

## МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ И АНТИСЕПТИКОВ IN VITRO

*Адамович Т. Г., Гаврилова И. А., Кирильчик Е. Ю.*

*УО «Белорусский государственный медицинский университет»*

*Минск, Беларусь*

*microbiol@bsmu.by*

*В последние годы растет интерес к исследованиям и разработке новых противомикробных средств для борьбы с резистентностью микроорганизмов. Поэтому большое внимание уделяется методам скрининга и оценки антимикробной активности. Некоторые методы, такие как диффузионный метод, метод серийных разведений в питательных средах, хорошо известны и широко используются, но другие, такие как проточная цитофлуориметрия и биOLUMИнесцентные методы, широко не используются, поскольку они требуют специального оборудования и дальнейшей оценки воспроизводимости и стандартизации. В этой статье представлен обзор методов тестирования чувствительности к противомикробным препаратам in vitro.*

**Ключевые слова:** *метод диффузии в агар; антимикробная активность; time-kill assay; метод перпендикулярных штрихов.*

## METHODS FOR STUDYING ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ANTIBIOTICS AND ANTISEPTICS IN VITRO

*Adamovich T. G. GavriloVA I. A., Kirilchik E. Yu.*

*Belarussian State Medical University*

*Minsk, Belarus*

*In recent years, there has been a growing interest in research and development of new antimicrobial agents to combat microbial resistance. Therefore, much attention is paid to methods of screening and assessment of antimicrobial activity. Some methods, such as the diffusion method, the method of serial dilution in culture media, are well known and widely used, but others, such as flow cytometry and bioluminescence methods, are not widely used because they require special equipment and further evaluation of reproducibility and standardization. The article provides an overview of in vitro methods for testing antimicrobial susceptibility.*

**Key words:** *agar diffusion method; antimicrobial activity; time-kill assay; perpendicular stroke method.*

Антимикробные соединения и субстанции широко используются в биофармацевтической и медицинской промышленности для деконтаминации поверхностей (объекты внешней среды, оборудование, устройства, растворы) и для уничтожения патогенов в живых организмах. Количественные методы определения микробицидного эффекта многочисленны и отличаются в промышленности и здравоохранении. По-прежнему актуальными являются унификация и стандартизация методов с учётом их воспроизводимости и достоверности. В этой статье мы стремились дать характеристику и сравнительную оценку существующим методам определения антимикробной эффективности антибиотиков и антисептиков *in vitro*.

Существующие аналитические методы исследования антимикробной активности можно условно разделить на методы, основанные на прямом подсчёте количества микроорганизмов, выживших после воздействия антимикробного средства / мероприятия, и те, которые учитывают наличие жизнеспособности микроорганизмов (видимый рост, способность к размножению, окислительно-восстановительный потенциал и др. признаки) после антимикробного воздействия [6]. Традиционно все методы исследования также классифицируют по процедурам проведения эксперимента.

Оценка антибиотикочувствительности, независимо от конкретного метода, предполагает последовательное выполнение нескольких этапов: приготовление питательных сред и суспензии исследуемых микроорганизмов (инокулюма), инокуляцию, инкубацию, учет и интерпретацию результатов, формулировку рекомендаций по лечению.

Диффузионные методы включают также этап наложения дисков или полосок Е-теста на плотную питательную среду [4]. Несомненным достоинством диффузионных методов является простота тестирования и доступность выполнения в любой бактериологической лаборатории. Однако с учетом высокой стоимости Е-тестов для рутинной работы обычно используют диско-диффузионный метод.

Для определения противомикробной активности различных веществ или антагонизма между микроорганизмами применяют методы диффузии из агаровых блоков или лунок агара. Данные методы удобны тем, что выращивание штаммов-антагонистов и тест-культур производится на разных питательных средах.

Для быстрого скрининга микробного антагонизма используется метод перпендикулярных штрихов, при котором на поверхность агаризованной среды в чашке Петри засевают штрихом исследуемый микроб-антагонист, продуцирующий антибактериальное вещество. После завершения роста и диффузии продуцируемого вещества в агаризованную среду, перпендикулярно к выросшему штриху, подсевают штрихами тест-культур. Если изучаемый микроорганизм-антагонист образует вещество, оказывающее антимикробное действие в отношении тест-культур, то рост последних будет начинаться на некотором расстоянии от роста самого антагониста. Чем больше это расстояние, тем более чувствительна тест-культура к продуцируемому антибиотическому веществу. Нечувствительные микроорганизмы будут развиваться в непосредственной близости от штриха.

Наиболее распространенным методологическим подходом для количественной оценки антимикробной активности, является метод подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) на агаризованных средах при высеве серийных разведений тест-образца [3]. Этот метод прост в исполнении и может быть выполнен с минимальными экономическими затратами в лабораториях любой оснащенности. Однако он требует много времени и трудоёмок. Кроме того, оценка роста на питательных средах не учитывает возможности наличия жизнеспособных, но некультивируемых клеток. Это состояние микроорганизмов может быть индуцировано стрессом, например, при

воздействии антимикробного соединения в сублетальной концентрации. Такие клетки имеют неповрежденные мембраны и геномный материал, но их метаболические функции могут отличаться от жизнеспособных, культивируемых клеток, и они больше не могут расти на стандартных средах. Такие некультивируемые формы патогенов могут представлять опасность для здоровья населения с учётом возможности реверсии в исходное состояние.

Преимуществами микрометода разведений является высокая производительность и возможность длительного хранения заранее приготовленных планшет. Тестирование проводят при величине конечного объема 0,2 мл и меньше, что позволяет значительно сократить количество расходных материалов. Методика не имеет отличий от макрометода, за исключением используемых объемов питательного бульона с разведениями антибиотиков и инокулюма, но требует дополнительного оснащения лаборатории.

В качестве индикатора роста бактерий чаще всего используют соли тетразолия или аламаровый синий (ресазурин). Они являются индикаторами окислительно-восстановительного потенциала, который используется для оценки метаболической функции клеток. Учет изменения цвета проводят на спектрофотометре.

Флуоресцентные красители (пропидия йодид, SYTO19 и др.) используются в различных методах в качестве быстрого способа дифференциации жизнеспособных и нежизнеспособных клеток в популяции. Одним из таких методов является проточная цитометрия. Распространенным тестом является анализ жизнеспособности LIVE / DEAD BacLight, в котором используется йодид пропидия для окрашивания клеток с поврежденными мембранами и SYTO19, который может проникать через поврежденные и неповрежденные мембраны [1]. Этот метод позволяет дать быструю количественную оценку жизнеспособности бактериальной популяции, отличается точностью и поддается стандартизации. Однако проточная цитометрия требует дорогостоящего оборудования, реактивов, обучения персонала для грамотной калибровки инструментов и анализа данных.

Для изучения антимикробной активности растительных экстрактов значительными преимуществами обладает тонкослойная хроматография (ТСХ) - биоавтография. Во время исследования исследуемое вещество разделяется по пластине с помощью ТСХ. Затем смесь расплавленного агара и тест-микроорганизма выливают на поверхность пластинки и инкубируют в подходящих для микроорганизма условиях. Для учета пластинку обрабатывают раствором йодонитротетразолия хлорида, который окрашивает в розовый цвет зоны с ростом бактерий и становится бесцветным в зоне ингибирования роста бактерий.

К современным методам диагностики относится time-kill assay, с построением кривой зависимости «время — летальное действие» [7]. Исследование проводится для оценки сокращения микробной популяции тестируемых организмов после воздействия исследуемого противомикробного агента *in vitro*. Испытуемый образец или его разведение приводят в контакт с известной популяцией микроорганизмов в течение определенного периода

времени при определенной температуре. Затем испытуемый образец нейтрализуется в заданное время отбора проб и подсчитывают выжившие организмы. Рассчитывают процент и / или  $\log_{10}$  снижения либо от исходной микробной популяции, либо от отрицательного контроля.

В последние годы для определения противомикробной эффективности всё шире используются молекулярно-генетические методы, такие, например, как количественная полимеразная цепная реакция (кПЦР). Преимуществами таких методов являются отсутствие необходимости культивирования микроорганизмов, быстрота, стандартизируемость и возможность дифференциации клеток по жизнеспособности [2]. Методика предполагает инкубацию образцов с ДНК-связывающим красителем (моноазид пропидия). Краситель связывается со свободной ДНК клеток с поврежденными мембранами, что препятствует дальнейшей амплификации при постановке ПЦР, таким образом в ходе реакции будут реплицироваться только геномный материал жизнеспособных бактерий, если такие сохранились после воздействия антимикробного средства.

Таким образом, определение антимикробной активности антибиотиков и антисептиков *in vitro* имеет существенное значение для клинической медицины, внося значительный вклад в определении конечного исхода заболевания. Унификация и стандартизация подходов к изучению антимикробной активности антибиотиков и антисептиков *in vitro* позволяет повысить воспроизводимость данных методов, что имеет важное значение в клинической практике.

### Список литературы

1. Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann HU and Egli T., Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry. Appl Environ Microbiol. 2007; 73: 3283–90. <https://doi.org/10.1128/AEM.02750-06> PMID: 17384309
2. Cangelosi GA, Meschke S. Dead or alive: Molecular assessment of microbial viability. Appl Environ Microbiol 2014; 80: 5884–91. <https://doi.org/10.1128/AEM.01763-14> PMID: 25038100
3. CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard, 9th ed., CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012
4. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 7th ed., CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.
5. Guschin A., Ryzhikh P., Rummyantseva T. Treatment efficacy, treatment failures and selection of macrolide resistance in patients with high load of *Mycoplasma genitalium* during treatment of male urethritis with Josamycin. BMC Infect. Dis. 2015;15:p.1–7.

6. Jorgensen J.H., Ferraro M.J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin. Infect. Dis.* 2009;49: p.1749–1755.

7. Pfaller M.A., Sheehan D.J., Rex J.H. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004;17: p. 268–280.