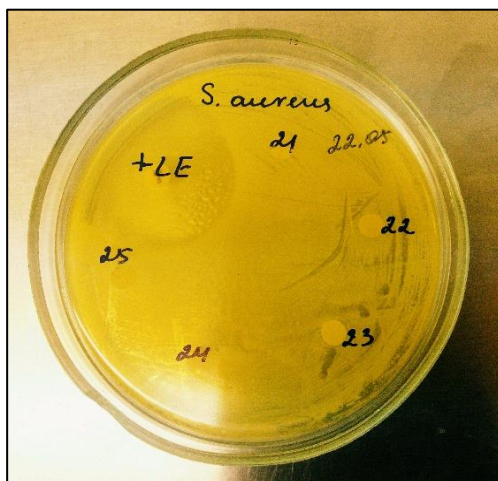


Рисунок 6 – Зоны ингибирования роста колоний *Staphylococcus aureus* под действием химических соединений TEV-200, TEV-347, TEV-346, TEV-691 и TEV-362 на питательной среде АГВ

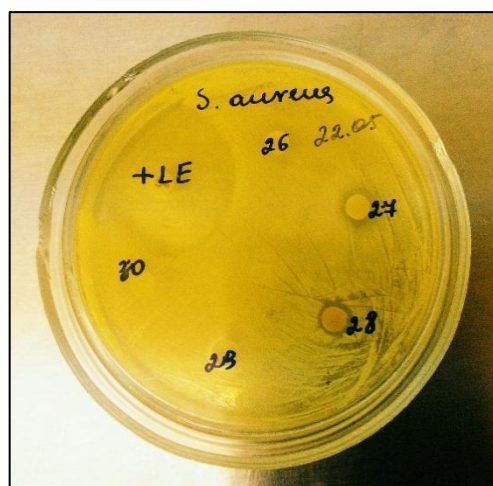


Рисунок 7 – Зоны ингибирования роста колоний *Staphylococcus aureus* под действием химических соединений TEV-006, TEV-326, TEV-104, TEV-108 и TEV-320 на питательной среде АГВ



Рисунок 8 – Зоны ингибирования роста колоний *Staphylococcus aureus* под действием химических соединений TEV-102, TEV-002, TEV-3096, TEV-3099 и TEV-016 на питательной среде АГВ

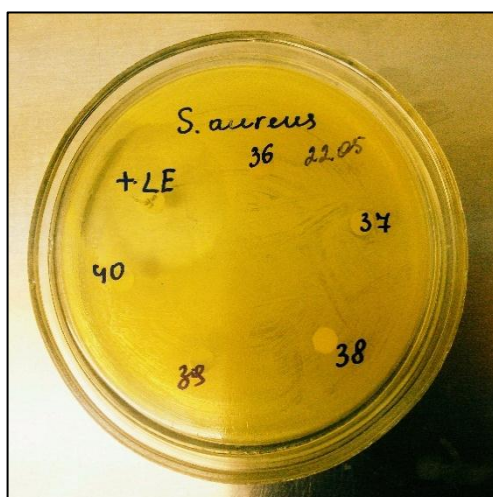


Рисунок 9 – Зоны ингибирования роста колоний *Staphylococcus aureus* под действием химических соединений TEV-016, TEV-3097, TEV-202, TEV-105 и SER-001 на питательной среде АГВ

Комплексный анализ результатов эксперимента показал повышенную чувствительность штаммов бактерий *Streptococcus spp.* на действие большинства исследуемых соединений. Наибольший эффект подавления роста культур *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sobrinus* и *Streptococcus mitis* наблюдался при культивировании в присутствии соединений TEV-201 ($C_{\%}=18,27$), TEV-001 ($C_{\%}=0,09$) и TEV-3096

($C_{\%}=281,35$). При этом средние значения диаметров зон ингибирования роста культур составили 21 мм, 22 мм и 29 мм соответственно (табл.1). Столь выраженный бактерицидный эффект терпеноидов на исследуемые штаммы коррелировал с результатами исследований группы авторов, продемонстрировавших данные, подтверждающие эффективность системного применения подобных препаратов в лечении стрептококковых инфекций кожи и мягких тканей (Коротяев А.И., Бабичев С.А.).

Таблица 1 - Результаты определения противомикробной активности химических соединений в отношении тестовых культур

Химические соединения	Концентрация раствора ($C_{\%}$)	Виды микроорганизмов					
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Str. oralis</i>	<i>Str. sobrinus</i>	<i>Str. mitis</i>	<i>C. albicans</i>
TEV-001	0,09	-	14	20	22	-	-
TEV-002	0,18	-	-	20	13	-	-
TEV-006	0,55	-	9	-	19	19	-
TEV-012	1,09	-	28	-	-	-	-
TEV-016	1,45	-	-	-	8	-	-
TEV-102	9,27	-	-	15	9		-
TEV-103	9,36	-	-	-	-		-
TEV-104	9,45	-	-	-	16	-	-
TEV-105	9,54	-	-	18	17	-	-
TEV-106	9,63	-	-	14	-	-	-
TEV-108	9,81	-	-	-	7	-	-
TEV-200	18,18	-	-	-	-	-	-
TEV-201	18,27	-	-	21	-	-	-
TEV-202	18,36	-	-	-	-	-	-
TEV-240	21,81	-	-	-	-	-	-
TEV-320	29,08	-	-	-	-	-	-
TEV-326	29,63	-	-	-	-	-	-

Химические соединения	Концентрация раствора (С%)	Виды микроорганизмов					
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Str. oralis</i>	<i>Str. sobrinus</i>	<i>Str. mitis</i>	<i>C. albicans</i>
TEV-3096	281,35	-	-	12	14	22	-
TEV-3097	281,44	-	-	-	9	-	-
TEV-3099	281,62	-	-	10	13	8	-
ДМСО (контроль)	99,0	-	-	-	-	-	-

Примечание: « - »* – полное отсутствие роста.

В отношении штамма *Staphylococcus aureus* были высокоактивны лишь два терпеноида - TEV-001 (С%=0,09) и TEV-012 (С%=1,09) (средний диаметр зоны подавления роста 14 и 28 мм соответственно). Обнаруженная резистентность культуры микроорганизма, вероятнее всего, была связана с плазмидно-обусловленным снижением проницаемости клеточной стенки микроорганизма (Волина. Е.Г.). Данный механизм является преобладающим у 70% резистентных штаммов *Staphylococcus aureus* и нередко сочетается с устойчивостью к антибактериальным препаратам других групп.

Проведение эксперимента на музейных культурах *Escherichia coli* и *Candida albicans* продемонстрировало полную резистентность микроорганизмов к синтезированным дитерпеноидам. В отношении *Escherichia coli* был описан возможный механизм резистентности, заключающийся в ферментативной инактивации антибактериального препарата хлорамфенилацетилтрансферазой I.

Таким образом, на музейных культурах микроорганизмов нами было протестировано 20 химических соединений, представляющих собой модификации дитерпеноидов. По результатам анализа всех соединений можно сказать, что наибольшей антимикробной активностью обладают соединения TEV-001, TEV-006, TEV-102, TEV-3096, TEV-3099 и, вероятнее всего, могут быть использованы для создания

антибактериальных препаратов, эффективных как в лечении системных и местных стафилококковых инфекций, так и в лечении ряда инфекций нестафилококковой этиологии.

3.2. Определение величины минимальной ингибирующей концентрации (МИК) новых химических соединений

Минимальные подавляющие концентрации химических соединений TEV-102, TEV-103, TEV-104, TEV-105, TEV-106, TEV-108, TEV-200, TEV-201, TEV-202, TEV-240, TEV-3096, TEV-3097, TEV-3099, TEV-320, TEV-326 оценивали референтным методом микроразведений в бульоне. Для этого готовили основные растворы из имевшихся навесок тестируемых веществ в стерильных флаконах, которые растворяли в 1 мл диметилсульфоксида (ДМСО) с вычислением процентной концентрации ($C_{\%}$, %). Затем готовили рабочие растворы путем двукратных последовательных разведений основных растворов (выше и ниже концентрации 1 мкг/л) в бульоне Мюллера-Хинтона («HiMedia», Индия). Разведения были приготовлены согласно процедуре, представленной в таблице 2. Готовые разведения использовали в день их приготовления.

Таблица 2 - Подготовка рабочих растворов химических соединений для использования при определении МПК с применением разведений в бульоне

Концентрация химического соединения в основном растворе, мкг/мл	Объем основного раствора, мл	Объем бульона, мл	Полученная концентрация препарата, мкг/мл
8,0	1,0	1,0	4,0
8,0	1,0	3,0	2,0
8,0	1,0	7,0	1,0
1,0	1,0	1,0	0,5
1,0	1,0	3,0	0,25
1,0	1,0	7,0	0,125

В качестве тестовых микроорганизмов использовали музейные штаммы:

Escherichia coli №25922 (Коллекция Клиники БГМУ)

Staphylococcus aureus №966 (Коллекция Клиники БГМУ)

Streptococcus oralis №27417 (Коллекция кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии БГМУ)

Streptococcus sobrinus №28417 (Коллекция кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии БГМУ)

Candida albicans №24433 (Коллекция Клиники БГМУ).

Инокулюм готовили путем суспендирования в физиологическом растворе 4-5 морфологически однородных колоний, выросших на чистой неселективной твердой питательной среде, инкубированной при 37°C в течение 18-24 часов, и довели суспензию до мутности, эквивалентной 0,5 стандарта МакФарланд ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл). Далее приготовленный инокулюм разводили в бульоне Мюллера-Хинтона (разведение 1:100), чтобы получить требуемую плотность микробной культуры 5×10^6 КОЕ/мл. Планшеты инокулировались в течение не более 30 мин после приготовления инокулюма для сохранения необходимого числа жизнеспособных клеток (Маркова, 2012).

Для проведения эксперимента по определению минимальных подавляющих концентраций использовали планшеты, в отдельные лунки которых последовательно добавляли по 50 мкл каждого из рабочих растворов тестируемых химических соединений. К каждой лунке, содержащей 50 мкл раствора химического соединения, разведенного в бульоне, добавляли 50 мкл бактериальной суспензии (5×10^6 КОЕ/мл).

Для контроля роста всех проверяемых штаммов микроорганизмов обязательно ставили положительный контрольный образец (ПКО) в лунке, содержащей 50 мкл бульона и инокулюма соответствующего микроорганизма без химического соединения. Аналогично, лунка, содержащая 50 мкл питательного бульона без химического соединения,

была использована как неинокулированная лунка отрицательного контрольного образца (ОКО). Пример планшета микроразведений для определения МПК химических соединений представлен в таблице 3.

Таблица 3 – Пример планшета микроразведений для определения МПК химических соединений TEV-102, TEV-103, TEV-104, TEV-105, TEV-106, TEV-108, TEV-200, TEV-201, TEV-202, TEV-240, TEV-3096, TEV-3097 в отношении *Escherichia coli*

	Рабочие разведения растворов тестируемых химических соединений											
	TEV - 102	TEV - 103	TEV - 104	TEV - 105	TEV - 106	TEV - 108	TEV - 200	TEV - 201	TEV - 202	TEV - 240	TEV - 3096	TEV - 3097
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	4,0 мкг/ мл	4,0 мкг/ мл	4,0 мкг/ мл	4,0 мкг/ мл	4,0 мкг/ мл	4,0 мкг/ мл	4,0 мкг/ мл	4,0 мкг/ мл	4,0 мкг/ мл	4,0 мкг/ мл	4,0 мкг/ мл	4,0 мкг/ мл
B	2,0 мкг/ мл	2,0 мкг/ мл	2,0 мкг/ мл	2,0 мкг/ мл	2,0 мкг/ мл	2,0 мкг/ мл	2,0 мкг/ мл	2,0 мкг/ мл	2,0 мкг/ мл	2,0 мкг/ мл	2,0 мкг/ мл	2,0 мкг/ мл
C	1,0 мкг/ мл	1,0 мкг/ мл	1,0 мкг/ мл	1,0 мкг/ мл	1,0 мкг/ мл	1,0 мкг/ мл	1,0 мкг/ мл	1,0 мкг/ мл	1,0 мкг/ мл	1,0 мкг/ мл	1,0 мкг/ мл	1,0 мкг/ мл
D	0,5 мкг/ мл	0,5 мкг/ мл	0,5 мкг/ мл	0,5 мкг/ мл	0,5 мкг/ мл	0,5 мкг/ мл	0,5 мкг/ мл	0,5 мкг/ мл	0,5 мкг/ мл	0,5 мкг/ мл	0,5 мкг/ мл	0,5 мкг/ мл
E	0,25 мкг/ мл	0,25 мкг/ мл	0,25 мкг/ мл	0,25 мкг/ мл	0,25 мкг/ мл	0,25 мкг/ мл	0,25 мкг/ мл	0,25 мкг/ мл	0,25 мкг/ мл	0,25 мкг/ мл	0,25 мкг/ мл	0,25 мкг/ мл
F	0,125 мкг/ мл	0,125 мкг/ мл	0,125 мкг/ мл	0,125 мкг/ мл	0,125 мкг/ мл	0,125 мкг/ мл	0,125 мкг/ мл	0,125 мкг/ мл	0,125 мкг/ мл	0,125 мкг/ мл	0,125 мкг/ мл	0,125 мкг/ мл
G	ПКО	ПКО	ПКО	ПКО	ПКО	ПКО	ПКО	ПКО	ПКО	ПКО	ПКО	ПКО
H	ОКО	ОКО	ОКО	ОКО	ОКО	ОКО	ОКО	ОКО	ОКО	ОКО	ОКО	ОКО

Планшеты для микроразведений перед инкубацией заклеивали прозрачной пленкой и запечатывали в полиэтиленовые пакеты для предотвращения высыхания. Планшеты инкубировали в термостате в течение 16-20 часов при 37 °С. Для более равномерного нагревания планшеты были сложены в стопки не больше чем по пять штук.

Результаты учитывали только при наличии достаточного роста испытуемого микроорганизма в положительном контроле, а также при отсутствии бактериального роста в отрицательном контроле. Размер роста в каждой лунке сравнивали с размером роста в положительном контроле и наиболее низкую концентрацию препарата, которая полностью тормозила видимый рост, регистрировали как минимальную подавляющую концентрацию. Результаты определения МПК тестируемых химических соединений представлены в таблице 4 и на рисунках 10-16.

Таблица 4 – Величины МПК (мкг/мл) тестируемых химических соединений в отношении *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sobrinus* и *Candida albicans*

№	Химические соединения	Концентрация раствора (С%)	Виды микроорганизмов				
			<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Str. oralis</i>	<i>Str. sobrinus</i>	<i>C. albicans</i>
1	TEV-102	9,27	-	-	-	0,25	-
2	TEV-103	9,36	-	-	-	-	-
3	TEV-104	9,45	-	-	0,5	0,25	-
4	TEV-105	9,54	-	-	-	4,0	-
5	TEV-106	9,63	-	-	0,5	1,0	-
6	TEV-108	9,81	-	-	1,0	-	-
7	TEV-200	18,18	-	-	-	4,0	-
8	TEV-201	18,27	-	-	-	-	-
9	TEV-202	18,36	-	-	-	0,25	-
10	TEV-240	21,81	-	-	-	0,25	-
11	TEV-3096	281,35	-	-	-	4,0	-
12	TEV-3097	281,44	-	-	-	2,0	-
13	TEV-3099	281,62	-	-	-	-	-
14	TEV-320	29,08	-	-	4,0	4,0	-
15	TEV-326	29,63	-	-	-	2,0	-

Примечание: «-» - подавления микробного роста не наблюдалось.

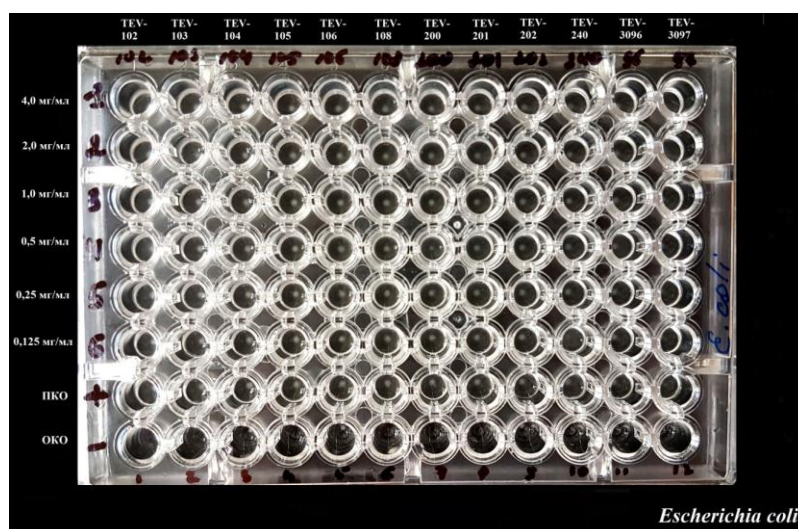


Рисунок 10 - Планшет микроразведений для определения МПК химических соединений TEV-102, TEV-103, TEV-104, TEV-105, TEV-106, TEV-108, TEV-200, TEV-201, TEV-202, TEV-240, TEV-3096 и TEV-3097 в отношении *Escherichia coli*

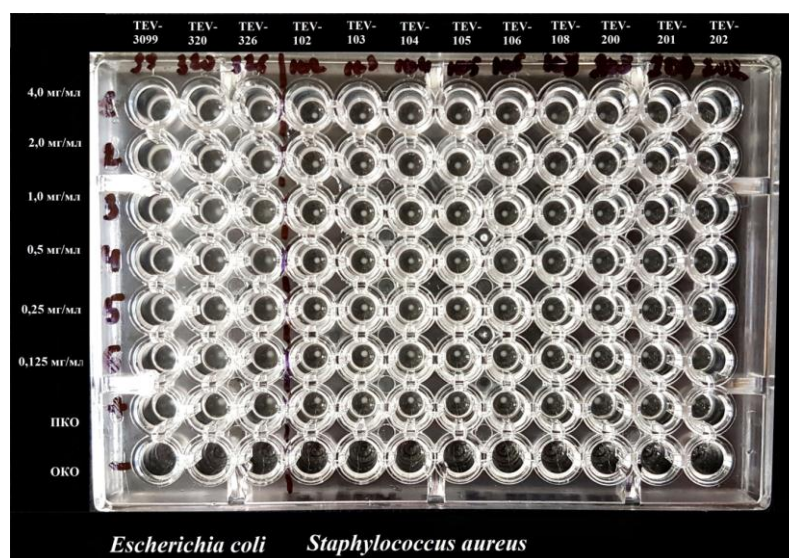


Рисунок 11 - Планшет микроразведений для определения МПК химических соединений TEV-3099, TEV-320 и TEV-326 в отношении *Escherichia coli*, а также TEV-102, TEV-103, TEV-104, TEV-105, TEV-106, TEV-108, TEV-200, TEV-201, TEV-202 в отношении *Staphylococcus aureus*

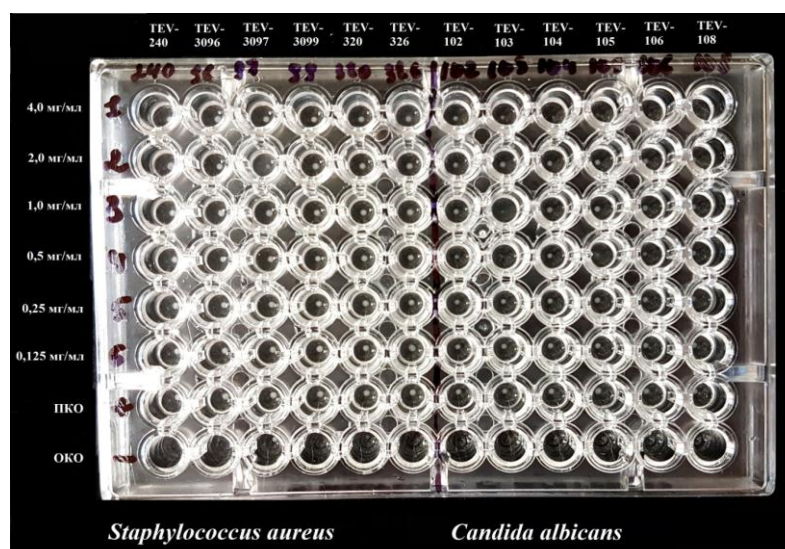


Рисунок 12 - Планшет микроразведений для определения МПК химических соединений TEV-240, TEV-3096 и TEV-3097, TEV-3099, TEV-320 и TEV-326 в отношении *Staphylococcus aureus*, а также TEV-102, TEV-103, TEV-104, TEV-105, TEV-106, TEV-108 в отношении *Candida albicans*

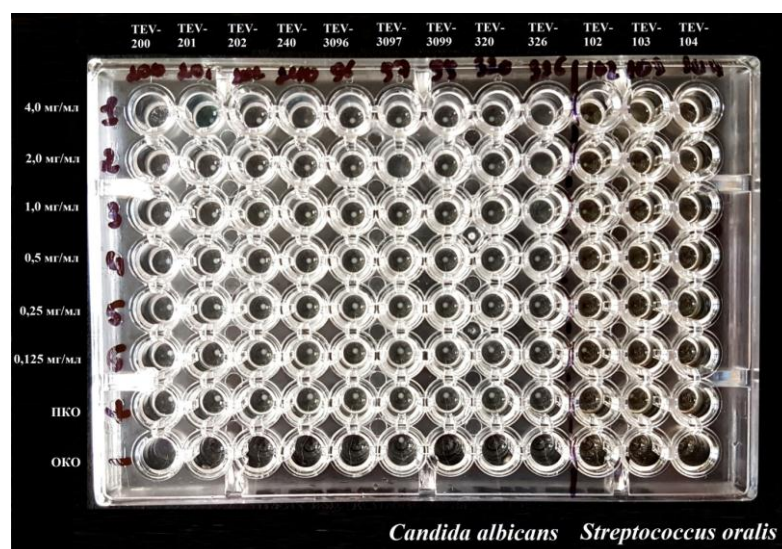


Рисунок 13 - Планшет микроразведений для определения МПК химических соединений TEV-200, TEV-201, TEV-202, TEV-240, TEV-3096 и TEV-3097, TEV-3099, TEV-320 и TEV-326 в отношении *Candida albicans*, а также TEV-102, TEV-103, TEV-104 в отношении *Streptococcus oralis*

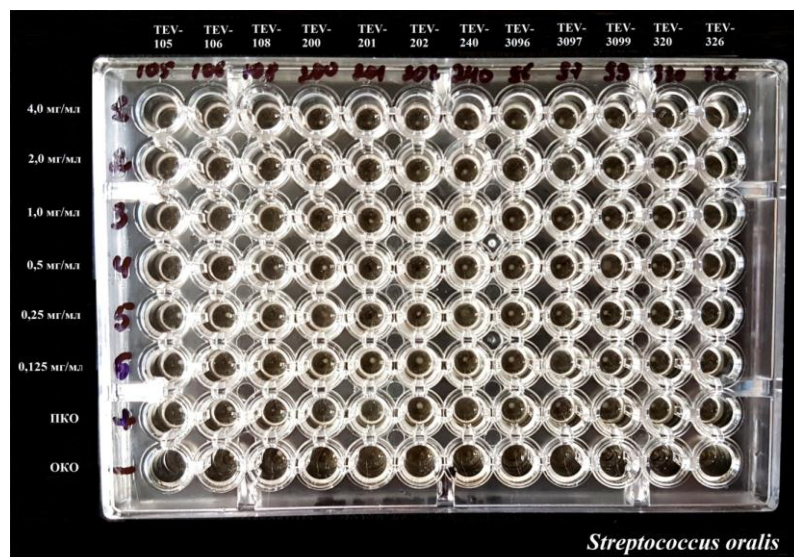


Рисунок 14 - Планшет микроразведений для определения МПК химических соединений TEV-105, TEV-106, TEV-108, TEV-200, TEV-201, TEV-202, TEV-240, TEV-3096 и TEV-3097, TEV-3099, TEV-320 и TEV-326 в отношении *Streptococcus oralis*

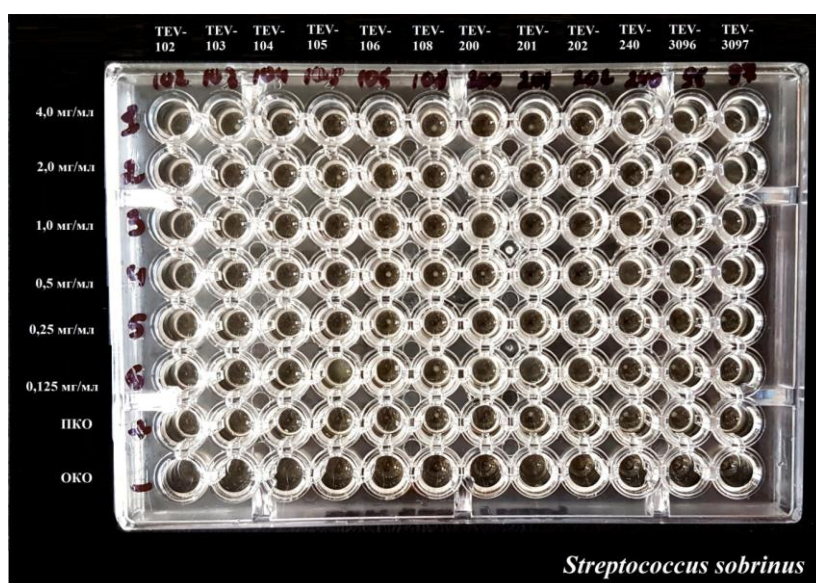


Рисунок 15 - Планшет микроразведений для определения МПК химических соединений TEV-102, TEV-103, TEV-104, TEV-105, TEV-106, TEV-108, TEV-200, TEV-201, TEV-202, TEV-240, TEV-3096 и TEV-3097 в отношении *Streptococcus sobrinus*

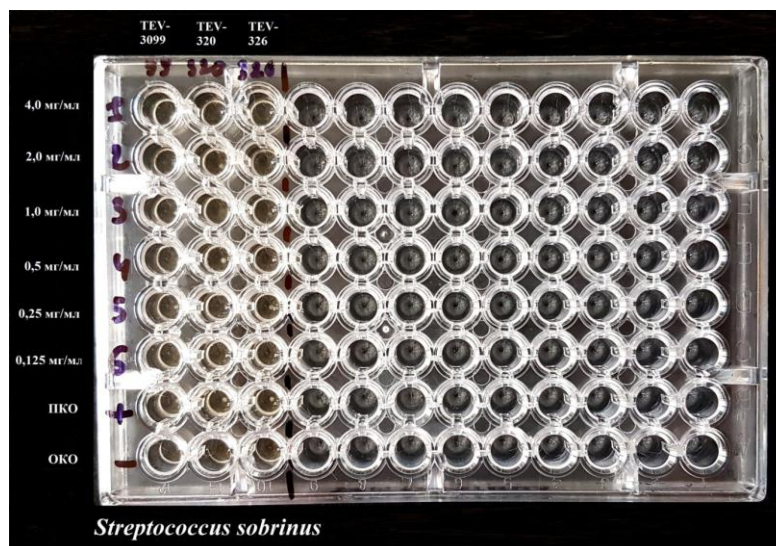


Рисунок 16 - Планшет микроразведений для определения МПК химических соединений TEV-3099, TEV-320 и TEV-326 в отношении *Streptococcus sobrinus*

ВЫВОДЫ

1. С использованием диско-диффузионного метода на музейных культурах микроорганизмов *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sobrinus* и *Candida albicans* было протестировано 20 новых химических соединений, полученных путем органического синтеза на основе дитерпеноидов.

2. Анализ антибактериальной активности тестируемых химических соединений позволил выделить группу веществ с наибольшей антимикробной активностью - TEV-001, TEV-006, TEV-102, TEV-3096, TEV-3099. Данные соединения проявляют активность в отношении сразу нескольких видов микроорганизмов.

3. При проведении экспериментов с использованием референтного метода микроразведений в бульоне были получены минимальные ингибирующие концентрации (МИК, мкг/мл) для всех тестируемых химических соединений дитерпеноидной природы в отношении культур микроорганизмов *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sobrinus* и *Candida albicans*.

4. Протестированные химические соединения дитерпеноидной природы, обладающие антимикробной активностью, в перспективе могут быть использованы при создании антибактериальных препаратов, эффективных в лечении заболеваний бактериальной этиологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Comite de l'Antibiogramme de la Societe Francaise de Microbiologie. (1966), Technical recommendations for in vitro susceptibility testing, Clin Microbiol Infect. 2 (suppl 1): S 11-25).
2. Cundliffe E. The mode of action of fusidic acid // Biochem Biophys Res Commun. 1972; 46:1794-1801
3. Freire-Moran L., Aronsson B., Manz C. et al. Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria. Time to react is now// Drug Resist. Updat. 2011.- V.14, N.2.- P.118—124.
4. Infectious Diseases. Gorbach S.L., Bartlett J.G., Blacklow N.R. (Eds.). 2nd ed., Philadelphia etc.: W.B. Saunders Company, 1998.
5. Lacey R.W., Rosdahl V.T. An unusual jpenicillinase plasmid of Staphylococcus aureus; evidence for its transfer under natural conditions.// J Med Microbiol.- 1974.- V.7.- P.117-125.
6. Molecular Pharmacology, Vol 11, 166--173, 1975 Antibiotics as Tools for Metabolic Studies XVIII. Inhibition of Sodium- and Potassium-Dependent Adenosine Triphosphatase JOHN B. SUSA, HENRY A. LARDY
7. Murray I.A., Cann P.A., Day P.J. et al. Steroid recognition by chloramphenicol acetyltransferase: engineering and structural analysis of a high affinity fusidic acid binding site/// J Mol Biol.- 1995. V.254.- P.993-100
8. Principles and Practice of Infectious Diseases. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. (Eds.). 5th ed. Philadelphia etc.: Churchill Livingstone, 2000
9. Quintiliani R., Owens R. Jr., Grant E. Clinical role of fluoroquinolones in patients with respiratory tract infections. Infect Dis Clin Pract. 1999; 8 Suppl 1: S 28–41.
10. Reynolds J.I.F.. Martindall The Extra Pharmacopoeia // 31st ed. London: Royal Pharmaceutical Society. 1996; 233-235.

11. Schwartz G.J., Haycock G.B., Edalman C.M., Spitzer A. A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. *Pediatrics*, 1976; 58: 259–63.
12. Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. Major trends in the nosocomial etiology of nosocomial infection. - *Am. J. Med.* 1991; 91: 72-75
13. Tenover F.C. Novel and emerging mechanisms of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens - *Am. J. Med.*, 91/3 B (76-81)
14. Therapeutic Guidelines: Antibiotic. Version 11. Melbourne, 2000.
15. Александров Н.Н.: Антибиотики, их свойства и применение в медицине. Л., 1958, с. 280.
16. Беляков В.Д., Литвин В.Ю., Емельченко Е.Н. Пушкарева В.И. Патогенные бактерии, общие для человека и животных. Патогенные бактерии в сообществах. М., 1994, С. 11-23.
17. Беляков В.Д., Ряпис Л.А., Сапрофиты медицинского значения и природа их полипатогенности (на примере псевдомонад). Экология возбудителей сапронозов. М., 1988. - 3-20 с.
18. Беляков В.Д., Ходырев А.П., Тополян А.А. Стрептококковая инфекция. Л., 1978. – 69-77 с.
19. Беляков В.Д. Яфаев Р.Х. Эпидемиология. М.: Медицина, 1989, - 416 с.
20. Брико Н.И., Ещина А.С., Ряпис Л.А. Лабораторная диагностика стрептококковых инфекций. М.: Хризостом, 2000, - 64 с.
21. Брико М., Ещина А.С., Ряпис Л.А. и др. Выделение и идентификация стрептококков. М., 2002. – 68-100 с.
22. Белясова Н.А. Микробиология, 2012. -443 с.
23. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология.- М.,2004.
24. Волина. Е.Г. Частная микробиология: учебное пособие / Е.Г. Волина, Л.Е. Саруханова. –М.:РУДН, 2016. -222с.

25. Воробьев А.А., ред. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. 2-е изд. М.: Медицинское информационное агентство; 2012.
26. Гусев М.В., Минеева Л.А., Микробиология, 4-е изд., стер. М.: Академия; 2003.
27. Грудянов А.И. Пародонтология. Избранные лекции.- М.: ОАО «Стоматология», 1997. - 32 с.
28. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учеб. для студентов биолог, спец. ун-тов. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высш. шк.; 1986.
29. Канкян А.П., Леонтьев В.К. Болезни пародонта: Новые подходы в этиологии, патогенезе, диагностике, профилактике и лечении/.- Ер.: Тигран Мец, 1998. - 360 с.
30. Картель Н. А., Макеева Е. Н., Мезенко А. М.. 2011.
31. Коротяев А.И., Бабичев С.А.. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. 4-е изд., испр. и доп. СПб.: СпецЛит; 2008.
32. Куракин Э.С. Перспективные подходы к диагностике внутрибольничных инфекций на основе современных представлений о молекулярно-генетических механизмах формирования госпитальных штаммов // Вестник новых медицинских технологий. 2011.
33. Лабинская А.С., 2004. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований.
34. Ланчини, Д. Антибиотики / Д. Ланчини. - М.: Книга по Требованию, 2012. - 136 с.
35. Маркова И.В., Михайлов И.Б., Неженцев М.В. Фармакология, СПб.: Фолиант; 2001.
36. Маянский А.Н., Чеботарь И.В., Руднева Е.И., Чистякова В.П. *Pseudomonas aeruginosa*: характеристика биопленочного процесса. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2012; 1(18): 3-8.

37. Меньшиков В.В. Методики клинических лабораторных исследований. Справочное пособие. Том 3. Клиническая микробиология. М.: Лабора, 2009.
38. Навашин С.М., Фомина И.П. Рациональная антибиотикотерапия (справочник), 4-е изд., 1982.
39. Новиков Д.К., Генералов И.И., Железняк Н.В., Окулич В.К. Медицинская иммунология, 1998.
40. Соловьев В.Н. Действие антибиотиков в тканях организма. М., 1968.
41. Старцева, Л.Е. Никитина, Е.В. Сиразиева и др. // Химия в интересах устойчивого развития. 2009.- Т.17, №5.- С.539–545.
42. Страчунский, Л. С. Антибиотики: клиническая фармакология. Руководство для врачей / Л.С. Страчунский, С.Н. Козлов. - М.: Амипресс, 2014 - 208 с
43. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н. В. Трухачева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 384 с.
44. Федеральное руководство для врачей по использованию лекарственных средств (формулярная система). Выпуск II. М., Эхо, 2001.
45. Харкевич Д.А. Фармакология. Учебник 10-еизд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.

ПРИЛОЖЕНИЕ



Вестник Башкирского государственного медицинского университета

сетевое издание

ISSN 2309-7183



приложение №3, 2018

vestnikbgmu.ru

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕНА <i>GSTP</i> ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ У КРЫС.....	1102
М.В. Курилов, Д.О. Каримов, Н.Ю. Хуснутдинова, Р.А. Даукаев	
МЕТАБОЛИЗМ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ПОСТУПЛЕНИИ КОНСЕРВАНТОВ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА.....	1107
Кутлина Т.Г. ¹ , Валова Я.В. ^{1,2} , Каримов Д.О. ¹ , Мухаммадиева Г.Ф. ¹ , Хуснутдинова Н.Ю. ¹	
ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА <i>GSTT</i> ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ У КРЫС.....	1112
А. Р. Муллабаева	
СТРЕПТОКОККИ КАК ПАТОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКТОР РАЗВИТИЯ ОЧАГОВОЙ ДЕМИНЕРАЛИЗАЦИЕЙ ТВЕРДЫХ ТКАНЕЙ ЗУБОВ.....	1117
Э.Н. Усманова, А.С. Фазлыева, Д.О. Каримов, Р.А. Даукаев, Д.А. Смолянкин	
НАКОПЛЕНИЕ КАДМИЯ В ОРГАНАХ КРЫС ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ.....	1122
А.С. Фазлыева, Э.Н. Усманова, Д.О. Каримов, Р.А. Даукаев, Д.А. Смолянкин	
НАКОПЛЕНИЕ КАДМИЯ В ОРГАНАХ КРЫС ПРИ СУБХРОНИЧЕСКОМ ОТРАВЛЕНИИ.....	1127
И.А. Янгурина, К.А. Сазонова, Е.Ш. Зулкарнаева	
СРАВНЕНИЕ ИНФОРМАТИВНОСТИ МЕТОДОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	1132
Э.Ф. Бердигулова	
К ВОПРОСУ О РОЛИ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ И СРЕДЫ В ПРОЯВЛЕНИИ НАРКОЛЕПСИИ	1137
К.Ю. Швеца ¹ , А.Р. Бахтияева ¹ , А.Т. Загафуранова ¹ , А.Д. Дворенкова ¹ , Е.В. Третьякова ²	
АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ.....	1142
Е. Ш. Зулкарнаева, К. А. Фархутдинова, И. А. Янгурина	
АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДНЫХ, СПИРТОВЫХ И ГЕКСАНОВЫХ ЭКСТРАКТОВ ВОДЯНОГО ОРЕХА <i>TRAPASIBIRICA</i> И ДРУГИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ	1147
Н.Н. Зигангирова, Г.К. Юмагузина, Э.Д. Гайнуллина, Л.О. Бижбалова, Л.Р. Хакимова	
ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ФРАГМЕНТОВ ГЕНОВ «ОСТРОВОВ» ГЕНОТОКСИЧНОСТИ <i>PKS+ESCHERICHIA COLI</i> ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА	1152
А.А. Трушкова, П.Е. Базарова	
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ В ОБРАЗЦАХ ВОДЫ ОТКРЫТЫХ ВОДОЁМОВ ГОРОДА УФЫ.....	1157
Л.О. Бижбалова, Л.Р. Хакимова, Э.Д. Гайнуллина, Н.Н. Зигангирова, Г.К. Юмагузина	
БАКТЕРИИ РОДА <i>SAMPYLOBACTER</i> И НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ЯЗВЕННЫЙ КОЛИТ	1160
Д. Ю. Анпилогова	

УДК 616.311.2-002-022:616.316-008.87-078-08

К.Ю. Швец¹, А.Р. Бахтнева¹, А.Т. Загафуранова¹, А.Д. Дворенкова¹, Е.В. Третьякова²

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Научный руководитель – д.м.н., профессор А.Р. Мавзютов

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии,

¹Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

²Институт нефтехимии и катализа РАН, г. Уфа

Резюме. С помощью полуколичественного диско-диффузионного метода проведено исследование антимикробной активности новых химических соединений в отношении тестовых культур *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sobrinus* и *Streptococcus mitis*. По результатам исследования всех соединений сделан вывод о наибольшей антимикробной активности соединений TEV-001, TEV-006, TEV-102, TEV-3096, TEV-3099, которые в будущем могут стать кандидатами для создания антибактериальных препаратов на основе дитерпеноидов.

Ключевые слова: химические соединения, дитерпеноиды, антибактериальная активность, диско-диффузионный метод

K.YU. Shvets¹, A.R. Bakhtiyeva¹, A.T. Zagafuranova¹, A.D. Dvorenkova¹, E.V. Tret'yakova²

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NEW CHEMICAL COMPOUNDS

Scientific Advisor — MD, Full professor A.R. Mavzyutov

Department of Fundamental and Applied Microbiology,

¹Bashkir State Medical University, Ufa

²Institute of Petrochemistry and Catalysis of RAS, Ufa

Summary. We conducted a study of the antimicrobial activity of synthesized chemical compounds using a semiquantitative disc-diffusion method for test cultures of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mitis*. According to the results of the analysis of all compounds, samples TEV-001, TEV-006, TEV-102, TEV-3096, TEV-3099 showed the greatest antimicrobial activity. The studied semisynthetic diterpenoid derivatives could serve as the base for the further development of novel antibacterial drugs.

Key words: diterpenoids, antibacterial activity, disco-diffusion method.

Актуальность. В связи с широким распространением устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к существующим лекарственным препаратам, серьёзными проблемами в лечении микробных и вирусных инфекций, потребность в новых антибиотиках чрезвычайно велика. В большинстве регионов мира, в том числе и в России, получили широкое распространение нозокомиальные штаммы микроорганизмов, характеризующиеся полирезистентностью - устойчивостью сразу к нескольким антибактериальным препаратам и даже панрезистентностью – устойчивостью «супербактерий» практически ко всем антибиотикам вследствие продукции металло-бета-лактамазы NDM (Zn^{2+}) [5].

Современный фармацевтический рынок предлагает широкий спектр противомикробных, антисептических, дезинфицирующих средств и препаратов как синтетического, так и природного происхождения. Выделение природных соединений в настоящее время затруднено в связи со сложностью идентификации новых классов антибиотиков на фоне известных веществ, поэтому все более актуальным представляется осуществление химических модификаций существующих антибактериальных препаратов, позволяющих усилить или изменить их нативную активность. На сегодняшний день накоплен значительный объем сведений о лечебных свойствах природных терпеноидов, синтезируемых различными растениями [1], бактериями и грибами [8]. Перспективными являются соединения, способные, например, ингибировать синтез бактериальных белков посредством взаимодействия с жизненно важным для бактериальной клетки белком, участвующим в процессе транслокации на рибосоме при образовании пептидной связи – фактором элонгации G [4].

Цель исследования. Изучение антибактериальной активности новых химических соединений на основе дитерпеноидов.

Материалы и методы. Объектами исследования были 20 химических соединений (TEV-001, 002, 006, 012, 016, 102, 103, 104, 105, 106, 108, 200, 201, 202, 240, 3096, 3097, 3099, 320, 326), полученных на основе дитерпеноидов.

Противомикробную активность химических соединений оценивали полуколичественным диско-диффузионным методом. Для этого готовили рабочие растворы из имевшихся навесок тестируемых веществ в стерильных флаконах, которые растворяли в 1 мл диметилсульфоксида (ДМСО). Перед исследованием готовили диски из фильтровальной бумаги диаметром 5 мм, стерилизовали в сухожаровом шкафу, пропитывали рабочим раствором тестируемого вещества и высушивали в термостате.

В качестве тест-штаммов для определения антимикробной активности использовали 6 коллекционных штаммов бактерий *Escherichia coli* №25922, *Staphylococcus aureus* №966, *Candida albicans* №24433 (Коллекция Клиники БГМУ); *Streptococcus oralis* №27417,

Streptococcus sobrinus №28417, *Streptococcus mitis* №29417 (Коллекция кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии БГМУ). На протяжении всего эксперимента музейные культуры хранились в толще агаризованной среды Айерса и Джонсона (Ayers & Johnson Agar (Stock Culture Agar), «HiMedia», Индия) под слоем минерального масла в соответствии с методикой, описанной нами ранее [3].

Антибактериальную активность исследуемых химических соединений полуколичественно оценивали по диаметру зон задержки роста микроорганизмов (мм).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программного пакета Statistica 7.0, руководствуясь пособием Трухачевой Н.В. по методам статистической обработки данных в биологии и медицине [2].

Результаты и обсуждения. Исследование антимикробной активности синтезированных химических соединений с помощью диско-диффузионного метода позволило получить представление о чувствительности тестовых культур *E.coli*, *S.aureus*, *C.albicans*, *Str.oralis*, *Str.sobrinus* и *Str.mitis* данным препаратам. В частности было установлено, что растворы дитерпеноидов обладают различной степенью антимикробной активности в отношении тестовых штаммов микроорганизмов. Анализ значений диаметров зон задержки роста микроорганизмов на агаризованной среде позволил среди всех веществ выделить группу с повышенной активностью в отношении трех и более микроорганизмов - TEV-001, TEV-006, TEV-102, TEV-3096, TEV-3099 (таблица 1).

Таблица 1

Результаты определения противомикробной активности химических соединений

Химические соединения	Концентрация раствора (C ₁₀₀)	Виды микроорганизмов					
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Str. oralis</i>	<i>Str. sobrinus</i>	<i>Str. mitis</i>	<i>C. albicans</i>
TEV-001	0,09	-	14	20	22	-	-
TEV-002	0,18	-	-	20	13	-	-
TEV-006	0,55	-	9	-	19	19	-
TEV-012	1,09	-	28	-	-	-	-
TEV-016	1,45	-	-	-	8	-	-
TEV-102	9,27	-	-	15	9	16	-
TEV-103	9,36	-	-	-	-	14	-
TEV-104	9,45	-	8	-	16	-	-
TEV-105	9,54	-	-	18	17	-	-
TEV-106	9,63	-	-	14	-	-	-
TEV-108	9,81	-	-	-	7	-	-
TEV-200	18,18	-	-	-	-	-	-
TEV-201	18,27	-	-	21	-	-	-
TEV-202	18,36	-	-	-	-	-	-
TEV-240	21,81	-	-	-	-	-	-
TEV-320	29,08	-	-	-	10	-	-
TEV-326	29,63	-	9	-	9	-	-
TEV-3096	281,35	-	-	12	14	22	-
TEV-3097	281,44	-	-	-	9	-	-
TEV-3099	281,62	-	-	10	13	8	-
ДМСО (контроль)	99,0	-	-	-	-	-	-

Примечание: « - »* – полное отсутствие роста.

Комплексный анализ результатов эксперимента показал повышенную чувствительность штаммов бактерий *Streptococcus spp.* на действие большинства исследуемых соединений. Наибольший эффект подавления роста культур *Str. oralis*, *Str. sobrinus* и *Str. mitis* наблюдался при культивировании в присутствии соединений TEV-201 ($C_{50}=18,27$), TEV-001 ($C_{50}=0,09$) и TEV-3096 ($C_{50}=281,35$). При этом средние значения диаметров зон ингибирования роста культур составили 21 мм, 22 мм и 29 мм соответственно. Столь выраженный бактерицидный эффект терпеноидов на исследуемые штаммы коррелировал с результатами исследований группы авторов [9], продемонстрировавших данные, подтверждающие эффективность системного применения подобных препаратов в лечении стрептококковых инфекций кожи и мягких тканей.

В отношении штамма *S. aureus* были высокоактивны лишь два терпеноида - TEV-001 ($C_{50}=0,09$) и TEV-012 ($C_{50}=1,09$) (средний диаметр зоны подавления роста 14 и 28 мм соответственно). Обнаруженная резистентность культуры микроорганизма, вероятнее всего, была связана с плазмидно-обусловленным снижением проницаемости клеточной стенки микроорганизма [6]. Данный механизм является преобладающим у 70% резистентных штаммов *S. aureus* и нередко сочетается с устойчивостью к антибактериальным препаратам других групп.

Проведение эксперимента на музейных культурах *E. coli* и *C. albicans* продемонстрировало полную резистентность микроорганизмов к синтезированным дитерпеноидам. В отношении *E. coli* был описан возможный механизм резистентности, заключающийся в ферментативной инаktivации антибактериального препарата хлорамфенилацетилтрансферазой I [7].

Таким образом, на музейных культурах микроорганизмов нами было протестировано 20 химических соединений, представляющих собой модификации дитерпеноидов. По результатам анализа всех соединений можно сказать, что наибольшей антимикробной активностью обладают соединения TEV-001, TEV-006, TEV-102, TEV-3096, TEV-3099 и, вероятнее всего, могут быть использованы для создания антибактериальных препаратов, эффективных как в лечении системных и местных стафилококковых инфекций, так и в лечении ряда инфекций нестафилококковой этиологии.

Фрагмент работы, связанный с синтезом новых химических соединений, полученных на основе дитерпеноидов, выполнен при финансовой поддержке РФФИ (проект 17-43-020021 p_a).

Литература

1. Старцева В.А., Л. Никитина.Е., Сиразиева Е.В. Синтез и биологическая активность монотерпеноидов ментанового ряда / В.А. Старцева, Л.Е. Никитина, Е.В. Сиразиева и др. // *Химия в интересах устойчивого развития*. 2009.- Т.17, №5.- С.539–545.
2. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н. В. Трухачева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 384 с.
3. Швец К.Ю., Мавзютов А.Р., Тамарова Э.Р., Рыскулова Г.М. Формирование коллекции пародонтопатогенных микроорганизмов рода *Streptococcus* / К.Ю. Швец, А.Р. Мавзютов, Э.Р. Тамарова, Г.М. Рыскулова // *Сборник трудов Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы экологии и природопользования»*. 2017; часть 2.-С.184-188.
4. Cundliffe E. The mode of action of fusidic acid // *Biochem Biophys Res Commun*. 1972; 46:1794-1801.
5. Freire-Moran L., Aronsson B., Manz C. et al. Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria. Time to react is now// *Drug Resist. Updat*. 2011.- V.14, N.2.- P.118—124.
6. Lacey R.W., Rosdahl V.T. An unusual jpenicillinase plasmid of *Staphylococcus aureus*; evidence for its transfer under natural conditions// *J Med Microbiol*.- 1974.- V.7.- P.117-125.
7. Murray I.A., Cann P.A., Day P.J. et al. Steroid recognition by chloramphenicol acetyltransferase: engineering and structural analysis of a high affinity fusidic acid binding site/// *J Mol Biol*.- 1995. V.254.- P.993-1005.
8. Reynolds J.I.F.. Martindall The Extra Pharmacopoeia // 31st ed. London: Royal Pharmaceutical Society. 1996; 233-235.
9. Spelman D. Fusidic acid in skin and soft tissue infections // *Int J Antimicrob Agents*.- 1999.- V.-12.- P.59-66.



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЕТСЯ

К.Ю. Швец, А.Р. Баязитова, А.М. Загафурова, А.Д. Дворникова,

В НОМИНАЦИИ

С.В. Претьякова

Открытие новых препаратов с антимикробной активностью
НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ *А.Р. Мазутов*

83-й ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ

СТУДЕНТОВ И МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

«ВОПРОСЫ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И ПРАКТИЧЕСКОЙ
МЕДИЦИНЫ»

г. Уфа, 23 апреля 2018 г.

Ректор БГМУ

В.Н.Павлов





«РАЗВИТИЕ ПАРТНЕРСТВА В ЗДРАВООХРАНЕНИИ»

**Альянс клинических химиотерапевтов
и микробиологов**
НП «Развитие партнерства в здравоохранении»

СЕРТИФИКАТ

Настоящим подтверждается, что

Бактимова Аюрыра Рустамовна

принимал участие
в Образовательной конференции
«Рациональное применение антимикробных средств
в амбулаторной практике»
количество прослушанных часов: 5

« 12 » марта 20 16 г.

Президент Альянса клинических
химиотерапевтов и микробиологов
Профессор


С. В. Яковлев



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

СЕРТИФИКАТ

УЧАСТНИКА (ЦЫ) Растамовский Альфред Гусманович
 НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ Мавзюнов Евгений Сагитович

83-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых

с международным участием

«Вопросы теоретической и практической медицины»

Уфа, 13 апреля 2018г.



Ректор БГМУ

В.Н.Павлов

Сертификат

БАХТИЕВА Альфира Рустамовна

принял(а) участие в работе школы-семинара

HTSDD-2018 High throughput screening in drug discovery

состоявшейся 13 июня 2018 г. в городе Уфа
в рамках Государственного контракта РНФ "Новый рациональный
подход к разработке антибактериальных и противоопухолевых
лекарственных молекул с применением технологии ВПС"

Председатель программного комитета
к.б.н. Иваненков Ян Андреевич



ОТЗЫВ НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

Бахтиева Альфира Рустамовна выполнила выпускную квалификационную работу на тему «СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ СИНТЕЗИРОВАННЫХ ХИМИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИИ В ОТНОШЕНИИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ».

Представленная работа посвящена проблеме поиска новых соединений с антибактериальной активностью. Методом «золотого стандарта» для количественной оценки антибактериальной активности во всем мире является метод серийных разведений, применяется для определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) сравниваемых антибиотиков или исследуемых соединений. В этой связи целью данной ВКР является сравнительная количественная оценка антимикробной активности цианэтильных производных фузидовой кислоты.

За время обучения в БГМУ Бахтиева А.Р. освоила учебную программу в достаточном объеме.

В процессе выполнения ВКР Бахтиева А.Р. освоила основные методы работы с микроорганизмами и методы оценки антибиотикочувствительности бактерий. Полученные в ходе выполнения результаты были представлены в виде устных сообщений на студенческой конференции.

В ходе выполнения ВКР Бахтиева Альфира Рустамовна продемонстрировала основные компетенции, которыми должен овладеть обучающийся по окончании учебы по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (профиль – микробиология).

Таким образом, выпускная квалификационная работа Бахтиевой А.Р. ДОПУСКАЕТСЯ К ЗАЩИТЕ и рекомендуется для положительной оценки.

Научный руководитель:
д.м.н., профессор, зав.кафедрой
фундаментальной и прикладной
микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России



А.Р.Мавзютов

Проблемы инфекционной патологии и сегодня не потеряли своей актуальности. Это связано со значительным снижением эффективности антибиотикотерапии в последние годы. Все более широкое распространение получает полирезистентность и даже панрезистентность и предполагает поиск новых химических соединений. .

В ходе проведения данного исследования автором были освоены все необходимые для решения этой задачи методы, включая качественные и количественные способы оценки антибактериальной активности.

Структурно в работе представлены разделы введение, литературный обзор, описание объектов и методов исследований, собственные данные и их обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы, приложения. Сформулированные в работе выводы достаточно обоснованы и могут быть использованы в практической деятельности.

Таким образом, выпускная квалификационная работа Бахтияевой Альфиры Рустамовны «СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ СИНТЕЗИРОВАННЫХ ХИМИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИИ В ОТНОШЕНИИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ», выполненная под руководством зав. кафедрой ФПМ, доктора медицинских наук, профессора Мавзютова Айрата Радиковича является завершённой и соответствует требованиям ФГОС ВО (приказ Минобрнауки РФ №944 от 07.08.2014 г.) по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (бакалавриат), а соискатель заслуживает положительной оценки.

доктор биологических наук, профессор
кафедры физиологии и общей биологии
ФГБОУ ВО Башгосуниверситет
Минобрнауки России

Валентина Гусмановна Шамратова





АНТИПЛАГИАТ
ТВОРИТЕ СОБСТВЕННЫМ УМОМ

Башкирский государственный
медицинский университет

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Бахтиева Альфира Рустамовна
Факультет, кафедра, номер группы	Б 401А
Тип работы	Дипломная работа
Название работы	СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ СИНТЕЗИРОВАННЫХ ХИМИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИИ В ОТНОШЕНИИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ
Название файла	СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ СИНТЕЗИРОВАННЫХ ХИМИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИИ В ОТНОШЕНИИ
Процент заимствования	20,04%
Процент цитирования	1,98%
Процент оригинальности	77,98%
Дата проверки	10:05:00 26 июня 2018г.
Модули поиска	Кольцо вузов; Модуль поиска общепотребительных выражений; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска переводных заимствований; Цитирование; Коллекция РГБ; Сводная коллекция ЭБС; Модуль выделения библиографических записей; Модуль поиска "БГМУ"

Работу проверил Кобзева Наталья Рудольфовна

ФИО проверяющего

Дата подписи

26.06.2018г.

ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России
НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

Подпись проверяющего

Чтобы убедиться
в подлинности справки,
используйте QR-код, который
содержит ссылку на отчет.



Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего. Предоставленная информация не подлежит использованию в коммерческих целях.