

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ МЕТОДОМ ОЦЕНКИ ОСЦИЛЛЯЦИЙ КАНТИЛЕВЕРА АТОМНО-СИЛОВОГО МИКРОСКОПА

*Судакова И.С. \*, Фомичев О.И. \*\*, Крюков Р.Н. \*\*, Плескова С.Н. \* \*\**

*\*Нижегородский государственный технический университет  
им.Р.Е.Алексеева,*

*\*\*Национальный исследовательский Нижегородский государственный  
университет им. Н.И. Лобачевского  
Нижний Новгород, Россия  
nntu@nntu.ru*

*В публикации обозначена проблема распространения антибиотикорезистентности и предложена новая методика ее решения. Использование высокочувствительной атомно-силовой микроскопии позволяет детектировать осцилляции кантилевера, возникающие вследствие метаболизма бактерий. Наблюдалось увеличение амплитуды колебаний кантилевера с адгезированными *Escherichia coli* по сравнению с контролем и образцом после воздействия гентамицина.*

*Ключевые слова: антибиотикорезистентность, бактерии, атомно-силовая микроскопия, антибиотикотерапия, кантилевер, осцилляции.*

## DETERMINATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE BY THE METHOD OF EVALUATING THE OSCILLATIONS OF THE CANTILEVER OF ATOMIC FORCE MICROSCOPE

*Sudakova I.S. \*, Fomichev O.I. \*\*, Kryukov R.N. \*\*, Pleskova S.N. \*\*\* \**

*\*Nizhny Novgorod State Technical University named after R.E. Alekseev,  
\*\* Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod  
Nizhny Novgorod, Russia*

*The publication outlines the problem of the spread of antibiotic resistance, authors proposes a new method for solving it. The use of highly sensitive atomic force microscopy makes it possible to detect cantilever oscillations arising from the metabolism of bacteria. An increase in the amplitude of oscillations of the cantilever with adhered *Escherichia coli* was observed as compared to the control and the sample after exposure to gentamicin.*

*Key words: antibiotic resistance, bacteria, atomic force microscopy, antibiotic therapy, cantilever, oscillations.*

Одной из актуальных проблем современной антибиотикотерапии является распространение приобретенной устойчивости бактерий к антибактериальным препаратам [1]. Распространение бактерий, резистентных к антибиотикам, ведет за собой неуклонный рост заболеваний, трудно поддающихся лечению.

Используемые в настоящее время методы обнаружения и характеристики бактериальной резистентности к антибиотикам имеют значительные недостатки. Используемый повсеместно классический диско-диффузионный тест дает ответ на вопрос, к каким из предложенных антибиотиков

чувствителен выделенный штамм, только спустя 5 – 7 дней с момента забора материала на анализ. В период проведения анализа пациентам обычно назначается этиотропная терапия – в основном антибиотики широкого спектра действия, что способствует усугублению ситуации с внутрибольничными полирезистентными штаммами. ПЦР-диагностика сокращает время анализа до 6 часов, но метод является дорогостоящим, так как необходимо использование дорогостоящих праймеров, а в случае неправильного выбора праймера можно установить ложную резистентность.

В 2013 г. группой проф. С. Казаса продемонстрировано, что колебания наномеханического сенсора (кантилевера) высокочувствительного атомно-силового микроскопа коррелируют с наличием микроорганизмов на его поверхности и могут быть использованы для обнаружения низких концентраций бактерий, характеристики их метаболизма и реакции на антибиотики [2]. Амплитуда колебаний кантилевера увеличивается, если на нем адгезированы метаболически активные бактерии [3, 4].

Целью данной работы являлась разработка методики, позволяющей быстро и безошибочно определить чувствительность/устойчивость бактерий к антибиотикам. Перед началом работы были установлены следующие задачи: разработать метод фиксации бактерий на кантилевере, оптимизировать систему регистрирования осцилляций, обработать полученные данные, выбрав физические параметры для корректного и наглядного представления результатов.

Штамм бактерий *Escherichia coli* 321 выращивали в LB среде, являющейся стандартом для выращивания *Escherichia coli* (37°C, 18 часов). Суспензию трижды отмывали центрифугированием в стерильной LB среде (450g, 5 мин) и стандартизировали по концентрации до значения  $10^9$  кл/мл на спектрофотометре при длине волны  $\lambda=670$  нм (СПЕКС-ССП, Спектроскопические системы, Россия), что соответствовало 10 МЕ.

Для обеспечения прочного прикрепления живых биологических образцов, кантилевер необходимо обработать специальными агентами. Фиксирующие агенты не должны давать бактериям возможности десорбироваться с поверхности кантилевера, но в то же время не должны ограничивать метаболическую активность бактерий, что может отразиться на амплитуде колебаний кантилевера. Были апробированы два вида фиксации: 0,5% глутаровым альдегидом (Pancreas, Испания) и 0,01% поли-L-лизинном (Merck, США). Аккуратно наносили на А-MLCT кантилевер (Bruker, США) фиксирующий агент на 10 минут, после чего трехкратно отмывали дистиллированной водой. После этого кантилевер инкубировали с суспензией бактерий (37°C, 30 мин) для клеточной адгезии. Для оценки среднего уровня шума, в котором проводится эксперимент, а также для определения амплитудно-частотной характеристики применяемого кантилевера в качестве контроля выступал кантилевер, обработанный фиксирующим агентом без бактерий.

Кантилевер устанавливали в холдер атомно-силового микроскопа NTegra (NT-MDT, Россия) и погружали в аналитическую камеру, заполненную 5 мл стерильного LB-бульона, после чего снимали аналитический сигнал DFL

(difference signal between top and bottom halves of the photodiode – разностный сигнал между верхним и нижним участками фотодиода) в течение 15 минут в режиме «Oscilloscope».

После экспозиции кантилевера с бактериями из аналитической камеры отбирали 2 мл LB-бульона и вносили в нее 2 мл 4%-го раствора гентамицина (конечная концентрация 16 мг/мл). Измерение DFL в среде с антибиотиком проводились в течение 1 часа. Полученный массив данных обрабатывали в программе OriginPro 8 SR4 v8.0951. С помощью Фурье-фильтра из аналитического сигнала удаляли колебания с частотами выше 1 Гц (колебания электросети и другие внешние колебания). Производили определение стандартного отклонения и дисперсии для каждого опыта.

#### Результаты и обсуждение

Было апробировано два фиксирующих агента: 0,5% глутаровый альдегид и 0,01% поли-L-лизин. В случае использования глутарового альдегида значительного изменения в нановибрациях контрольного кантилевера, покрытого только глутаровым альдегидом, и кантилевером, на котором с помощью глутарового альдегида фиксированы бактерии не обнаружено (рис. 1а, 1б).

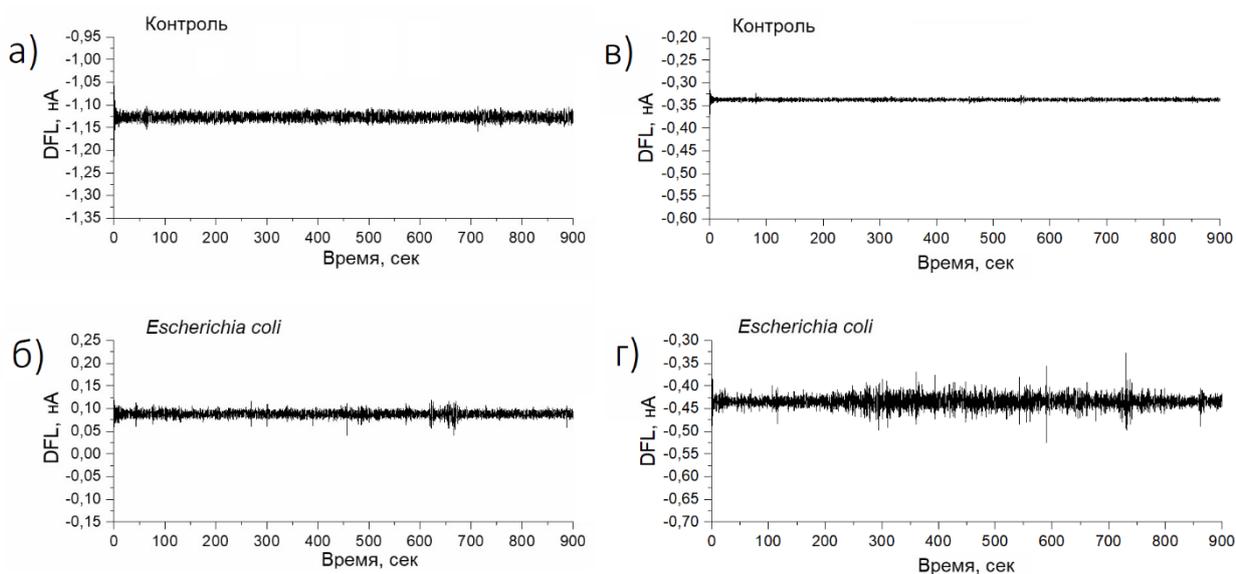


Рисунок 1. Кривые колебаний кантилевера: а) кантилевер без бактерий, обработанный 0,5% глутаровым альдегидом, б) кантилевер с фиксированными на нем 0,5% глутаровым альдегидом *E.coli*, в) кантилевер без бактерий, обработанный 0,01% поли-L-лизином, г) кантилевер с фиксированными на нем 0,01% поли-L-лизином *E.coli*

В случае использования поли-L-лизина (рис. 1в, 1г) различия осцилляций в контроле и в опыте были существенными, поэтому дальнейшие измерения проводили с ним. Причиной является механизм фиксации поли-L-лизина, он осуществляет связывание с отрицательно заряженной поверхностью клеточной стенки через электростатические «слабые» взаимодействия [5].

На рисунке 1(г) очевидно увеличение амплитуды колебаний по сравнению с пустым кантилевером. Это подтверждает то, что нам удалось

зафиксировать осцилляции, вызванные непосредственно метаболически активными бактериями.

В качестве параметра сравнения полученных опытов была выбрана дисперсия, значения которой характеризуют, насколько сильно отклоняется амплитуда колебаний от средних значений. По полученным значениям дисперсии установлено, что после адгезии бактерий на кантилевере амплитуда колебаний возрастает, однако после добавления антибиотика в аналитическую камеру, колебания затухают и сравнимы с контрольными.

Апробирование данной методики показало, что использование кантилевера атомно-силового микроскопа в режиме «Oscilloscope» для детекции антибиотикорезистентности бактерий является высокоэффективной методикой, позволяющей получить результат в течение 1-2 часов.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ проекта 16-14-10179).*

### **Список литературы**

1. Lerminiaux, N. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments / N. Lerminiaux, A. Cameron // Canadian Journal of Microbiology. – 2018. – Vol. 65, N 1. – P. 34-44.
2. Longo G. Rapid detection of bacterial resistance to antibiotics using AFM cantilevers as nanomechanical sensors / Longo G., L. Alonso-Sarduy, L. Rio, A. Bizzini et al. // Nature nanotechnology. – 2013. – Vol. 8, N 7. – P. 522-526.
3. Boisen A. Cantilever-like micromechanical sensors / A. Boisen, S. Dohn, S. S. Keller et al. // Reports on Progress in Physics – 2011. – Vol. 74, N 3. – P. 36-101
4. Tamayo J. Biosensors based on nanomechanical systems / J. Tamayo, P. M. Kosaka, J. J. Ruz et al. // Chemical Society Reviews – 2013. – Vol. 42, N 3. – 49 p.
5. Pleskova S. N. The interaction between human blood neutrophil granulocytes and quantum dots / S. N. Pleskova, E. R. Mikheeva, E. E. Gornostaeva // Micron – 2018. – Vol. 105, P. 82-92.