

Определение резистентности бактерий к антибиотикам и наночастицам методами сканирующей зондовой микроскопии

Докладчик: Сагитова Алсу Вакифовна

Научный руководитель: профессор, д.ф.-м.н.

Яминский Игорь Владимирович

Антибиотикорезистентность

Устойчивость к антибиотикам может развиваться в результате естественного отбора посредством случайных мутаций и/или благодаря воздействию антибиотика

Полирезистентность — устойчивость микроорганизмов к двум и более антибактериальным препаратам

Причины развития устойчивости микроорганизмов к антибиотикам:

1. Необоснованное назначение антибактериальных средств
2. Ошибки в выборе антибактериального препарата
3. Ошибки в выборе режима дозирования антибактериального препарата
4. Ошибки комбинированного назначения антибиотиков
5. Ошибки, связанные с длительностью антибактериальной терапии

Методы определения

резистентности

- **Диффузия в агар по Kirby – Bauer (метод дисков)**

После посева выделенного штамма микроорганизма на плотную питательную среду на нее же наносятся бумажные диски, содержащие определенную концентрацию антимикробного препарата

- **Серийные разведения**

Методика серийных разведений предполагает приготовление серии разведений антимикробного препарата в жидкой или плотной питательной среде. Полученные таким образом среды с антибиотиком засеваются определенным объемом культуры исследуемого микроорганизма. После инкубации оценивается наличие или отсутствие видимого роста

- **Генетическая идентификация мутаций резистентности**

Метод генетической идентификации мутаций резистентности позволяет непосредственно выявлять наличие у выделенных микроорганизмов генов, отвечающих за формирование устойчивости к антибактериальному препарату

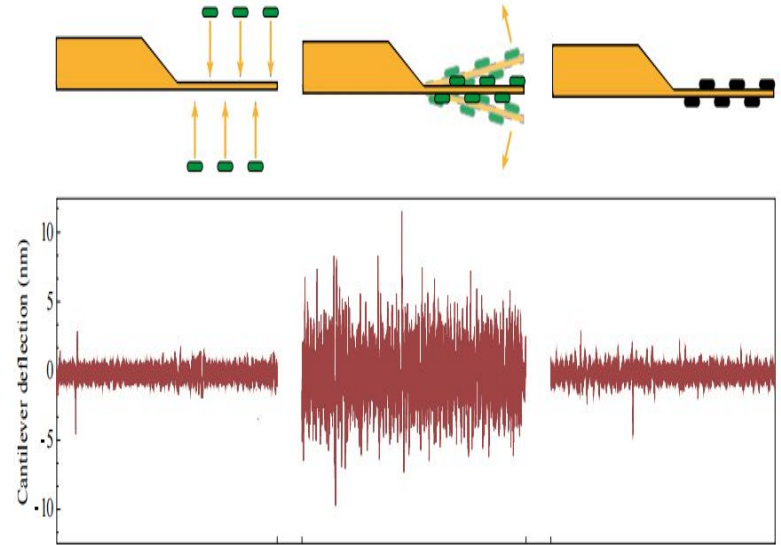
Новая медицинская аппаратура

Кантилевер и бактерии

Перед нанесением бактерий колебания малы +/- 1-2 нм **(слева)**

Бактерии иммобилизованы на кантилевер колебания увеличиваются +/- 5-10 нм **(в центре)**

После гибели организмов в результате химического или физического агента колебания уменьшаются +/- 1-2 нм **(справа)**



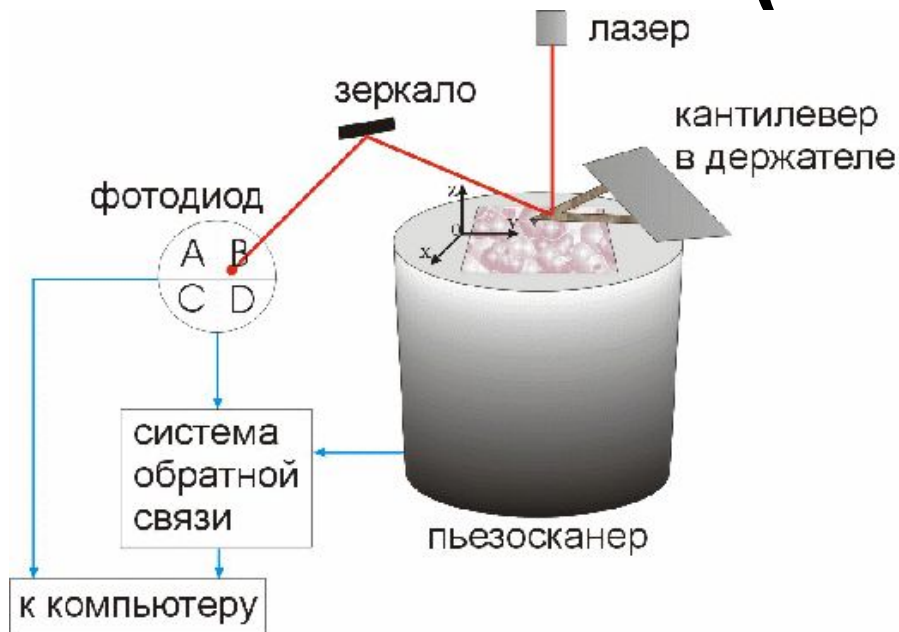
Недостатки метода

- Измерения на кантилевере, сложная пробоподготовка
- Влияние лазерного излучения
- Отсутствие контроля осаждения бактерий на кантилевере

Задачи на 2 года

- Определить спектр колебаний живой бактерии различными методами: атомно-силовой микроскопией, сканирующей капиллярной микроскопией
- Решить проблему фиксации бактерий на подложке в условиях протока биологической жидкости
- Определить особенности изменения спектра колебаний мембраны бактерий под воздействием антибиотиков

Атомно-силовая микроскопия (АСМ)

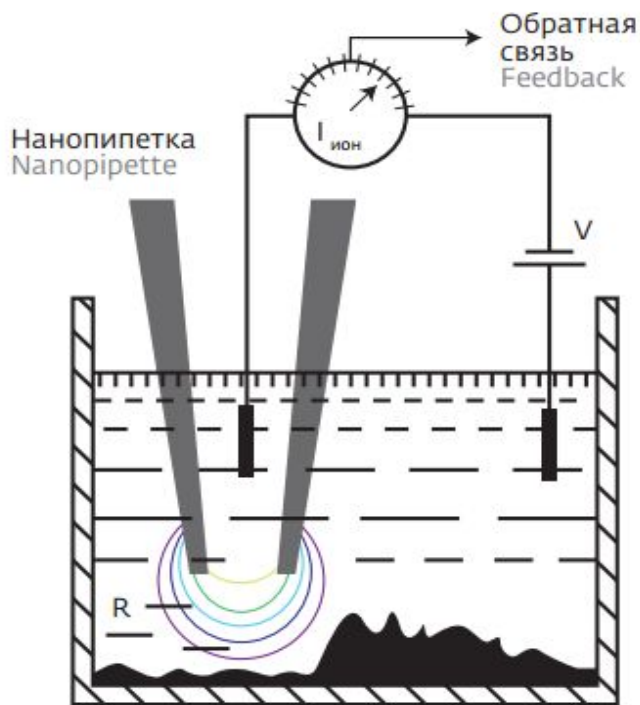


1. Микроскопический зонд
2. Пьезоэлектрические двигатели
3. Электронная цепь обратной связи
4. Компьютерная система
5. Оптическая система регистрации малых изгибов консоли кантилевера

Возможность дополнительного контроля по механическим параметрам: упругость, трение, адгезия и геометрическим параметрам: линейные размеры, площадь, объем, форм-фактор, шероховатость и их изменение во времени

Разрешающая способность АСМ определяется качеством зонда и чувствительностью системы регистрации отклонений кантилевера

Сканирующий ион-проводящий микроскоп (СИПМ)



Нанопипетка устанавливается над поверхностью непроводящего образца в растворе электролита. Между двумя хлор-серебряными электродами под действием внешнего напряжения течет ионный ток (один электрод находится внутри нанопипетки, другой – снаружи в электролите). Вдали от поверхности ток максимален, при приближении – начинает уменьшаться. Таким образом, не касаясь поверхности, нанопипетка "считывает" исследуемый рельеф

Возможность локально доставлять антибиотик на бактерию. Встроенные в капилляр электрохимические электроды для определения изменения содержания веществ вблизи клеточной стенки. Дешевые расходные материалы – капилляры. Отсутствие лазера.

Метод является бесконтактным и позволяет выполнять "живое" сканирование

Схема эксперимента АСМ

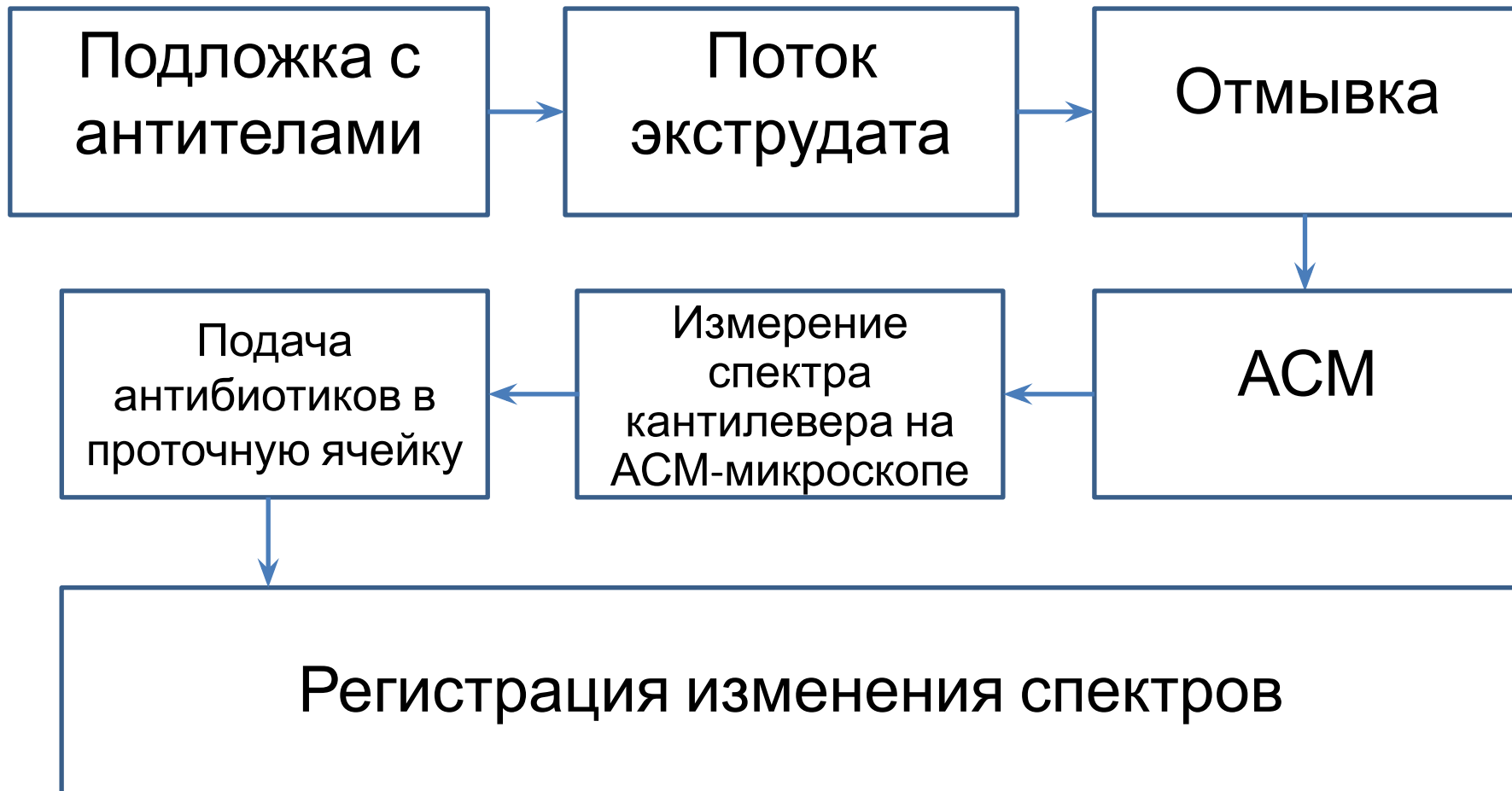


Схема эксперимента СИПМ

- Капилляр с 2-7 каналами
- Каналы находятся на расстоянии 1-10 нм
- Подача антибиотиков через каналы
- Наблюдение за бактерией в жидкости (электролите) с микронным и нанометровым пространственным разрешением



Преимущества

АСМ	СИПМ
Высокое быстродействие	Отсутствие силового воздействия

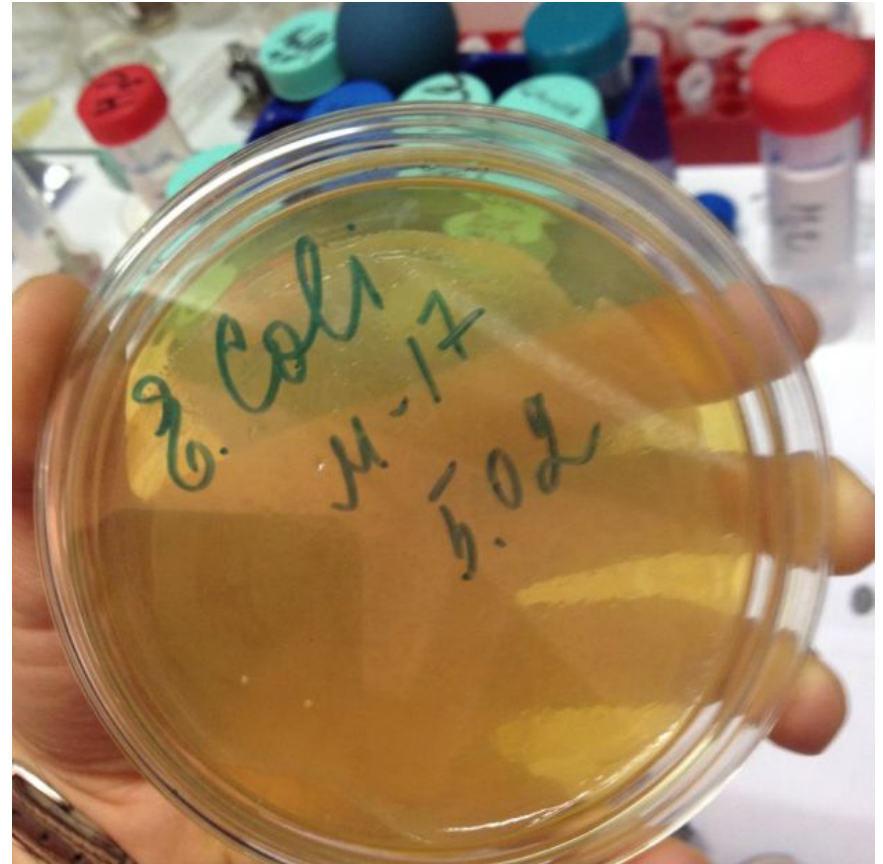
Оптимизация

АСМ	СИПМ
Жесткости и геометрии кантилевера	Диаметр капилляра

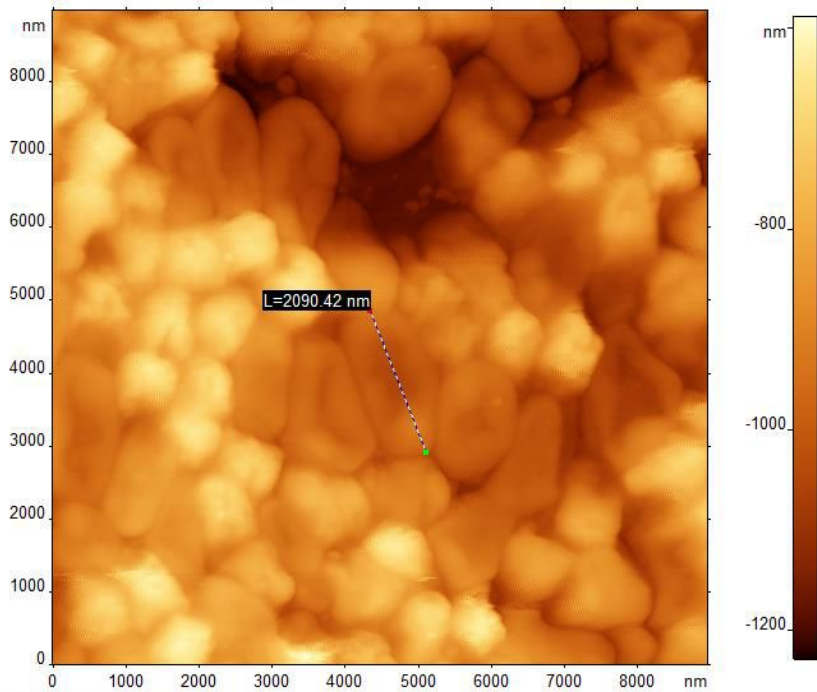
Пробоподготовка бактерий

Варианты подготовки проб бактерий:

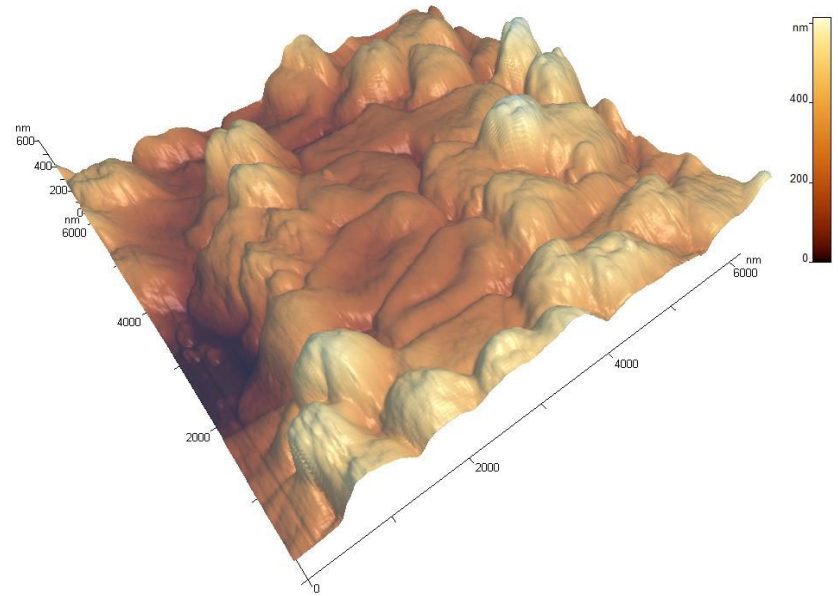
1. без компонентов на природной слюде
2. фиксация глутаровым альдегидом
3. обработка полилизинном покровные стекла



АСМ бактерий



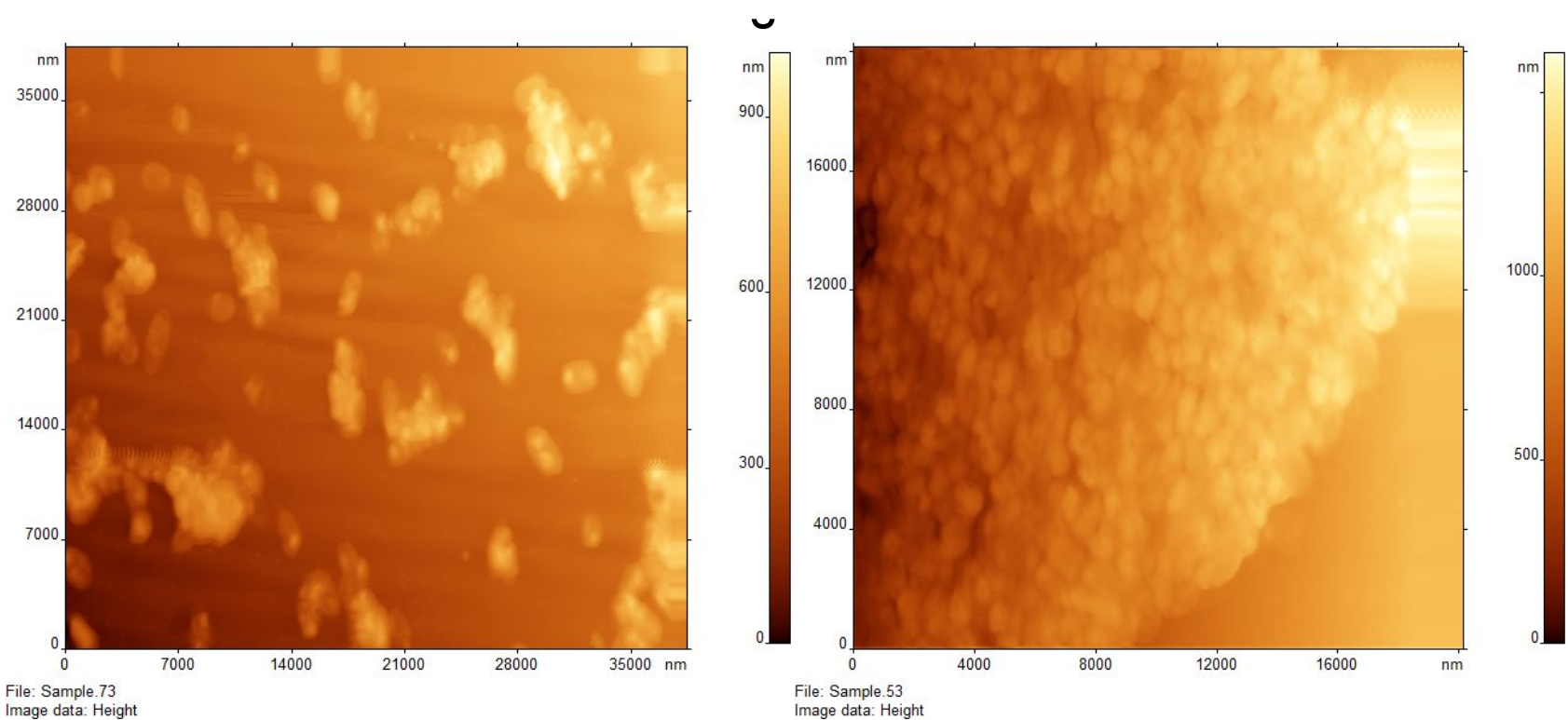
АСМ-изображение штамма *E.coli* M-17.
Топография. Измерения длины одиночной
бактерии



АСМ 3D-изображение штамма бактерий
E.coli M-17. В режиме боковой подсветки

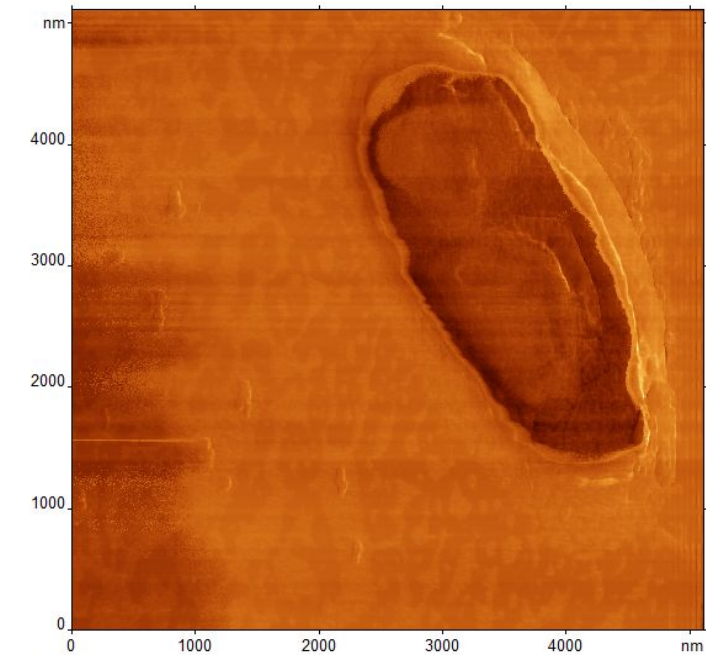
АСМ бактерий с наночастицами

Оксид цинка – антибактериальные

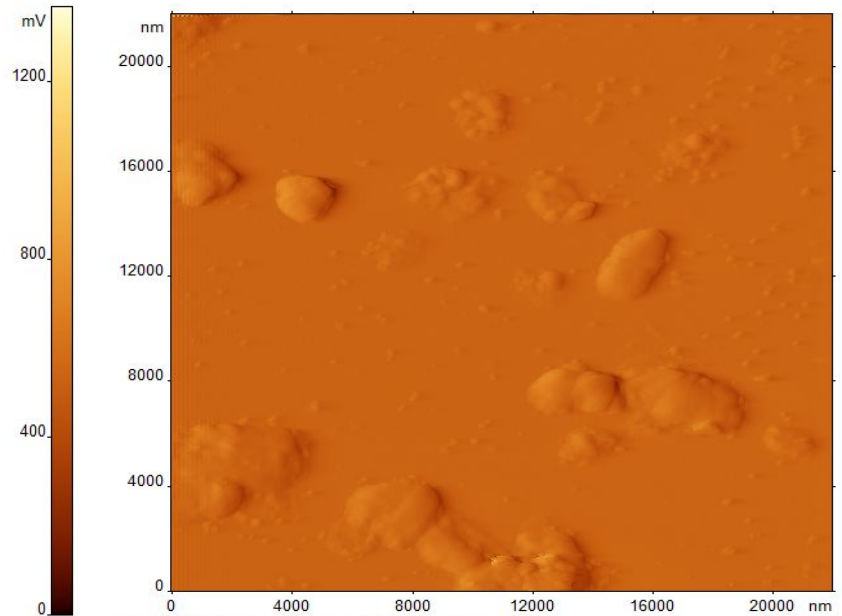


АСМ-изображения штамма *E.coli* M-17 с наночастицам оксида цинка. Топография.

АСМ бактерий с наночастицами



File: Sample.84
Image data: Friction



Файл: 2016.03.11 Бактерии E.coli M17.plane.359
Данные изображения: Height

АСМ-изображения штамма E.coli M-17 с наночастицам оксида цинка. Топография. Режим трения и отклонения

Проточная термостатированная ячейка

- Условия для определения жизнеспособности микроорганизмов, и воздействия антибиотиков
- Для фиксации биологических образцов в жидкости и проведение «живого» сканирования
- Поддержание физиологических условий

Публикации

- View of the bacterial strains of Escherichia coli M-17 by means of atomic force microscopy/ Yaminsky I., Meshkov G., Sagitova A.// Школа-конференция с международным участием "Saint-Petersburg OPEN 2016", Санкт-Петербург, Россия, 28-30 марта 2016
- Расширенные тезисы в IOP Journal of Physics: Conference Series

Список литературы

- Butt, H.J., Cappella, B., Kappl, M. Surf. Sci. Rep., 59, 1–152 (2005)
- Gross L., Mohn F., Moll N., Liljeroth P., Meyer G. The chemical structure of a molecule resolved by atomic force microscopy. Science 325, 1110–1114 (2009)
- Yaminsky I., Filonov A., Sinitsyna O., Meshkov G. FemtoScan Online software. Nanoindustry, N2 (64), 42-46 (2016)

Спасибо за внимание!

