

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*

Дворенкова Анастасия Дмитриевна

РАЗРАБОТКА ПРЕЦИЗИОННОЙ ТЕХНОЛОГИИ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ  
ОЦЕНКИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ  
ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ОТНОШЕНИИ  
ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Научный руководитель:

зав. кафедрой ФПМ,  
доктор медицинских наук, профессор



А.Р. Мавзютов

Уфа – 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений	4
ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. Инфекционные заболевания, вызванные грамотрицательными бактериями	9
1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> общая микробиологическая характеристика	11
1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : вирулентность и ее регуляция	13
1.4. Антибиотики с выраженной активностью в отношении грамотрицательных бактерий	18
1.5. Методы определения чувствительности к антимикробным препаратам	23
1.5.1. Методы серийных разведений	23
1.5.1.1. Метод серийных разведений в бульоне	26
1.5.1.2. Метод серийных разведений в агаре	28
1.5.2. Диско-диффузионный метод (ДДМ)	31
1.5.3. Е-тест (эпсилومترический метод)	35
1.5.4. Метод пограничных концентраций	36
1.5.5. Молекулярно-генетические методы: полимеразная цепная реакция (ПЦР)	36
1.5.5.1. Стандартная ПЦР	37
1.5.5.2. ПЦР в режиме реального времени (РТ-ПЦР)	39
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	41
2.1. Объекты исследования	41
2.2. Приготовление питательных сред для культивирования <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
2.3. Конструирование положительного образца	45
2.4. Выделение бактериальной ДНК из выросших колоний	45
2.5. Проведение стандартной полимеразно цепной реакции (ПЦР)	46
2.6. Электрофоретическая детекция продуктов амплификации	47
2.7. Проведение ПЦР в режиме реального времени (РТ-ПЦР)	49

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	51
3.1. Конструирование калибратора для количественной оценки содержания <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51
3.2. Определение величины минимальной подавляющей концентрации (МИК) исследуемых антибиотиков	56
3.3. Экспериментальная оценка сконструированного калибратора на антибактериальных препаратах	
3.4. Разработка системы интерпретации результатов молекулярно-генетического анализа антибактериальной активности препаратов	
ВЫВОДЫ	
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	
ПРИЛОЖЕНИЕ	

## Список сокращений и условных обозначений

АБП – антибактериальный препарат

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ДДМ – диско-диффузионный метод

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ – дезоксинуклеотидтрифосфат

ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид

КОЕ – колониеобразующие единицы

МЛР-ГОВ – множественная лекарственная резистентность  
грамотрицательных бактерий

МПК – минимальная подавляющая концентрация

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

РТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

СИБ – система индикаторных бумажек

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность.** Инфекционные болезни на протяжении многих столетий были и остаются наиболее опасными болезнями человеческого организма из-за их способности вовлечь в процесс большое число здоровых людей в течение короткого периода времени. По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) 2013 г. в Российской Федерации зарегистрировано более 33 млн 225 тыс. инфекционных заболеваний (в 2012 г. – 31 млн 477 тыс.). В 2013 г. в России умерло 1,9 млн человек, от инфекционных болезней – 31 808 (1,7%), зарегистрировано 33 млн 255 тыс. случаев инфекционных болезней, летальный исход составил – 0,096%. С каждым годом число больных, страдающих инфекционными заболеваниями, увеличивается и не имеет тенденции к снижению. В связи этим встает вопрос о необходимости совершенствования методик быстрого выявления возбудителя и точного определения его чувствительности к лекарственным препаратам, что в свою очередь, необходимо для выбора адекватной антибиотикотерапии.

В настоящее время для оценки чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам применяют фенотипические методы, которые предполагают оценку влияния веществ на жизнедеятельность микроорганизмов по таким параметрам, как скорость роста и биохимическая активность. Существенными недостатками данных методов является длительность и трудоемкость проводимых манипуляций, что способствует отдалению процесса подбора подходящей антибиотикотерапии и применения её на практике (Ekadashi R Sabharwal, 2012). Следственно, вопрос наиболее быстрого определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам становится очень важным.

На сегодняшний день современные молекулярно-генетические методы создают новые возможности в области диагностики онкологических заболеваний, пренатальной диагностики моногенных болезней, в судебной медицине для идентификации личности, а также для диагностики

инфекционных заболеваний. Представляется возможным использование данных методов для определения противомикробной активности новых химических соединений. В качестве такого метода можно рассматривать полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и её модификации. Метод ПЦР считается одним из наиболее быстрых и точных методов диагностики многих инфекционных заболеваний. Все более часто используется ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (РТ-ПЦР), которая позволяет проводить не только качественный анализ образца на предмет наличия или отсутствия генетической мишени, но и осуществлять количественную оценку содержания целевого маркера в пробе (Saha, 2001). В отличие от традиционных микробиологических методов, метод ПЦР может позволить проводить идентификацию генетических детерминант резистентности микроорганизмов, получать полную антибиотикограмму в короткие сроки, прогнозировать появление устойчивости к различным группам антимикробных препаратов, а также оценивать распространение резистентных штаммов на локальном и региональном уровнях (Парфенова с соавт. 2013). Именно поэтому обнаружение антибиотикорезистентности методом ПЦР является отличным дополнением к традиционному микробиологическому тестированию (Струкова, 2012).

Поиск новых антибактериальных веществ в настоящее время остаётся актуальной задачей в связи с постоянным появлением резистентных к классическим антибиотикам штаммов условно-патогенных микроорганизмов. Важным направлением такого поиска является исследование антибактериальных свойств новых синтезированных веществ в отношении микроорганизмов, способных вызывать серьезные инфекции. К таким микроорганизмам относится вид *Pseudomonas aeruginosa*. Этот микроорганизм отличается уникальной способностью быстро приобретать и накапливать устойчивость к антибактериальным препаратам разнообразных групп. Приобретенная устойчивость может быть связана практически со всеми известными механизмами: дерепрессией хромосомных цефалоспоринов AmpC, продукцией плазмидных или интегрон-опосредованных  $\beta$ -лактамаз различных молекулярных классов,

снижением мембранной проницаемости в результате утраты пориновых белков OprD, активацией эффлюксных систем с широким субстратным профилем (MexAB-OprM, MexEF-OprN, MexXY-OprM), синтезом аминокликозид-модифицирующих ферментов, структурными перестройками топоизомераз II и IV (Johansen, 2008; Strateva, 2009). Широкое распространение полиантибиотикорезистентных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* представляет собой глобальную проблему. Поэтому предлагаемая идея определения антимикробных свойств новых химических соединений с использованием ПЦР представляется достаточно востребованной, а проблема весьма актуальной.

**Цель исследования.** Разработка способа ускоренной молекулярно-генетической оценки противомикробной активности новых химических соединений на модели *Pseudomonas aeruginosa*.

#### **Задачи исследования**

1. Конструирование калибровочного образца pAL-TAPseudAer16S известной концентрации для количественной оценки антимикробной активности антибиотиков в отношении *Pseudomonas aeruginosa* с помощью метода ПЦР в режиме реального времени.

2. Экспериментальная оценка сконструированного калибратора на антибактериальных препаратах (не менее 5).

3. Разработка системы интерпретации результатов молекулярно-генетического анализа антибактериальной активности препаратов.

4. Тестирование при помощи предложенной технологии новых химических соединений и субстанций, обладающих антимикробным действием.

**Практическая значимость.** Сконструирован калибровочный образец pAL-TAPseudAer16S для количественной оценки противомикробной активности химических соединений в отношении условно-патогенных микроорганизмов с помощью метода ПЦР в режиме реального времени.

**Область применения результатов исследования.** Проведение комплексной оценки противомикробной активности новых химических

соединений с помощью метода ПЦР в режиме реального времени может ускорить процесс лечения инфекционных заболеваний благодаря подбору наиболее эффективного препарата в короткие сроки.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Инфекционные заболевания, вызываемые грамотрицательными бактериями

В последние годы инфекции, вызванные грамотрицательными микроорганизмами, резко возросли во всех частях мира. Основными возбудителями таких инфекций являются резистентные к множественным лекарственным средствам грамотрицательные бактерии (МЛР-ГОб), распространение которых сильно увеличилось по причине частого и ненадлежащего использования антибиотиков широкого спектра действия (Pranita et al., 2012; Martin et al., 2017). К таким инфекциям следует отнести пневмонию, менингит, диарею, гонорею, отит, окулярные инфекции, внутрибольничные инфекции, катетер-ассоциированные инфекции, внутрибрюшинные инфекции, инфекции мочевыводящих путей и кровотока.

Среда обитания грамотрицательных видов бактерий, вызывающих инфекционные заболевания, достаточно разнообразна. К примеру, большинство видов процветает во влажной среде, следовательно, типичными резервуарами могут быть душевые кабинки, бассейны, диализные трубки и респираторное оборудование (Гусев, Минеева, 2003). Однако, некоторые виды могут выжить и на сухих поверхностях даже в течение нескольких месяцев (Kramer, Schwebke, Kampf, 2006).

Одной из основных причин высокой смертности от инфекций, вызываемых грамотрицательными бактериями, является поздняя разработка стратегии антибактериальной терапии. Было обнаружено, что отставленное начало приема антибактериальных препаратов может стать причиной летального исхода, особенно у пациентов с заболеваниями повышенного риска, которые обычно вызваны такими микроорганизмами, как *Pseudomonas aeruginosa*, *Echerichia coli*, *Enterobacter spp* и *Klebsiella pneumonia*. Согласно литературным данным (Chandy, Bhattacharya, 2015), у пациентов, которым была оказана своевременная помощь, смертность составила 27,4% в сравнении с 38,4% пациентов с ненадлежащим лечением.

Исходя из этих данных, среднее время от обнаружения вида микроорганизма до момента смерти может быть очень коротким (Chandy, Bhattacharya, 2015). Именно поэтому для пациента является важным своевременное назначение адекватной антибактериальной терапии (Kumar et al., 2009).

На сегодняшний день основным и наиболее эффективным способом лечения всех инфекционных заболеваний бактериальной этиологии является антибиотикотерапия. Однако имеет место возрастающая тенденция резистентности грамотрицательных бактерий к таким противомикробным препаратам, как амикацин, цефепим, цефтазидим, имипенем, меропенем и ципрофлоксацин (Talbot et al., 2006).

В последнее время для лечения инфекций МЛР-ГОб применяют комбинированную терапию, которая обычно состоит из  $\beta$ -лактама и аминогликозида или фторхинолона (Pranita, Tamma et al., 2012). Такую терапию применяют в том случае, если возбудитель неизвестен, либо инфекция является смешанной. Считается, что сочетанный прием нескольких антибактериальных препаратов (АБП) повышает их лекарственное действие. Группой американских ученых (Pranita, Tamma, et al., 2012) был проведен анализ проведения подобной терапии пациентам с бактериемией, раневыми инфекциями, пневмонией и септическим шоком. Была показана эффективность применения подобной терапии и выявлена положительная динамика течения заболевания почти в 50% случаев. Однако стоит отметить, что данное лечение подходило лишь для небольшого числа инфекций и к тому же обладало рядом существенных недостатков - усиление побочных действий и дороговизна.

## 1.2. *Pseudomonas aeruginosa*: общая микробиологическая характеристика

*Pseudomonas aeruginosa* – это аэробные неферментирующие каталазо- и оксидазопозитивные грамотрицательные подвижные бактерии, имеющие прямую или слегка изогнутую палочковидную форму. Данные бактерии являются оппортунистическим патогеном человека, способным вызывать широкий спектр опасных для жизни острых и хронических инфекций, особенно у пациентов с нарушенной иммунной защитой.

Данная бактерия выживает в условиях с повышенным содержанием кислорода и не нуждается в наличии особых питательных веществ. Оптимальная температура роста - 37°C. Не способна к спорообразованию, формирует полисахаридную капсулу.

Синегнойная палочка подвижна, имеет один или два полярно расположенных жгутика. Обладает твичинг-подвижностью (twitching mobility), реализуемой через сокращение-расслабление пилей IV типа. Помимо пилей важную роль в адгезии имеет гликопротеид, который обнаруживается во внеклеточной слизи. Это вещество предохраняет бактерию от факторов иммунной защиты. В развитии лихорадки участвует эндотоксин, который является липополисахаридом клеточной стенки. Цитотоксин синегнойной палочки подавляет синтез белка во всех клетках и тканях, в результате чего возникают глубокие нарушения метаболизма. Данный токсин активируется благодаря ферментам организма, но при наличии антитоксических антител можно избежать его повреждающего действия. На гранулоциты крови человека влияет лейкоцидин, который является цитотоксином. При кишечных формах синегнойной инфекции выступают такие факторы патогенности, как энтеротоксин и факторы проницаемости, которые нарушают водно-солевой обмен (Коротяев, Бабичев, 2008).

*P. aeruginosa* продуцирует богатый спектр окрашенных веществ, которые расцениваются как пигменты (Пыж А.Э., 2011). Их можно отнести к трем основным химическим группам — производным феназинов (группа

пиоцианина), дериватам хинолина, связанным с пептидной и ацильной цепями (группа пиовердина), и производным гомогентизиновой кислоты (группа пиомеланина). Штаммы, продуцирующие сразу два или три пигмента, немногочисленны, большинство изолятов продуцируют лишь одну группу пигментов.

Многие штаммы *P. aeruginosa* обладают гемолитической активностью, она воспроизводится на 5% кровяном агаре (с эритроцитами барана). Рост синегнойной палочки часто сопровождается специфичным ароматом, который авторы описывают по-разному, сравнивая с запахом винограда, цветущей липы, жасмина и даже гниющей картошки. Вероятно, что различия в оценке ароматов связаны не только с субъективным восприятием исследователей, но и с индивидуальными особенностями штаммов, продуцирующими разные спектры летучих соединений, главными из которых являются 2-аминоацетофенон, 2,4-диметилхиназолин и 4-метилхиназолин (Лазарева, 2015). Встречаются штаммы, не синтезирующие пахучие вещества.

Синегнойная палочка характеризуется универсальностью метаболической активности, используя в качестве источников питания широкий спектр веществ — от простых углеводов и тканевых субстанций организма человека до антимикробных препаратов (этакридина лактата, детергентов, фурацилина и даже формальдегида), что обеспечивает ее широкую экологическую пластичность. Характерна пептидазная, протеазная, а также липолитическая активность за счет наличия набора ферментов липаз.

*P. aeruginosa* чувствительна к высушиванию, действию хлорсодержащих препаратов и кипячению. Проницаемость наружной мембраны довольно низкая, этот факт объясняет множественную устойчивость к антибиотикам.

Почва и различные водоемы являются естественной средой обитания, часто встречается в водопроводных системах, продуктах питания, детергентах, растворах для инъекций и т.д. Также около 5-10% людей являются носителями различных штаммов *P. aeruginosa*.

### 1.3. *Pseudomonas aeruginosa*: вирулентность и её регуляция

Синегнойная палочка обладает большим набором компонентов, которые могут играть роль факторов патогенности, вызывающих повреждение тканей и обеспечивающих выживание *P. aeruginosa* в организме. Факторы патогенности при синегнойной инфекции активно действуют на всех этапах инфекционного процесса — адгезии, инвазии, в случае диссеминации и персистенции, а также вызывают прямую интоксикацию и обеспечивают ускользание от иммунного ответа.

Основные факторы адгезии синегнойной палочки — это пили и флагеллярные протеины. Они оказывают влияние в совокупности и вносят вклад в реализацию процесса адгезии на тканях человека и абиотических поверхностях (Giltner, 2006; Лазарева, 2015). Наиболее опасны пили IV типа, которые способны взаимодействовать с многочисленными локусами, например, с несиалированными углеводными участками сложных биополимеров и ДНК-комплексами, которые могут присутствовать в составе разнообразных элементов нормальных и патологически измененных тканей (van Schaik, 2005; Heiniger, 2010; Лазарева, 2015).

Помимо перечисленных адгезинов, немаловажную роль в процессе адгезии принимает липид А, который инициирует закрепление липополисахарида на поверхностных молекулах TLR 1–10 типов на клетках легочной ткани и роговицы (Pier, 2007). Также обеспечивают адгезию поверхностные протеины из семейств Omp (LptF), Opr (OprQ, OprF) беспилевых штаммов на многих субстратах, включая муцин, лактотрансферрин, ламинин, фибронектин и др. (Azghani, 2002; Arhin, 2010). На поверхности клетки присутствуют адгезины, распознающие сиаловые кислоты, ганглиозиды, а также адгезивные лектины PA-II и PA-III (рисунок 1) (Gilboa-Garber, 2002; Гришин, 2015).

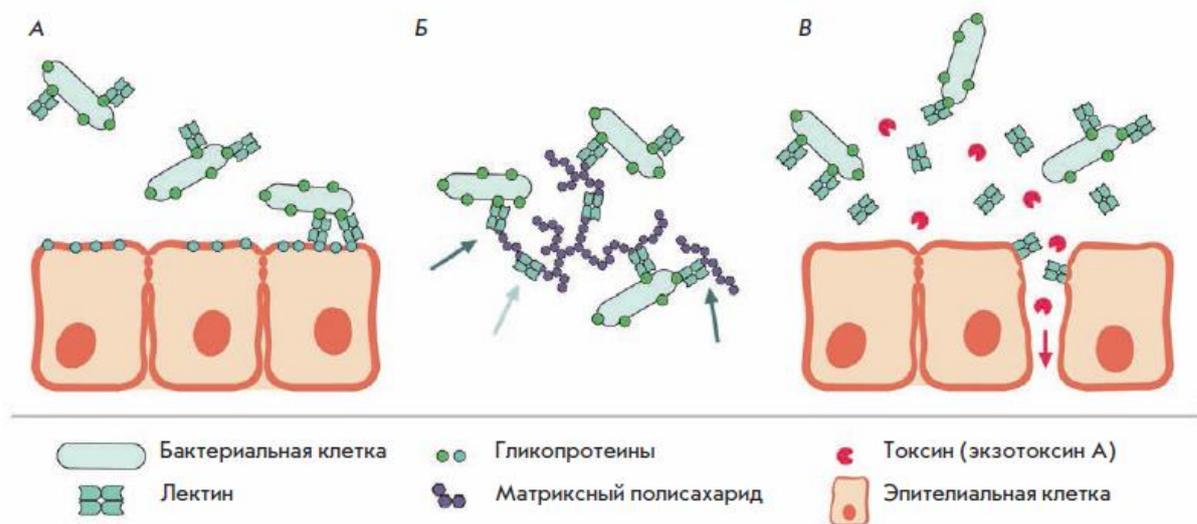


Рисунок 1 - Предполагаемые функции лектинов *P. aeruginosa*: адгезия к эпителиальным клеткам организма-хозяина (А); прикрепление бактериальных клеток к полисахаридам матрикса биопленок и «сшивание» цепочек полисахаридов друг с другом (Б); нарушение барьерной функции и повышение проницаемости эпителиального слоя для других факторов патогенности (В). Светло-серой стрелкой отмечен пример сшивания полисахаридов лектином, темно-серыми стрелками – прикрепление полисахарида к гликопротеинам бактериальной клетки, красной стрелкой обозначено проникновение токсинов через эпителий (Гришин и др., 2015)

В том случае, если *P. aeruginosa* оказывается на поверхности с отсутствующими сайтами адгезии (катетеры, эндопротезы) сначала синтезируется прилипающий к инертной поверхности внеклеточный матрикс, который может включать полисахариды (альгинат, полисахариды Pel и Psl), ДНК, белки и рамнолипиды. Затем бактериальные клетки фиксируются на матриксе, используя адгезины, специфично реагирующие с матричными молекулярными комплексами. В качестве матриксвзаимодействующих адгезинов могут выступать белки пилей, поверхностные белки (например, CdrA) (Маянский, 2012).

Следующим фактором вирулентности, после адгезии, является фактор инвазии. К важнейшим инвазионным факторам принадлежат протеолитические ферменты, а именно: два варианта эластазы - LasA и LasB, щелочная протеаза (AprA), протеаза IV (PrpL). Эластазы разрушают

эластин, коллаген и фибрин, вызывая деструкцию соединительной ткани и нарушая раневые барьеры, а также могут вызывать деградацию иммуноглобулинов классов G и A, интерферонов. Щелочная протеаза активна в отношении фибрина, факторов комплемента и в комплексе с эластазой разрушает молекулы  $\gamma$ - и  $\alpha$ -интерферона. Протеаза IV вызывает деструкцию эластина, факторов комплемента, молекул иммуноглобулина G и Fe-связывающих белков человека лактоферрина и трансферрина (Caballero, 2001; Лазарева, 2015).

*P. aeruginosa* располагает патогенетически значимыми экзоферментами — липазой (варианты LipA, LipB, LipC) и фосфолипазой C, которые совместно в условиях *in vivo* могут дестабилизировать мембраны любых типов клеток млекопитающих, вызывая серьезные некротические изменения в тканях. Немаловажную роль в процессе инвазии играют два различных класса экзотоксинов. К первому классу относят экзотоксин A (ExoA), который активно высвобождается бактериями во внешнюю среду через систему Xcp по II типу секреции (Morlon-Guyot, 2009). Экзотоксин A состоит из трех субъединиц, одна из которых отвечает за рецепцию на  $\alpha$ -2-макроглобулинах на поверхности клеток-мишеней, другая обеспечивает транслокацию через плазматическую мембрану, третья, обладая АДФ-рибозил-трансферазной активностью, непосредственно оказывает повреждающий эффект на фактор элонгации-2. Результатом является блокада синтеза белка. Второй класс экзотоксинов высвобождается, используя III тип секреции, который образно называют «макромолекулярным шприцом» (Veesenmeyer, 2009). Данный токсин при помощи поверхностного молекулярного комплекса вводится непосредственно в цитоплазму клетки, на которой плотно адгезирована синегнойная палочка. Это приводит к повреждению конкретной клетки, однако делает невозможным воздействие токсинов III типа на другие клетки хозяина, не соприкасающиеся с бактерией («контактные токсины»). У *P. aeruginosa* 4 варианта таких токсинов. Токсины ExoS и ExoT функционально схожи: они обладают свойствами ГТФ-активирующего протеина и АДФ-рибозилтрансферазы, которые в совместно вызывают

перестройку актина в цитоскелете клетки хозяина, приводящую к ее немедленной гибели. Наиболее опасен для клеток человека EхoU, работающий как внутриклеточная фосфолипаза, которая вызывает быстрый лизис клеток. EхoY является аденилатциклазой (Sato, 2004).

ЛПС (эндотоксин) синегнойной палочки может оказывать как генерализованное действие (пирогенность и интоксикация), так и прямой местный токсический эффект. Патогенные свойства ЛПС зависят, в основном, от липида А. Взаимодействие с клетками происходит за счет рецепции элементов ЛПС на молекулярных паттернах, специализированных на распознавании патогенов (Cigana, 2009).

Пигменты также расцениваются в качестве факторов инвазии: пиоцианин вызывает непосредственное повреждение эпителиальных тканей, пиовердин и пиоцианин обладают способностью к прямому гемолизу эритроцитов (Sadikot, 2005; Пыж, 2011).

*P. aeruginosa* обладает системами захвата железа, жизненно необходимого для функционирования железосодержащих ферментов дыхательной цепи. Наиболее активными сидерофорами являются пиовердин, пиохелин, псевдобактин, салициловая кислота (Cornelis, 2013).

Регуляция экспрессии генов вирулентности происходит в рамках системы глобального сигналинга, которая получила название «кворум-сенсинг» (Jimenez, 2012). Кворум-сенсинг обеспечивает однотипную и одновременную реакцию на внешний стимул всех бактерий многоклеточного сообщества. Система кворум-сенсинга функционирует по принципам, общим для всех грамотрицательных бактерий: сигнальные молекулы семейства N-ацилгомосеринлактонов, синтезируемые белками системы LuxI и секретируемые во внешнюю среду, взаимодействуют с протеином LuxR. У синегнойной палочки аналогичные функции выполняют системы Las и Rhl. Система Las регулирует продукцию и связывание N-3-оксо-додеканоилгомосеринлактона (3-оксо-C<sub>12</sub>-HSL). LasI отвечает за его синтез и секрецию, а LasR распознает 3-оксо-C<sub>12</sub>-HSL, связывает его и выступает в роли транскрипционного регулятора, контролирующего выработку эластазы, экзотоксина А, щелочной протеазы и

биоупленкообразования. Rhl-система, включающая белок синтеза RhlII и белок распознавания RhlR, «работает» с N-бутаноил-гомосеринлактоном (C<sub>4</sub>-HSL) по аналогичному принципу. Комплекс C<sub>4</sub>-HSL-RhlR является транскрипционным регулятором продукции рамнолипидов, белков III типа секреции, синтеза пиоцианина и синильной кислоты. Rhl-система находится в функциональном подчинении у Las-системы: стимуляция Las растормаживает Rhl. Среди других значимых регуляторов, функционирующих в рамках кворум-сенсинга, следует упомянуть молекулы циклических дипептидов: цикло (ΔАла-L-Вал), цикло (ΔПро-L-Тир), 4-хинолоны (2-гептил-3-гидрокси-4-хинолон и др.), ионы Fe (через взаимодействие с пиовердином, поверхностным рецептором FpvA и анти-сигма-фактором FpvR), производные декановой (каприновой) кислоты, циклическую АМФ и ди-ГМФ, гуанозин-5'-дифосфат-3'-дифосфат (ppGpp) и гуанозин-5'-трифосфат-3'-дифосфат (pppGpp) (Jimenez P.N., 2012).

Система кворум-сенсинга является перспективной мишенью для фармакологического управления вирулентностью синегнойной палочки (Jakobsen, 2013).

#### **1.4. Антибиотики с выраженной активностью в отношении грамотрицательных бактерий**

Антибиотики - специфические продукты жизнедеятельности или их модификации, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов (вирусам, бактериям, грибам, водорослям, протозоа) или к злокачественным опухолям, избирательно задерживающие их рост либо полностью подавляющие развитие. Условно все важнейшие в практическом отношении антибиотики можно разделить на несколько групп:

- 1) противобактериальные антибиотики узкого спектра действия, активные преимущественно в отношении грамположительных организмов,
- 2) противобактериальные антибиотики широкого спектра действия,

- 3) противотуберкулезные антибиотики,
- 4) противогрибковые антибиотики,
- 5) противоопухолевые антибиотики,
- 6) противоамебные и противомаларийные антибиотики (Егоров, 2004).

Наиболее активными в отношении *Pseudomonas aeruginosa* являются антибиотики группы фторхинолонов и аминогликозидов. Рассмотрим некоторые из них.

1. Ципрофлоксацин – антибиотик широкого спектра действия группы фторхинолонов. Подавляет ДНК-гиразу и угнетает синтез бактериальной ДНК. Наиболее активен в отношении грамотрицательных бактерий следующих видов: *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*.

Активно всасывается из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Биодоступность после приема внутрь составляет 70%. Связывание с белками плазмы составляет 20-40%. Распределяется в тканях и жидкостях организма. Проникает в спинномозговую жидкость: концентрация в невоспаленных мозговых оболочках 10%, при воспаленных – до 37%. Высокие концентрации антибиотика достигаются в желчи.

Показаниями к применению являются инфекционно-воспалительные заболевания, вызванные чувствительными к ципрофлоксацину бактериями, в том числе заболевания дыхательных путей, костей, суставов, кожи, брюшной полости и органов малого таза; инфекции ЛОР-органов; септицемия.

2. Гемифлоксацин – антибиотик группы фторхинолонов. Влияет на процессы репликации, репарации и транскрипции бактериальной ДНК путем ингибирования ферментов ДНК-гиразы и топоизомеразы IV.

Механизм действия фторхинолонов, включая гемифлоксацин, отличается от такового у бета-лактамов, макролидов, аминогликозидов и тетрациклинов. Не отмечено перекрестной резистентности между гемифлоксацином и перечисленными группами антибиотиков. Резистентность к фторхинолонам появляется в результате

мутации в генах ДНК-гиразы и ДНК-топоизомеразы IV, частота возникновения которых составляет  $10^{-7}$ - $10^{-10}$ .

Антибиотик активен в отношении аэробных грамотрицательных бактерий принадлежащих к следующим видам: *Haemophilus spp.* (в том числе *Haemophilus influenza*, включая штаммы, продуцирующие β-лактамазы, *Haemophilus parainfluenzae*), *Moraxella spp.* (в том числе *Moraxella catarrhalis*, продуцирующие и непродуцирующие β-лактамазу), *Klebsiella spp.* (в том числе *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella oxytoca*), *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Acinetobacter spp.* (в том числе *Acinetobacter lowoffii*, *Acinetobacter anitartus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter haemophilus*), *Citrobacter spp.* (в том числе *Citrobacter freundii*, *Citrobacter coseri*), *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Enterobacter spp.* (в том числе *Enterobacter aerogenes*), *Serratia spp.* (в том числе *Serratia marcescens*), *Proteus spp.* (в том числе *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*), *Providencia spp.*, *Morganella spp.* (в том числе *Morganella morganii*), *Yersinia spp.*, *Pseudomonas spp.* (в том числе *Pseudomonas aeruginosa*), *Bordetella spp.* (в том числе *Bordetella pertussis*).

После приема внутрь антибиотик быстро абсорбируется из ЖКТ. После однократного приема в дозе 320 мг  $C_{\max}$  в плазме крови достигается в течение 0,5-2 ч. После повторного приема 320 мг  $C_{\max}$  в плазме крови составляет  $1,61 \pm 0,51$  мкг/мл, а  $AUC - 9,91 \pm 3,07$  мкг хч/мл.

Гемифлоксацин практически не кумулирует. Хорошо проникает в ткани легкого. В небольшом количестве метаболизируется в печени, не подвергается биотрансформации микросомальными ферментами печени системы цитохрома P450.

Показаниями к применению являются инфекционно-воспалительные заболевания, вызванные чувствительными к препарату микроорганизмами.

3. Пefлоксацин – антибиотик широкого спектра действия группы фторхинолонов. Ингибирует репликацию бактерий на уровне ДНК-гиразы, оказывает действие на РНК и синтез белков бактерий.

Действует на грамотрицательные бактерии, находящиеся в различных стадиях (роста, покоя). Антибиотик активен в отношении

грамотрицательных бактерий следующих видов: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Aeromonas spp.*, *Campylobacter spp.*, *Legionella spp.*, *Moraxella spp.*, *Morganella spp.*, *Pasteurella spp.*, *Providencia spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia spp.*, *Ureaplasma urealyticum*.

После однократной инфузии в дозе 400 мг  $C_{max}$  пefлоксацина составляет 4 мкг/мл и поддерживается в течение 12-15 ч. После приема внутрь антибиотик быстро абсорбируется из ЖКТ. После однократного приема внутрь 400 мг пefлоксацина через 20 мин абсорбируется 90% дозы, при этом  $C_{max}$  достигается через 1-2 ч и составляет через 1,5 ч 4 мкг/мл. Биодоступность около 100%.

Связывание с белками плазмы составляет 20-30%.  $V_d$  – 1,5-1,8 л/кг.

Выводится преимущественно с мочой. 30% выводится с желчью в неизменном виде, частично в виде метаболитов.

Показаниями к применению являются инфекционно-воспалительные заболевания, вызванные чувствительными к препарату микроорганизмами.

4. Спарфлоксацин – антибиотик, являющийся производным фторхинолона. Ингибитор ДНГ-гиразы. Для клеток макроорганизма не токсичен вследствие отсутствия гираз. Действует на грамотрицательные микроорганизмы как на стадии деления, так и на стадии покоя, так как влияет не только на ДНК-гиразу, но и вызывает лизис клеточной стенки. Снижает способность клеток к делению, поскольку предотвращает транскрипцию генетического материала. В результате его действия не происходит параллельной выработки устойчивости к другим антибиотикам, не принадлежащим к группе ингибиторов гираз.

Антибиотик высоко активен в отношении *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Proteus* (индол-положительные и индол-отрицательные), *Providencia spp.*, *Morganella morganii*, *Yersinia spp.*, *Vibrio spp.*, *Aeromonas spp.*, *Plesiomonas spp.*, *Pasteurella spp.*, *Haemophilus spp.*,

*Campylobacter spp.*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella spp.*, *Moraxella*, *Neisseria spp.*, *Acinobacter spp.*, *Brucella*.

Резистентность к сарфлоксацину развивается крайне медленно, поскольку практически не остается персистирующих микроорганизмов и у бактериальных клеток нет ферментов, инактивирующих его.

После исчезновения активного вещества из плазмы бактерии не способны к размножению в течении 0,5-4 ч.

После приема внутрь абсорбируется около 90%. Хорошо распределяется в тканях организма. В высоких концентрациях обнаруживается в альвеолярных макрофагах. Терапевтические концентрации достигаются в слюне, желчи, кишечнике, органах брюшной полости малого таза, почках, мочевыводящих органах, легочной ткани, бронхиальном секрете, костной ткани, мышцах, синовиальной жидкости, коже. Концентрация в СМЖ и внутриглазной жидкости – 10% от концентрации в плазме.  $V_d$  – 2-3 л/кг, связывание с белками плазмы – около 45%. После приема внутрь в дозе 400 мг  $C_{max}$  в плазме крови достигается через 3-6 ч, содержание в тканях в 2-12 раз выше, чем в плазме.

Метаболизируется в печени, выводится с калом и мочой, из них в неизменном виде выводится около 10 % принятой внутрь дозы.

Показаниями к применению являются инфекции дыхательных путей, среднего уха, придаточных пазух носа, особенно если они вызваны грамотрицательными возбудителями и др.

5. Нетилмицин – антибиотик группы аминогликозидов. Активен в отношении грамотрицательных бактерий: *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.* (в т.ч. *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*), *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*.

После внутримышечного введения  $C_{max}$  нетилмецина в плазме крови достигается через 0,5-1 ч и составляет 7мкг/мл при дозе 2 мг/кг. После быстрого внутривенного введения возможно транзитное увеличение  $C_{max}$  в плазме в 2-3 раза, по сравнению с в/в инфузией. Около 80% выводится с мочой в течении 24 ч.

Показаниями к применению являются инфекционно-воспалительные заболевания, вызванные чувствительными к препарату микроорганизмами (Справочник ВИДАЛЬ «Лекарственные препараты в России», 2010).

### **1.5. Методы определения чувствительности к антимикробным препаратам**

Определение чувствительности микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний человека к антимикробным препаратам имеет важное значение в связи с широким распространением антибиотикорезистентности у бактерий. Степень чувствительности выделенных культур возбудителей к антибактериальным препаратам необходимо знать для рационального подбора средств эффективной терапии и профилактики возникновения и распространения инфекций. Другой стороной этих исследований является получение данных (резистогамм), которые могут служить удобным инструментом-маркером в эпидемиологических исследованиях.

Стандартные методы определения чувствительности микроорганизмов к АБП (диско-диффузионный и серийных разведений) были разработаны во второй половине 60-х – начале 70-х годов XX века и с тех пор с методической точки зрения не потерпели принципиальных изменений. Современные стандартизованные методы определения чувствительности микроорганизмов к АБП подразделяют на методы серийных разведений и диффузионные. Однако внедрение в клиническую практику значительного количества новых АБП и появление новых механизмов антибиотикорезистентности у микроорганизмов потребовало более строгой стандартизации процедуры тестирования, разработки новых подходов к интерпретации результатов, внедрения современной системы внутреннего контроля качества на каждом этапе исследования.

### 1.5.1. 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.

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

где:

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

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

$m_{\text{АБ}_{\text{теор}}}$  - расчетная (теоретическая) навеска АБП;

$V_{\text{твор}}$  - 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  $-20^{\circ}\text{C}$  (сроки хранения отдельных АБП при этой температуре существенно различаются). Оптимальными условиями для хранения основных растворов АБП является температура  $-60^{\circ}\text{C}$  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  $1,0 \text{ мкг/мл}$  (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.

### 1.5.1.1. Метод серийных разведений в бульоне

Тестирование проводят в объеме 1 мл каждого разведения АБП с конечной концентрацией исследуемого микроорганизма примерно  $5 \cdot 10^5$  КОЕ/мл. Питательный бульон для определения чувствительности разливают по 0,5 мл в каждую пробирку. Количество пробирок определяют необходимым диапазоном разведений АБП и увеличивают 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 (рисунок 2).

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

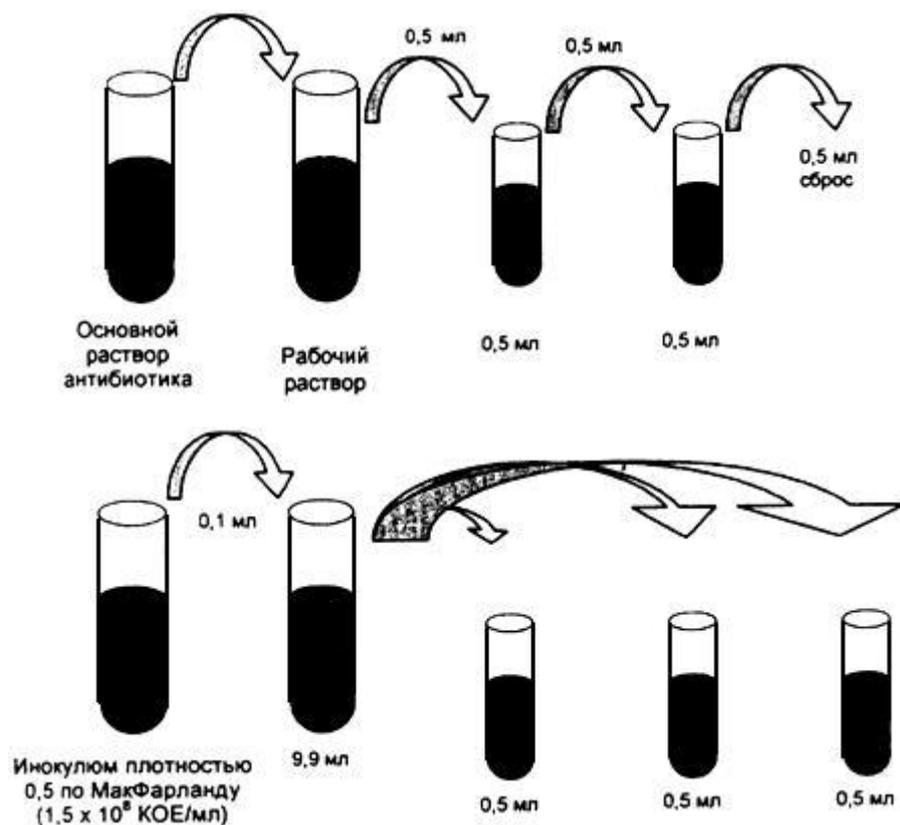


Рисунок 2 - Алгоритм определения чувствительности одной исследуемой культуры к одному АБП методом разведений в жидкой питательной среде

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 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  $5 \cdot 10$  КОЕ/мл. Инокулюм должен быть внесен в пробирки с разведениями АБП не позднее 15-30 мин с момента приготовления.

Пробирки закрывают стерильными ватно-марлевыми пробками или металлическими колпачками и все пробирки с тестируемыми штаммами, кроме пробирки "отрицательный" контроль, инкубируют в обычной

атмосфере при температуре 35°C в течение 16-20 или 20-24 ч (в зависимости от вида тестируемого микроорганизма). Пробирку "отрицательный" контроль помещают в холодильник при 4°C, где хранят до учета результатов.

Для определения наличия роста микроорганизма пробирки с посевами просматривают в проходящем свете. Рост культуры в присутствии АБП сравнивают с референтной пробиркой ("отрицательный" контроль), содержащей исходный инокулюм и хранившейся в холодильнике. МПК определяют по наименьшей концентрации АБП, которая подавляет видимый рост микроорганизма.

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 высева на неселективные среды. Каждая партия тестируемых штаммов сопровождается внутренним контролем качества исследования с использованием соответствующих контрольных (референтных) штаммов (Лабинская, 2004; Меньшиков, 2009).

#### **1.5.1.2. 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 проводят тестирование партии клинических штаммов и соответствующих контрольных штаммов, а также контроль роста микроорганизмов на чашках без АБП и контроль чистоты культуры путем высева образцов инокулюма на неселективные питательные среды.

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 АБП в каждом последующем разведении должна быть в 2 раза меньшей, чем в предыдущем. Для приготовления серии разведений используют любые стерильные химически инертные лабораторные емкости с завинчивающимися крышками объемом не менее 10 мл (для удобства размешивания).

Сухую агаризованную питательную среду растворяют и автоклавируют в соответствии с инструкцией изготовителя. После автоклавирования колбы с питательной средой помещают на водяную баню при 48-50 °С, где выдерживают 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 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 маркируют с указанием препарата и его концентрации. Очень важно тщательно перемешивать агар до того, как он начнет застывать для равномерного распределения АБП по всей толщине питательной среды. Перемешивание производят 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 бета-лактамы (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.

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 колониобразующих единиц путем посева образца приготовленного инокулята на неселективные питательные среды.

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 проводят, поместив чашку на темную не отражающую свет поверхность. За МПК принимают концентрацию,

вызвавшую полную ингибицию видимого роста. Для дифференцирования 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.

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).

### **1.5.2. Диско-диффузионный метод (ДДМ)**

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

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 ингибиции 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 сут. 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.

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.

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

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

При определении чувствительности ДДМ используют стандартный инокулюм, соответствующий по плотности 0,5 по стандарту МакФарланда и содержащий примерно  $1,5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл. Инокулюм следует использовать в течение 15 мин 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  $60^\circ$ .

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.

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 прижать пинцетом.

Непосредственно после аппликации дисков чашки Петри помещают в термостат кверху дном и инкубируют при температуре  $35^\circ\text{C}$  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.

После окончания инкубации чашки помещают кверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом в  $45^\circ$  (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 ингибиции 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).

### **1.5.3. Е-тест (эпсилOMETрический метод)**

В эпсилOMETрическом методе в качестве носителя используется узкая полоска полимера (0,5x6,0 см), пропитанная различными концентрациями антибиотика (от минимальных до максимальных). Ингибиция 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 ингибиции 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).

#### **1.5.4. Метод пограничных концентраций**

Метод пограничных концентраций можно считать усеченным методом серийных разведений. В соответствии с ним испытуемую 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.

Результат этого исследования имеет качественное (полуколичественное) выражение, но само исследование отличается простотой и экономичностью.

#### **1.5.5. Молекулярно-генетические методы: полимеразная цепная реакция (ПЦР)**

В последние годы в различных областях медицины, промышленности и сельского хозяйства все большее применение находят молекулярно-генетические методы. В частности, наиболее широко применяется метод

полимеразной цепной реакции (ПЦР), относящийся к экспериментальным методам молекулярной биологии и позволяющий добиться значительного увеличения даже небольших концентраций определенных фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК/РНК), полученных при взятии и выделении ДНК из биологического материала (пробы).

В отличие от традиционных микробиологических методов, метод ПЦР позволяет проводить идентификацию генетических детерминант антибиотикорезистентности микроорганизмов, в том числе сложно культивируемых бактерий, в сравнительно короткие сроки. Он отличается высокой точностью и меньшими требованиями к забору материала, не требует наличия питательных сред, дисков с антибиотиками и дополнительных реактивов. Определение антибиотикорезистентности с помощью ПЦР позволяет спрогнозировать появление устойчивости к различным группам антимикробных препаратов, а также оценить распространение резистентных штаммов на локальном и региональном уровнях. Поэтому обнаружение антибиотикорезистентности методом ПЦР является отличным дополнением к традиционному микробиологическому тестированию (Струкова с соавт. 2012; Парфенова с соавт. 2013).

#### **1.5.5.1. Стандартная ПЦР**

Принцип метода заключается в увеличении коротких двуцепочечных участков ДНК в геометрической прогрессии *in vitro*. Для протекания реакции в первую очередь необходимо наличие реакционной смеси, в состав которой должны входить следующие компоненты: анализируемый образец ДНК-матрица), искусственно синтезированные олигонуклеотиды (праймеры), термостабильный фермент (Taq-полимераза), смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) и буфер, представляющий смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающей оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение рН (Ребриков, 2009).

Процесс амплификации состоит из трех этапов: денатурация, отжиг и элонгация. После отжига праймеров Taq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера. Температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы Taq-полимеразы, которая с максимальной эффективностью начинает синтез второй цепи ДНК от 3'-конца праймера, связанного с матрицей, и движется в направлении от 3'- к 5'-концу. В каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается. Процесс накопления специфических продуктов амплификации идет в геометрической прогрессии, а затем его эффективность критически падает – эффект плато.

Детекция результатов амплификации осуществляется с использованием метода метод электрофореза, основанный на разделении молекул ДНК по размеру и визуализации результатов в пластине агарозного геля, в который добавлен специальный краситель ДНК (бромистый этидий). Пластину геля помещают в аппарат для горизонтального гель-электрофореза и подключают источник постоянного напряжения (например, источники питания серии «Эльф» производства компании «ДНК-Технология»). Отрицательно заряженная ДНК начинает двигаться в геле от минуса к плюсу. При этом более короткие молекулы ДНК движутся быстрее, чем длинные. На скорость движения ДНК в геле влияют: концентрация агарозы, напряженность электрического поля, температура, состав электрофорезного буфера и, в меньшей степени, ГЦ-состав ДНК. Краситель встраивается (интеркалирует) плоскостными группами в молекулы ДНК. Все молекулы одного размера движутся с одинаковой скоростью. После окончания электрофореза, продолжающегося от 10 минут до 1 часа, гель помещают на фильтр трансиллюминатора, который излучает свет в ультрафиолетовом диапазоне (254–310 нм). Энергия ультрафиолета, поглощаемая ДНК в области 260 нм, передается на краситель, заставляя его флуоресцировать в оранжево-красной области видимого спектра (590 нм).

Необходимо отметить, что электрофоретическая детекция позволяет осуществлять только качественный анализ и сопряжена с рядом проблем: большие затраты времени на стадию детекции, невозможность

автоматизации, сложность и субъективность трактовки результатов, высокий риск контаминации и большие затраты на ее устранение.

### **1.5.5.2. ПЦР в режиме реального времени (РТ-ПЦР)**

На сегодняшний день ПЦР в режиме реального времени (РТ-ПЦР) является наиболее эффективным методом при решении молекулярно-генетических задач в области диагностики инфекционных заболеваний, анализа генетических полиморфизмов, исследований сложных биологических систем, таких как биоценозы урогенитального и желудочно-кишечного трактов. Данный метод позволяет увеличить эффективность реакции, снизить риск образования неспецифических продуктов, реализовать возможность проведения как качественного, так и количественного анализа искомым участкам молекулы ДНК/РНК.

Для постановки РТ-ПЦР используют флуоресцентно-меченые ДНК-зонды или интеркалирующие красители, что позволяет регистрировать результат по увеличению флуоресценции в течение всех циклов реакции. В состав используемых ДНК-зондов входят флуоресцентная метка в 5'-положении, гаситель флуоресценции в 3'-положении, а также фосфатная группа в 3'-положении. Эти зонды имеют места посадки внутри амплифицируемой области. Гаситель поглощает испускаемое флуоресцентной меткой излучение, а фосфатная группа в 3'-положении блокирует полимеразу (Трофимов с соавт., 2008).

В зависимости от поставленной задачи все флуорофоры можно разделить на две группы. Первая группа осуществляет квантовый выход при связывании с двуцепочечной ДНК или РНК (SYBR Green). Вторая группа устроена так, что флуорофоры удобно связывать с олигонуклеотидами, в процессе синтеза праймеров. Процесс свечения при втором типе представляет из себя перенос энергии с донорного флуорофора на акцепторный или перенос энергии на «темновой гаситель» флуоресценции (Bates, Taulor, 2001).

Для анализа в режиме реального времени используют специальные ДНК-амплификаторы с оптическим блоком, позволяющие детектировать флуоресценцию внутри реакционной пробирки во время каждого цикла реакции, например, амплификаторы с детектированием в реальном времени «Bio-Rad» (CFX96 Touch, CFX384), приборы серии ДТ производства компании «ДНК-Технология» (ДТлайт, ДТпрайм, ДТ-96, ДТ-322), а также приборы Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) и Rotor Gene Q (QIAGEN, Германия).

Можно с уверенностью сказать о замещении классической ПЦР методиками с флуоресцентной регистрацией накопления ДНК. Флуоресцентные методы позволяют избирательно регистрировать накопление определенных фрагментов ДНК, что повышает чувствительность и специфичность методов. Таким образом, данный подход имеет ряд преимуществ по сравнению с методами анализа по конечной точке:

- 1) количественный анализ специфической ДНК в широком диапазоне концентраций;
- 2) сравнительный количественный анализ нескольких типов ДНК в одной пробирке;
- 3) обнаружение и определение процентного содержания ДНК с измененной последовательностью;
- 4) автоматизация и стандартизация ПЦР-анализа.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Объекты исследования

Для проведения молекулярно-генетической оценки антимикробной активности в отношении грамотрицательной бактерии *Pseudomonas aeruginosa* (штамм SS14 КС 866140) были выбраны следующие антибиотики: амикацин (конечная концентрация 50 мг/мл), гентамицин (конечная концентрация 40 мг/мл), пefлоксацин (конечная концентрация 80 мг/мл), ципрофлоксацин (конечная концентрация 2 мг/мл) и цефтриаксон (конечная концентрация 100 мг/мл).

### 2.2. Приготовление питательных сред для культивирования

#### *Pseudomonas aeruginosa*

1) Агар для определения пиоцианина псевдомонад (Pseudomonas Agar (For Pyocyanin))

- Применение: питательная среда рекомендуется для определения продукции псевдомонадами пиоцианина.

- Состав среды:

Ингредиенты	Вес, грамм/литр
Пептический перевар животной ткани	20,00
Калия сульфат	10,00
Магния хлорид	1,40
Агар-агар	15,00
Конечное значение рН (при 25°C) 7,0 ± 0,2	

- Ход приготовления питательной среды:

Размешивали 46,4 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды, содержащей

10 мл глицерина. Кипятили для полного растворения частиц и стерилизовали автоклавированием при 1,1 атм (121°C) в течение 15 минут.

- Культивирование в течение 18-24 ч при 35-37°C.

- Принцип и оценка результата:

Этот агар первоначально описан Кингом и соавт., а в дальнейшем был рекомендован американским фармакопейным комитетом для определения продукции псевдомонадами пиоцианина – водорастворимого пигмента. На среде стимулируется выработка пиоцианина и подавляется образование флюоресцеина. Пиоцианин диффундирует в среду, обуславливая голубое окрашивание вокруг колоний псевдомонад. У некоторых штаммов вырабатывается небольшое количество пигмента, поэтому отмечается голубовато-зеленое окрашивание.

Пептический перевар животной ткани служит источником азотистых питательных веществ, углерода, серы и микроэлементов для роста псевдомонад. Сульфат калия и хлорид магния необходимы для активации выработки пиоцианина и подавления образования флюоресцеина.

2) Питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар) (ФГУН ГНЦ ПМБ "Оболensk", Россия).

- Применение: для культивирования различных микроорганизмов, таких как энтеробактерии, синегнойная палочка, стафилококки, а также для проведения исследований в санитарной и клинической микробиологии.

- Состав среды:

<b>Ингредиенты</b>	<b>Вес, грамм/литр</b>
Панкреатический гидролизат рыбной муки	24,0
Натрия хлорид	4,0
Агар микробиологический	10,0±2,0
Конечное значение рН (при 25°C) 7,4 ± 0,2	

- Ход приготовления питательной среды:

Препарат в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии питательной среды, размешивали в 1 л дистиллированной воды, кипятили в течение 2 мин до полного расплавления агара, фильтровали через ватно-марлевый фильтр, разливали в стерильные флаконы и стерилизовали автоклавированием при температуре 121°C в течение 15 мин.

- Культивирование в течение 18-48 ч при 35-37°C.

- Принцип и оценка результата:

«ГРМ-агар» обеспечивает на всех засеянных чашках Петри рост: 1) тест-штаммов *Shigella flexneri* 1a 8516 и *Shigella sonnei* «S form» при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения  $10^{-6}$  через 18-20 ч инкубации при температуре 37°C в виде бесцветных прозрачных круглых колоний диаметром (1,50,5) мм; 2) тест-штаммов *Pseudomonas aeruginosa* 27/99 и *Serratia marcescens* 1 с образованием сине-зеленого и красного пигмента соответственно через 18-20 ч инкубации при температуре 37°C для *P. aeruginosa* 27/99 и 222 С для *S. marcescens* 1 при посеве по 0,1 мл микробной взвеси, соответствующей 10 единицам по стандартному образцу мутности, соответствующего года выпуска.

3) Питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-бульон) (ФГУН ГНЦ ПМБ "Оболенск", Россия).

- Применение: для культивирования различных микроорганизмов, неприхотливых по своим питательным потребностям, таких как энтеробактерии, синегнойная палочка, стафилококки, а также для проведения исследований в санитарной и клинической микробиологии.

- Состав среды:

<b>Ингредиенты</b>	<b>Вес, грамм/литр</b>
Панкреатический гидролизат рыбной муки	8,0
Пептон сухой ферментативный	8,0
Натрия хлорид	4,0
Конечное значение рН (при 25°C) 7,3 ± 0,2	

- Ход приготовления питательной среды:

Размешивали 20,0 г порошка в 1 л дистиллированной воды, кипятили в течение 3 мин, фильтровали через бумажный фильтр, разливали по 10,0 мл в стерильные пробирки и стерилизовали автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин.

Готовая к употреблению питательная среда должна быть прозрачная, желтого цвета. Готовую среду можно использовать в течение 1 месяца при условии хранения ее при температуре 2-8°C.

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

«ГРМ-бульон» обеспечивает во всех засеянных пробирках при посеве по 0,5 мл микробной взвеси рост каждого из тест-штаммов: *Corynebacterium xerosis* 1911 и *Staphylococcus aureus* Wood-46 из разведения  $10^{-6}$  не позднее 48 ч инкубации; *Escherichia coli* 3912/41 (055:K59) и *Pseudomonas aeruginosa* 27/99 - из разведения  $10^{-7}$  через 20-24 ч инкубации при температуре  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$  в виде диффузного помутнения среды.

Питательная среда должна обеспечивать во всех засеянных пробирках образование индола и сероводорода тест-штаммами *Shigella flexneri* 1a 8516 и *Salmonella typhi* Н-901 ГДР/ГИСК соответственно, при посеве по одной бактериологической петле диаметром 2 мм через 20-24 ч инкубации при температуре  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ .

Образование индола и сероводорода обнаруживается визуально по изменению цвета индикаторных бумажек. При положительной реакции на индол бумажки, пропитанные модифицированным реактивом Эрлиха (парадиметиламинобензальдегид – 4 г; спирт этиловый – 50 мл; кислота ортофосфорная – 10 мл), или система индикаторных бумажек для идентификации микроорганизмов (СИБ зарегистрированный в РФ), окрашиваются в розовый цвет, а при положительной реакции на сероводород бумажки, пропитанные реактивом для индикации сероводорода (вода дистиллированная – 100 мл; свинец уксуснокислый – 20,0 г; натрий углекислый – 1,0 г), окрашиваются в черный цвет.

### **2.3. Конструирование положительного образца**

Положительный контрольный образец получали встраиванием участка генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* в вектор рAL-TA («Евроген», Москва) с последующей трансформацией и наработкой плазмиды в клетках *E.coli* XL1-Blue.

## **2.4. Выделение бактериальной ДНК из выросших колоний**

Для выделения тотальной ДНК микроорганизмов использовали ионообменную смолу Chelex100, приготовленную с использованием следующих реагентов: Triton X-100 (1%), Tween-20 (1%), Chelex 100, TRIS-HCl (pH 9,1, 100 mM), крезоловый красный, ddH<sub>2</sub>O. Для этого растворить 0,5 г Chelex 100, 5 мл TRIS-HCl и 0,5 мл Triton X-100 в 50 мл в ddH<sub>2</sub>O. Добавляли щепотку красителя крезоловый красный и перемешивали до полного растворения. Готовый реактив постоянно ресуспендировали для растворения частичек, осевших на дно. Реагент хранили при температуре +4°C.

Ход работы:

1. Подготовили и расставили в штативе пробирки с отобранными бактериальными колониями, необходимое количество одноразовых стерильных пробирок типа Eppendorf объемом 1,5 мл, промаркировали.

2. В каждую пробирку с колониями одним наконечником добавляли по 200 мкл реактива. Использовали синие наконечники с фильтром. При окрашивании фильтра наконечник меняли.

3. Тщательно ресуспендировали пробирки на вортексе и затем помещали в термостат с температурой 95°C на 10 минут. После окончания инкубации повторно перемешивали содержимое пробирок на вортексе.

4. Центрифугировали пробирки при 12 тыс об/мин в течение 5 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержала очищенную ДНК, готовую к постановке ПЦР.

В дальнейшем полученную ДНК использовали в качестве матрицы для амплификации нужного участка гена 16S рРНК, выявляемого методом ПЦР.

## **2.5. Проведение стандартной полимеразной цепной реакции (ПЦР)**

Амплификацию участков ДНК осуществляли с использованием стандартных наборов на амплификаторе «Терцик МС-2», «ДНК-технология», г. Москва.

Ход работы:

1. Расположили в штативе буфер Таq-полимеразы, dNTP, растворы праймеров для разморозки, затем ресуспендировали на вортексе. Таq-полимеразу необходимо хранить в морозильнике, избегать долгого нахождения на рабочем месте без холодного штатива.

2. Отобрали пинцетом необходимое количество одноразовых стерильных полипропиленовых пробирок объемом 0,6 мл, промаркировали и расставили в штатив соответствующим образом.

3. Приготовили амплификационную смесь для общего количества анализируемых проб в пробирке на 1,5 мл и разлили по 22 мкл в каждую пробирку для амплификации на 0,6 мл.

Состав реакционной смеси для 1 пробирки: 2,5 мкл 10× Таq – буфера, 2,5 мкл раствора dNTP, по 1 мкл каждого праймера (10 праймеров по 1 о.е.), 0,5 мкл Таq-полимеразы, 14,5 мкл mQ

4. В каждую пробирку внесли по 3 мкл ДНК исследуемого образца, используя для каждой пробы отдельный наконечник с фильтром.

5. Во избежание испарения жидкости на поверхность каждой реакционной смеси наслаивали 1 каплю минерального масла.

6. Пробирки закрывали, центрифугировали 5 с при 3000 об/мин на микроцентрифуге-вортекс.

7. Переносили пробирки в прогретый до 94°C амплификатор.

8. На ДНК-амплификаторе запускали необходимую программу со следующими параметрами:

	Температура	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95 °C	1 мин	1
Денатурация	95 °C	30 сек	30
Отжиг	60 °C	40 сек	
Элонгация	72 °C	20 сек	
Финальное удлинение	72 °C	2 мин	1
Хранение	10 °C	пауза	

## 2.6. Электрофоретическая детекция продуктов амплификации

Электрофоретический анализ продуктов ПЦР в агарозном геле осуществляли с использованием стандартных наборов на сертифицированном оборудовании (Биоком, г. Москва) в 1,7% горизонтальном агарозном геле. Детекцию результатов проводили путем окрашивания агарозного геля бромистым этидием с последующей визуализацией при освещении УФ на трансиллюминаторе «УВТ-1» (Биоком, Россия). Документирование результатов проводили с использованием цифровой видеокамеры «Mintron» и программы «Biotest-D» (Биоком, Россия).

Агарозный гель-электрофорез проводили по следующей схеме:

1. Приготовили 1 л 2х-ного ТАЕ буфера путем разбавления 50х-ного ТАЕ буфера в дистиллированной воде. К 20 мл 50х-ного ТАЕ буфера добавить 980 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешали.

2. Взвесили 1,7 г агарозы и добавили 2 мл 50х-ного ТАЕ буфера, перемешали и расплавили смесь в микроволновой печи в течение 2-3 минут, периодически помешивая. Необходимо доводить до кипения, но не допускать кипения более 10 секунд. Смесь в колбе должна стать прозрачного цвета.

3. Разливали агарозу на ровной поверхности в специальную форму (заливка) с одной или двумя пластиковыми гребенками, при этом толщина геля была не менее 2 мм и не более 5 мм. Гель полностью застывает и может быть использован после 15-20 минут.

4. Наливали в камеру для электрофореза необходимое количество 2х-ного ТАЕ буфера и помещали в него застывший гель. Буфер должен полностью покрывать гель сверху на 2-10 мм.

5. Медленно наносили автоматической пипеткой пробу ДНК с красителем в лунку геля в последовательности, соответствующей нумерации проб. Благодаря глицерину раствор ДНК не всплывает из лунки.

6. Наносили автоматической пипеткой отрицательный контроль и маркерную лестницу в отдельные лунки.

7. Подключали клеммы прибора к источнику питания так, чтобы (-) находился на старте, а (+) – на финише.

8. Запускали электрофорез при помощи источника питания (Эльф-4, ДНК-Технология) при следующих параметрах: сила тока 400 мА, мощность 80Вт, напряжение 120 В. На старте пузырей должно быть больше, чем на финише. Контроль за электрофоретическим разделением осуществляется визуально по движению полосы красителя.

9. Электрофорез проводили в течение 20-50 минут, затем вынимали гель из формы и помещали в кювету для окрашивания. Наливали в кювету слабый раствор бромистого этидия и окрашивали в течение 5-7 мин.

10. Сливали краситель в колбу и промывали гель проточной водой. Затем помещали его на стекло УФ-трансиллюминатора. Включали трансиллюминатор и анализировали результаты анализа. Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся оранжево-красных полос при облучении УФ-излучением с длиной волны 310 нм.

## 2.7. Проведение ПЦР в режиме реального времени (РТ-ПЦР)

Для постановки ПЦР в режиме реального времени использовали пары видоспецифичных праймеров к фрагментам ДНК исследуемых микроорганизмов (таблица 1) и 2,5х-ную реакционную смесь в присутствии SYBR Green I (ООО «СИНТОЛ»), согласно инструкции производителя).

Таблица 1 - Праймеры для детекции генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa*

Объект	Название праймера	5'-3' последовательность	Темп. отжига	Ожидаемый размер продукта (п.н.)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ps.aer F_Pr1	F: agaaagtgggggatcttcggacctca	55°C	270
	Ps.aer R_Pr2	R: tgttggtaacgtcaaacagcaaggtattaactt		

ПЦР проводили с помощью детектирующего амплификатора CFX96 Touch "REAL TIME" (Bio-Rad, США). Учет результатов проводили с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager. Реакцию амплификации проводили в 25 мкл смеси, содержащей 10 мкл 2,5х реакционной смеси ПЦР-Микс SYBR Green I, 8 мкл ddH<sub>2</sub>O, 2 мкл каждого из пары праймеров и 3 мкл тотальной ДНК.

Ход работы:

1. Подготовили и расставили в штативе пробирки с тотальной ДНК, выделенной из бактериальных культур, 2,5х-ную реакционную смесь в присутствии SYBR Green I, mQ, растворы праймеров для разморозки; ресуспендировать на вортексе.

2. Отобрали пинцетом необходимое количество одноразовых стерильных полипропиленовых пробирок объемом 0,2 мл и расставили в штатив соответствующим образом.

3. В подготовленные одноразовые стерильные полипропиленовые пробирки внесли по 8 мкл mQ, после чего внесли по 10 мкл 2,5х-ной реакционной смеси, используя наконечники без фильтра.

4. Добавили в каждую пробирку по 2 мкл растворов праймеров, предварительно разведенных до 1 о.е.

5. В каждую пробирку внесли по 3 мкл ДНК исследуемого образца, используя для каждой пробы отдельный наконечник с фильтром.

6. Пробирки плотно закрыли, перемешали содержимое встряхиванием, затем перенесли пробирки в амплификатор и расставили соответствующим образом.

7. На приборе создавали эксперимент с соответствующими параметрами плашки: размер, тип, режим сканирования, флуорофор, названия проб; указать объем реакционной смеси в одной пробирке. Затем запускали программу со следующими параметрами:

	Температура	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95 °C	1 мин	1
Денатурация	95 °C	15 сек	40
Отжиг	55 °C	30 сек	
Элонгация	72 °C	40 сек	

Достраивание цепей ДНК	72 °С	30 сек	1
------------------------	-------	--------	---

8. По окончании амплификации по показателю индикаторного цикла рассчитывали количество ДНК исследуемого инфекционного агента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

### 3.1. Конструирование калибратора для количественной оценки содержания *Pseudomonas aeruginosa*

Калибровочный образец конструировали с использованием в качестве ДНК-матрицы плазмиду рAL-TA (3,0 т.п.н.) со вставкой участка гена 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* (270 п.н.), в результате чего была получена плазида рAL-TAPseudAer16S (рисунок 3). Клонирование проводили по Маниатис Т. и соавт. (Maniatis et al., 1984).

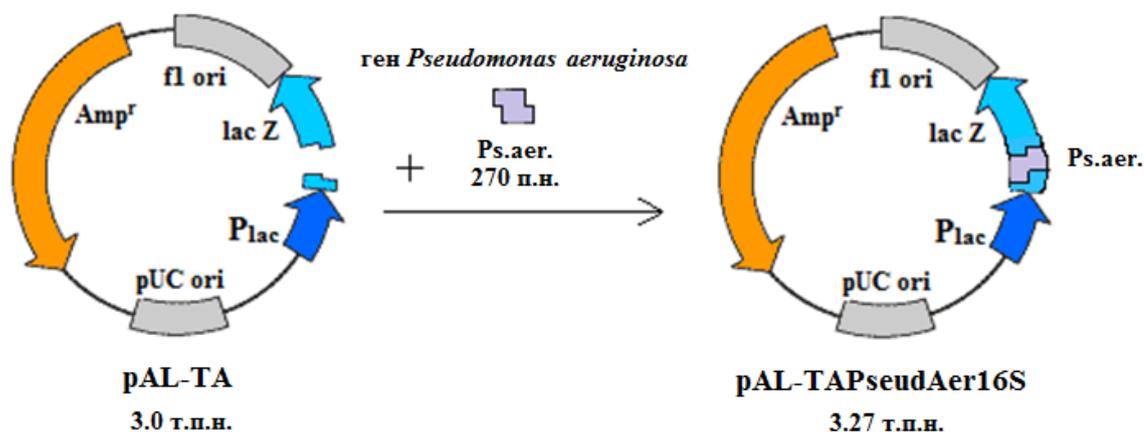


Рисунок 3 - Схема конструирования калибровочного образца рAL-TAPseudAer16S.

Выделенная с использованием лизирующего раствора, входящего в комплект набора реагентов для выделения ДНК из клинического материала (АО «Вектор-Бест»), тотальная ДНК использовалась в качестве матрицы для проведения классической ПЦР с целью накопления участка гена 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* (270 п.н.). Амплификацию проводили на термоциклере Терцик МС-2 («ДНК-Технология», Россия) с использованием пары видоспецифичных праймеров к выбранному участку следующей структуры:

5' agaaagtgggggatcttcggacctca 3'

5' tgttgtaacgtcaaaacagcaaggtattaactt 3'.

Выделение искомого амплифицированного участка из реакционной смеси проводили с применением набора для очистки ДНК («Цитокин», Санкт-Петербург).

1. Добавили равный объем связывающего буфера, тщательно перемешали и инкубировали 5 минут при 60°C.
2. Поместили спин-колонку в собирательную пробирку. Перенесли раствор в спин-колонку и оставили на 2 мин при комнатной температуре.
3. Центрифугировали на полной скорости (~10 000 g) 1 мин. В процессе центрифугирования жидкость из колонки перемещается в собирательную пробирку, а ДНК сорбируется на силиконовом носителе колонки.
4. Удаляли жидкость из собирательной пробирки и добавляли 500 мкл отмывочного буфера в спин-колонку. Центрифугировали 15 секунд.
5. Повторяли шаг 4.
6. Удаляли жидкость из собирательной пробирки и центрифугировали 1 мин для полного удаления отмывочного раствора из спин-колонки.
7. Переносили спин-колонку в новую микроцентрифужную пробирку с отрезанной крышкой.
8. Добавили 30-50 мкл буфера для элюции, помещая буфер непосредственно в центр мембраны спин-колонки. Инкубировали 2 минуты при комнатной температуре. Центрифугировали 30 секунд.
9. Переносили ДНК в новую пробирку. Хранили при -20°C.

Полученный фрагмент клонировали с использованием векторной плазмиды pAL-TA. Для этого в стерильной микроцентрифужной пробирке готовили реакционную смесь для лигирования, включающую ДНК вектор и клонируемый фрагмент в эквимольном соотношении, NEB-буфер CutSmart для лигирования (1X раствор: 50 mM ацетат K, 20 mM трис-ацетат, 10 mM ацетат Mg, 100 мкг/мл БСА, pH 7.9 при 25°C) и ДНК - лигазу фага T4 (конечная концентрация - 400000 е.а./мл) («New England Biolabs», США). Реакцию проводили при 4-10°C в течение ночи.

Затем получали компетентные клетки *Escherichia coli* XL1 - Blue путем их инкубации при низкой температуре в растворе, содержащем катионы  $\text{Ca}^{2+}$ . Чтобы повысить уровень трансформации помимо  $\text{CaCl}_2$  в раствор добавляли различные вещества. Приобретшие компетентность «кальциевые клетки» использовали сразу. Все работы с компетентными клетками проводили на холоде, используя поддоны с мелкоколотым льдом или снегом.

1. Рассевали бактерии штрихом на чашку с селективной агаризованной средой SOB (2% триптон; 0,5% дрожжевой экстракт; 10мМ NaCl; 2,5мМ KCl; 10мМ  $\text{MgCl}_2$ ; 10мМ  $\text{MgSO}_4$ ), выращивали при 37°C в течение ночи.
2. Несколько колоний *E.coli* (10–12) диаметром приблизительно 2–3 мм помещали в 40 мл среды SOB в колбе на 0,5–1 л. Выращивали при интенсивном встряхивании на качалке в течение 2–2,5 часов при скорости вращения 200–300 об/мин до оптической плотности  $\text{OD}_{600}=0,6$  при температуре 37°C. Все дальнейшие манипуляции проводили на льду.
3. В 50 мл центрифужную пробирку помещали 30 мл культуры клеток и оставляли при 0°C на 10–15 мин.
4. Центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин и удаляли супернатант.
5. Центрифугировали 20 с при 3000 об/мин и удаляли жидкость пипеткой.
6. Суспензировали в 10 мл буфера ТВ (10мМ HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфо-новая кислота); 15мМ  $\text{CaCl}_2$ ; 55мМ  $\text{MnCl}_2$ ; 250мМ KCl) и оставляли при 0°C на 10–15 мин.
7. Повторяли п. 4 и п. 5.
8. Ресуспензировали осадок клеток в 2 мл буфера ТВ и добавляли криопротектор ДМСО до 3,5% (70 мкл). Далее полученную смесь оставляли при 0°C на 10–15 мин.
9. Повторяли п. 4.

10. Ресуспензировали клетки в остатках жидкости и разливали по 100 мкл в охлажденные пробирки. Готовые компетентные клетки использовали сразу или замораживали в жидком азоте.

Затем проводили трансформацию *Escherichia coli* XL1-Blue с использованием очищенной плазмидной ДНК или «лигазной смеси».

1. Культуру выращивали в среде LB при 37°C до середины логарифмической фазы роста.
2. Клетки осаждали центрифугированием. Осадок ресуспендировали в 1/2 первоначального объема 10 mM раствора CaCl<sub>2</sub>, выдерживали 20 мин и после центрифугирования ресуспендировали в 1/50 первоначального объема 50 mM CaCl<sub>2</sub>.
3. Через 12-24 ч хранения при 2-4°C 0,2 мл суспензии клеток смешивали с 10 мкл лигированной смеси и инкубировали 30-60 мин на льду.
4. Трансформационную смесь переносили на 2 мин в водяную баню (42°C) (тепловой шок), добавляли к суспензии 1 мл среды LB, инкубировали 1 ч при 37°C, перемешивая каждые 15 минут.
5. Центрифугировали 30 сек при 14000 об/мин, отбирали 100 мкл трансформированных клеток и высевали на чашки с агаризованной средой LB, содержащей антибиотик ампициллин («Serva», ФРГ) в концентрации 100 мкг/мл, а также ИПТГ (конечная концентрация 200 мг/мл) и X-gal (конечная концентрация 20 мг/мл).
6. Чашки инкубировали в течение 16-20 часов в термостате при 37°C.

После инкубирования чашек Петри отбирали бесцветные колонии. Из 50 таких колоний выделяли плазмидные ДНК и, используя их в качестве матриц, проводили классическую ПЦР. Разделение продуктов амплификации осуществляли электрофоретически в 1,7%-ном горизонтальном агарозном геле («Sigma», США) с последующей визуализацией после окраски бромистым этидием ультрафиолетом в фотодокументационной системе. В качестве электролита для электрофореза применяли 50X трис-ацетатный электродный буфер (2 M Tris-base, pH = 8,0; 1,56 M уксусная кислота, pH 7,6; 50 mM ЭДТА, pH = 8,0).

Одну из «положительных» колоний пересевали на чашки с агаризованной средой LB, содержащей антибиотик ампициллин (конечная концентрация 100 мкг/мл) и помещали в термостат при 37°C на 2 дня для получения большего количества колоний. Бактериологической петлей забирали большую часть выросших колоний и переносили в пробирку типа Eppendorf (1,5 мл).

Щелочным методом (лизисом) выделяли плазмиду из бактериальных клеток, используя следующие буферы:

- 1) для разделения клеток – 1 М TRIS, 1 М ЭДТА, сахараза;
- 2) для лизиса клеток – 10% SDS, 5 М NaOH;
- 3) для нейтрализации примесей – 5 М ацетата калия, 1,56 М уксусная кислота.

Полученную плазмиду растворяли в 25 мкл mQ и проводили препаративный электрофорез (элюцию), смешивая 25 мкл плазмиды и 20 мкл смеси красителей (бромфеноловый синий, ксиленцианол, 30% глицерин).

После проведения элюции экстрагировали ДНК из вырезанных фрагментов агарозного геля, содержащих ДНК необходимой длины с помощью набора для очистки ДНК («Цитокин», Санкт-Петербург).

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

### **3.2. Определение величины минимальной подавляющей концентрации (МИК) исследуемых антибиотиков**

Основным параметром, характеризующим взаимоотношения между микробом и антимикробным препаратом, является величина минимальной ингибирующей концентрации препарата. МИК определяют как минимальную концентрацию, подавляющую видимый рост микроба. Именно поэтому следующим этапом было определение величины МИК исследуемых нами 5 антибактериальных препаратов (амикацин, гентамицин, пефлоксацин, цефтриаксон и ципрофлоксацин). Тестирование чувствительности *Pseudomonas aeruginosa* к перечисленным антибиотикам проводили методом серийных разведений в бульоне в соответствии с клиническими рекомендациями определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, принятыми Межрегиональной ассоциацией по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (2014 г.).

1. Приготовление инокулюма:

- 1) В стерильную пробирку добавляли 10 мл изотонического раствора NaCl (0,9%).
- 2) К раствору добавляли несколько колоний чистой 18-24-часовой культуры бактерий, выросшей на плотной неселективной питательной среде (концентрация инокулюма составила  $1,5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл, что соответствует 0,5 стандарту мутности по МакФарланду).
- 3) Концентрацию инокулюма доводили до  $1,5 \cdot 10^6$  КОЭ/мл путем добавления к концентрату 9,9 мл раствора NaCl (0,9%).

2. Приготовление двукратных разведений антибиотиков в питательном бульоне:

- 1) Приготовили необходимое количество стерильных пробирок для двукратных разведений каждого антибиотика. Таким образом, для гентамицина было приготовлено 15, для цефтриаксона – 15, амикацина – 14, пефлоксацина – 17 и для ципрофлоксацина – 12 пробирок с разведениями.
- 2) Во все пробирки добавляли по 500 мкл питательного бульона.

3) В первые пробирки каждого ряда антибиотиков добавляли по 500 мкл основного раствора антибиотика и производили серию двукратных разведений.

Таким образом, для каждого антибиотика был получен один ряд разведений с указанными в таблице концентрациями (таблица 2).

Таблица 2 – Концентрации антимикробных препаратов при последовательных двукратных разведениях

Антимикробный препарат	Исходная концентрация, мкг/мл	Концентрация в первой пробирке, мкг/мл	Концентрация в последней пробирке, мкг/мл
Амикацин	50000	25000	3,05
Гентамицин	40000	20000	1,22
Пефлоксацин	10000	40000	0,61
Цефтриаксон	10000	50000	3,05
Ципрофлоксацин	2000	1000	0,49

На следующем этапе эксперимента в стерильные пробирки типа Eppendorf добавляли 250 мкл готового разведения антимикробного препарата и 250 мкл инкулюма. Пробирки ставили инкубироваться в термостат на 18 часов при 37°C.

После инкубации проводили анализ полученных результатов с установлением МИК каждого из антибиотиков в отношении *P. aeruginosa* (штамм SS14 КС 866140). Таким образом, для амикацина, гентамицина, пефлоксацина, цефтриаксона и ципрофлоксацина МИК составили 3,05 мкг/мл, 1,22 мкг/мл, 2,4 мкг/мл, 6,1 мкг/мл и 0,61 мкг/мл соответственно.

### **3.3. Экспериментальная оценка сконструированного калибратора на антибактериальных препаратах**

Для определения антимикробной активности исследуемых антимикробных препаратов (амикацин, гентамицин, пефлоксацин, цефтриаксон и ципрофлоксацин) и экспериментальной оценки сконструированного калибратора, нами проводилось культивирование микроорганизма *Pseudomonas aeruginosa* в питательном бульоне в

присутствии антибиотика (в 9 различных концентрациях - от 256 до 1 мкг/мл) с целью получения данных об изменении концентрации микроорганизма после непродолжительного культивирования.

Перед началом работ концентрацию всех растворов антибиотиков выравняли до единого значения - 256 мкг/мл. Для этого разводили каждый антибиотик в стерильной воде. Разведения производили по формуле:

$$X=A*B/C,$$

где:

X – количество концентрированного раствора, которое необходимо взять для приготовления рабочего раствора;

A – необходимая концентрация;

B – количество раствора, которое нужно приготовить;

C – концентрация имеющегося раствора.

Данные значения для каждого антибиотика составили:

Антибактериальный препарат	X, мкл	A, мкг/мл	B, мл	C, мкг/мл
Гентамицин	9	256	1,4	40000
Цефтриаксон	3,5	256	1,4	10000
Амикацин	7	256	1,4	50000
Пефлоксацин	4,5	256	1,4	10000
Ципрофлоксацин	179	256	1,4	2000

Далее готовили двукратные серийные разведения каждого антибиотика:

1. В подготовленные 8 стерильных пробирок типа Eppendorf добавили 500 мкл стерильной воды.
2. Произвели последовательные двукратные разведения каждого антибиотика начиная с начального разведения. Таким образом получили следующие концентрации: 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 мкг/мл соответственно.

Инокулом чистой культуры *P. Aeruginosa* готовили по схеме:

1. В стерильную пробирку добавляли 10 мл изотонического раствора NaCl (0,9%).

2. К раствору добавляли несколько колоний чистой 18-24-часовой культуры бактерий, выросшей на плотной неселективной питательной среде (концентрация инокулюма составила  $1,5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл, что соответствует 0,5 стандарту мутности по МакФарланду).

Далее проводили непродолжительное культивирование *P. aeruginosa* в питательном бульоне и в 9 различных концентрациях антибиотиков. Для этого:

1. В заранее подготовленные стерильные пробирки типа Eppendorf вносили по 90 мкл питательного бульона.
2. В каждую пробирку добавляли по 10 мкл соответствующего разведения антибиотика (от 256 до 1 мкг/мл для каждого антибиотика).
3. В каждую пробирку добавляли по 5 мкл инокулюма *P. aeruginosa* ( $1,5 \cdot 10^8$  КОЭ/мл).
4. Далее перемешивали и помещали инкубироваться в термостат на 2 часа при 37°C.

По истечении 2 часов выделяли тотальную ДНК микроорганизмов из суспензий, прошедших культивирование, с использованием ионообменной смолы Chelex100.

1. Подготовили и расставили в штативе пробирки с отобранными бактериальными суспензиями, необходимое количество одноразовых стерильных пробирок типа Eppendorf объемом 1,5 мл, промаркировали.
2. В каждую пробирку с суспензиями одним наконечником добавляли по 200 мкл реактива. Использовали синие наконечники с фильтром. При окрашивании фильтра наконечник меняли.
3. Тщательно ресуспендировали пробирки на вортексе и затем помещали в термостат с температурой 95°C на 10 минут. После окончания инкубации повторно перемешивали содержимое пробирок на вортексе.

5. Центрифугировали пробирки при 12 тыс. об/мин в течение 5 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержала очищенную ДНК, готовую к постановке ПЦР.

В дальнейшем полученную ДНК использовали в качестве матрицы для амплификации нужного участка гена 16S рРНК, выявляемого методом ПЦР.

Для оптимизации проведения количественного ПЦР-анализа готовили десятикратные разведения плазмиды pAL-TAPseudAer16S (конечная концентрация  $2,5 \times 10^{10}$  копий ДНК/мл):

1. В 9 стерильных пробирок типа эппендорф добавляли 90 мкл mQ.
2. В первую пробирку закапывали 10 мкл плазмиды исходной концентрации ( $2,5 \times 10^{10}$  копий ДНК/мл) и производили последовательные десятикратные разведения.

Затем проводили количественную ПЦР в режиме реального времени. Для постановки РТ-ПЦР использовали пары видоспецифичных праймеров к фрагментам ДНК *Pseudomonas aeruginosa* и 2,5х-ную реакционную смесь в присутствии SYBR Green I (ООО «СИНТОЛ»), согласно инструкции производителя).

РТ-ПЦР проводили с помощью детектирующего амплификатора CFX96 Touch "REAL TIME" (Bio-Rad, США). Учет результатов проводили с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager. Реакцию амплификации проводили в 25 мкл смеси, содержащей 10 мкл 2,5х реакционной смеси ПЦР-Микс SYBR Green I, 8 мкл ddH<sub>2</sub>O, 2 мкл каждого из пары праймеров и 3 мкл тотальной ДНК.

1. Подготовили и расставили в штативе пробирки с тотальной ДНК, выделенной из бактериальных культур, 2,5х-ную реакционную смесь в присутствии SYBR Green I, mQ, растворы праймеров для разморозки; ресуспендировали на вортексе.
2. Отобрали пинцетом необходимое количество одноразовых стерильных полипропиленовых пробирок объемом 0,2 мл и расставили в штатив соответствующим образом.

3. В подготовленные одноразовые стерильные полипропиленовые пробирки внесли по 8 мкл mQ, после чего добавили по 10 мкл 2,5х-ной реакционной смеси, используя наконечники без фильтра.
4. Добавили в каждую пробирку по 2 мкл растворов праймеров, предварительно разведенных до 1 о.е.
5. В каждую пробирку внесли по 3 мкл ДНК исследуемого образца, используя для каждой пробы отдельный наконечник с фильтром.
6. Пробирки плотно закрыли, перемешали содержимое встряхиванием, затем перенесли пробирки в амплификатор и расставили соответствующим образом.
7. На приборе создавали эксперимент с соответствующими параметрами плашки: размер, тип, режим сканирования, флуорофор, названия проб; указывали объем реакционной смеси в одной пробирке. Затем запускали программу со следующими параметрами:

	Температура	Время	Кол-во циклов
Начальная денатурация	95 °С	1 мин	1
Денатурация	95 °С	15 сек	40
Отжиг	55 °С	30 сек	
Элонгация	72 °С	40 сек	
Достраивание цепей ДНК	72 °С	30 сек	1

По окончании амплификации по показателю порогового цикла рассчитывали количество ДНК *Pseudomonas aeruginosa* по формуле:

$$X_o = X_{or} \times (1+E)^{Ct_{or} - Ct_o},$$

где:

$X_o$  – концентрация матриц исследуемого образца (ГЭ/образец);

$X_{or}$  – стандартная начальная концентрация (копий ДНК/мл);

$E$  – эффективность РТ-ПЦР;

$Ct_{or}$  – пороговый цикл для стандартного образца;

$Ct_o$  – пороговый цикл для исследуемого образца.

### **3.4. Результаты молекулярно-генетической оценки антимикробной активности исследуемых препаратов**

Проведение количественной ПЦР в режиме реального времени позволило рассчитать средние значения концентраций ДНК *Pseudomonas aeruginosa* после культивирования в питательной среде в присутствии антибиотика, что дало возможность оценить антимикробную активности исследуемых препаратов. Расчет производили по формуле:

$$X_o = X_{or} \times (1+E)^{Ct_{or} - Ct_o},$$

где:

$X_o$  – концентрация матриц исследуемого образца (ГЭ/образец);

$X_{or}$  – стандартная начальная концентрация (копий ДНК/мл);

$E$  – эффективность РТ-ПЦР;

$Ct_{or}$  – пороговый цикл для стандартного образца;

$Ct_o$  – пороговый цикл для исследуемого образца.

Результаты расчетов для каждого антибиотика представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Абсолютное количество ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в растворе антибиотика после непродолжительного культивирования (ГЭ/образец)

Антибактериальные препараты	Рабочие разведения антибактериальных препаратов								
	256,0 мкг/мл	128,0 мкг/мл	64,0 мкг/мл	32,0 мкг/мл	16,0 мкг/мл	8,0 мкг/мл	4,0 мкг/мл	2,0 мкг/мл	1,0 мкг/мл
Амикацин	$1,3 \times 10^7$	$7,75 \times 10^6$	$9,38 \times 10^6$	$1,28 \times 10^7$	$1,01 \times 10^7$	$1,57 \times 10^7$	$1,17 \times 10^7$	<b><math>2,24 \times 10^7</math></b>	$2,31 \times 10^7$
Гентамицин	$8,9 \times 10^6$	$16,5 \times 10^6$	$14,3 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$1,35 \times 10^7$	$1,86 \times 10^7$	$1,67 \times 10^7$	<b><math>4,71 \times 10^7</math></b>	$3,09 \times 10^7$
Пефлоксацин	$8,53 \times 10^6$	$9,33 \times 10^6$	$1,38 \times 10^7$	$1,70 \times 10^7$	$2,30 \times 10^7$	$3,03 \times 10^7$	$1,79 \times 10^7$	<b><math>1,0 \times 10^7</math></b>	$3,43 \times 10^7$
Цефтриаксон	$2,93 \times 10^7$	$4,58 \times 10^6$	$2,27 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$2,09 \times 10^7$	$2,89 \times 10^7$	<b><math>1,91 \times 10^7</math></b>	$4,05 \times 10^7$	$3,22 \times 10^7$
Ципрофлоксацин	$4,2 \times 10^6$	$7,35 \times 10^6$	$7,6 \times 10^6$	$7,98 \times 10^6$	$9,25 \times 10^6$	$9,38 \times 10^6$	$1,72 \times 10^7$	<b><math>1,34 \times 10^7</math></b>	$2,72 \times 10^7$

Молекулярно-генетические исследования антимикробной активности рабочих растворов амикацина, гентамицина, пefлоксацина, цефтриаксона, цiproфлоксацина с различными концентрациями (от 256,0 до 1,0 мкг/мл) показали, что антибиотики действительно являются эффективными в отношении аэробных неферментирующих грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, в том числе и в отношении выбранного для эксперимента и исследования штамма *Pseudomonas aeruginosa* (штамм SS14 КС 866140).

Результаты количественной оценки антимикробной активности амикацина позволили сделать вывод о том, что рост бактерий наиболее сильно подавляли следующие концентрации амикацина: 256 мкг/мл, 128 мкг/мл, 64 мкг/мл, 32 мкг/мл, 16 мкг/мл, 8 мкг/мл, 4 мкг/мл и 2 мкг/мл. При этом абсолютное количество ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в растворе антибиотика после непродолжительного культивирования для рабочих растворов антибиотика с данными концентрациями составило  $1,3 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $7,75 \times 10^6$  ГЭ/образец,  $9,38 \times 10^6$  ГЭ/образец,  $1,28 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $1,01 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $1,57 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $1,17 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $2,24 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $2,31 \times 10^7$  ГЭ/образец соответственно.

Ниже представлены графики амплификации, описывающие данные результаты (рисунок 4-6).

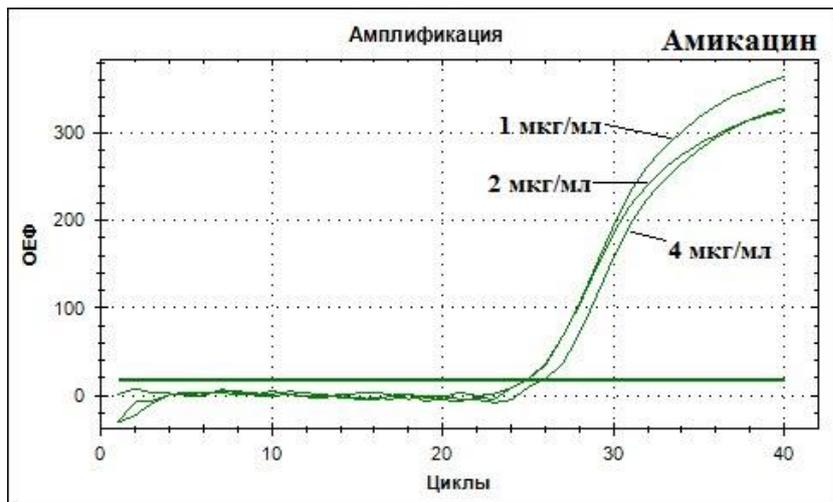


Рисунок 4 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования микроорганизма в рабочих растворах амикацина

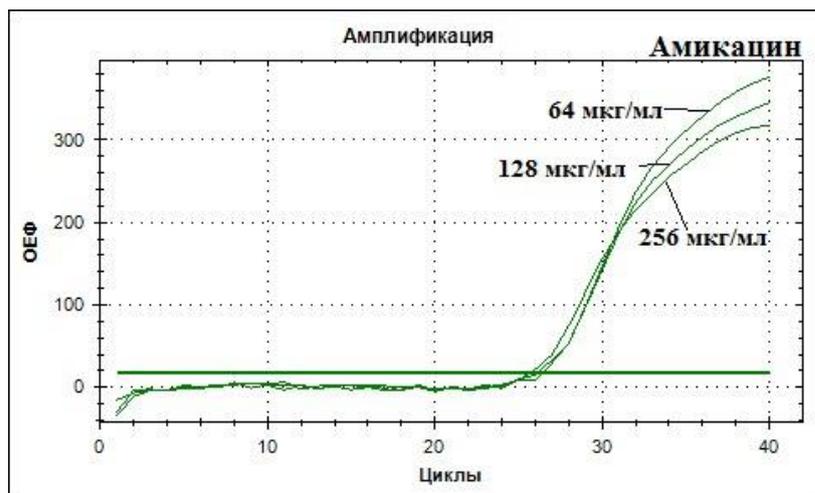


Рисунок 5 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования микроорганизма в рабочих растворах амикацина

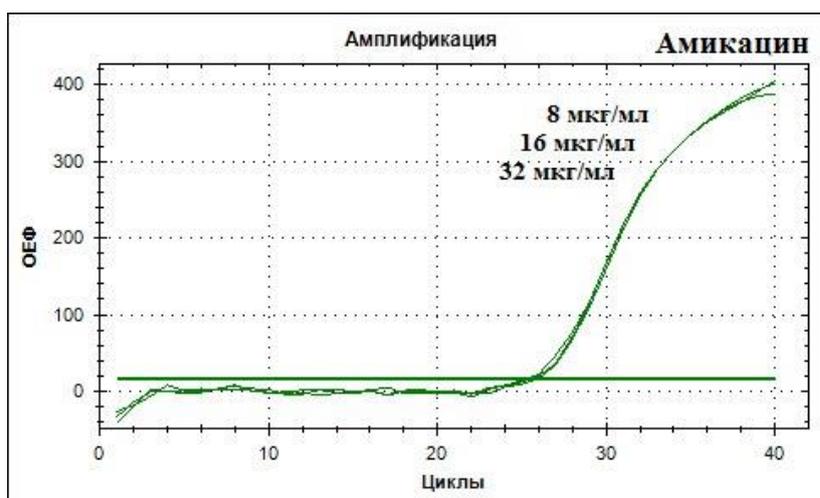


Рисунок 6 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования микроорганизма в рабочих растворах амикацина

Минимальная подавляющая концентрация для гентамицина составила 2 мкг/мл, что совпадает с результатами, полученными при оценке антимикробной активности амикацина. Однако стоит отметить, что абсолютное количество ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в растворе гентамицина после непродолжительного культивирования оказалось больше в сравнении с амикацином и составило  $8,9 \times 10^6$  ГЭ/образец,  $16,5 \times 10^6$  ГЭ/образец,  $14,3 \times 10^6$  ГЭ/образец,  $1,3 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $1,35 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $1,86 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $1,67 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $4,71 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $3,09 \times 10^7$  ГЭ/образец для рабочих растворов гентамицина с концентрацией 256 мкг/мл, 128 мкг/мл, 64 мкг/мл, 32 мкг/мл, 16 мкг/мл, 8 мкг/мл, 4 мкг/мл, 2 мкг/мл, 1 мкг/мл соответственно (рисунок 7-9).

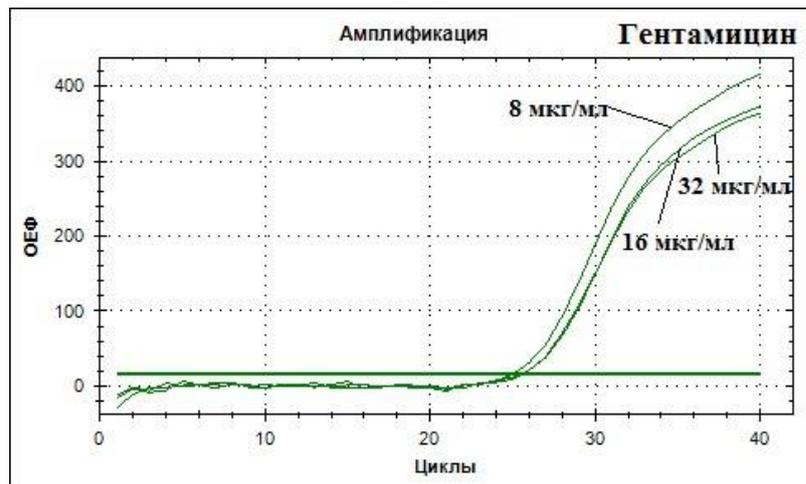


Рисунок 7 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования микроорганизма в рабочих растворах гентамицина

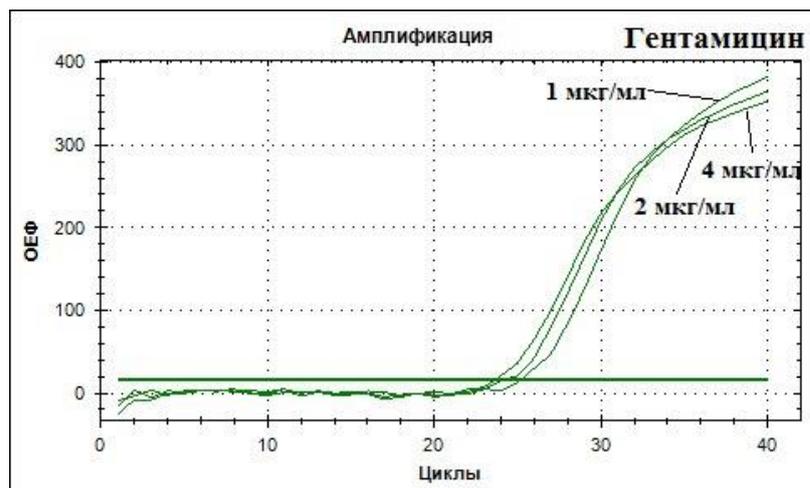


Рисунок 8 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования микроорганизма в рабочих растворах гентамицина

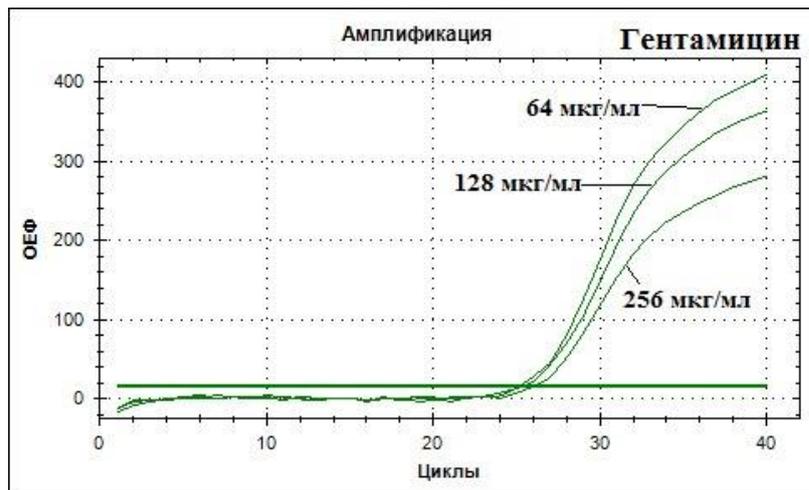


Рисунок 9 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования микроорганизма в рабочих растворах гентамицина

Пефлоксацин в равной степени проявлял высокую активность в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, как и указанные раньше антибактериальные препараты. Минимальная подавляющая концентрация составила 2 мкг/мл. При этом абсолютное количество ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в растворе антибиотика после непродолжительного культивирования оказалось в разы больше, чем после амикацина и гентамицина и составило  $8,53 \times 10^6$  ГЭ/образец,  $9,33 \times 10^6$  ГЭ/образец,  $1,38 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $1,70 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $2,30 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $3,03 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $1,79 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $1,0 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $3,43 \times 10^7$  ГЭ/образец для рабочих растворов антибиотика с концентрацией 256 мкг/мл, 128 мкг/мл, 64 мкг/мл, 32 мкг/мл, 16 мкг/мл, 8 мкг/мл, 4 мкг/мл, 2 мкг/мл, 1 мкг/мл соответственно. Ниже представлены графики амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* (рисунок 10-12).

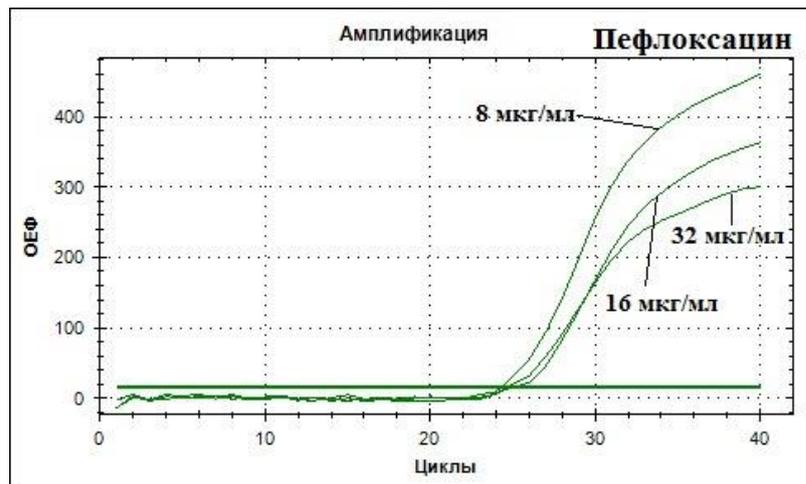


Рисунок 10 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования микроорганизма в рабочих растворах пefлоксацина

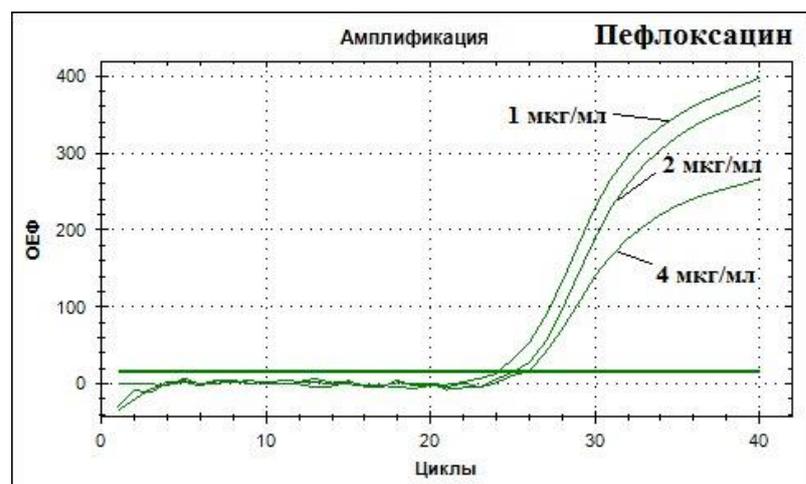


Рисунок 11 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования микроорганизма в рабочих растворах пefлоксацина

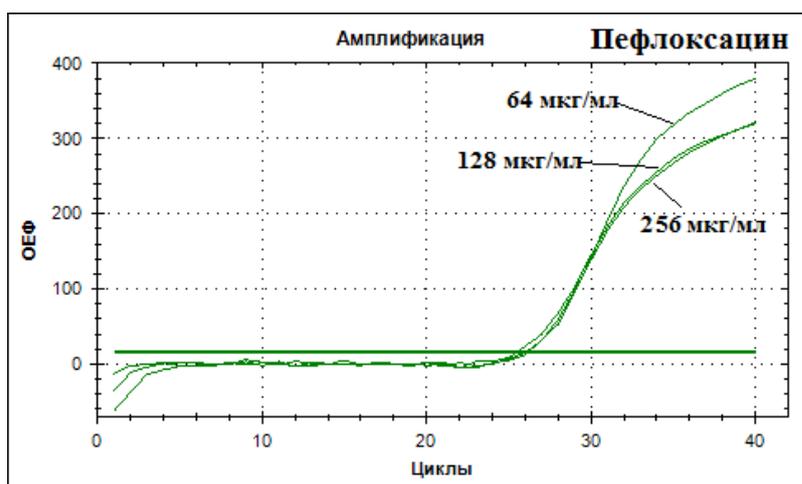


Рисунок 12 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования микроорганизма в рабочих растворах пefлоксацина

Цефтриаксон оказался наименее эффективен в отношении *Pseudomonas aeruginosa*. Минимальная подавляющая концентрация для данного антибиотика составила 4 мкг/мл, что в разы превышает значения всех исследуемых препаратов. Однако абсолютное количество ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в растворе антибиотика после непродолжительного культивирования для рабочих растворов антибиотика с концентрацией от 256 мкг/мл до 4 мкг/мл в среднем оставалось на одном и том же уровне, что и для амикацина, гентамицина и пefлоксацина. Числовые показатели концентраций для рабочих растворов антибиотика с концентрациями 256 мкг/мл, 128 мкг/мл, 64 мкг/мл, 32 мкг/мл, 16 мкг/мл, 8 мкг/мл, 4 мкг/мл, 2 мкг/мл, 1 мкг/мл составили  $2,93 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $4,58 \times 10^6$  ГЭ/образец,  $2,27 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $1,9 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $2,09 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $2,89 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $1,91 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $4,05 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $3,22 \times 10^7$  ГЭ/образец соответственно. Ниже представлены графики амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* (рисунок 13-15).

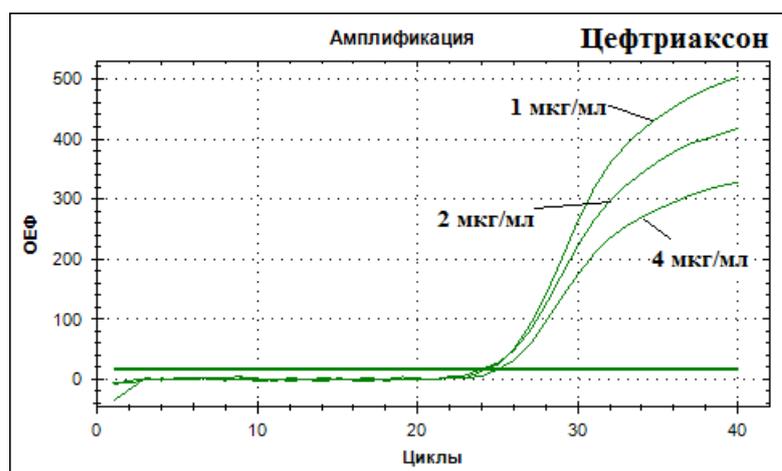


Рисунок 13 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования микроорганизма в рабочих растворах цефтриаксона

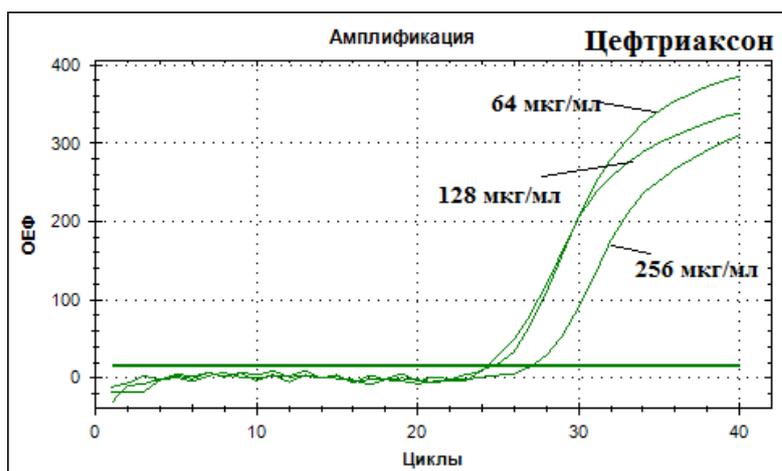


Рисунок 14 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования микроорганизма в рабочих растворах цефтриаксона

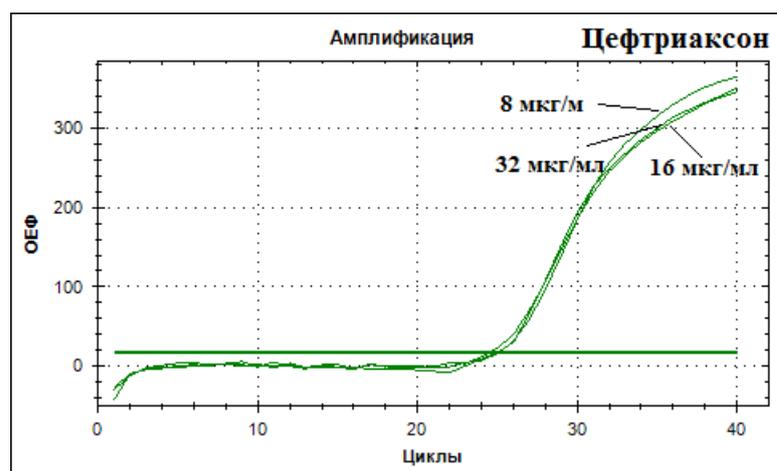


Рисунок 15 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования микроорганизма в рабочих растворах цефтриаксона

Наиболее эффективным из 5 исследуемых антибактериальных препаратов оказался ципрофлоксацин. Значения абсолютного количества ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в растворе антибиотика после непродолжительного культивирования для рабочих растворов антибиотика с концентрациями 256 мкг/мл, 128 мкг/мл, 64 мкг/мл, 32 мкг/мл, 16 мкг/мл, 8 мкг/мл, 4 мкг/мл, 2 мкг/мл, 1 мкг/мл составили  $4,2 \times 10^6$  ГЭ/образец,  $7,35 \times 10^6$  ГЭ/образец,  $7,6 \times 10^6$  ГЭ/образец,  $7,98 \times 10^6$  ГЭ/образец,  $9,25 \times 10^6$  ГЭ/образец,  $9,38 \times 10^6$  ГЭ/образец,  $1,72 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $1,34 \times 10^7$  ГЭ/образец,  $2,72 \times 10^7$  ГЭ/образец соответственно. Полученные значения оказались наименьшими по сравнению с амикацином, гентамицином, пefфлоксацином и цефтриаксоном. Минимальная подавляющая концентрация для данного антибиотика составила 2 мкг/мл.

Ниже представлены графики амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* (рисунок 16-18).

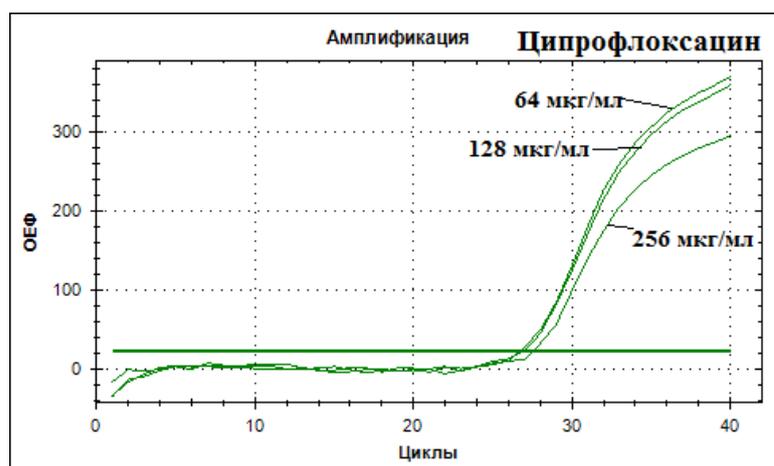


Рисунок 16 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования микроорганизма в рабочих растворах ципрофлоксацина

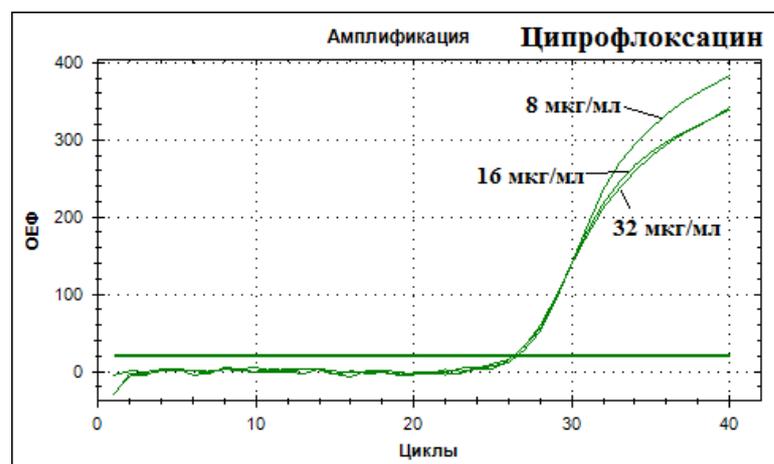


Рисунок 17 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования микроорганизма в рабочих растворах ципрофлоксацина

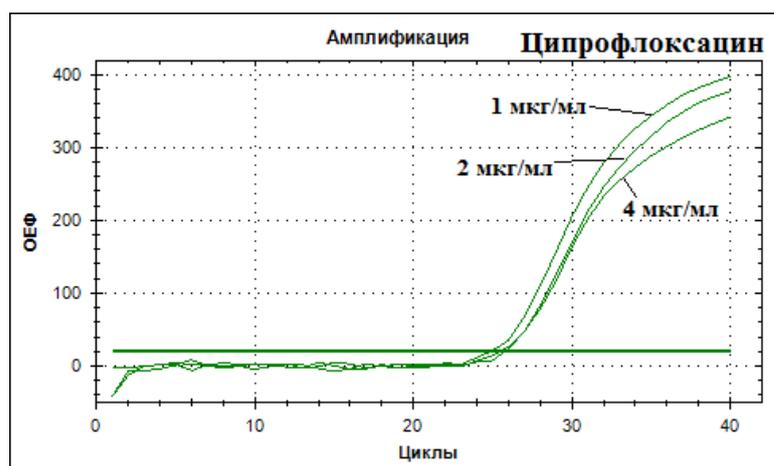


Рисунок 18 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования микроорганизма в рабочих растворах ципрофлоксацина

## ВЫВОДЫ

1. Путем встраивания участка гена 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* в плазмиду рAL-ТА был сконструирован калибровочный образец рAL-ТАPseudAer16S с конечной концентрацией  $2,5 \cdot 10^{10}$  копий ДНК/мл.

2. Калибровочный образец рAL-ТАPseudAer16S для количественного определения ДНК *Pseudomonas aeruginosa* позволяет оценивать антимикробную активность, а также определять минимальные ингибирующие концентрации антибактериальных препаратов в отношении штаммов *Pseudomonas aeruginosa*.

3. В ходе экспериментальной оценки сконструированного калибратора рAL-ТАPseudAer16S были протестированы антибактериальные препараты амикацин, гентамицин, пефлоксацин, цiproфлоксацин и цефтриаксон по разработанной методике непродолжительного культивирования в различных разведениях антибиотиков.

4. В результате исследования антибактериальной активности препаратов амикацина, гентамицина, пефлоксацина, цiproфлоксацина и цефтриаксона в отношении штамма *Pseudomonas aeruginosa* наиболее высокую активность проявлял антибиотик цiproфлоксацин (МИК=0,61 мкг/мл).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arhin A., Boucher C. The outer membrane protein OprQ and adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human fibronectin. *Microbiology*. 2010; 156(5): 1415-1423.
2. Azghani A.O., Idell S., Bains M., Hancock R.E. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. *Microbial pathogenesis*. 2002; 33(3): 109-114.
3. Bryan C.S., Reynolds K.L., Brenner E.R. Analysis of 1, 186 episodes of gram-negative bacteremia in non-university hospitals: the effects of antimicrobial therapy. *Rev. Infect. Dis*. 1983; 5 (4): 629-638.
4. Caballero A.R., Moreau J.M., Engel L.S., Marquart M.E., Hill J.M., O'Callaghan R.J. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases. *Annal Biochem*. 2001; 290: 330-337.
5. Chandy M., Bhattacharya S. The problem of multi-drug resistant Gram-negative Infections among Cancer patients in Eastern India. Book of Abstracts the 11th Indo-Australian Biotechnology conference on innovation in the immunology of infection, cancer and autoimmune diseases and vaccines. 2015; 39.
6. Cigana C., Curcurù L., Leone M.R., Ieranò T., Lorè N.I., Bianconi I., et al. *Pseudomonas aeruginosa* exploits lipid A and muropeptides modification as a strategy to lower innate immunity during cystic fibrosis lung infection. *PloS one*. 2009; 4(12): 8439.
7. Cornelis P., Dingemans J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front Cell Infect Microbiol* 2013; 3(7):1-7.
8. Fata M., Shirin G., Bernd H. A., *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence, *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7: 19-39.

9. Gilboa-Garber N., Avichezer D., Garber N.C. Bacterial lectins: properties, structure, effects, function and applications. In book: Glycosciences: Status and Perspectives. 2008; 369–396.
10. Giltner C.L., Van Schaik E.J., Audette G.F., et al. The *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces. *Molecular microbiology*. 2006; 59(4): 1083-1096.
11. Heiniger R.W., Winther-Larsen H.C., Pickles R.J., Koomey M., Wolfgang M.C. Infection of human mucosal tissue by *Pseudomonas aeruginosa* requires sequential and mutually dependent virulence factors and a novel pilus-associated adhesion. *Cellular Microbiol*. 2010; 12(8): 1158-1173.
12. Jakobsen T.H., Bjarnsholt T., Jensen P.O., Givskov M., Hoiby N. Targeting quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: current and emerging inhibitors. *Future microbiology*. 2013; 8(7): 901-921.
13. Jimenez P.N., Koch G., Thompson J.A., Xavier K.B., Cool R.H., Quax W.J. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2012; 76(1): 46-65.
14. Kramer A., Schwebke I., Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis*. 2006; 6: 118-130.
15. Kumar A., Ellis P, Arabi Y., Roberts D., Light B., Parrillo J.E., Dodek P., Wood G., Kumar A., Simon D., Peters C., Ahsan M., Chateau D. Cooperative Antimicrobial Therapy of Septic Shock Database Research Group. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest*. 2009; 136(5): 1237–1248.
16. Liu W., Saint D. A. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem*. 2002; 302: 52-59.
17. Liu W., Saint D. A., Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2002; 294: 347-353.

18. Martin E., Sanjay B., Bärbel C., Jürgen G., Peter G. B., Philippe H., Peter H., Carola I., Axel K., Elaine L., Wolfgang M., Martin M., Peter O., Birgit R., Manfred R., Ricarda M. S., Hans-Günther S., Matthias T. Antibiotic resistance: What is so special about multidrug – resistant Gram – negative bacteria, *GMS Hyg Infect Control*. 2017; 12: 37-45.
19. Marin H. K., Yoav G., Scott T. M., Andrew F. S., Marcos I. R., Appraising Contemporary Strategies to Combat Multidrug Resistant Gram-Negative Bacterial Infections—Proceedings and Data From the Gram-Negative Resistance Summit, *Clin Infect Dis*. 2011; 53(2): 33–55.
20. Morlon-Guyot J., Mere J., Bonhoure A., Beaumelle B. Processing of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A is dispensable for cell intoxication. *Infection and immunity*. 2009; 77(7): 3090-3099.
21. Nayeb F. D., Mohammad A., Abbas R. F., Fereshteh F., Survey of Communicable Diseases Surveillance System in Hospitals of Iran: A Qualitative Approach. *Glob J Health Sci*. 2016; 8(9): 44–57.
22. Pawan K., Satyabrata B., Tarini S. G., Prasanta D., Mayanka D., Bipasa S., Jyoti V., Archana P., Shruti S., Anbumani D., Preety R., Dhirendra K., Naresh C., Pranita H., Tushar K. M., Asish K. M., Rupak K. B., G. Balakrish N., Thandavarayan R., Bhabatosh D., Molecular Insights into Antimicrobial Resistance Traits of Multidrug Resistant Enteric Pathogens isolated from India. *Scientific Reports*. 2017; 7: 14468.
23. Peirson S. N., Butler J. N., Foster R. G. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res*. 2003; 31: 60-73.
24. Pier G.B. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: A major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *Int J Med Microbiol*. 2007; 297(5): 277-295.
25. Pranita D.T., Sara E.C., Lisa L.M. Combination Therapy for Treatment of Infections with Gram-Negative Bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2012; 25(3): 450–470.

26. Sadikot R.T., Blackwell T.S., Christman J.W., Prince A.S. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171(11): 1209-1223.
27. Sato H., Frank D.W. ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Mol Microbiol*. 2004; 53(5): 1279-1290.
28. Talbot G.H., Bradley J., Edwards J.E., Gilbert D., Scheld M., Bartlett J.G. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2006; 42: 657–668.
29. van Schaik E.J., Giltner C.L., Audette G.F., Keizer D.W., Bautista D.L., Slupsky C.M. DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. *J Bacteriol*. 2005; 187(4): 1455-1464.
30. Veessenmeyer J.L., Hauser A.R., Lisboa, T., Rello J. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. *Crit Care Med*. 2009; 37(5): 1777.
31. Воробьев А.А., ред. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. 2-е изд. М.: Медицинское информационное агентство; 2012.
32. Гришин А.В., Кривоzubов М.С., Карягина А.С., Гинцбург А.Л. Лектины *Pseudomonas aeruginosa* как мишени для новых антибактериальных соединений. *Acta naturae*. 2015; 2(7): 32-45.
33. Гусев М.В., Минеева Л.А., Микробиология, 4-е изд., стер. М.: Академия; 2003.
34. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учеб. для студентов биолог, спец. ун-тов. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высш. шк.; 1986.
35. Жданова О.С., Красноженов Е.П., Соснин Э.А., Гудкова Л.В., Грицута А.В., Протас И.М., Ефиц А.В. Антибиотикорезистентность штаммов *Pseudomonas aeruginosa* с разной способностью к синтезу пикоцианина. *Альманах клинической медицины*. 2013; 1(28):13-17.
36. Калошин А.А., Леонова Е.И., Солдатенкова А.В., Михайлова Н.А. Исследование протективных свойств рекомбинантного комплекса

белка F наружной мембраны и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa*. Вестник РАМН. 2016; 71(1): 5-10.

37. Калошин А.А., Солдатенкова А.В., Зими́на Е.М., Михайлова Н.А. Перспективы рекомбинантных препаратов для иммунопрофилактики инфекций, вызываемых *Pseudomonas aeruginosa*. Медицинская иммунология. 2017; 5(19): 35.

38. Коротяев А.И., Бабичев С.А.. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. 4-е изд., испр. и доп. СПб.: СпецЛит; 2008.

39. Кузнецова М.В., Павлова Ю.А., Карпунина Т.И., Демаков В.А. Опыт использования методов молекулярной генетики при идентификации клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. Клиническая лабораторная диагностика. 2013; 3(1): 34-37.

40. Лазарева А. В., Чеботарь И. В., Крыжановская О. А., Маянский Н. А. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. Болезни и возбудители. 2015; 3(17): 170-186.

41. Мальцева Н. В., Воробьева О. Н., Тараско А. Д., Пирогов Е. А. ДНК-диагностика синегнойной инфекции. Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 12(60): 35-38.

42. Маркова И.В., Михайлов И.Б., Неженцев М.В. Фармакология, СПб.: Фолиант; 2001.

43. 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.

44. Меньшиков В.В. Методики клинических лабораторных исследований. Справочное пособие. Том 3. Клиническая микробиология. М.: Лабора, 2009.

45. Пыж А.Э., Никандров В.Н. Вклад сине-зеленых пигментов *Pseudomonas aeruginosa* в гемолитическую активность культуральной жидкости. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011; 1: 19-25.

46. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. ПЦР в реальном времени, 2-е изд., испр. и доп. М: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2009.
47. Солдатенкова А.В., Калошин А.А., Борисова О.В., Калиниченко Е.О., Ахматова Н.К., Михайлова Н.А. Влияние комплекса рекомбинантных антигенов *Pseudomonas aeruginosa* на ключевые эффекторы иммунной системы. Медицинская иммунология. 2017; 5(19): 60.
48. Соловей Н.В., Карпов И.А. Проблема мультирезистентности синегнойной палочки в многопрофильном стационаре. КМАХ. 2012; 2(14): 49-52.
49. Трофимов Д. Ю., Ребриков Д. В., Саматов Г. А., Семенов П. А., Балугев А. Б., Гончарова Е. В., Алексеев Л. П., Хаитов Р. М. Метод повышения точности ПЦР «в реальном времени». Доклады Академии наук; 2008; 3(419): 421-424.
50. Харкевич Д.А. Фармакология. Учебник 10-еизд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

# ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ

Том 20 №2



Problems in medical mycology

Vol.20 №2

**2018**

<i>Чалпа В.И., Вяткина Л.Г., Жуйков Н.Н.</i> Анализ заболеваемости инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, в Урало-Сибирском регионе .....	126	<i>Шевчук Е.А., Вдовенко О.А., Черных И.Г., Акконен Т.Н., Соколова И.Р., Харитонова Ю.В., Бадмаев С.Е.</i> Определение чувствительности к дезинфектантам панрезистентных грамотрицательных бактерий .....	129
<i>Чеботарева Т.Я., Жарко И.Г., Жеребцова Н.Ю.</i> Влияние вакцинации на эпидемиологический процесс гепатита А .....	127	<i>Шевякова А.М., Стребков А.И.</i> Ипохондрический синдром как конфликтогенный фактор в практике врача-миколога .....	129
<i>Чиркина Т.М., Асланов Б.И., Рицук С.В., Гурова М.И., Ниценко Н.Ю., Эберт М.А.</i> Эпидемиологические особенности репродуктивно значимой эндокринной и уроандрологической патологии у детей и подростков Санкт-Петербурга в современных условиях ..	127	<i>Шепелин А.П., Новиков С.А., Полосенко О.В., Шолохова Л.П., Марчихина И.И.</i> Питательные среды для микологических исследований .....	130
<i>Чудиновских Ю.А., Семилазова Т.Ю., Шадривова О.В., Фролова Е.В., Богомолова Т.С., Ианатьева С.М., Алексеев С.М., Зюзгин И.С., Клишко Н.Н.</i> Инвазивный аспергиллез у больных клеточными лимфомами .....	127	<i>Шерстеникова А.К., Неклюдова В.С., Кашутин С.Л., Николаев В.И., Шагров Л.Л., Шутский Н.А.</i> Изучение содержания различных фенотипов естественных киллеров венозной крови у больных псориазом .....	130
<i>Шадривова О.И., Хостелиди С.Н., Борзова Ю.В., Десятник Е.А., Волкова А.Г., Полова М.О., Маркова И.В., Успенская О.С., Шнейдер Т.В., Богомолова Т.С., Ианатьева С.М., Зубаровская Л.С., Афанасьев Б.В., Клишко Н.Н.</i> Мукормикоз и инвазивный аспергиллез у онкогематологических пациентов: результаты проспективного исследования .....	127	<i>Ширшикова Т.В., Шарипова М.Р., Богомольная Л.М.</i> Роль эффлюкс системы MacAB <i>Serratia marcescens</i> SM6 в защите клеток от антибактериальных препаратов .....	130
<i>Шаров Т.Н., Маркин А.М., Липницкий А.В., Викторов Д.В., Топорков А.В.</i> Особенности масс-спектров культур <i>Coccidioides immitis</i> и <i>Coccidioides posadasii</i> .....	128	<i>Шмьленко В.А., Бондаренко А.П., Троценко О.Е.</i> Назофарингеальное носительство бактерий <i>Moraxella catarrhalis</i> у детей с рекуррентным течением респираторных заболеваний г. Хабаровска в 2016 году .....	130
<i>Шаталова Е.В., Парахина О.В.</i> Лизосомально катионные белки нейтрофильных лейкоцитов при <i>Candida</i> -бактериальной инфекции в условиях иммуносупрессии .....	128	<i>Шульгина Т.А., Нечаева О.В., Торгашова А.С.</i> Изучение антимикотического действия водных дисперсий наночастиц серебра, стабилизированных синтетическим и натуральным полимерами ..	131
<i>Швец К.Ю., Хакимова Л.Р., Деоренкова А.Н., Загафуранова А.Т., Маевзотов А.Р.</i> Конструирование молекулярно-генетического стандарта для изучения концентрации грамположительных бактерий .....	128	<i>Эсауленко Н.Б., Каменева О.А., Дорофеева В.И., Морозова С.Е., Косякова К.Г.</i> Сравнение результатов микробиологического мониторинга в стационарах различного профиля .....	131
<i>Шевелева Д.В., Яшина А.Н., Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Баранцевич Е.П.</i> Спектр возбудителей гнойно-септических инфекций в многопрофильном стационаре .....	129	<i>Юцковский А.Д., Лешунов Е.В.</i> Предподготовка пациентов перед проведением эстетической интимной хирургии .....	131
		<i>Язлак В.С.</i> Оценка дерматоскопических признаков <i>Tinea capitis</i> ..	131



**Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова (СЗГМУ)**  
**Научно-исследовательский институт медицинской микологии им. П.Н. Кашкина (НИИ ММ) СЗГМУ им. И.И. Мечникова**  
 Адрес редакции: 194291, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28. Тел.: (812) 303-51-45, факс (812) 510-62-77  
 E-mail: mycobiota@szgmu.ru. Заведующая редакцией: Е.С. Гукова.

**North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov**  
**Kashkin Research Institute of Medical Mycology**  
 Address of Editorial Office: Santiago-de-Cuba str., 1/28, Saint Petersburg, 194291, RUSSIA.  
 Tel.: (812) 303-51-45, Fax (812) 510-62-77  
 E-mail: mycobiota@szgmu.ru. Manager of Editorial Office: E.S. Gukova

**«ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКОЛОГИИ»**

Reg. № 77-1396 от 20.12.1999 г. ISSN 1999-6780

Журнал включен в реферативный журнал и базы ВИННИТИ.

Сведения о журнале ежегодно публикуются в международной системе по периодическим и продолжающимся изданиям «Ulrich's Periodicals Directory».

Оригинал-макет — НИИ «Медицинской микологии им. П. Н. Кашкина СЗГМУ».

Подписано в печать 28.04.2018. Формат 60×90 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 16.5. Тираж 999 экз.

**Материалы и методы.** Мы сравнили данные регистров онкогематологических больных мукормикозом и ИА, созданных в Санкт-Петербурге. В I группу включили 59 пациентов с мукормикозом, возраст – от 3-х до 74 лет (медиана – 27), из них мужчин – 56%. II группу составил 541 больной с ИА, возраст – 1-78 лет, (медиана – 38), мужчин – 57%. Для диагностики инвазивных микозов и оценки эффективности терапии мы использовали критерии EORTS / MSG, 2008.

**Результаты.** Среди фоновых состояний у пациентов с мукормикозом было больше острых лейкозов (64% vs 51%,  $p=0,03$ ). Для больных мукормикозом была характерна более выраженная иммуносупрессия: тяжелую нейтропению отмечали в 88% vs 82% случаев, у пациентов I группы она имела большую продолжительность (медиана – 30 дней vs 14 дней,  $p=0,0001$ ). Лимфоцитопению выявили у 77% vs 63%, она была длительнее у больных мукормикозом (медиана – 25 дней vs 14 дней,  $p=0,001$ ). Мукормикоз чаще развивался у рецидивентов аллогенных трансплантатов гемопозитивических стволовых клеток – 44% vs 28%, ( $p = 0,01$ ), а также на фоне реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), 42% vs 22%, ( $p=0,0001$ ). У 52% пациентов I группы мукормикоз был диагностирован через 1-225 дней после ИА. Основными возбудителями мукормикоза были *Rhizopus* spp. (47%), *Rhizomucor* spp. (28%) и *Lichtheimia corymbifera* (17%). Наиболее частыми возбудителями ИА были *Aspergillus fumigatus* (43%), *A. niger* (33%) и *A. flavus* (17%).

Основным локусом инфекции в обеих группах были легкие (73% vs 96%), однако у пациентов с мукормикозом чаще выявляли диссеминацию процесса (42% vs 8%,  $p=0,001$ ) и поражение придаточных пазух носа (15% vs 6%,  $p=0,04$ ). Типичным клиническим признаком мукормикоза было кровохарканье (32% vs 6%), частыми КТ-признаками – гидроторакс (53% vs 7%), деструкция ткани легкого с образованием полостей (38% vs 8%,  $p=0,0001$ ) и симптом «обратного ореола» (17% vs 3%). Антимикотическую терапию получили 78% vs 99% больных, ( $p=0,001$ ), хирургическое лечение – 47% vs 3%, ( $p=0,0001$ ).

Общая выживаемость в течение 12-ти недель была значительно ниже у пациентов с мукормикозом (49% vs 81%,  $p=0,0001$ ). Неблагоприятными прогностическими факторами у больных мукормикозом и ИА были: поражение 2-х и более органов ( $p = 0,0009$ ), сопутствующая бактериальная или вирусная инфекция ( $p=0,001$ ;  $p=0,008$  соответственно). Неблагоприятным прогностическим фактором при мукормикозе было кровохарканье ( $p=0,002$ ), благоприятным – ремиссия онкогематологического заболевания ( $p=0,006$ ). При ИА благоприятным прогностическим фактором была ранняя диагностика с использованием бронхоскопии ( $p=0,003$ ), применение вориконазола ( $p=0,0007$ ) и вторичная антифунгальная профилактика ( $p=0,0001$ ).

**Выводы.** У онкогематологических больных мукормикоз чаще развивался на фоне более длительного агранулоцитоза и лимфоцитопении, а также при развитии РТПХ. Основным локусом инфекции при мукормикозе и ИА были легкие. Общая выживаемость в течение 12-ти недель была значительно ниже у пациентов с мукормикозом (49% vs 81%,  $p=0,0001$ ). Неблагоприятные прогностические факторы у больных мукормикозом и ИА – диссеминация процесса и сопутствующая бактериальная или вирусная инфекция. Благоприятные прогностические факторы: у пациентов с мукормикозом – ремиссия основного заболевания, у больных ИА – ранняя диагностика с использованием бронхоскопии, терапия вориконазолом и вторичная антифунгальная профилактика.

#### ОСОБЕННОСТИ МАСС-СПЕКТРОВ КУЛЬТУР *COCCIDIOIDES IMMITIS* И *COCCIDIOIDES POSADASII*

Шаров Т.Н., Маркин А.М., Липницкий А.В., Викторов Д.В., Топорков А.В.

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, Волгоград, Россия

#### FEATURES OF THE MASS SPECTRA OF *COCCIDIOIDES IMMITIS* И *COCCIDIOIDES POSADASII*

Sharov T.N., Markin A.M., Lipnitskii A.V., Viktorov D.V. Toporkov A.V. Volgograd Antiplague Scientific Research Institute, Volgograd, Russia

**Цель исследования** – выявление особенностей масс-спектров *Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii*, пригодных для дифференцировки представителей этих видов друг от друга.

**Материалы и методы.** Использовали 15 штаммов *C. posadasii* и 11 штаммов *C. immitis*. Масс-спектры были получены с помощью времяпролетного масс-спектрометра Axima Confidence. Обработку спектров выполняли с помощью программного обеспечения mMass (v.5.5.0).

**Результаты.** Анализ масс-спектров группы штаммов *C. immitis* позволил выявить 9 основных областей, в которых группировались пики средней интенсивности с близким показателем  $m/z$ . Большая часть этих областей располагалась в диапазоне 1000-4000  $m/z$  (1224, 1520, 1985, 3101, 3814), а остальные – в районе 7000-9000  $m/z$  (7055, 7484, 7751, 8964). В этих областях масс-спектров у 8-11 штаммов (88-100%) располагались пики с показателем относительной интенсивности 15-50% и разбросом  $m/z \pm 2$ . При анализе масс-спектров группы штаммов *C. posadasii* было выявлено 12 областей группирования, 8 из которых были расположены на участке от 6000 до 9000  $m/z$  (6647, 6860, 7077, 7390, 7724, 8177, 8359, 8760) и 4 – на участке 1000-4000  $m/z$  (1759, 2324, 2958, 3302). Находящиеся в этих зонах пики обнаружили у 10-13 штаммов (73-84 %). Сопоставление масс-спектров всех 26 штаммов демонстрирует наличие как минимум 15 областей группирования пиков на всем диапазоне измерения от 1000 до 9000  $m/z$  с координатами, близкими к вышеперечисленным группам обоих видов. Отмечено, что при взаимном сравнении штаммов *Coccidioides* spp. количество групп схожих

пиков увеличивается, а число штаммов, составляющих эти группы, уменьшается. Проведенный анализ также демонстрирует, что, несмотря на наличие воспроизводимых и интенсивных пиков, отмечаемых на спектрограмме визуально, низко- и среднеинтенсивные пики вносят значительный вклад в картину взаимного распределения штаммов при кластерном анализе.

**Заключение.** Согласно результатам исследования, пики различной интенсивности вносят вклад в отличия картин характеристических масс-спектров, достаточные для проведения их дифференцировки. На данный момент вклад среднеинтенсивных пиков расценен нами как более весомый. Для выяснения степени влияния наиболее визуально заметных высоко- и низкоинтенсивных пиков необходимо проведение дальнейших исследований.

#### ЛИЗОСОМАЛЬНО КАТИОННЫЕ БЕЛКИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ *CANDIDA*-БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ В УСЛОВИЯХ ИМУНОСУПРЕССИИ

Шаталова Е.В., Парахина О.В.

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

#### LYSOSOMAL CATIONIC PROTEINS OF NEUTROPHILS WITH *CANDIDA*-BACTERIAL INFECTION IN IMMUNOSUPPRESSIVE CONDITIONS

Shatalova E. V., Parahina O. V.

Kursk State Medical University, Kursk, Russia

**Цель исследования** – обоснование выбора интегрального индикатора (лизосомально-катионного теста – ЛКТ) нарушения неспецифической резистентности организма при *Candida*-бактериальной инфекции в условиях иммуносупрессии организма.

**Материалы и методы.** Эксперименты выполняли на крысах Вистар. Для создания иммуносупрессии была выбрана модель термического ожога III-В степени (Минухин В.В. 1985). Через сутки рану инфицировали смесью суточных бульонных культур, состоящих из свежеевяденных от больных штаммов: *Candida albicans* + *Escherichia coli*, *C. albicans* + *Staphylococcus aureus* и *C. albicans* + *Pseudomonas aeruginosa* (по 0,1 мл 2 млрд.). ЛКТ изучали по наличию лизосомальных катионных белков в цитоплазме лейкоцитов периферической крови в мазках, окрашенных бромфеноловым синим (Шубич М.Г., 1974), с определением среднего истомического показателя (СГП).

**Результаты.** По возрасту тяжести вызываемой иммуносупрессии у животных ассоциации возбудителей располагались в следующей последовательности: *C. albicans* + *E. coli* → *C. albicans* + *S. aureus* → *C. albicans* + *P. aeruginosa*. Это подтверждено и впервые полученными нами данными о наличии катионных белков (КБ) в нейтрофилах периферической крови таких животных. У всех крыс с *Candida*-бактериальной инфекцией на фоне ожоговой травмы наблюдали достоверное ( $P<0,01$ ) снижение СГП, в то время как у крыс с «чистым» ожогом достоверной разницы относительно интактных (контроль) животных не отмечали (0,07±0,01 и 0,1±0,01 на 7 сутки исследования соответственно). Наиболее выраженное угнетение СГП у обожженных крыс вызывала ассоциация возбудителей из грибов с псевдомонадами. На всем протяжении исследования (до 28 суток) КБ у таких животных обнаруживали лишь в виде пылевидных отложений. Корреляционный анализ уровня КБ и выживаемости крыс позволил установить наличие сильной прямой связи между изучаемыми параметрами ( $r = 0,982 \pm 0,090$ ).

**Выводы.** Полученные результаты позволяют рекомендовать ЛКТ в качестве одного из интегральных методов изучения неспецифической резистентности организма при *Candida*-бактериальной инфекции в условиях иммуносупрессии.

#### КОНСТРУИРОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО СТАНДАРТА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Швец К.Ю.<sup>1</sup>, Хакимова Л.Р.<sup>1,2</sup>, Дворенкова А.Н.<sup>1</sup>, Загафаранова А.Т.<sup>1</sup>, Мавзютов А.Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Башкирский государственный медицинский университет; <sup>2</sup>Институт биохимии и генетики, Уфа, Россия

#### CONSTRUCTION OF THE MOLECULAR-GENETIC STANDARD FOR OBTAINING DATA ON CHANGING THE CONCENTRATION OF GRAMMABLE BACTERIA

Shvets K.YU.<sup>1</sup>, Khakimova L.R.<sup>1,2</sup>, Dvorenkova A.N.<sup>1</sup>, Zagafuranova A.T.<sup>1</sup>, Mavzyutov A.R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bashkir State Medical University; <sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa, Russia

**Цель исследования** – создание молекулярно-генетической конструкции для количественной оценки чувствительности грамположительных бактерий к антибактериальным препаратам.

**Результаты исследования.** Стандартный образец конструировали с использованием в качестве ДНК-матрицы плазмиды pAL-TA (3,0 т.п.н.) со вставкой участка гена 16S рРНК *Streptococcus sobrinus* (235 п.н.). Выделенную с помощью ионообменной смолы Chelex100 тотальную ДНК использовали в качестве матрицы для проведения классической ПЦР с целью накопления участка гена 16S рРНК *Streptococcus sobrinus*. Амплификацию

проводили на термоциклере Терцик МС-2 («ДНК-Технология», Россия). Выделение искомого амплифицированного участка из реакционной смеси выполняли с применением набора для очистки ДНК («Цитокин», Санкт-Петербург). Полученный очищенный фрагмент клонировали с использованием векторной плазмиды pAL-TA в компетентные клетки *Escherichia coli* XL1-Blue. Щелочным методом (лизисом) выделяли плазмиду из бактериальных клеток. Полученную плазмиду обрабатывали РНК-азой (50 мкг/мл) и растворяли в 25 мкл ТQ, затем проводили элюцию и экстракцию ДНК из вырезанных фрагментов агарозного геля, содержащих ДНК необходимой длины, с помощью набора для очистки ДНК («Цитокин», Санкт-Петербург).

Чистоту и концентрацию препарата ДНК определяли спектрофотометрически с помощью флуориметра QUBIT («Invitrogen», США) с использованием коммерческого набора реагентов Quant-iT DNA HS («Invitrogen», США). Для постановки реакции готовили реакционную смесь, содержащую буфер и флуоресцентный краситель, для исследуемой пробы ДНК и для пары стандартных образцов с известной концентрацией. По окончании измерений оптической плотности реакционной смеси в пробирке концентрация двухцепочечной ДНК составила 2,48 мкг/мл (с учетом молекулярной массы ДНК –  $7,08 \cdot 10^6$  копий ДНК/мл).

**Вывод.** Сконструированный молекулярно-генетический стандартный образец может использоваться для приготовления серийных разведений и построения стандартной кривой для определения количества копий ДНК искомого микроорганизма (копий ДНК/мл), что позволяет в дальнейшем усовершенствовать процедуру точной сравнительной оценки активности антибактериальных препаратов в отношении грамположительных бактерий.

#### СПЕКТР ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ В МНОГОПРОФИЛЬНОМ СТАЦИОНАРЕ

Шевелева Д.В.<sup>1</sup>, Яшина А.Н.<sup>1</sup>, Козлова Н.С.<sup>1</sup>, Баранцевич Н.Е.<sup>2</sup>, Баранцевич Е.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова; <sup>2</sup>Научно-исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

#### SPECTRUM OF PURULENT-SEPTIC INFECTION AGENTS IN MULTIDISCIPLINARY MEDICAL CENTRE

<sup>1</sup>Sheveleva D.V., <sup>1</sup>Yashina A.N., <sup>1</sup>Kozlova N.S., <sup>2</sup>Barantsevich N.E., <sup>2</sup>Barantsevich E.P.

<sup>1</sup>North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov; <sup>2</sup>Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia

**Цель исследования** – анализ спектра возбудителей гнойно-септических инфекций (ГИ) различной локализации в многопрофильном стационаре Санкт-Петербурга.

**Материалы и методы.** В 2015 г. в стационаре из различного материала больных ГСИ было выделено 1507 штаммов микроорганизмов, идентифицированных фенотипически и по последовательности первых 500 пар нуклеотидов гена 16SРНК.

**Результаты.** Среди возбудителей ГСИ преобладали грамотрицательные микробы (62,4%), прежде всего, энтеробактерии (42,3%). Они включали представителей 9 родов – *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Morganella morganii*, *Proteus* spp., *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei* и *Pantoea agglomerans*, наиболее распространенным среди которых оказалась *Klebsiella pneumoniae* (25,3%), значительно меньшим был удельный вес *Escherichia coli* (10,0%). Энтеробактерии остальных семи родов выделялись редко и были представлены небольшим количеством штаммов. Среди неферментирующих грамотрицательных бактерий – НГОБ (19,6%) чаще встречались *Pseudomonas aeruginosa* (8,9%) и *Acinetobacter baumannii* (7,2%), доля *Stenotrophomonas maltophilia* составила всего 1,5%, остальные роды были представлены единичными штаммами. Среди грамположительных возбудителей ГСИ (37,6%) преобладали энтерококки (18,8%), при этом удельный вес *Enterococcus faecalis* (12,3%) в 2 раза превышал таковой *Enterococcus faecium* (6,2%). Доля стафилококков была ниже (17,5%), из 6 видов преобладали *Staphylococcus aureus* (7,8%) и *Staphylococcus epidermidis* (6,8%). Стрептококки 5 видов составили вместе всего 0,7% изолятов. В целом среди возбудителей ГСИ в стационаре преобладали штаммы восьми видов грамотрицательных и грамположительных микробов. Удельный вес трех видов ведущих возбудителей (*K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *E. coli*) составил почти половину от общего числа штаммов (47,6%).

**Выводы.** Структура возбудителей ГСИ в многопрофильном стационаре была крайне разнообразной с преобладанием грамотрицательных микроорганизмов (62,4%), преимущественно энтеробактерий (42,5%). Ведущим грамотрицательным микроорганизмом в стационаре оказалась *K. pneumoniae* (25,3%), ведущим грамположительным – *E. faecalis* (12,3%). Меньшим был удельный вес *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *A. baumannii* и *E. faecium*. Совместный удельный вес культуры указанных восьми ведущих видов возбудителей ГСИ составил более трети четвертой от числа выделенных бактерий (84,5%).

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ДЕЗИНФЕКТАНТАМ ПАНРЕЗИСТЕНТНЫХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Шевчук Е.А., Вдовенко О.А., Черных И.Г., Акконен Т.Н., Соколова И.Р., Харитонов Ю.В., Бадмаев С.Е.

Северо-Западный Центр доказательной медицины, Санкт-Петербург, Россия

#### DETERMINATION OF THE SENSITIVITY OF RESISTANT GRAM-NEGATIVE BACTERIA TO DISINFECTANTS

Shevchuk E. A., Vdovanko O. A., Chernykh I. G., Akkonen T. N., Sokolova R. I., Kharitonova Yu. V., Badmaev S. E.

North-Western Centre of Evidence-Based Medicine, St. Petersburg, Russia

**Цель исследования** – изучение чувствительности к дезинфектантам панрезистентных штаммов грамотрицательных бактерий, выявленных от пациентов лечебно-профилактических учреждений Санкт-Петербурга и Ленинградской области.

**Материалы и методы.** Анализовали чувствительность 22 штаммов, выделенных из 11 стационаров города и области, из них: *Klebsiella pneumoniae* – 37%, *Escherichia coli* – 9%, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* – по 27% соответственно. Микроорганизмы проявляли резистентность ко всем классам антибактериальных препаратов. Устойчивость к антибиотикам устанавливали согласно МУК 4.2.1690-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» и рекомендациям EUCAST 2017 г. Для исследования выбрали дезсредства: 0,1% «Тетрамин», 0,5% «Оксигенон S», 0,5% «Дескоцид-Н» с экспозициями 30, 15 и 30 минут соответственно, а также «Триосепт-экспресс». В работе использовали суспензионный метод согласно Руководству 4.2.2643-10 «Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки эффективности и безопасности».

**Результат.** Приготовленные растворы дезсредств в соответствующих концентрациях по 4,5 мл разливали в стерильные пробирки, в которые добавляли по 0,5 мл взвесей тест-микроорганизмов согласно стандарту мутности 0,5 по МакФарланду. Через заданные интервалы времени по 0,5 мл полученной взвеси добавляли в пробирки с 4,5 мл нейтрализатора, для «Триосепт-экспресс» экспозиция не регламентирована. Затем по 0,1 мл высевали на поверхности плотных питательных сред. В контрольных образцах дезсредств не использовали. Посевы инкубировали 48 часов при 37 °С. В результате проведенных опытов на плотных питательных средах рост тест-микроорганизмов отсутствовал, тогда как в контрольных высевах определяли наличие типичного роста тест-культур.

**Выводы.** Тестируемые дезинфектанты, предназначенные для обработки медицинского оборудования методами протирания и погружения, оказались эффективны в 100% случаев в отношении панрезистентных штаммов грамотрицательных бактерий. Данные исследования имеют важное практическое значение в цепи санитарно-противоэпидемических мероприятий, обеспечивая эффективную профилактику внутрибольничных инфекций.

#### ИПОХОНДРИЧЕСКИЙ СИНДРОМ КАК КОНФЛИКТОГЕННЫЙ ФАКТОР В ПРАКТИКЕ ВРАЧА-МИКОЛОГА

Шевьякова А.М., Стребков А.И.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

#### IPHONDRIAL SYNDROME AS A CONFLICTOGENIC FACTOR IN PRACTICE OF PHYSICIAN-MYCOLOGIST

Shevyakova A.M., Strebkov A.I.

St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

**Цель исследования** – выработка целостной стратегии поведения врача-миколога в конфликте с пациентом, страдающим ипохондрическим синдромом.

**Материалы и методы.** Анализ научной литературы в области конфликтологии, психологии и психиатрии.

**Результаты.** По данным клинических исследований, 25-60% симптомов, указываемых пациентами, не имеют под собой достаточных биологических и физиологических оснований. Восприятие ситуации врачом-микологом зависит от объективных показателей, которые не совпадают с субъективными ощущениями пациента с ипохондрией, что провоцирует возникновение неизбежных противоречий. Таким образом, взаимодействие врача-миколога и пациента с ипохондрическим синдромом является ситуацией латентного конфликта, требующей от врача конфликтологической компетентности.

**Заключение.** Для предотвращения межличностного конфликта с пациентом, страдающим ипохондрией, при необходимости направить его на консультацию психиатра следует помнить о возможном нарушении самокритики у пациента, характерном для психозов. В этой связи прямое высказывание представляется конфликтогенным, в то время как рациональным является указание на связь заболевания со стрессом и необходимость комплексного подхода, включающего консультацию психоневролога. Таким образом, врач-миколог предпочитает направление к врачу-психиатру как необходимое сотрудничество, а не как намерение уклониться от оказания помощи.



**23 АПРЕЛЯ 2018 ГОДА  
ПОНЕДЕЛЬНИК**

**83-я Всероссийская  
научная конференция  
студентов и молодых ученых  
«Вопросы теоретической и  
практической медицины»**





# Вестник Башкирского государственного медицинского университета

сетевое издание

ISSN 2309-7183



приложение №3, 2018

[vestnikbgmu.ru](http://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
КутлинаТ.Г. <sup>1</sup> , ВаловаЯ.В. <sup>1,2</sup> , КаримовД.О. <sup>1</sup> , МухаммадиеваГ.Ф. <sup>1</sup> , ХуснутдиноваН.Ю. <sup>1</sup>	
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. Янтурина, К.А. Сазонова, Е.Ш. Зулькарнаева	
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 <sup>1</sup> , А.Р. Бахтиева <sup>1</sup> , А.Т. Загафуранова <sup>1</sup> , А.Д. Дворенкова <sup>1</sup> , Е.В. Третьякова <sup>2</sup>	
АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ.....	1142
Е. Ш. Зулькарнаева, К. А. Фархутдинова, И. А. Янтурина	
АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДНЫХ, СПИРТОВЫХ И ГЕКСАНОВЫХ ЭКСТРАКТОВ ВОДЯНОГО ОРЕХА <i>TRAPASIBIRICA</i> И ДРУГИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ.....	1147
Н.Н. Зигангирова, Г.К. Юмагужина, 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. Юмагужина	
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. Швец<sup>1</sup>, А.Р. Бахтиева<sup>1</sup>, А.Т. Загафуранова<sup>1</sup>, А.Д. Дворенкова<sup>1</sup>, Е.В. Третьякова<sup>2</sup>

**АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ**

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

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии,

<sup>1</sup>Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

<sup>2</sup>Институт 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*, *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. Shvets<sup>1</sup>, A.R. Bakhtiyeva<sup>1</sup>, A.T. Zagafuranova<sup>1</sup>, A.D. Dvorenkova<sup>1</sup>, E.V. Tret'yakova<sup>2</sup>

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NEW CHEMICAL COMPOUNDS**

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

Department of Fundamental and Applied Microbiology,

<sup>1</sup>Bashkir State Medical University, Ufa

<sup>2</sup>Institute 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 обсуждение. 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.mitisk* 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 (С%)	Виды микроорганизмов					
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Str.oralis</i>	<i>Str.sobrinus</i>	<i>Str.mitisk</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 инактивации 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 penicillinase 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.

ПРОБЛЕМЫ ПРИ ОКАЗАНИИ ДОВРАЧЕБНОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ ПОСТРАДАВШИМ С СИНДРОМОМ ДЛИТЕЛЬНОГО СДАВЛЕНИЯ НА ДОГОСПИТАЛЬНОМ ЭТАПЕ. .... 1758

Ю.В. Старикова

ВЛИЯНИЕ РАЗВИТИЯ ПОЗИТИВНОГО МЫШЛЕНИЯ НА КАЧЕСТВО ЖИЗНИ ЛИЧНОСТИ. .... 1763

**Иновационные проекты, цифровые и информационные технологии в биологии и  
медицине**

Т.Р. Бикташев, А.Р. Галиева

ПРЕИМУЩЕСТВО БЕСКОНТАКТНОЙ ТЕРМОМЕТРИИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПРОБЫ С ПОСТОККЛЮЗИОННОЙ РЕАКТИВНОЙ ГИПЕРЕМИЕЙ ..... 1768

А.Р. ВАЛИТОВА

АНАТОМИЯ ОРГАНА ЗРЕНИЯ ПО ДАННЫМ НЕИНВАЗИВНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ 1773

Д.А. Гареев, Д.Н. Овсяк, Х.М. Талипова, В.А. Чумак, Д.А. Александрова

ИМПЕДАНСНАЯ ПНЕВМОГРАФИЯ КАК НЕИНВАЗИВНЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЁГКИХ ..... 1778

Р.Р. Муллаянов

АЛГОРИТМ РАСПОЗНАВАНИЯ ДЫХАТЕЛЬНОГО ПАТТЕРНА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ..... 1783

А.А. АРСЛАНОВА

КОМПОНОВКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПО МЕСТАМ ХРАНЕНИЯ..... 1788

А. А. Евграфов

ПРИМЕНЕНИЕ ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ОБРАБОТКИ МЕДИЦИНСКИХ ДАННЫХ ..... 1793

К.В. Сафиуллина

ПРОГРАММА ПРИКЛАДНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ И ОПТИМИЗАЦИИ ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОДУЦЕНТА ХОЛЕСТЕРОЛОКСИДАЗЫ ..... 1798

ХУСАИНОВ И.И.

РАЗРАБОТКА WEB- СЕРВИСА ДЛЯ АНАЛИЗА СТРУКТУРЫ ПОТРЕБЛЕНИЯ РЕСУРСОВ МЕДИЦИНСКИХ УЧРЕЖДЕНИЙ НА ОСНОВЕ ОТКРЫТЫХ ИСТОЧНИКОВ ИНФОРМАЦИИ .... 1803

А.И. Никонова

ТРЕХМЕРНОЕ ВИЗУАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ГРУДНОГО ОТДЕЛА ПОЗВОНОЧНИКА ..... 1808

А.Д. Дворенкова, К.Ю. Швец, Л.Р. Хакимова

НАБОР КАЛИБРАТОРОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ *PSEUDOMONASAERUGINOSA* В РАЗЛИЧНЫХ СРЕДАХ БЕЗ ВЫДЕЛЕНИЯ ИХ В ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЕ «PSEUDOMONAS SCREEN - RQ» ..... 1813

Николаев В.А.

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

А.Д. Дворенкова, К.Ю. Швец, Л.Р. Хакимова

**НАБОР КАЛИБРАТОРОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ  
СОДЕРЖАНИЯ *PSEUDOMONASAERUGINOSA* В РАЗЛИЧНЫХ СРЕДАХ БЕЗ  
ВЫДЕЛЕНИЯ ИХ В ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЕ «PSEUDOMONAS SCREEN - RQ»**

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

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии,

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

*Резюме. Разработаны генно-инженерные конструкции с известными количествами копий ДНК Pseudomonasaeruginosa для определения концентрации микробных клеток в образце без выделения чистой культуры. Проведена оценка объективности использования ПЦР в реальном времени для идентификации возбудителей инфекционных заболеваний.*

*Ключевые слова: идентификация, молекулярно-генетические методы, калибратор, количественная ПЦР в режиме реального времени.*

A.D. Dvorenkova, K.Yu. Shvets, L.R. KHakimova

**CALIBRATOR SET «PSEUDOMONAS SCREEN - RQ» FOR QUANTITATIVE  
EVALUATION OF EXPRESS *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* IN DIFFERENT  
ENVIRONMENTS WITHOUT ISOLATION IN PURE CULTURE**

Scientific Advisor – Ph. D. in Medicine, Full professor A.R. Mavzyutov

Department of Fundamental and Applied Microbiology,

Bashkir State Medical University, Ufa

*Abstract. Developed genetically engineered constructions with known amounts of DNA copies of Pseudomonas aeruginosa to determine the concentration of microbial cells in a sample without isolation of a pure culture. An evaluation of the objectivity of using real-time PCR for identification of pathogens of infectious diseases was carried out.*

*Keywords: identification, molecular genetic methods, calibrator, quantitative real-time PCR.*

**Актуальность.** Одним из наиболее частых факторов передачи возбудителей инфекционных заболеваний, в том числе инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), служат объекты внешней среды. В последние годы в связи с этим практически повсеместно возросло эпидемиологическое значение неферментирующих бактерий, среди которых безусловным «лидером» по актуальности остаются *Pseudomonas aeruginosa* [1, 4].

Все выше сказанное предполагает актуальность обнаружения этих бактерий, например, в смывах с поверхностей в медицинских организациях и/или с рук медицинского персонала. Однако в условиях часто нерационального применения дезинфектантов и

антибактериальных препаратов эффективность выявления жизнеспособных микроорганизмов хорошо известными культуральными методами значительно снижается. Ещё ниже вероятность обнаружения *Pseudomonas aeruginosa* в пищевых продуктах при расследовании пищевых отравлений, которые могут вызываться высвобождением бактериальных эндотоксинов в ходе термической обработки неправильно хранившихся, обсемененных этими грамотрицательными бактериями, полуфабрикатов или пищевых продуктов [2, 3, 5]. В связи этим перспективным представляется применение молекулярно-генетических методов, ориентированных на выявление длительно сохраняющейся во внешней среде и выдерживающей термическую обработку бактериальной ДНК.

Среди молекулярно-генетических методов в клинической медицине, благодаря высокой чувствительности, специфичности и скорости выполнения анализа, наиболее широкое применение получила полимеразная цепная реакция (ПЦР). Стоит отметить, что применение стандартной ПЦР в санитарной микробиологии весьма неинформативно, поскольку возникает потребность в получении количественных данных. Именно поэтому перспективно использовать количественную ПЦР в режиме реального времени. Для практического применения данной методики необходима разработка соответствующих генно-инженерных конструкций с известными количествами ДНК обнаруживаемых микроорганизмов, именуемых калибраторами.

**Цель.** Разработка панели калибраторов для количественной экспресс-детекции *Pseudomonas aeruginosa* в различных средах без выделения их в чистой культуре.

**Задачи.** 1. Разработка панели генно-инженерных калибраторов разных концентраций для получения количественных данных о содержании *Pseudomonas aeruginosa* в образцах.

2. Разработка нового способа количественной оценки содержания *Pseudomonas aeruginosa* в различных средах без выделения их в чистой культуре и оформление заявки на изобретение.

**Количественные показатели проекта.** Диагностический набор реагентов «*Pseudomonas*Screen - RQ» будет ориентирован на количественное определение ДНК микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa*, прошедших культивирование в исследуемых антибактериальных веществах. При этом время, необходимое для проведения полного молекулярно-генетического исследования и определения антимикробной активности исследуемых веществ к целевому микроорганизму составит всего 5-8 часов.

Себестоимость полного набора реагентов для количественной оценки антимикробной активности новых химических соединений будет составлять 6000-8000 руб. (на 96 исследований, включая контроли). В состав набора войдут: реактивы для экспресс-выделения ДНК из образцов, раскапанная готовая реакционная смесь для проведения ПЦР,

положительный контрольный образец, калибровочные образцы с известной концентрацией в копиях ДНК/мл.

**Качественные показатели проекта.** Набор реагентов «PseudomonasScreen - RQ» предназначен для количественного определения ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в пищевых продуктах и объектах внешней среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Предлагаемый диагностический набор позволяет провести оптимизированный количественный молекулярно-генетический анализ ДНК *Pseudomonas aeruginosa* и обеспечить полный контроль всех этапов исследования (система внутренних контролей). К характеристикам диагностического набора следует отнести высокую чувствительность (чувствительность выявления 100 копий ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в стандартных образцах – 100%), специфичность (специфичность выявления ДНК *Pseudomonas aeruginosa* – 100%) и воспроизводимость результатов, прецизионность и сокращение времени полного исследования до 8 часов.

**Область применения.** Разрабатываемая нами технология имеют целый ряд преимуществ по срокам исследования, количественным показателям, по чувствительности, специфичности, возможности автоматизации, по экономическим показателям. Именно поэтому в качестве перспективных целевых рынков можно рассматривать бактериологические лаборатории гигиенического и эпидемиологического профиля, научно-исследовательские институты и иные учреждения, осуществляющие контроль за санитарно-эпидемиологической обстановкой, проведением санитарно-эпидемиологических исследований и разработкой предложений о проведении санитарно-противоэпидемических мероприятий, проведением социально-гигиенического мониторинга для оценки и прогноза состояния здоровья населения и среды обитания.

**Перспектива коммерциализации.** Действующий индустриальный партнер проекта и в перспективе площадка для организации и масштабирования производства – ООО «Биоскрин».

**План по реализации проекта.**

Первый год:

1) Конструирование панели генно-инженерных калибраторов для количественной оценки содержания *Pseudomonas aeruginosa* в анализируемых пробах.

2) Экспериментальная оценка сконструированных калибраторов на образцах.

Второй год:

1) Разработка способа получения количественных данных при исследовании образцов на содержание *Pseudomonas aeruginosa* и оформление патента на изобретение.

2) Разработка системы интерпретации результатов молекулярно-генетического анализа образцов.

Команда проекта. Преподаватели и студенты кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, научные сотрудники лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологии Института биохимии и генетики УФИЦ РАН.

1) Мавзютов Айрат Радикович – д.м.н., зав. кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России

2) Баймиев Алексей Ханифович – д.б.н., профессор кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, зав. лабораторией молекулярной биологии и нанобиотехнологии Института биохимии и генетики УФИЦ РАН

3) Хасанова Гузель Фаузавиевна – старший преподаватель кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России

4) Хакимова Лилия Ралисовна – ассистент кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологии Института биохимии и генетики УФИЦ РАН

5) Швец Ксения Юрьевна - ассистент кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России.

#### Список литературы

1. Маянский А. Н. и соавт. Чистякова *Pseudomonas aeruginosa*: характеристика биопленочного процесса// Молекулярная генетика, микробиология и вирусология – 2012.-№1.- с. 3-8
2. Лазарева А. В. и соавт. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология // Клиническая микробиологическая антимикробная химиотерапия..-2015.-Т.17 №3.-с. 170-186
3. Шелякова О.А., Серегина Н.В. Проблема резистентности *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам// Современная медицина: актуальные вопросы: сб. ст. по матер. XVII междунар. науч.-практ. конф. – Новосибирск: СибАК, 2013.- с. 91-94
4. Соловей Н.В., Карпов И.А. Проблема мультирезистентности синегнойной палочки в многопрофильном стационаре // КМАХ, 2012. — Т. 14. — № 2. — С. 49-52.
5. Калошин А.А., Леонова Е.И., Солдатенкова А.В., Михайлова Н.А. Исследование протективных свойств рекомбинантного комплекса белка F наружной мембраны и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa*// Вестник Российской академии медицинских наук.- 2016 - 71(1).- с. 5-10.



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

**БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

# ДИПЛОМ

*Студентке 4 курса медико-профилактического  
факультета с отделением биологии  
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России  
Дворенковой Анастасии Дмитриевне -  
победителю Всероссийского  
конкурса по отбору проектов  
для финансирования по программе «УМНИК -Хелснет».  
Научная работа на тему:  
«Разработка прецизионной технологии оценки и  
селекции штаммов-суперпродуцентов  
антибиотиков и перспективных  
антибактериальных химических соединений на  
платформе полимеразной цепной реакции в  
реальном времени»*

Ректор, чл.- корр. РАН

*В.Н. Павлов*





АЛЬЯНС  
КЛИНИЧЕСКИХ  
ХИМИТЕРАПЕВТОВ  
И МИКРОБИОЛОГОВ



РАЗВИТИЕ ПАРТНЕРСТВА В ЗДРАВООХРАНЕНИИ

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

## СЕРТИФИКАТ

Настоящим подтверждается, что

Добрынина Анастасия Дмитриевна

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) \_\_\_\_\_

*Добреевой А.В.*

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ \_\_\_\_\_

*Шабдуллин А.А.*

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

*[Signature]*  
В.Н.Павлов





ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

**БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

# ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЕТСЯ

*К.Ю. Щевц, А.Р. Басатиева, А.М. Закафурганова, Т.Д. Дворенкова,  
В.В. Претьякова*

В НОМИНАЦИИ

*Открытие новых препаратов с антимикробной активностью*

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ *А.Р. Мабутов*

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





ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

**БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

# ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЕТСЯ

*Дворникова А.Ф., Мельник Н.Ю., Лакшмова Л.Р.*

ЗА ЛУЧШИЙ ПРОЕКТ НА СЕКЦИИ

*„Инновационные технологии“*

83-Й ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ

СТУДЕНТОВ И МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ

«ВОПРОСЫ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И ПРАКТИЧЕСКОЙ  
МЕДИЦИНЫ»

г. Уфа, 23 апреля 2018 г.

Ректор БГМУ

В.Н.Павлов



# Сертификат

*Дворенкова Анастасия Дмитриевна*

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 РФ "Новый рациональный  
подход к разработке антибактериальных и противоопухолевых  
лекарственных молекул с применением технологии ВПС"

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



# HTSDD-2018

High throughput screening in drug discovery

## ДИПЛОМ

*Дворенкова Анастасия Дмитриевна*

занял(а) 2 место

В конкурсе устных докладов

13 июня 2018 г., Уфа

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

## СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа  
на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе  
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Дворенкова А.Д.
Факультет, кафедра, номер группы	Б-401А
Тип работы	Дипломная работа
Название работы	Разработка прецизионной технологии количественной оценки антимикробной активности новых химических соединений в отношении грамотрицательных бактерий
Название файла	Разработка прецизионной технологии количественной оценки антимикробной активности новых химических соединений в отношении грамотрицательных
Процент заимствования	18,15%
Процент цитирования	1,37%
Процент оригинальности	80,48%
Дата проверки	12:33:26 22 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	26.06.2018  Подпись проверяющего

ФГБОУ ВО БГМУ  
Минздрава России  
НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

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.

## ОТЗЫВ НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

Дворенкова Анастасия Дмитриевна выполнила выпускную квалификационную работу на тему «РАЗРАБОТКА ПРЕЦИЗИОННОЙ ТЕХНОЛОГИИ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ОТНОШЕНИИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ».

Представленная работа посвящена проблеме поиска новых соединений, обладающих выраженной антибактериальной активностью. Одной из методических сложностей этого процесса является отсутствие высокопроизводительных и, одновременно, высокоточных методов, позволяющих проводить одновременно скрининг большого количества новых химических соединений. Разработка такого метода является целью данной ВКР.

За время обучения в БГМУ А.Д.Дворенкова освоила учебную программу в полном объеме. Все годы училась только на «отлично», совмещая учебу с научной работой в студенческом научном кружке, что позволило ей стать победителем конкурса «Хелснет-2018», проводившегося в рамках федеральной программы «Национальная технологическая инициатива».

В процессе выполнения ВКР А.Д.Дворенкова уверенно овладела навыками работы с микроорганизмами, включая условно-патогенные бактерии, и методами полуколичественной и количественной оценки антибиотикочувствительности. Освоила методы клонирования ДНК и конструирования векторных плазмид, что позволило экспериментально оценить возможность применения молекулярно-генетических методов для поиска новых антибактериальных соединений.

Полученные в ходе выполнения результаты были апробированы и представлены в публикациях и в виде устных сообщений на конференциях, включая международные (PLAMIC-2018 и др.).

В ходе выполнения ВКР Дворенкова Анастасия Дмитриевна продемонстрировала навыки самостоятельной работы и компетенции, которыми должен обладать обучающийся по окончании учебы по направлению подготовки 06.03.01 – Биология (профиль – микробиология).

Таким образом, выпускная квалификационная работа Дворенковой А.Д. 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

## ОТЗЫВ

внешнего рецензента доктора биологических наук, профессора Чемериса А.В. на выпускную квалификационную работу Дворенковой Анастасии Дмитриевны «РАЗРАБОТКА ПРЕЦИЗИОННОЙ ТЕХНОЛОГИИ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ОТНОШЕНИИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ».

Данная тема является важной и актуальной по ряду причин. На сегодняшний день существует проблема распространенной резистентности микроорганизмов к антибактериальным веществам. Все существующие методики не дают прецизионной количественной оценки антибиотикам. Именно поэтому обнаружение антибиотикорезистентности методом ПЦР является отличным дополнением к традиционному микробиологическому тестированию

Теоретическая значимость работы заключается в возможности использования полученных результатов при изучении методов оценки антимикробной активности. Практическая значимость состоит в разработке прецизионной экспресс технологии для количественной оценки антимикробной активности химических соединений.

Результаты исследований были опубликованы в сборниках материалов всероссийских и международных конференций, а также в научных журналах, рекомендованных ВАК Минздрава России.

Автором при написании дипломной работы сохранена традиционная структура, а именно в ней представлены разделы введение, литературный обзор, описание объектов и методов исследований, представление собственных данных и их обсуждения, заключение, выводы, список цитируемой литературы, приложения. Сформулированные в работе выводы достаточно обоснованы и могут быть использованы в практической деятельности.

Таким образом, выпускная квалификационная работа Дворенковой Анастасии Дмитриевны «РАЗРАБОТКА ПРЕЦИЗИОННОЙ ТЕХНОЛОГИИ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ОТНОШЕНИИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ» 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 оценки «отлично».

Доктор биологических наук, профессор,  
главный научный сотрудник

Института биохимии и генетики  
УФИЦ РАН

Алексей Викторович Чемерис



## Доклад к защите дипломной работы

[1 слайд]

Уважаемые председатель и члены государственной экзаменационной комиссии, разрешите представить Вам доклад на тему: «Разработка прецизионной технологии количественной оценки антибактериальной активности новых химических соединений в отношении грамотрицательных бактерий».

[2 слайд]

Проблема формирования устойчивости микроорганизмов приобретает особую актуальность в странах с развитой системой здравоохранения и интенсивным сельским хозяйством. Согласно оценкам международных экспертов, устойчивость микроорганизмов к антибиотикам является причиной более 700 тысяч смертельных случаев ежегодно. Это обосновывает актуальность поиска новых эффективных химических соединений и оценку их антибактериальной активности. Экспресс-тестирование антибактериальной активности при сохранении высокой чувствительности и специфичности исследования могли бы обеспечить молекулярно-генетические методы, в особенности ПЦР в режиме реального времени

[3 слайд]

**Цель исследования** заключается в разработке способа ускоренной молекулярно-генетической оценки противомикробной активности антибактериальных препаратов на модели *Pseudomonas aeruginosa*.

### **Задачи исследования:**

5. Конструирование калибровочного образца pAL-TAPseudAer16S известной концентрации для количественной оценки антимикробной активности антибиотиков в отношении *Pseudomonas aeruginosa* с помощью метода ПЦР в режиме реального времени.

6. Экспериментальная оценка сконструированного калибратора на антибактериальных препаратах (не менее 5).

7. Разработка системы интерпретации результатов молекулярно-генетического анализа антибактериальной активности препаратов.

8. Тестирование при помощи предложенной технологии новых химических соединений и субстанций, обладающих антимикробным действием.

[4 слайд]

1) Для проведения молекулярно-генетической оценки антимикробной активности в отношении грамотрицательной бактерии *Pseudomonas aeruginosa* были выбраны следующие антибиотики: амикацин (конечная концентрация 50 мг/мл), гентамицин (конечная концентрация 40 мг/мл), пefлоксацин (конечная концентрация 80 мг/мл), ципрофлоксацин (конечная концентрация 2 мг/мл) и цефтриаксон (конечная концентрация 100 мг/мл).

2) Материалом для исследования являлась чистая культура грамотрицательной бактерии *Pseudomonas aeruginosa* (штамм SS14 KC 866140).

3) Методика сравнения – определение МИК антибиотика методом серийных разведений в бульоне.

4) Положительный контрольный образец получали встраиванием участка генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* в вектор pAL-TA («Евроген», Москва)

с последующей трансформацией и наработкой плазмиды в клетках *E.coli* XL1-Blue.

5) Методом ПЦР в режиме реального времени выявляли количество ДНК (в ДНК копиях/мл) *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования в исследуемых веществах.

6) Калибровочный образец конструировали с использованием в качестве ДНК-матрицы плазмиду pAL-TA (3,0 т.п.н.) со вставкой участка гена 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* (270 п.н.), в результате чего была получена плазида pAL-TAPseudAer16S с концентрацией  $2,5 \times 10^{10}$  копий ДНК/мл.

[5 слайд]

Основным параметром, характеризующим взаимоотношения между микробом и антимикробным препаратом, является величина минимальной ингибирующей концентрации препарата. Тестирование чувствительности *Pseudomonas aeruginosa* к следующим антибиотикам: гентамицин, цефтриаксон, амикацин, пefлоксацин и ципрофлоксацин, проводили методом серийных разведений в бульоне. Для каждого антибиотика был получен один ряд разведений с указанными в таблице концентрациями. В каждой концентрации антибиотика культивировали исследуемый микроорганизм. После инкубации проводили анализ полученных результатов с установлением МИК каждого из антибиотиков в отношении *P. aeruginosa*. Таким образом, для амикацина, гентамицина, пefлоксацина, цефтриаксона и ципрофлоксацина МИК составили 3,05 мкг/мл, 1,22 мкг/мл, 2,4 мкг/мл, 6,1 мкг/мл и 0,61 мкг/мл соответственно.

[6 слайд]

Для определения антимикробной активности исследуемых антимикробных препаратов (амикацин, гентамицин, пefлоксацин, цефтриаксон и ципрофлоксацин) и экспериментальной оценки сконструированного калибратора, нами проводилось культивирование микроорганизма *Pseudomonas aeruginosa* в питательном бульоне в присутствии антибиотика (в 9 различных концентрациях - от 256 до 1 мкг/мл) с целью получения данных об изменении концентрации микроорганизма после непродолжительного культивирования.

Проведение количественной ПЦР в режиме реального времени позволило рассчитать средние значения концентраций ДНК *Pseudomonas aeruginosa* после культивирования в питательной среде в присутствии антибиотика, что дало возможность оценить антимикробную активность исследуемых препаратов. Расчет производили по формуле представленной на слайде:

$$X_o = X_{or} \times (1+E)^{Ct_{or} - Ct_o},$$

где:

$X_o$  – концентрация матриц исследуемого образца (ГЭ/образец);

$X_{or}$  – стандартная начальная концентрация (копий ДНК/мл);

$E$  – эффективность РТ-ПЦР;

$Ct_{or}$  – пороговый цикл для стандартного образца;

$Ct_o$  – пороговый цикл для исследуемого образца.

Молекулярно-генетические исследования антимикробной активности рабочих растворов амикацина, гентамицина, пefлоксацина, цефтриаксона, ципрофлоксацина с различными концентрациями (от 256,0 до 1,0 мкг/мл)

показали, что антибиотики действительно являются эффективными в отношении аэробных неферментирующих грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, в том числе и в отношении выбранного для эксперимента и исследования штамма *Pseudomonas aeruginosa* (штамм SS14 KC 866140).

[7 слайд]

Результаты количественной оценки позволили сделать вывод о том, что рост бактерий наиболее сильно подавляли следующие концентрации амикацина от 256 мкг/мл до 2 мкг/мл. Абсолютное количество ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в растворе антибиотика после непродолжительного культивирования для рабочих растворов антибиотика представлено на слайде.

Минимальная подавляющая концентрация для гентамицина составила 2 мкг/мл. Что совпадает с результатами, полученными при оценке амикацина. Однако, абсолютное количество ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в растворе гентамицина после непродолжительного культивирования оказалось больше в сравнении с амикацином.

Пефлоксацин в равной степени эффективен в отношении *Pseudomonas aeruginosa* как и предыдущие антибактериальные препараты. Минимальная подавляющая концентрация составила 2 мкг/мл. При этом абсолютное количество ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в растворе антибиотика после непродолжительного культивирования оказалось в разы больше чем для амикацина и гентамицина.

Цефтриаксон оказался наименее эффективен в отношении *Pseudomonas aeruginosa*. Минимальная подавляющая концентрация для данного антибиотика составила 4 мкг/мл, что в разы превышает значения всех исследуемых препаратов. Однако абсолютное количество ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в растворе антибиотика после непродолжительного культивирования для рабочих растворов антибиотика с концентрацией от 256 мкг/мл до 4 мкг/мл в среднем оставалось на одном и том же уровне, что и для амикацина, гентамицина и пефлоксацина.

Наиболее эффективным из 5 антибактериальных препаратов оказался ципрофлоксацин. Значения абсолютного количества ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в растворе антибиотика после непродолжительного культивирования наименьшие среди амикацина, гентамицина, пефлоксацина и ципрофлоксацина. При этом минимальная подавляющая концентрация соответствует амикацину, гентамицину, пефлоксацину и составляет 2 мкг/мл.

[8 слайд]

Также представлены графики амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa*.

[9 слайд]

5. Путем встраивания участка гена 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* в плазмиду рAL-ТА был получен калибровочный образец с концентрацией  $2,5 \cdot 10^{10}$  копий ДНК/мл

6. При помощи калибровочного образца рAL-ТАрPseudAer16S можно измерить точное количество ДНК *Pseudomonas aeruginosa* выделенную из растворов антибиотика после непродолжительного культивирования.

7. По изменению количества ДНК *Pseudomonas aeruginosa*, в различных концентрациях антибактериальных веществ, после непродолжительного культивирования, можно количественно оценивать антибактериальную активность исследуемых соединений.

8. В результате применения калибровочного образца pAL-TAPseudAer16S было измерено количество ДНК *Pseudomonas aeruginosa*, выделенная из различных концентраций растворов амикацина, гентамицина, пefлоксацина, цiproфлоксацина после непродолжительного культивирования, в результате были получены минимальные подавляющие концентрации антибиотиков и отобран наиболее эффективный из них – цiproфлоксацин.

Работа выполнена при поддержке «Фонда содействия инновациям» по программе «УМНИК-Хелснет»



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

**ДВОРЕНКОВА АНАСТАСИЯ ДМИТРИЕВНА**

**РАЗРАБОТКА ПРЕЦИЗИОННОЙ ТЕХНОЛОГИИ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ  
ОЦЕНКИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ  
ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ОТНОШЕНИИ  
ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ**

Научный руководитель – д.м.н., зав. кафедрой фундаментальной и  
прикладной микробиологии Мавзютов А.Р.

Научный консультант – ассистент кафедры фундаментальной и  
прикладной микробиологии Швец К.Ю.

## Актуальность

### УСТОЙЧИВОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБИОТИКАМ –

#### ПОСЛЕДСТВИЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ:

- снижение эффективности профилактики и лечения инфекционных и паразитарных заболеваний;
- увеличение тяжести и длительности течения заболеваний;
- повышение смертности среди населения, гибель животных и растений.

**ВЫХОД** - поиск новых эффективных соединений и препаратов.

**РЕШЕНИЕ** - экспресс-тестирование антибактериальной активности неограниченного количества новых химических соединений.



## Цель исследования

Разработка способа ускоренной молекулярно-генетической оценки противомикробной активности антибактериальных препаратов на модели *Pseudomonas aeruginosa*.

## Задачи исследования

- ➔ Конструирование калибровочного образца рAL-TAPseudAer16S известной концентрации для количественной оценки антимикробной активности антибиотиков в отношении *Pseudomonas aeruginosa* с помощью метода ПЦР в режиме реального времени.
- ➔ Экспериментальная оценка сконструированного калибратора на антибактериальных препаратах (не менее 5).
- ➔ Разработка системы интерпретации результатов молекулярно-генетического анализа антибактериальной активности препаратов.
- ➔ Тестирование при помощи предложенной технологии новых химических соединений и субстанций, обладающих антимикробным действием.

## Материалы и методы

**Антибиотики:** амикацин (конечная концентрация 50 мг/мл), гентамицин (конечная концентрация 40 мг/мл), пefлоксацин (конечная концентрация 80 мг/мл), ципрофлоксацин (конечная концентрация 2 мг/мл) и цефтриаксон (конечная концентрация 100 мг/мл).

**Объект исследования:** чистая культура грамотрицательной бактерии *Pseudomonas aeruginosa* (штамм SS14 KC 866140).

**Методика сравнения:** определение МИК антибиотика методом серийных разведений в бульоне.

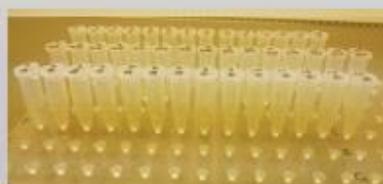
**Положительный контрольный образец:** векторная плазмида рAL-TA с вставкой участка генов 16S рPHK *Pseudomonas aeruginosa* с последующей трансформацией и наработкой плазмиды в клетках *E. coli* XL1-Blue.

Методом ПЦР в режиме реального времени выявляли количество ДНК (в ДНК копиях/мл) *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования в исследуемых веществах.

**Калибровочный образец:** плазмида рAL-TA (3,0 т.п.н.) со вставкой участка гена 16S рPHK *Pseudomonas aeruginosa* (270 п.н.), в результате чего была получена плазмида рAL-TAPseudAer16S с концентрацией  $2,5 \times 10^{10}$  копий ДНК/мл.

## Минимальные подавляющие концентрации (МИК) исследуемых антибиотиков

Антимикробный препарат	Концентрация в первой пробирке, мкг/мл	Концентрация в последней пробирке, мкг/мл	МИК, мкг/мл
Амикацин	25000	3,05	3,05
Гентамицин	20000	1,22	1,22
Пефлоксацин	40000	0,61	2,4
Цефтриаксон	50000	3,05	6,1
Ципрофлоксацин	1000	0,49	0,61



## Экспериментальная оценка сконструированного калибратора на антибактериальных препаратах

$$X_o = X_{or} \times (1+E)^{Ct_{or} - Ct_o}$$

где:

$X_o$  – концентрация матриц исследуемого образца (ГЭ/образец);

$X_{or}$  – стандартная начальная концентрация (копий ДНК/мл);

$E$  – эффективность РТ-ПЦР;

$Ct_{or}$  – пороговый цикл для стандартного образца;

$Ct_o$  – пороговый цикл для исследуемого образца.

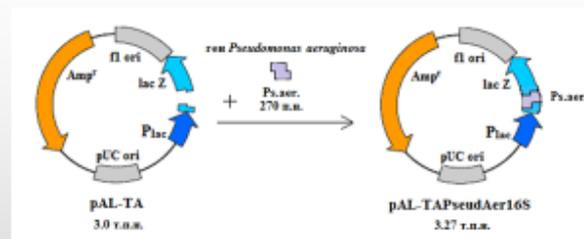


Рис.1. Клонирование участка гена 16S rRNA *Pseudomonas aeruginosa* в векторную плазмиду pAL-TA

## Абсолютное количество ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в растворах антибиотиков после непродолжительного культивирования (ГЭ/образец)

Антибактериальный препарат	Рабочие разведения антибактериальных препаратов								
	256,0 мкг/мл	128,0 мкг/мл	64,0 мкг/мл	32,0 мкг/мл	16,0 мкг/мл	8,0 мкг/мл	4,0 мкг/мл	2,0 мкг/мл	1,0 мкг/мл
<b>Амикацилин</b>	$1,3 \times 10^7$	$7,75 \times 10^6$	$9,38 \times 10^6$	$1,28 \times 10^7$	$1,01 \times 10^7$	$1,57 \times 10^7$	$1,17 \times 10^7$	<b><math>2,24 \times 10^7</math></b>	$2,31 \times 10^7$
<b>Гентамицин</b>	$8,9 \times 10^6$	$16,5 \times 10^6$	$14,3 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$1,35 \times 10^7$	$1,86 \times 10^7$	$1,67 \times 10^7$	<b><math>4,71 \times 10^7</math></b>	$3,09 \times 10^7$
<b>Пефлоксацин</b>	$8,53 \times 10^6$	$9,33 \times 10^6$	$1,38 \times 10^7$	$1,70 \times 10^7$	$2,30 \times 10^7$	$3,03 \times 10^7$	$1,79 \times 10^7$	<b><math>1,0 \times 10^7</math></b>	$3,43 \times 10^7$
<b>Цефтриаксон</b>	$2,93 \times 10^7$	$4,58 \times 10^6$	$2,27 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$2,09 \times 10^7$	$2,89 \times 10^7$	<b><math>1,91 \times 10^7</math></b>	$4,05 \times 10^7$	$3,22 \times 10^7$
<b>Ципрофлоксацин</b>	$4,2 \times 10^6$	$7,35 \times 10^6$	$7,6 \times 10^6$	$7,98 \times 10^6$	$9,25 \times 10^6$	$9,38 \times 10^6$	$1,72 \times 10^7$	<b><math>1,34 \times 10^7</math></b>	$2,72 \times 10^7$

## Графики амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* в растворах антибиотиков

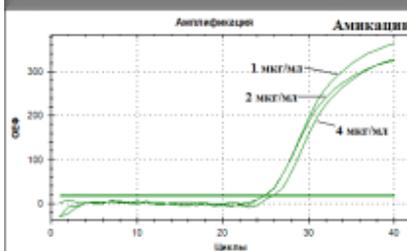


Рисунок 2 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования микроорганизма в рабочих растворах амикацина

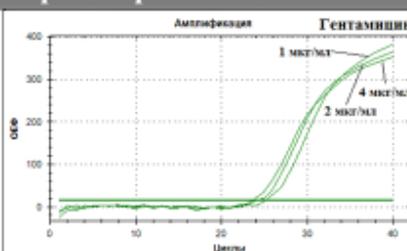


Рисунок 3 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования микроорганизма в рабочих растворах гентамицина

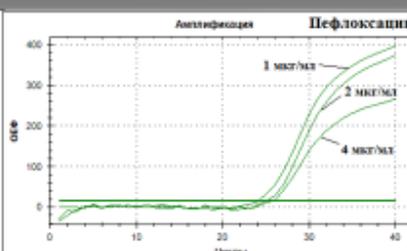


Рисунок 4 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования микроорганизма в рабочих растворах пефлоксацина

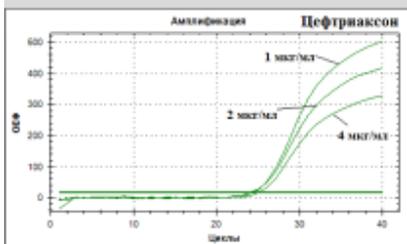


Рисунок 5 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования микроорганизма в рабочих растворах цефтриаксона

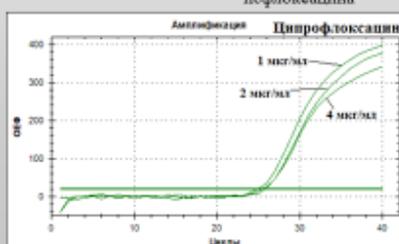


Рисунок 6 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* после непродолжительного культивирования микроорганизма в рабочих растворах ципрофлоксацина

## Выводы

1. Путем встраивания участка гена 16S рРНК *Pseudomonas aeruginosa* в плазмиду рAL-TA был сконструирован калибровочный образец рAL-TAPseudAer16S с конечной концентрацией  $2,5 \cdot 10^{10}$  копий ДНК/мл.
2. Калибровочный образец рAL-TAPseudAer16S для количественного определения ДНК *Pseudomonas aeruginosa* позволяет оценивать антимикробную активность, а также определять минимальные ингибирующие концентрации антибактериальных препаратов в отношении штаммов *Pseudomonas aeruginosa*.
3. В ходе экспериментальной оценки сконструированного калибратора рAL-TAPseudAer16S были протестированы антибактериальные препараты амикацин, гентамицин, пefлоксацин, ципрофлоксацин и цефтриаксон по разработанной методике непродолжительного культивирования в различных разведениях антибиотиков.
4. В результате исследования антибактериальной активности препаратов амикацина, гентамицина, пefлоксацина, ципрофлоксацина и цефтриаксона в отношении штамма *Pseudomonas aeruginosa* наиболее высокую активность проявлял антибиотик ципрофлоксацин (МИК=0,61 мкг/мл).

Работа выполнена при поддержке «Фонда содействия инновациям» по программе «УМНИК-Хелснет»

## Апробация результатов



1. Швец К.Ю., Хакимова Л.Р. Дворенкова А.Д., Загафуранова А.Т., Мавзютов А.Р. Конструирование молекулярно-генетического стандарта для изучения концентрации грамположительных бактерий. Проблемы медицинской микологии, 2018; 20(2):128-129
2. Швец К.Ю., Бахтиева А.Р., Загафуранова А.Т., Дворенкова А.Д., Третьякова Е.В. Антимикробная активность новых химических соединений. Вестник Башкирского государственного медицинского университета. Сетевое издание ISSN 2309-7183; приложение №3, 2018; 1142-1146
3. Дворенкова А.Д., Швец К.Ю., Хакимова Л.Р. Набор калибраторов для количественной экспресс-оценки содержания *Pseudomonas aeruginosa* в различных средах без выделения их в чистой культуре «*Pseudomonas screen – RQ*». Вестник Башкирского государственного медицинского университета. Сетевое издание ISSN 2309-7183; приложение №3, 2018; 1813-1816