

Разработка панели генно-инженерных калибраторов для количественной оценки антимикробной активности химических соединений на платформе ПЦР в режиме реального времени в отношении *Pseudomonas aeruginosa*

Научный руководитель – Баймиев Андрей Ханифович

Хабирова А.Д.¹, Швец К.Ю.²

1 - Башкирский государственный университет, Уфа, Россия, *E-mail: ndvorenkova@mail.ru*; 2 - Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия, *E-mail: kseniya.shvets@yandex.ru*

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. Следственно, вопрос наиболее быстрого определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам становится очень важным.

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

Материалы и методы. Для проведения молекулярно-генетической оценки антимикробной активности в отношении грамотрицательной бактерии *Pseudomonas aeruginosa* (штамм SS14 KC 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). 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. Для выделения тотальной ДНК микроорганизмов использовали ионообменную смолу Chelex100. Определение количества копий ДНК проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green I (ООО «СИНТОЛ»).

Результаты. 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).

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. Затем проводили количественную ПЦР в режиме реального времени. 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.

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, пefлоксацином и цефтриаксоном. Минимальная подавляющая концентрация для данного антибиотика составила 2 мкг/мл.

Таким образом, разработанная нами методика позволит производить комплексную оценку противомикробной активности новых химических соединений с помощью метода ПЦР в режиме реального времени при этом ускоряя процесс лечения инфекционных заболеваний благодаря подбору наиболее эффективного препарата в короткие сроки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по программе «УМНИК ХЕЛСНЕТ НТИ»-2017, Москва.