

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

**ФОРМИРОВАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ
*STREPTOCOCCUS SPP.***



Выполнил: Алибаков Салават Халилович
Направление подготовки 06.04.01
Биология

Руководитель: Баймиев Андрей
Ханифович, д.б.н., профессор кафедры
фундаментальной и прикладной
микробиологии

Выпускная квалификационная
работа допущена к защите:
«17» 06 2025 г.

Выпускная квалификационная работа
защищена с оценкой «отлично»
«24» 06 2025 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений	4
ВВЕДЕНИЕ.	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1.Инфекционные заболевания, вызываемые грамположительными бактериями	9
1.2.Антибиотики с выраженной активностью в отношении грамположительных бактерий	12
1.3.Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам	15
1.3.1.Диско-диффузионный метод (ДДМ)	15
1.3.2.Метод серийных разведений	17
1.3.3.Эпсилометрический тест (Е-тест)	19
1.3.4.ДНК-ДНК-гибридизация для выявления генов антибиотикорезистентности	19
1.3.5.Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	21
1.3.6.ПЦР в реальном времени (РТ-ПЦР)	22
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	25
2.1.Объекты исследования	25
2.2.Приготовление питательных сред для культивирования <i>Streptococcus sobrinus</i>	30
2.3.Конструирование положительного образца	36
2.4.Выделение бактериальной ДНК из выросших колоний	36
2.5.Проведение стандартной полимеразной цепной реакции (ПЦР)	37
2.6.Электрофретическая детекция продуктов амплификации	38
2.7.Проведение ПЦР в режиме реального времени (РТ-ПЦР)	40
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	42
3.1.Конструирование калибратора для количественной оценки содержание <i>Streptococcus sobrinus</i>	42

3.2.Определение величины минимальной подавляющей концентрации (МИК) исследуемых антибиотиков	48
3.3.Экспериментальная оценка сконструированного калибратора на антибактериальных препаратах	50
3.4.Молекулярно-генетическая оценка антимикробной активности исследуемых антибиотиков	54
ВЫВОДЫ	66
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	67
ПРИЛОЖЕНИЕ	75

Список сокращений и условных обозначений

АБП – антибактериальный препарат

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ДДМ – диско-диффузионный метод

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КОЕ - Колониеобразующая единица

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

МПК - минимальная подавляющая концентрация

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РТ-ПЦР - полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Е-тест - эпсилометрический тест

РНК – рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

ДМСО – диметилсульфоксид

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Инфекционные заболевания являются серьезной проблемой здравоохранения. Ежегодно инфекции бактериальной этиологии уносят сотни тысяч жизней, а многие переболевшие получают неизлечимые осложнения на всю оставшуюся жизнь (Семенова и др., 2008). По статистике, именно инфекционные заболевания становятся причиной 26% всех смертей на планете (по данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) за 2008 год). В 2013 г. на территории Российской Федерации было зарегистрировано более 33 млн. 225 тыс. инфекционных заболеваний, что значительно превышает данные за 2012 г. (31 млн. 477 тыс. случаев) (Пономарев, Яковлев, 2017).

На сегодняшний день особо актуальной представляется проблема возрастания случаев заболеваемости инфекционными болезнями, вызываемыми грамположительными бактериями (Wing Fei Wong, Santiago, 2017). В частности, основной причиной развития инфекций являются так называемые «проблемные» микроорганизмы - метициллин-резистентные стафилококки, встречающиеся повсеместно и являющиеся возбудителями пневмоний, инфекций кожи, мягких тканей, костей и суставов (Shopsin et al., 2000). Не уступают по распространенности инфекционные заболевания, вызываемые представителями рода *Streptococcus spp.* Стрептококковые инфекции входят в число наиболее острых проблем здравоохранения во всех странах мира (Rice, 2006). По данным ВОЗ в мире ежегодно возникает свыше 111 млн. случаев стрептодермии и 616 млн. случаев стрептококковых фарингитов. Тяжелыми заболеваниями, вызванными стрептококками группы А страдает около 18 млн. человек, из них 15,5 млн. человек – ревматическими заболеваниями сердца. Ежегодно регистрируется около 2 млн. новых случаев и умирает свыше 500 тыс. человек. (Покровский, 2009).

Особую важность представляет распространение микроорганизмов, резистентных к антибактериальным препаратам (АБП), что служит причиной существенного ограничения выбора антибиотиков для лечения. (Свистушкин, Мустафаев, 2016). На сегодняшний день активно ведется разработка новых антибактериальных препаратов, обладающих выраженной антимикробной активностью в отношении клинически значимых штаммов микроорганизмов, по новейшим современным технологиям (Fish, Ohlinger, 2006). Поэтому вопрос проверки и тестирования новых препаратов в рамках доклинических исследований становится очень актуальным.

В настоящее время для проверки антимикробной активности применяют фенотипические и генотипические методы, позволяющие провести всесторонние наблюдения за микроорганизмом, определить детерминанты, отвечающие за устойчивость к антибактериальным препаратам и расшифровать природу их устойчивости (Платонов, 2011).

Фенотипические методы предполагают оценку влияния АБП на жизнедеятельность микроорганизмов по таким параметрам, как скорость роста и биохимическая активность (Marie, Coyle, 2005). Среди фенотипических методов хорошо стандартизованными являются методы серийных разведений (в бульоне/агаре) и диффузионные (диско-диффузионный и эпсилометрический (Е-тест), основанные на детекции роста исследуемых культур. (Ashtiani et al., 2008) Стоит отметить, что перечисленные методы не дают полную информацию по действию антибиотиков на микроорганизмы и, кроме того, отличаются высокой трудоемкостью.

Генотипические методы основаны на прямой детекции генов, кодирующих детерминанты устойчивости к АБП (Медведева и др., 2009). Детекцию осуществляют с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) - молекулярно-генетического метода, успешно внедряемого в практику клинической диагностики как для высокоэффективного

выявления, так и для количественного определения специфических участков нуклеиновых кислот, ассоциированных с инфекционными заболеваниями (Орадова, 2013). Определение антибиотикорезистентного профиля бактерий не дает возможность проводить данную процедуру постоянно ввиду высокой вероятности возникновения мутаций в генах, регулирующих системы выведения АБП из бактериальной клетки и, как следствие, формирования резистентности в отношении отдельных антибиотиков (Кафтырева и др., 2012).

Именно поэтому возникает необходимость создания высокочувствительного, специфичного, малотрудоемкого способа молекулярно-генетической оценки эффективности антимикробных соединений в отношении грамположительных микроорганизмов с возможностью получения количественных данных.

Цель исследования. Разработка технологии проверки антимикробной активности антибактериальных препаратов в отношении грамположительных бактерий с использованием количественной ПЦР в режиме реального времени.

Задачи исследования

1. Конструирование калибровочного образца pAL-TAStoSob16S известной концентрации для количественной оценки антимикробной активности антибиотиков в отношении *Streptococcus sobrinus* 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. Апробация разработанных технологий для сравнительной оценки антибактериальных препаратов.

Практическая значимость. Сконструирован калибровочный образец на основе рекомбинантной плазмида pAL-TAStoSob16S для

количественной оценки противомикробной активности антибактериальных препаратов в отношении грамположительных бактерий с помощью метода ПЦР в режиме реального времени.

Область применения результатов исследования. Проведение комплексной оценки противомикробной активности как оригинальных синтетических препаратов, так и новых химических соединений и их производных, получаемых в ряду уже зарекомендовавших себя классов химических соединений с помощью метода ПЦР в режиме реального времени. Предложенная методика может в будущем ускорить процесс подбора тактики лечения инфекционных заболеваний благодаря подбору наиболее эффективного антибактериального препарата в короткие сроки.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Инфекционные заболевания, вызываемые грамположительными бактериями

На сегодняшний день инфекционные заболевания, вызываемые грамположительными бактериями (стафилококки, стрептококки, гонококки, менингококки и т.д.), играют особую роль в жизни каждого человека и по данным ВОЗ занимают второе место в мире по числу больничных летальностей. К числу таких инфекционных заболеваний относят пневмонию, менингит, простатит, пиодермит, остеомиелит, пиодермию, тонзиллит и др. Рассмотрим некоторые из них.

1. Пневмония - является широко распространённой инфекцией, в Российской Федерации отмечен высокий уровень смертности от данного заболевания. Возбудителями чаще всего являются стрептококки, стафилококки, пневмококки, легионеллы, вирусы гриппа и парагриппа, аденоvирусы, цитомегаловирус, грибковые инфекции, аспергиллы и актиномицеты (Харит, Перова, 2015). Заболеванию способствуют различные факторы: переохлаждение или чрезмерное перегревание, травмы, переутомление, курение.

Чтобы идентифицировать возбудителей пневмонии исследуют мокроту и бронхиальные смывы. Этиологическое значение имеют те микроорганизмы, которые высеваются в высоких концентрациях (10^6 - 10^8 КОЕ/мл) на селективные питательные среды. В качестве возбудителей может выступать большое количество бактерий, в том числе грамположительные кокки *Streptococcus pneumoniae* (Галкина-Лазарева, 2012).

Возникновение, течение и последствия пневмонии зависят от вирулентных свойств возбудителя, с одной стороны, и уровня местного и общей защиты организма (состояния иммунитета) - с другой. Ослабление местной защиты способствует размножению патогенных

микроорганизмов. Например, пневмококк *Streptococcus pneumoniae*, выделяет эндотоксин, который вызывает отек в альвеолах, вследствие чего инфекция распространяется через межальвеолярные поры и затем на соседние участки – другие бактериальные агенты, производящие экзотоксин, способствующий реакции ограничения воспаления фибрином и микроателектазу (Галицкая и др., 2007).

2. Бактериальный менингит – воспаление оболочек головного или спинного мозга, развивающееся в результате бактериальной инфекции. Этиологическими факторами являются представители бактерии рода *Streptococcus spp.* группы В или D, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* (Шипицына, Савичева, 2014).

Заболевание развивается в результате проникновения возбудителя в полость черепа гематогенным или контактным путем (Королева, Белошицкий, 2007). Бактерии попадают в организм человека через слизистую оболочку носоглотки или зева и распространяется через кровеносное русло к органам. Инфекционные агенты выделяют токсины, которые воздействуют на нервную систему и могут стать причиной следующих процессов инфекционно-токсического шока и ДВС-синдрома с тромбозом сосудистого русла. Это приводит к кровоизлиянию в кожные покровы, слизистые оболочки и органы, в которых в последующем возникает некроз (Челпан, Прохорова, 2014). В результате оболочки мозга подвергаются обсеменению воспалительными клетками с последующим увеличением числа нейтрофильных клеток. Прогрессия продолжения исходного заболевания приводит к появлению лимфоцитарных и плазматических клеток. Сам воспалительный процесс обусловлен реакцией мозговой ткани на бактериальные компоненты и поражением мягкой мозговой оболочки мозга (Евграфов и др., 2006).

Так же менингит может приводить к повышению давления внутри полости черепа, что в последующем вызывает сдавление и смешение мозгового вещества. Особенно опасно смешение продолговатого мозга с

его вдавлением в большое затылочное отверстие мозга, что может быть чревато бульбарным параличом и нарушением дыхательной функции вплоть до летального исхода (Tunkel, Scheld, 1999).

3. Простатит - воспаление предстательной железы, самое распространенное заболевание мужских половых органов. (Деревянко И.И 2004) Возбудитель может проникать в предстательную железу восходящим путем при воспалительном процессе в мочеиспускательном канале, мочевом пузыре или при постановке мочеиспускательного катетера. Возможен и гематогенный путь из гнойных воспалительных очагов.

Этиологическими факторами являются виды *Staphylococcus spp.* и *Streptococcus spp.* (Крупин и др., 2009; Артифексова, 2013; Крупин и др., 2013).

4. Пиодермит - гнойничковые заболевания кожи, которые составляют большую группу различных по клиническим формам, течению и прогнозу дерматозов, вызываемых гноеродными кокками - *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* и другими микроорганизмами (Пашинян, 2007). Поражение кожного покрова может быть поверхностным или глубоким, а течение - острым или хроническим. Стафилококки колонизируют верхние слои эпидермиса, больше в области устьев волосяных фолликулов, сальных и потовых желез, наиболее часто поражая придатки кожи. Стрептококки же присутствуют на поверхности гладкой кожи человека без связи с придатками кожи, чаще на лице и в области естественных складок. Системные иммунные и эндокринные нарушения организма, изменяя механизм образования и отделения пота и кожного сала, могут приводить к биологическим изменениям резидентной флоры и переходу в состав патогенных штаммов (Устинов, Владимирова 2004).

1.2. Антибиотики с выраженной активностью в отношении грамположительных бактерий

Антибиотики - вещества природного происхождения, обладающие выраженной биологической активностью (Венгеровский, 2015). Они могут быть получены из микробов, растений, животных тканей, а также синтетическим путем (Харкеевич, 2010). Антибактериальные препараты по своей природе оказывают избирательное воздействие на жизнедеятельность бактерий, подавляя и не затрагивая процессы, протекающие в клетках человеческого организма (Егоров, 2014).

Существует множество АБП, классифицировать которые можно по механизму действия на микроорганизм и по химической структуре антибиотика (Чанышева, Василова, 2014).

Механизм действия антибиотиков основывается на двух принципах:

- 1) бактерицидный механизм - препарат воздействует на саму бактерию, разрушает ее стенку и приводит к гибели;
- 2) бактериостатический механизм – препарат является вспомогательным, останавливает размножение и рост бактерий, тем самым ограничивая их численность.

По химическому строению выделяют следующие группы антибактериальных препаратов:

- 1) бета-лактамные антибиотики - обладают бактерицидным эффектом, включают в себя природные пенициллины, которые активны против многих грамположительных и грамотрицательных, аэробных и анаэробных бактерий;
- 2) макролиды - оказывают бактериостатическое и бактерицидное действие, содержат в своем составе макроциклическое лактонное кольцо, связанное с углеводными остатками (к этой группе относятся эритромицин, олеандомицин, карбомицин – активные

антибактериальные препараты в отношении грамположительных бактерий);

- 3) аминогликозиды - антибиотики олигосахаридной или псевдоолигосахаридной природы (гентамицин, неомицин, канамицин, мономицин), обладающие бактерицидным действием;
- 4) тетрациклины - оказывают бактериостатическое действие (хлортетрациклин, окситетрациклин, тетрациклин и их производные);
- 5) полимиксины - оказывают бактерицидное действие, устойчивостью к данной группе антибиотиков обладают грамотрицательные кокки и все грамположительные бактерии;
- 6) полиены - противогрибковые антибиотики;
- 7) хлорамфеникол (левомицетин) - обладает бактерицидным действием, активен в отношении многих видов грамотрицательных и грамположительных бактерий;
- 8) гликопептидные антибиотики - высокомолекулярные соединения, содержащие углеводы и аминокислоты (ванкомицин, ристомицин, линкомицин, клиндамицин, эремомицин и др.), действуют на многие грамположительные кокки и палочки, неактивны в отношении грамотрицательных бактерий;
- 9) антибиотики разных химических групп - оказывают бактериостатическое действие (Аляутдин, 2016).

Ниже представлена краткая характеристика действия некоторых антибиотиков, проявляющих активность в отношении грамположительной микрофлоры.

1. Амоксациллин - полусинтетический пенициллин, ингибирующий один или более ферментов на пути биосинтеза пептидогликана, являющегося структурным компонентом клеточной стенки бактерии.

Ингибиование синтеза пептидогликана приводит к потере прочности клеточной стенки, что приводит к лизису и гибели клеток микроорганизма. Антибиотик оказывает бактерицидное действие на грамположительные (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*) и грамотрицательные (*Enterobacter spp.*, *Haemophilus influenza*) бактерии.

2. Азитромицин - бактериостатический антибиотик широкого спектра действия из группы макролидов-азалидов. Механизм действия антибиотика связан с подавлением синтеза белка, что способствует замедлению роста и размножения бактерий. В высоких концентрациях оказывает бактерицидное действие. Обладает антимикробной активностью в отношении грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*,) и грамотрицательных (*Haemophilus influenza*, *Legionella pneumophila*) анаэробных (*Clostridium perfringens*, *Fusobacterium spp.*) микроорганизмов.

3. Кларитромицин - является полусинтетическим антибиотиком группы макролидов и оказывает антибактериальное действие, взаимодействуя с 50S рибосомальной субъединицей чувствительных бактерий и подавляя синтез белка. Кларитромицин высокоэффективен в отношении многих грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*) и грамотрицательных (*Pseudomonas spp.*, *Legionella pneumophila*) микроорганизмов.

4. Ванкомицин – представляет собой трициклический гликопептидный антибиотик, выделенный из *Amycolatopsis orientalis*. Ингибитирует синтез клеточной стенки бактерий и способен изменять проницаемость клеточной мембранны бактерий и синтез рибонуклеиновых кислот. Действует бактерицидно на большинство грамположительных микроорганизмов: стафилококки (*Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidemis*) и стрептококки (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*,

Streptococcus agalactiae), но неактивен в отношении грамотрицательных микроорганизмов.

5. Мупироцил - бактериостатический антибиотик широкого спектра действия для местного применения. Воздействует на возбудителей кожных инфекций: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* и *Staphylococcus epidermidis Streptococcus pyogenes*.

1.3. Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам

Современные методы определения чувствительности микроорганизмов к АБП подразделяются на фенотипические и генотипические (Helegbe et al., 2009). Генотипические методы основаны на прямой детекции генов, кодирующих детерминанты устойчивости к АБП. Фенотипические методы предполагают оценку влияния АБП на жизнедеятельность микроорганизмов по скорости роста и биохимической активности (Marie, Coyle, 2005). К данной группе методов относят методы серийных разведений (в бульоне/агаре) и диффузионные (диско-диффузионный и эпсилометрический (Е-тест)), основанные на детекции роста исследуемых культур (Erfani et al., 2011).

1.3.1. Диско-диффузионный метод (ДДМ)

Диско-диффузионный метод (Kirby—Bauer) – полуколичественный метод определения antimикробной активности, основанный на формировании вокруг бумажного диска, пропитанного антибиотиком, зоны ингибции поверхностного роста микроорганизма на плотной питательной среде (рисунок 1) (Depardieu et al., 2007).

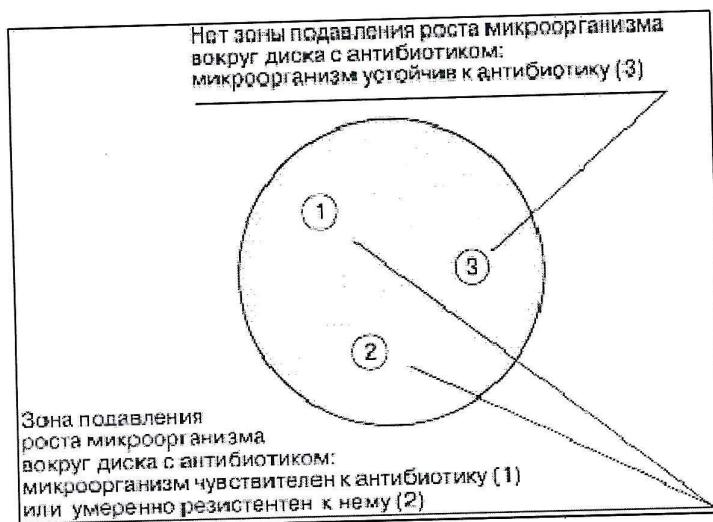


Рисунок 1 - Определение чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом

При определении чувствительности ДДМ используют стандартный инокулум, соответствующий по плотности 0,5 по стандарту МакФарланда и содержащий примерно $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Для инокуляции используют стерильный ватный тампон, который необходимо погрузить в стандартную суспензию микроорганизма, затем избыток инокулума удалить, отжав тампон о стенки пробирки. Инокуляцию проводят штриховыми движениями, поворачивая чашку Петри на 60°(Онищенко, 2004).

После инокуляции на поверхность питательной среды наносят диски с АБП. Нанесение производят аккуратно, прижимая диски стерильным пинцетом к поверхности агара. При этом расстояние между дисками и краями чашки должно быть не менее 15-20 мм. (Pietzcker et al., 2007).

После нанесение дисков чашки Петри помещают в термостат кверху дном и инкубируют при температуре 35-37 °C в течение 18-24 ч. (Сидоренко, Колупаев, 2003).

Учет результатов. После окончания инкубации чашки помещают кверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом в 45°. Диаметр зон задержки роста измеряют с точностью до 1

мм с помощью штангенциркулем или кронциркулем (Лабниская, 2008).

Интерпретация получаемых результатов.

На основании полученных диаметров зон подавления роста микроорганизма вокруг дисков с антибиотиками тестируемые штаммы подразделяют на чувствительные, умеренно резистентные и резистентные (Davila et al., 1992).

К чувствительным микроорганизмам относят бактерии, не обладающие резистентностью к данному антибиотику.

К микроорганизмам, обладающим промежуточной резистентностью, относят субпопуляции, находящиеся в соответствии со значениями минимальной подавляющей концентрацией между чувствительными и резистентными микроорганизмами.

К резистентным штаммам относят нечувствительные микроорганизмы, образующие рост вокруг дисков, пропитанных антибиотиком (Решедько, Стецюк, 2001).

1.3.2. Методы серийных разведений

Метод серийных разведений – полуколичественный метод, позволяющий непосредственным образом определять основной количественный показатель, характеризующий антбактериальную активность антибиотика, — величину минимальной подавляющей концентрации (МПК). Определение величины МПК проводят в соответствии с МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антбактериальным препаратам. Для этого в пробирки с питательной средой вносят АБП в возрастающих концентрациях (обычно с двукратным шагом). Пробирка, не содержащая антибиотика, является ("отрицательный" контроль). Таким образом, получается ряд пробирок с растворами АБП, концентрации которых отличаются в соседних пробирках в 2 раза (Меньшиков, 2009).

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 $1,5 \times 10^6$ КОЕ/мл (рисунок 2) (Онищенко, 2004).

Инокулюм вносят в каждую пробирку, содержащую соответствующего разведения АБП, и в одну пробирку с питательным бульоном без антибиотика ("отрицательный" контроль). Пробирки закрывают стерильными ватно-марлевыми пробками или металлическими колпачками, и все пробирки с тестируемыми штаммами, кроме пробирки "отрицательный" контроль, инкубируют при температуре 37°C в течение 20-24 ч. Пробирка "отрицательный" контроль помещается в холодильник при + 4 °C, где хранится до учета результатов. Учет результатов: для определения наличия роста микроорганизма, пробирки с посевами просматриваются в проходящем свете. Рост микроорганизмов с АБП сравнивают с «отрицательным» контролем. МПК определяется по наименьшей концентрации АБП, которая подавляет видимый рост культур (Фаращук, Цюман, 2012).

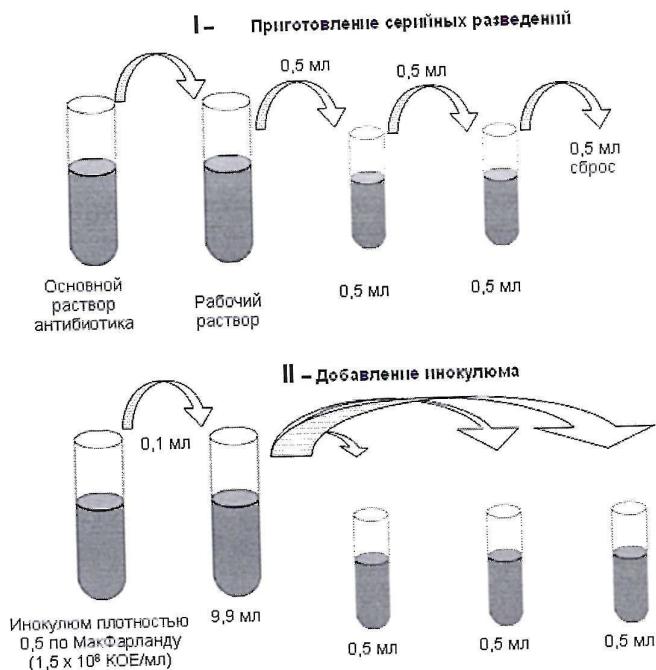


Рисунок 2 - Алгоритм определения чувствительности исследуемой культуры к АБП методом разведений в жидкой питательной среде

1.3.3. Эпсилометрический тест (Е-тест)

E-test — хорошо продуманный и применяемый в лабораториях всего мира метод определения антибиотикочувствительности препаратов. Тест представляет собой количественный метод определения минимальной ингибирующей концентрации противогрибковых и антибактериальных препаратов для инфекционных агентов, в том числе септических, что особенно важно для тяжелых больных (Erfani et al., 2008). Для применения в данном методе в настоящий момент насчитывается свыше 100 антибиотиков, используемых для тестирования ряда аэробных бактерий и привередливых микроорганизмов, таких как пневмококки, гемофильные микроорганизмы, менингококки, гонококки, анаэробны, грибы, и микобактерии (Erfani, Rasti, 2011).

Эпсилометрический тест дает возможность рационального использования антибиотиков, обеспечивающих наилучший результат для пациентов, а также для коррекции схемы лечения после эмпирического назначения препаратов и считается очень простым и надежным методом для определение антибиотикочувствительности (Mahjoub et al., 2008). Тест чрезвычайно важен для определения дозы антибиотика у пациентов с топографически труднодоступной локализацией очага инфекции, при некоторых внутрибольничных инфекциях, хронических инфекциях и у пациентов с иммунодефицитом (Soltani et al., 2012).

Принцип теста состоит в том, что на пластиковую тест-полоску нанесены последовательные разведения антибиотика от меньшего к большему. С другой стороны на полоску нанесена шкала соответствующих минимальных ингибирующих концентраций, благодаря чему Е-тесты позволяют определять минимальную ингибирующую концентрацию антимикробного препарата (Меньшиков, 2009).

1.3.4. ДНК-ДНК-гибридизация для выявления генов антибиотикорезистентности

Исторически метод ДНК- или РНК-гибридизации был внедрен раньше, чем метод полимеразной цепной реакции. В основе метода лежит способность нуклеиновых кислот к гибридизации — образованию двухцепочных структур за счет взаимодействия комплементарных последовательностей нуклеиновых кислот (Картельи др., 2011). В 1970-е гг. для выявления инфекционного возбудителя или мутации использовали ДНК-зондовую детекцию, основанную на гибридизации специфических олигонуклеотидных зондов, меченых флюорохромом с образцом выделенной ДНК. Олигонуклеотидные зонды содержат последовательность нуклеотидов, комплементарные участку цепи ДНК-мишени с известной структурой (Решедько, 2001).

В 1988 г. группой авторов (Bergeron, 1998) была предложена методика экспресс-определения лекарственной устойчивости микроорганизмов на основе ДНК-ДНК гибридизации. Принцип метода заключался в применении ДНК-зондов, выявляющих у микроорганизмов генетические детерминанты, кодирующие плазмидную или хромосомную резистентность к определенным типам антибиотиков.

Различают методы гибридизационного анализа, проводимые в растворе и на твердом носителе. Методы гибридизации на твердом носителе получили более широкое распространение благодаря тому, что имеют большую аналитическую чувствительность и специфичность, являются более технологичными, их проще стандартизировать и автоматизировать. Метод гибридизации на твердом носителе состоит из следующих стадий: выделение ДНК из образца; фиксация ДНК-образца на мемbrane; гибридизация с ДНК-зондом, меченным флюорофором; детекция результата. В качестве твердой поверхности чаще всего используют полимерную нейлоновую мембрану.

Для выделения нуклеиновых кислот из состава клеточных структур проводят лизис клеток и очищают ДНК с помощью фенола. Фиксацию ДНК-образца на твердом субстрате осуществляют в два этапа: вначале ДНК денатурируют с помощью щелочи, затем образец нуклеиновой кислоты фиксируют на носителе — нитроцеллюлозной или нейлоновой мембране, обычно путем инкубации от 10 мин до 4 ч при 80°C в вакууме. Для того чтобы олигонуклеотидный зонд не взаимодействовал с мембраной, свободные точки связывания на мембране инактивируются. На стадии гибридизации фрагменты ДНК комплементарно связываются с флюорофором. Избыток зонда удаляется в процессе промывки. Далее осуществляют детекцию одним из возможных методов (авторadiографическим, ферментативно-гибридизационным или флюориметрическим) (Решедько, 2001).

1.3.5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

К числу наиболее часто используемых методов молекулярной биологии относится метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Данный метод был изобретен К. Мюллисом в 1983 г., и за разработку ПЦР-метода, он был удостоен Нобелевской премии (Ребриков, 2009).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – молекулярно-биологический метод исследования, который позволяет обнаружить и многократно размножить в исследуемом клиническом материале небольшой фрагмент ДНК (Лопухов, Эйдельштейн, 2000). При ПЦР-диагностике размножению подвергается не бактерия, а только ее ДНК, причем не вся молекула, а только строго специфическая нуклеотидная последовательность, имеющаяся лишь у данного возбудителя (Avashia ,Garibyan., 2010). В связи с этим, проведение ПЦР-анализа включает в себя три этапа: пробоподготовка (выделение нуклеиновых кислот ДНК/РНК из клинического материала), амплификация (экспоненциальное увеличение

количества целевых участков ДНК), регистрация и интерпретация полученных результатов (Патрушев, 2005). Амплифицированный фрагмент ДНК выявляют методом электрофореза в агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Бромистый этидий образует с фрагментами ДНК устойчивый комплекс, внедряясь в «стопку» остатков азотистых оснований ДНК, составляющих сердцевину двойной спирали. В результате они оказываются в гидрофобном окружении, в котором бромистый этидий начинает флуоресцировать (Медведева, 2009).

На сегодняшний день метод ПЦР применяется в диагностике инфекционных заболеваний, в том числе вызванных агентами, трудно поддающимися культивированию, в клинической диагностике вирусных и бактериальных инфекций, диагностике наследственных и онкологических заболеваний, HLA-типовании, гражданской и судебной медицине, генотипировании микроорганизмов, оценке их вирулентности, определении устойчивости микрофлоры к антибиотикам, биологическом контроле препаратов крови (Ребриков, 2009).

1.3.6. ПЦР в реальном времени (РТ-ПЦР)

В настоящее время на смену визуальной оценке результатов ПЦР методом электрофореза уверенно приходят флуоресцентные методы детекции продуктов амплификации (Fredborg et al., 2013). Получать и интерпретировать результаты ПЦР становится проще, быстрее и надежнее (Rakwal et al., 2007).

Одним из флуоресцентных методов является метод ПЦР в режиме реального времени. В его основе лежит принцип флуоресцентной детекции продуктов ПЦР непосредственно в ходе амплификации (Owen, 2002). Детекция продуктов амплификации проводится прямо в реакционной смеси через стенки или крышку закрытой пробирки. (Бикбулатова и др., 2012). В состав реакционной смеси наряду с праймерами и остальными

компонентами реакции добавлены специальные флуоресцентные метки (зонды). Флуоресцентный зонд представляет собой олигонуклеотид, комплементарный внутренней последовательности амплифицируемого фрагмента ДНК возбудителя. На 3'-конце зонда находится флуоресцентная молекула – флуорофор, а на 5'-конце расположена молекула – гаситель флуоресценции. За счет близости флуорофора и гасителя вся энергия, поглощенная флуорофором, переходит на гаситель по принципу флуоресцентно-резонансного переноса энергии. При этом сигнал флуоресценции отсутствует (Лопухов, Эйдельштейн, 2000).

В ходе РТ-ПЦР при повышении температуры происходит денатурация ДНК возбудителя, и зонд наряду с праймерами гибридизуется с комплементарным участком ДНК.

В процессе синтеза новой цепи ДНК, фермент ДНК-полимераза расщепляет этот зонд. При расщеплении зонда флуорофор отделяется от гасителя, расстояние между ними увеличивается, и процесс тушения флуоресценции становится невозможным. В этот момент можно зарегистрировать флуоресцентный сигнал от флуорофора (Ricchi, Kralik, 2012).

Процесс амплификации принято разделять на три основные стадии ПЦР:

- 1) стадия экспоненциального накопления (log-фаза), во время которой эффективность амплификации максимальна, а накопление ампликонов связано с начальным количеством копий ДНК-матрицы;
- 2) стадия выхода на плато (линейная фаза), во время которой под действием ряда факторов эффективность амплификации постепенно снижается;
- 3) стадия плато, при которой прекращается накопление продукта амплификации и эффективность равна (Yuan et al., 2006).

Сигнал флуоресценции в ходе ПЦР возрастает пропорционально количеству продукта амплификации, чем больше количество ДНК в образце, тем раньше наблюдается начало роста сигнала флуоресценции и тем меньше пороговый цикл (Arya et al., 2005).

Главным преимуществом детекции результатов ПЦР в режиме реального времени является возможность проведения количественного анализа. При количественном исследовании образцов каждая серия экспериментов сопровождается постановкой амплификации с контрольными образцами, в которых заранее известно количество копий ДНК (калибровочные образцы). Сравнение кинетики накопления продуктов амплификации в экспериментальных и контрольных образцах позволяет оценить концентрацию ДНК в диапазоне разведений контрольных препаратов ДНК (Ребриков, 2009).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

Для проведения молекулярно-генетической оценки антимикробной активности в отношении грамположительных бактерий были выбраны следующие антибиотики: амикацин (конечная концентрация 50 мг/мл), гентамицин (конечная концентрация 40 мг/мл), пефлоксацин (конечная концентрация 80 мг/мл), ципрофлоксацин (конечная концентрация 2 мг/мл) и цефтриаксон (конечная концентрация 100 мг/мл). Ниже приведена краткая характеристика исследуемых антибактериальных препаратов.

1. Амикацин - представляет собой антибактериальное лекарственное средство. Производитель - ОАО «Красфарма» (Россия).

Форма выпуска и состав: Амикацин выпускается в форме раствора для инъекций в ампулах по 4 мл и порошка для приготовления раствора во флаконах. Основным действующим веществом препарата является амикацина сульфат, также в него входят вспомогательные вещества: цитрат натрия, серная кислота разведенная, дисульфит натрия и вода.

Фармакологические свойства: амикацин является антибиотиком фармакологической группы аминогликозиды III поколения. Он оказывает бактериостатическое действие. Уничтожение бактериальной клетки происходит за счет связывания с субъединицей 30S рибосомы и нарушения процесса репликации белковых молекул, что приводит к гибели бактериальной клетки. Антибиотик активен в отношении аэробных грамотрицательных бактерий: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Providencia stuartii*. Высоко активен также в отношении некоторых грамположительных бактерий: *Staphylococcus spp.* (в том числе штаммов, устойчивых к пенициллину, метициллину, некоторым цефалоспоринам), некоторых штаммов *Streptococcus spp.* Неактивен в отношении анаэробных бактерий.

2. Гентамицин - это бактерицидный антибиотик широкого спектра действия из группы аминогликозидов. Производитель – ОАО «Нижфарм» (Россия).

Форма выпуска и состав: антибиотик выпускают в виде порошка для разведения раствора для инъекций, в ампулах, аэрозоль, мазь для наружного применения и глазные капли. Состав 1 мл: активное вещество - гентамицина сульфата 5,0 мг; вспомогательные вещества - натрия гидрофосфата додекагидрат 14,33 мг, натрия дигидрофосфата моногидрат 3,68 мг, натрия хлорид 4,60 мг, бензалкония хлорид раствор 50 %, 0,20 мг, вода очищенная до 1 мл.

Фармакологические свойства: антибиотик группы широкого спектра действия. Оказывает бактерицидное действие. Активно проникая через клеточную мембрану бактерий, необратимо связывается с 30S субъединицей бактериальных рибосом и, тем самым, угнетает синтез белка возбудителя.

Гентамицин эффективен в отношении многих грамположительных и грамотрицательных бактерий. Высокочувствительны к гентамицину (МПК менее 4 мг/л) грамотрицательные микроорганизмы — *Proteus spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.*; грамположительные микроорганизмы — *Staphylococcus spp.*; чувствительны при МПК 4-8 мг/л — *Serratia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.* (в том числе *Pseudomonas aeruginosa*), *Acinetobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Providencia spp.* Резистентны (МПК более 8 мг/л) — *Neisseria meningitidis*, *Treponema pallidum*, *Streptococcus spp.* Резистентность микроорганизмов к гентамицину развивается очень медленно.

3. Пефлоксацин – противомикробное лекарственное средство широкого спектра бактерицидного действия, группы фторхинолонов. Производитель - ОАО «Красфарма» (Россия).

Форма выпуска и состав: выпускается в виде таблеток и растворов для инфузий. Содержание действующего вещества (на 1 таблетку): пефлоксацин, в виде метансульфоната – 400 мг; на 1 мл раствора: пефлоксацин, в виде мезилата дигидрата (в пересчете на пефлоксацин) – 4 мг.

Фармакологические свойства: пефлоксацин является противомикробным препаратом широкого спектра действия. Препарат действует бактерицидно, блокируя фермент ДНК-гиразу и нарушая репликацию А-субъединицы ДНК и РНК, а также синтез бактериальных белков. Пефлоксацин активен в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий. Действует на клетки, которые находятся в стадии деления и покоя (у грамотрицательных бактерий) и на клетки, находящиеся в процессе митоза (у грамположительных бактерий). Пефлоксацин действует на следующие микроорганизмы: аэробные грамотрицательные бактерии: *Enterobacter spp.*, *Morganella morganii*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Serratia spp.*, *Citrobacter spp.*, *Shigella spp.*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus spp.*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter spp.*; грамположительные бактерии: *Streptococcus spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium diphtheriae*. Умеренной чувствительностью к препарату обладают: *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Pneumococcus spp.*, *Chlamydia trachomatis* и *Clostridium perfringens*. Пефлоксацин не действует на анаэробные грамотрицательные бактерии.

4. Ципрофлоксацин – противомикробный лекарственный препарат широкого спектра бактерицидного действия из группы фторхинолонов. Производитель - ОАО "Верофарм" (Россия).

Формы выпуска: ципрофлоксацин выпускается в виде таблеток, раствора для внутривенных инфузий, капель для глаз и ушей, а также

глазной мази. Активное вещество: ципрофлоксацина гидрохлорида моногидрата – 250 мг. Вспомогательные вещества: крахмал кукурузный поливинилпирролидон низкомолекулярный медицинский, аэросил, целлюлоза микрокристаллическая, магния стеарат, оксипропилметилцеллюлоза, титана диоксид, полиэтиленоксид 4000.

Фармакологические свойства: ципрофлоксацин оказывает бактерицидное действие. Подавляет ДНК-гиразу и угнетает синтез бактериальной ДНК. Высокоактивен в отношении большинства грамотрицательных бактерий: *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*.

Активен в отношении *Staphylococcus spp.* (в том числе штаммы, производящие и не производящие пенициллиназу, метициллин-резистентные штаммы), некоторых штаммов *Enterococcus spp.*, *Campylobacter spp.*, *Legionella spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Chlamydia spp.*, *Mycobacterium spp.*

5. Цефтриаксон - антибиотик цефалоспоринового ряда широкого спектра действия. Производитель - ЗАО «Лекко» (Россия).

Форма выпуска: препарат цефтриаксон выпускается в форме порошка для приготовления раствора для внутримышечного и внутривенного введения. В одном флаконе содержится 1,0 г цефтриаксона натриевой соли.

Фармакологические свойства: цефтриаксон - цефалоспориновый антибиотик III поколения для парентерального применения, обладает бактерицидным действием, угнетает синтез клеточной мембраны, *in vitro* подавляет рост большинства грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. *In vitro* и в условиях клинической практики цефтриаксон обычно эффективен в отношении следующих грамположительных микроорганизмов: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus A*

(*Str.pyogenes*), *Streptococcus V* (*Str. agalactiae*), *Streptococcus viridans*, *Streptococcus bovis*; грамотрицательных: *Aeromonas spp.*, *Alcaligenes spp.*, *Branhamella catarrhalis*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.* и др. Большинство штаммов энтерококков (*Streptococcus faecalis*) также устойчивы к цефтриаксону.

В качестве модельного микроорганизма для разработки методики проверки антимикробной активности антибактериальных препаратов в отношении грамположительных бактерий был использован штамм *Streptococcus sobrinus*, выделенный из клинического материала больных хроническим генерализованным пародонтитом.

Streptococcus sobrinus - это сферические или овальные клетки диаметром 0,5-2,0 мкм. Располагаются попарно или в виде коротких цепочек различной длины. Подвижностью не обладают, спор не образуют. Факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы, растут на средах, богатых органическими соединениями, иногда — только в присутствии 5% CO₂. Метаболизм ферментативный, с образованием главным образом молочной кислоты; газ не образуют. Катализоотрицательные.

Хотя официально *S.sobrinus* при знают самостоятельным видом, отдельные специалисты считают с биоваром или сероваром *S.mutans*. В таксономических исследованиях выявлена тесная связь между штаммами серонара а *S.cricetus*, а также сероварами dug *S.sobrinus*. На агаре с кровью некоторые штаммы проявляю гемолитическую активность, другие гемолиз не вызывают. Образуют кислоту из маннита, инулина и лактозы, не образуют аммиак из аргинина, не гидролизуют эскулин. Штаммы, описанные как *S.sobrinus*, обычно реагируют с сыворотками d и g против *S.mutans*, однако типовой штамм *S.sobrinus* SL1 не обладает d-типовыми антигенами. Местом обитания у человека считается поверхность зубов. Эти стрептококки способны вызывать кариес, пародонтиты, периодонтиты и другие воспалительные заболевания полости рта. Типовые штаммы - ATCC 33478, CC.M 6070, DSM 20742, SLI.

2.2. Приготовление питательных сред для культивирования

Streptococcus sorbinus

1) Селективный агар для стрептококков (*Streptococcus Selection Agar*, «HiMedia», Индия).

- Применение: питательная среда предназначена для селективного выделения и подсчета всех типов стрептококков, включая бета-гемолитические стрептококки группы А.

- Состав среды:

Ингредиенты	Вес, грамм/литр
Гидролизат казеина	15,00
Папаиновый перевар соевой муки	5,00
Глюкоза	5,00
Натрия хлорид	4,00
Натрия цитрат	1,00
Натрия сульфит	0,20
L-Цистин	0,20
Натрия азид	0,20
Кристаллический фиолетовый	0,0002
Агар-агар	15,00
Конечное значение pH (при 25°C) 7,4 ± 0,2	

- Ход приготовления питательной среды:

Размешивали 45,6 г питательной среды в 1000 мл дистиллированной воды. Подогревали до кипения для полного растворения частиц. Если предполагалось использовать среду в тот же день, автоклавирование не требовалось. В противном случае стерилизовали автоклавированием при 0,9 атм (118°C) в течение 15 мин., не допуская перегревания среды.

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

- Принцип и оценка результата:

Папаиновый перевар соевой муки, гидролизат казеина, соли и глюкоза служат источником необходимых питательных веществ для роста стрептококков. Азид и сульфит натрия подавляют рост грамположительных палочек, а кристаллический фиолетовый – рост стафилококков. Вместе с тем указанные ингибиторы в данных

концентрациях не подавляют рост стрептококков, именно поэтому нами были использованы именно эти среды для выделения и культивирования стрептококков. Также на этой среде активно подавляется рост колiformных бактерий, протеев, псевдомонад и бацилл, но некоторые стафилококки и пневмококки могут давать на ней рост. Все колонии стрептококков, выросшие на данной среде, отправлялись на дальнейшую идентификацию.

2) Основа стрептококкового агара (Mitis Salivarius Agar Base, «HiMedia», Индия).

- Применение: для выделения из смешанных культур стрептококков, особенно *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis*, которые дают на кровяном агаре альфа-гемолиз или относятся к негемолитическим.
- Состав среды:

Ингредиенты	Вес, грамм/литр
Гидролизат казеина	15,00
Пептический перевар животной ткани	5,00
Глюкоза	1,00
Сахароза	50,00
Калия гидрофосфат	4,00
Трипановый синий	0,075
Кристаллический фиолетовый	0,0008
Агар-агар	15,00
Конечное значение pH (при 25°C) 7,4 ± 0,2	

- Ход приготовления питательной среды:

Размешивали 90,0 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды. Кипятили для полного растворения частиц. Затем разливали в соответствующие емкости. Стерилизовали автоклавированием при 1,1 атм (121°C) в течение 15 мин. Остужали до 50-55°C и асептично добавляли 1 мл 1%-ного раствора теллурида калия. После добавления теллурида калия питательную среду не нагревали.

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

- Принцип и оценка результата:

Эта среда готовится по прописи Чепмен (1) для выделения из смешанных культур стрептококков, которые дают альфа-гемолиз или относятся к негемолитическим. На этой высокоселективной среде (при добавлении 1% теллурита калия) можно выделять стрептококки из обильно контаминированного материала, например, различных экссудатов, фекалий и пр. На ней подавляется рост широкого круга бактерий.

Гидролизат казеина и пептический перевар животной ткани служат источником азотистых питательных веществ (аминокислот, пептидов), витамина В1, микроэлементов и других веществ, необходимых для роста микроорганизмов. Глюкоза и сахароза являются источником ферментируемых углеводов. Фосфат обеспечивает буферные свойства среды. Трипановый синий является кислым синим диазокрасителем, кристаллический фиолетовый – щелочным красителем и бактериостатическим средством, которое подавляет рост многих грамположительных микроорганизмов.

3) Основа колумбийского кровяного агара (Columbia Blood Agar Base, «HiMedia», Индия).

- Применение: в качестве эффективной основы для приготовления кровяного, шоколадного агаров, а также различных селективных и дифференциальных сред.

- Состав среды:

Ингредиенты	Вес, грамм/литр
Пептон (специальный)	23,00
Крахмал кукурузный	1,00
Натрия хлорид	5,00
Агар-агар	15,00
Конечное значение pH (при 25°C)	7,3 ± 0,2

- Ход приготовления питательной среды:

Размешивали 44,0 г порошка в 1000 мл дистиллированной воды.

Кипятили для полного растворения частиц. Стерилизовали

автоклавированием при 1,1 атм (121°C) в течение 15 мин. Остужали до 40-50°C и асептично вносили стерильную дефибринированную кровь барана (до 5% об/об).

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

Присутствие специального пептона обеспечивает быстрый и обильный рост на ней даже прихотливых микроорганизмов. Кроме того, на ней вырастают типичные колонии, лучше проявляется пигментообразование и более четкие гемолитические реакции.

Кукурузный крахмал служит источником энергии и одновременно нейтрализует токсические метаболиты. Баранья кровь позволяет оценить способность микробов к гемолизу и обеспечивает их гемином (Х фактором), который необходим для роста многих бактерий. Вместе с тем в среде нет фактора V (никотинамидадениндинуклеотида), поэтому *Haemophilus influenzae*, имеющие потребность в обоих факторах (Х и V), на этой среде рости не будут.

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

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

- Состав среды:

Ингредиенты	Вес, грамм/литр
Панкреатический гидролизат рыбной муки	24,0
Натрия хлорид	4,0
Агар микробиологический	10,0±2,0
Конечное значение pH (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.

5) 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:

Ингредиенты	Вес, грамм/литр
Панкреатический гидролизат рыбной муки	8,0
Пептон сухой ферментативный	8,0
Натрия хлорид	4,0
Конечное значение pH (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°С.

- Культивирование в течение 40-48 ч при 35-37°С.
- 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±1)°С 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±1)°С.

Образование индола и сероводорода обнаруживается визуально по изменению цвета индикаторных бумажек. При положительной реакции на индол бумажки, пропитанные модифицированным реагентом 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 реагентом 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 пРНК *Streptococcus sorbinus* в вектор pAL-TA («Евроген», Москва) с последующей трансформацией и наработкой плазмида 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 (рН 9,1, 100 mM), крезоловый красный, ddH₂O. Для этого растворить 0,5 г Chelex 100, 5 мл TRIS-HCl и 0,5 мл Triton X-100 в 50 мл в ddH₂O. 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:

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

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

3. 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 насылаивали 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	15 сек	
Отжиг	55 °C	30 сек	40
Элонгация	72 °C	40 сек	
Достраивание цепей ДНК	72 °C	30 сек	1

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-ногого 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 *Streptococcus sorbinus*

Объект	Название праймера	5'-3' последовательность	Темп. отжига	Ожидаемый размер продукта (п.н.)
<i>Streptococcus sorbinus</i>	Sobr F_Pr1	F:caacgatacatagccgacctg	60°C	235
	Sobr R_Pr2	R: ttagccgtcccttctggta		

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 ddH₂O, 2 мкл каждого из пары праймеров и 3 мкл тотальной ДНК.

Ход работы:

- 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.
- 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	5 мин	1
Денатурация	95 °C	10 сек	
Отжиг	59 °C	25 сек	35
Элонгация	72 °C	30 сек	
Достраивание цепей ДНК	72 °C	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 *Streptococcus sobrinus*

Калибровочный образец конструировали с использованием в качестве ДНК-матрицы плазмида pAL-TA (3,0 т.п.н.) со вставкой участка гена 16S рPHK *Streptococcus sobrinus* (235 п.н.), в результате чего была получена плазмида pAL-TA_{Sob16S} (рисунок 3). Клонирование проводили по Маниатис Т. и соавт. (Maniatis et al., 1984).

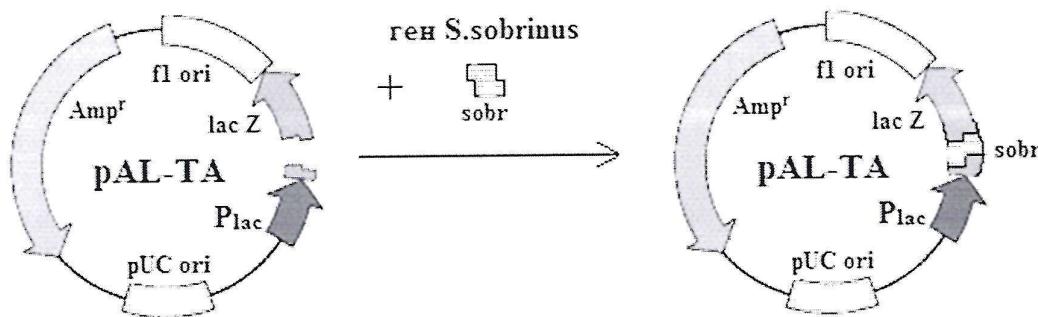


Рисунок 3 - Схема конструирования калибровочного образца pAL-TA_{Sob16S}

Выделенная с помощью ионообменной смолы Chelex100 тотальная ДНК использовалась в качестве матрицы для проведения классической ПЦР с целью накопления участка гена 16S рPHK *Streptococcus sobrinus* (235 п.н.). Амплификацию проводили на термоцикLERе Терцик MC-2 («ДНК-Технология», Россия) с использованием пары видоспецифических праймеров к выбранному участку следующей структуры:

5'саacgatacatagccgaccctg 3'

5'ttagccgtcccttctggta 3'.

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

1. Добавили равный объем связывающего буфера и тщательно перемешали. Инкубировали 1 минуту при комнатной температуре.
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 6.
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 мембранны 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 плазиды pAL-TA. Для этого в стерильной микроцентрифужной пробирке готовили реакционную смесь для лигирования, включающую ДНК вектор и клонируемый фрагмент в эквимолярном соотношении, буфер для лигирования (конечная концентрация - 66 мМ трис-HCl, pH 7,5, 5 мМ MgCl₂, 5мМ дитиотрейтол, 1 мМ АТФ) и ДНК - лигазу фага T4 (1 ед/мкг ДНК) («Fermentas», Литва). 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 Ca^{2+} . Чтобы повысить уровень трансформации помимо CaCl_2 в раствор добавляли различные вещества. Приобретшие компетентность «кальциевые клетки» использовали сразу. Все работы с компетентными клетками проводили на холодае, используя поддоны с мелкоколотым льдом или снегом.

1. Рассевали бактерии штрихом на чашку с селективной агариованной средой SOB (2% триптон; 0,5% дрожжевой экстракт; 10мМ NaCl ; 2,5мМ KCl ; 10мм MgCl_2 ; 10мМ 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-гидроксиэтилпiperазин-N'-2-этансульфо-новая кислота); 15мМ CaC_{12} ; 55мМ 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 ресуспензировали в 1/2 первоначального объема 10 мМ раствора CaCl₂, выдерживали 20 мин и после центрифугирования ресуспензировали в 1/50 первоначального объема 50 мМ CaCl₂.
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 водянную баню (42°C) (тепловой шок), добавляли к суспензии 1 мл среды LB, инкубировали 1 ч при 37°C, перемешивая каждые 15 минут.
5. Центрифугировали 2 мин (4000 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 50Х трис-ацетатный электродный буфер (2 М Tris-base, pH = 8,0; 1,56 М уксусная кислота, pH 7,6; 50 мМ 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 ночь. 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, сахароза;
- 2) для лизиса клеток – 10% SDS, 5 М NaOH;
- 3) для нейтрализации примесей – 5 М ацетата калия, 1,56 М уксусная кислота.

Полученную плазмиду очищали от ферментов, ионов и молекул РНК. Для этого препарат ДНК обрабатывали РНК-азой (конечная концентрация 50 мкг/мл) в течение 16-20 часов при 4-10°C. Затем 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 флуориметра QUBIT ("Invitrogen", США) с использованием коммерческого набора реагентов Quant-iT DNA HS ("Invitrogen", США).

1. Перед измерением подготовили тонкостенные прозрачные пробирки на 0,5 мкл, промаркировали на верхней поверхности крышки.

2. Приготовили раствор буфера, содержащий флуоресцентный краситель, исходя из расчета 200 мкл буфера и 1 мкл красителя на каждый образец.

3. Приготовили рабочий раствор, состоящий из буферного раствора с флуоресцентным красителем и пробы ДНК/стандарта.

Компонент, мкл	Кол-во пробы, мкл	Кол-во буф. р-ра, мкл	Общий объём, мкл
Стандарт	10	190	200
Образец ДНК	1-20	180-199	200

Перед внесением стандарты и образцы продуктов ПЦР тщательно перемешали на вортексе в течение 10 сек. Нанесение образцов проводилось в следующем порядке: стандарт 1, стандарт 2, и далее измеряемые образцы. После внесения всех компонентов, образцы снова тщательно перемешивали на вортексе, затем инкубировали 2 минуты, для связывания красителя с молекулами двухцепочной ДНК.

4. Измерение на приборе (следовали инструкции на мониторе): включить прибор, → выбрать тип измеряемых молекул ДНК и набор (HS/BR); → провести калибровку (New calibration), → внести в прибор стандарт 1, затем стандарт 2, → далее измерить образцы, для расчета концентрации в исходном образце, необходимо указать количество внесенного образца.

Концентрация двухцепочной ДНК составила $2,48 \text{ мкг/мл}$ ($7,08 \times 10^{11}$ 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 микробы. Именно поэтому следующим этапом было определение величины МИК исследуемых нами 5 антибактериальных препаратов (гентамицин, цефтриаксон, амикацин, пефлоксацин и ципрофлоксацин). Тестирование чувствительности *Streptococcus sobrinus* 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	12,21
Гентамицин	40000	20000	9,77
Пефлоксацин	10000	40000	4,88
Цефтриаксон	10000	50000	12,21
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 *S. sobrinus*. Таким образом, для амикацина, гентамицина, пефлоксацина, цефтриаксона и ципрофлоксацина МИК составили 12,21 мкг/мл, 9,77 мкг/мл, 4,88 мкг/мл, 12,21 мкг/мл и 0,49 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 *Streptococcus sobrinus* 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 выравнивали 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 эплендорф 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.

Инокуллюм чистой культуры *S. sobrinum* 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 *S. sobrinum* в питательном бульоне и в 9 различных концентрациях антибиотиков. Для этого:

1. В заранее подготовленные стерильные пробирки типа эппendorф 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 *S. sobrinum* ($1,5 \cdot 10^8$ 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 супензий, прошедших культивирование, с использованием ионообменной смолы Chelex100.

1. Подготовили и расставили в штативе пробирки с отобранными бактериальными супензиями, необходимое количество одноразовых стерильных пробирок типа Eppendorf объемом 1,5 мл, промаркировали.
2. В каждую пробирку с супензиями 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.

Для оптимизации проведения количественного ПЦР-анализа готовили десятикратные разведения плазмида pAL-TAStSob16S (конечная концентрация $2,5 \times 10^{10}$ копий ДНК/мл):

1. В 9 стерильных пробирок типа эппendorф добавляли 90 мкл тМФ.
2. В первую пробирку закапывали 10 мкл плазмида 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 *Streptococcus sobrinus* и 2,5x-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 2,5x реакционной смеси ПЦР-Микс SYBR Green I, 8 мкл ddH₂O, 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, 2,5x-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 2,5%-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: параметрами:

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

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

4.4. Молекулярно-генетическая оценка антимикробной активности исследуемых антибиотиков

Проведение количественной ПЦР в режиме реального времени позволило рассчитать средние значения количества ДНК *Streptococcus sobrinus* после культивирования в питательной среде в присутствии антибиотика, что дало способность оценить антимикробную активности исследуемых препаратов

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

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

Рабочие разведения антибактериальных препаратов							
Антибактериальные препараты	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
Амикацин	1,56×10 ⁶	1,6×10 ⁶	2,02×10 ⁶	4,6×10 ⁶	6,96×10 ⁶	6,3×10 ⁹	7,22×10 ⁹
Гентамицин	1,62×10 ⁶	2,2×10 ⁶	2,86×10 ⁶	2,9×10 ⁶	6,5×10 ⁶	1,07×10 ⁸	9,6×10 ⁹
Пефллоксацин	1,75×10 ⁶	2,24×10 ⁶	2,28×10 ⁶	3,66×10 ⁶	6,24×10 ⁷	7,17×10 ⁷	6,48×10 ⁷
Цефтриаксон	1,54×10 ⁶	2,56×10 ⁶	2,92×10 ⁶	3,08×10 ⁶	1,1×10 ⁶	1,38×10 ⁸	9,27×10 ⁹
Ципрофлоксацин	1,85×10 ⁶	2,02×10 ⁶	2,03×10 ⁶	2,12×10 ⁶	1,18×10 ⁷	1,02×10 ⁷	7,73×10 ⁷
							8,74×10 ⁷
							1,02×10 ⁸

Молекулярно-генетические исследования антимикробной активности рабочих растворов амикацина, гентамицина, пефлоксацина, цефтриаксона и ципрофлоксацина с различными концентрациями (от 256,0 до 1,0 мкг/мл) показали, что антибиотики проявляют антимикробную активность в отношении исследуемого клинического штамма бактерий *Streptococcus sobrinus*, выделенного из содержимого пародонтальных карманов больных пародонтитом.

Результат количественной молекулярно-генетической оценки антимикробной активности амикацина позволил сделать следующий вывод: при применении антибиотика в концентрациях 256 мкг/мл, 128 мкг/мл, 64 мкг/мл, 32 мкг/мл и 16 мкг/мл происходит значительное подавление бактериального роста *Streptococcus sobrinus*, чем при более низких концентрациях антибиотика. Данное суждение подтверждается количественными результатами, согласно которым не происходит увеличения количества бактериальных клеток и средние концентрации бактерий при данных концентрациях амикацина составляют $1,56 \times 10^6$ ГЭ/образец, $1,6 \times 10^6$ ГЭ/образец, $2,02 \times 10^6$ ГЭ/образец, $4,6 \times 10^6$ ГЭ/образец и $6,96 \times 10^6$ ГЭ/образец соответственно.

Результаты количественной оценки антимикробной активности амикацина в отношении *Streptococcus sobrinus* представлены на рисунках 4-6.

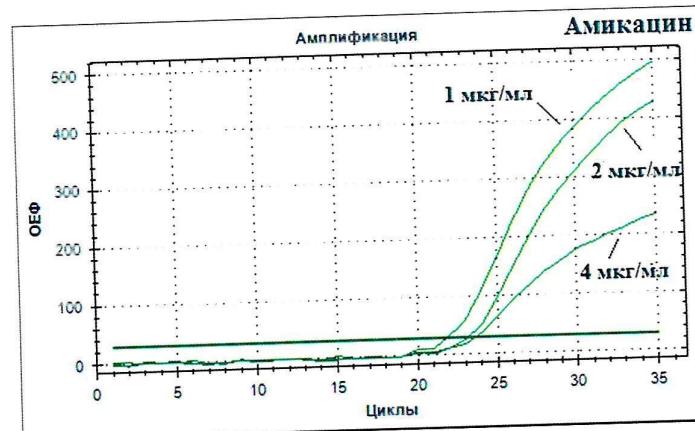


Рисунок 4 – График амплификации участков генов 16S pРНК Streptococcus sobrinus

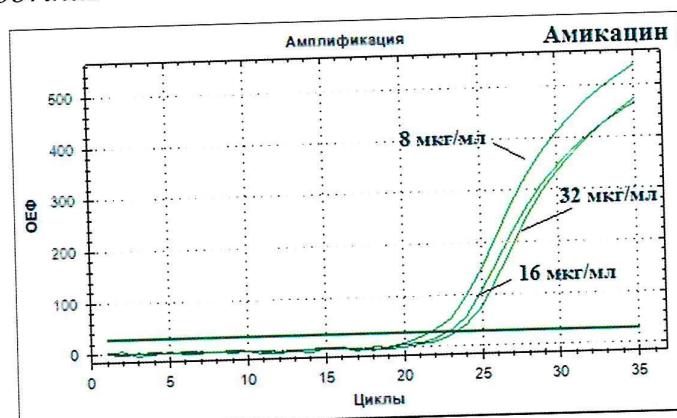


Рисунок 5 – График амплификации участков генов 16S pРНК Streptococcus sobrinus

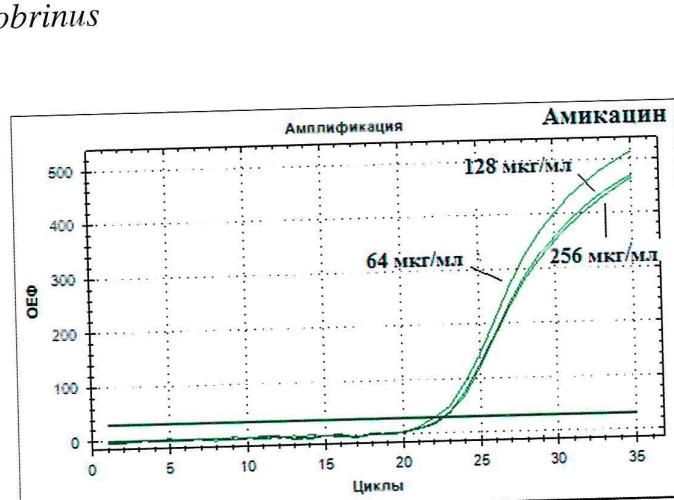


Рисунок 6 – График амплификации участков генов 16S pРНК Streptococcus sobrinus

Аналогичная картина наблюдалась при количественной оценки антимикробной активности гентамицина. Рабочие растворы антибиотика в концентрациях 256 мкг/мл, 128 мкг/мл, 64 мкг/мл, 32 мкг/мл и 16 мкг/мл проявляли достаточно высокую активность в отношении тестируемого штамма *Streptococcus sobrinus* и ингибировали рост бактерий. Абсолютные значения концентраций бактерий при концентрациях 256 мкг/мл, 128 мкг/мл, 64 мкг/мл, 32 мкг/мл и 16 мкг/мл составили $1,62 \times 10^6$ ГЭ/образец, $2,2 \times 10^6$ ГЭ/образец, $2,86 \times 10^6$ ГЭ/образец, $2,9 \times 10^6$ ГЭ/образец и $6,5 \times 10^6$ ГЭ/образец соответственно.

Результаты количественной оценки антимикробной активности гентамицина в отношении *Streptococcus sobrinus* представлены на рисунках 7-9.

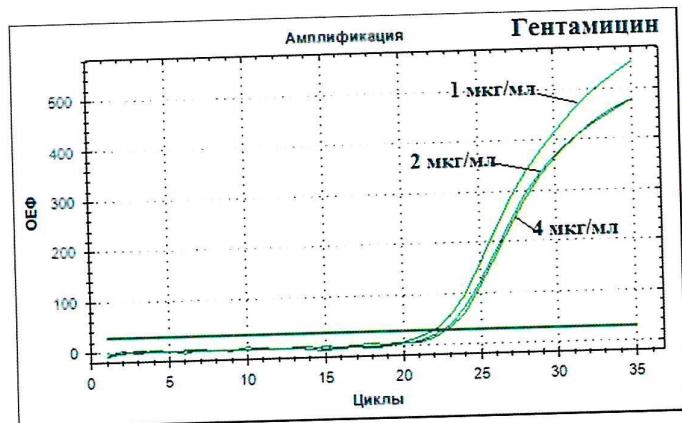


Рисунок 7 – График амплификации участков генов 16S pPHK *Streptococcus sobrinus*

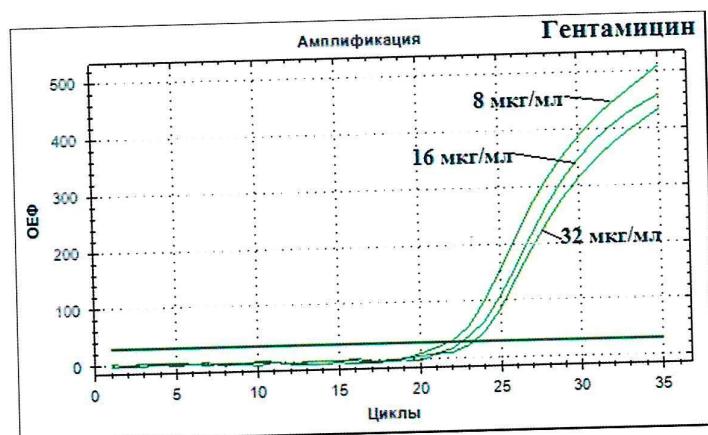


Рисунок 8 – График амплификации участков генов 16S pPHK *Streptococcus sobrinus*

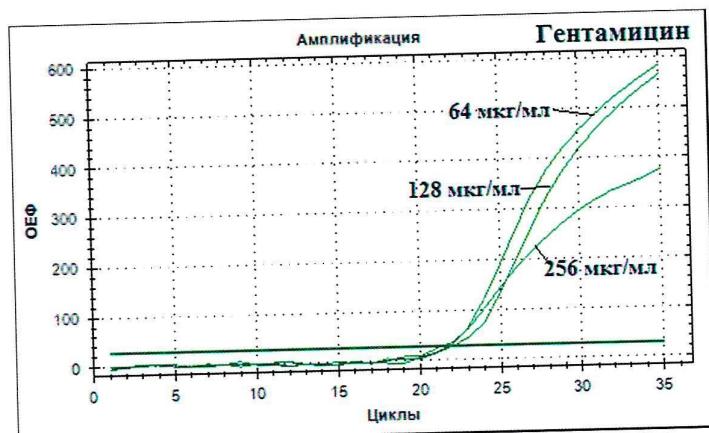


Рисунок 9 – График амплификации участков генов 16S pPHK *Streptococcus sobrinus*

При исследовании антибиотикочувствительности исследуемого штамма *Streptococcus sobrinus* к пефлоксацину с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени было выявлено, что антибиотик подавляет рост микроорганизма только при концентрациях антибиотика 256 мкг/мл, 128 мкг/мл, 64 мкг/мл и 32 мкг/мл. Последующие разведения основного раствора антибиотика не замедляли роста бактерий и, соответственно, в ходе молекулярно-генетического анализа мы наблюдали увеличение абсолютной концентрации бактерий сразу на несколько порядков. Абсолютные значения концентраций бактерий при концентрациях 256 мкг/мл, 128 мкг/мл, 64 мкг/мл и 32 мкг/мл составили $1,75 \times 10^6$ ГЭ/образец, $2,24 \times 10^6$ ГЭ/образец, $2,28 \times 10^6$ ГЭ/образец и $3,66 \times 10^6$ ГЭ/образец соответственно.

Результаты количественной оценки антимикробной активности пефлоксацина в отношении *Streptococcus sobrinus* представлены на рисунках 10-12.

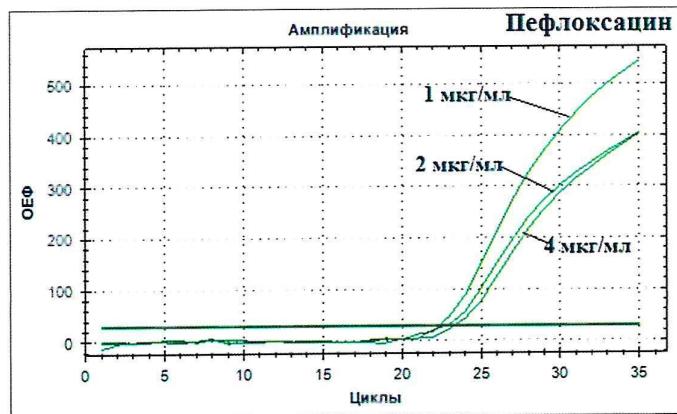


Рисунок 10 – График амплификации участков генов 16S pРНК *Streptococcus sobrinus*

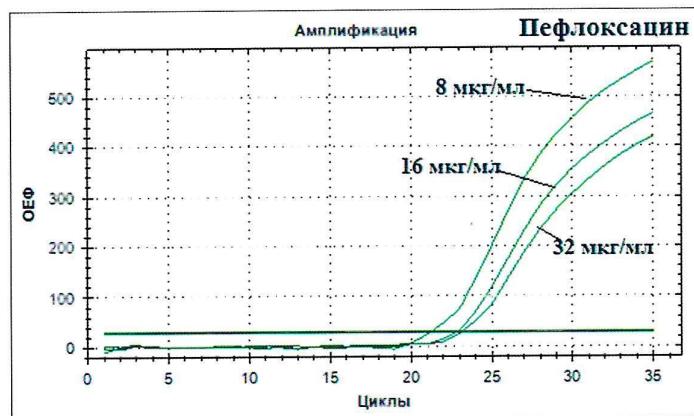


Рисунок 11 – График амплификации участков генов 16S pРНК *Streptococcus sobrinus*

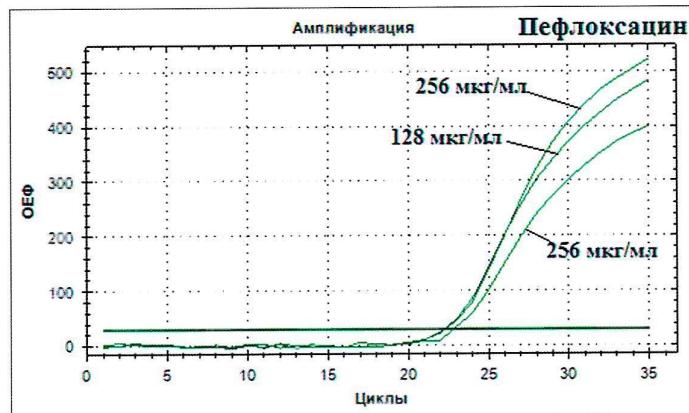


Рисунок 12 – График амплификации участков генов 16S pРНК *Streptococcus sobrinus*

При молекулярно-генетическом исследовании антимикробной активности цефтриаксона в отношении вида *Streptococcus sobrinus* наблюдалась картина, аналогичная результатам исследований активности амикацина и гентамицина. По результатам анализа количественного содержания *Streptococcus sobrinus* стало известно, что концентрации бактерий при рабочих разведениях цефтриаксона 256 мкг/мл, 128 мкг/мл, 64 мкг/мл, 32 мкг/мл и 16 мкг/мл составляют $1,54 \times 10^6$ ГЭ/образец, $2,56 \times 10^6$ ГЭ/образец, $2,92 \times 10^6$ ГЭ/образец, $3,08 \times 10^6$ ГЭ/образец и $1,1 \times 10^6$ ГЭ/образец соответственно.

Результаты количественной оценки антимикробной активности цефтриаксона в отношении *Streptococcus sobrinus* представлены на рисунках 13-15.

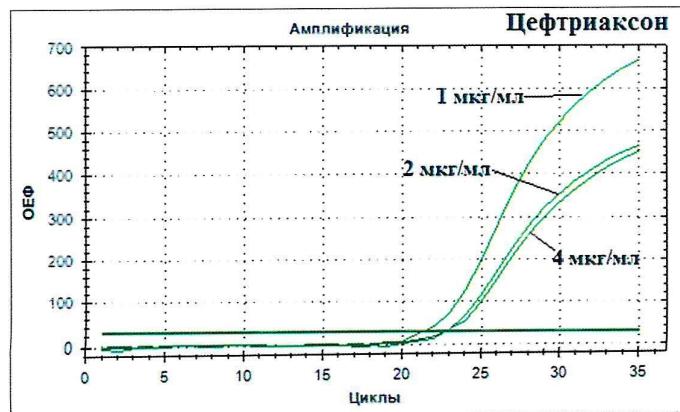


Рисунок 13 – График амплификации участков генов 16S pРНК *Streptococcus sobrinus*

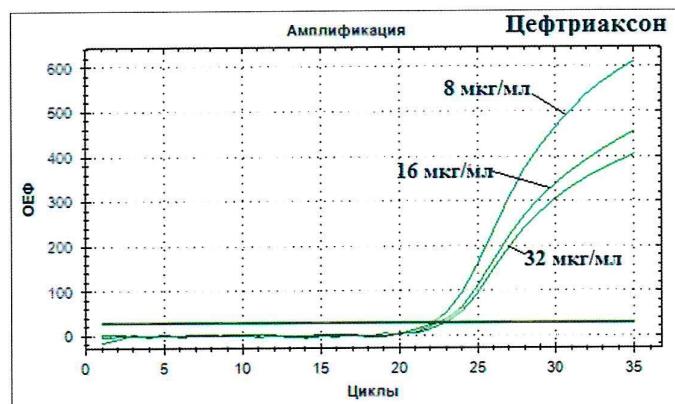


Рисунок 14 – График амплификации участков генов 16S pРНК *Streptococcus sobrinus*

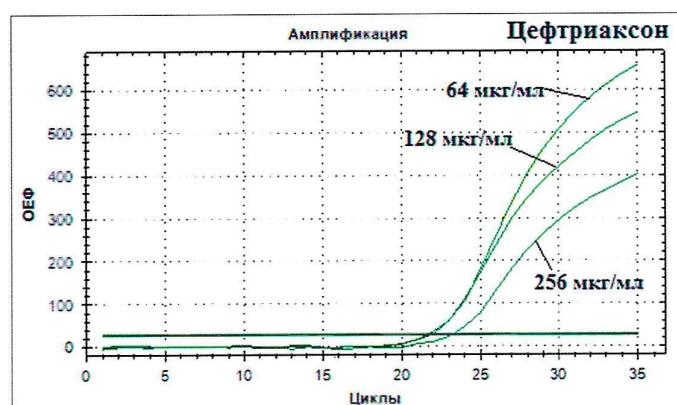


Рисунок 15 – График амплификации участков генов 16S pРНК *Streptococcus sobrinus*

По результатам количественной молекулярно-генетической оценки антимикробной активности ципрофлоксацина в отношении микроорганизма *Streptococcus sobrinus* стало ясно, что данный антибактериальный препарат обладает наибольшей активностью в отношении тестируемого штамма и ингибирует бактериальный рост при самых низких концентрациях антибиотика по сравнению с указанными выше антибиотиками. Таким образом, бактерии *Streptococcus sobrinus* проявляли наибольшую чувствительность по отношению к ципрофлоксацину. При культивировании бактерий в рабочих растворах ципрофлоксацина с концентрациями 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 происходило замедление роста бактерий в питательной среде и абсолютное количество бактерий при настоящих концентрациях составляло $1,85 \times 10^6$ ГЭ/образец, $2,02 \times 10^6$ ГЭ/образец, $2,03 \times 10^6$ ГЭ/образец, $2,12 \times 10^6$ ГЭ/образец, $1,18 \times 10^7$ ГЭ/образец, $1,02 \times 10^7$ ГЭ/образец, $7,73 \times 10^7$ ГЭ/образец и $8,74 \times 10^7$ ГЭ/образец соответственно.

Результаты количественной оценки антимикробной активности цефтриаксона в отношении *Streptococcus sobrinus* представлены на рисунках 16-18.

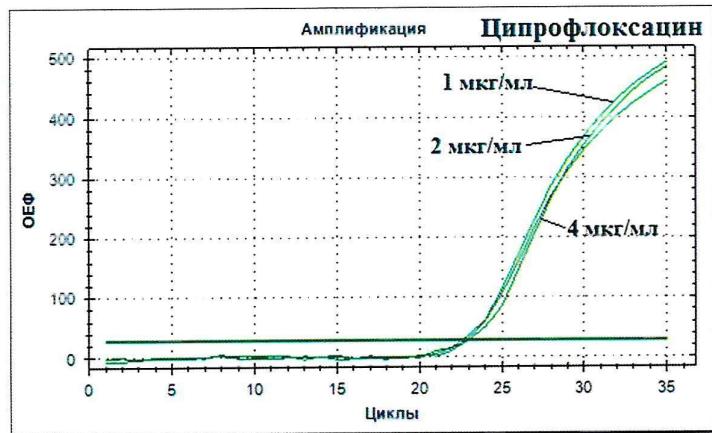


Рисунок 16 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Streptococcus sobrinus*

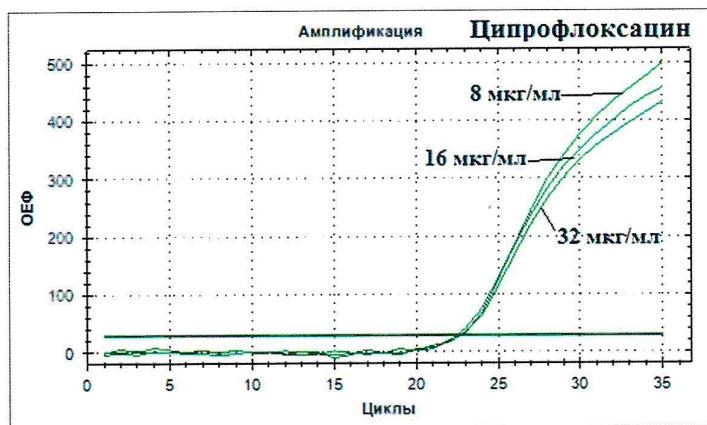


Рисунок 17 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Streptococcus sobrinus*

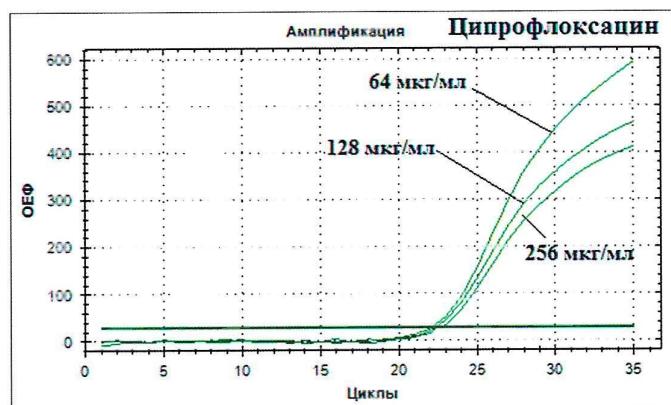


Рисунок 18 – График амплификации участков генов 16S рРНК *Streptococcus sobrinus*.

ВЫВОДЫ

1. Сконструирован калибратор, позволяющий определять количество микроорганизма *Streptococcus sobrinus* в исследуемом образце.
2. Молекулярно-генетические исследования антимикробной активности исследуемых веществ амикацина, гентамицина, пефлоксацина, цефтриаксона и ципрофлоксацина с различными концентрациями (от 256,0 до 1,0 мкг/мл) показали, что данные вещества действительно подавляют активность роста исследуемого штамма *Streptococcus sobrinus*.
3. В результате исследования антимикробной активности для сравнения антибиотиков амикацина, гентамицина, пефлоксацина, цефтриаксона и ципрофлоксацина в отношении *Streptococcus sobrinus* была выявлена наибольшая активность ципрофлоксацина. Данный антибактериальный препарат обладал наибольшей активностью в отношении тестируемого штамма и ингибировал бактериальный рост при самых низких концентрациях. Наименьшей активностью против данного микроорганизма обладал антибиотик пефлоксацин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аляутдин Р.Н., ред. Фармакология. 2-е изд; М.: ГЭОТАР-МЕД; 2016.
2. Асташкина А.П. Приготовление питательных сред и культивирование микроорганизмов. Методические указания к выполнению лабораторной работы по дисциплинам «Микробиология», «Фармакология, биохимия, микробиология» и «Биотехнология» для студентов ИПР, ИФВТ дневной формы обучения; 2015.
3. Ахмадиев Г.М. Микробиология: учебно-методический комплекс. Изд-во ЕГПУ; 2010.
4. Бикбулатова С. М., Чемерис Д. А., Никоноров Ю. М., Машков О. И., Гарафутдинов Р. Р., Чемерис А. В., Вахитов В. А. Способы детекции результатов полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Вестник Башкирского университета. 2012;1: 59-66
5. Быков А.С., Воробьёв А.А. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. М.: Медицинское информационное агентство; 2008.
6. Венгеровский А.И. Фармакология. Курс лекций: учеб, пособие 4-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2015.
7. Воробьев А.А., ред. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов 2-е изд. М.: Медицинское информационное агентство; 2012.
8. Галицкая М. Г., Намазова Л. С., Федосеенко М. В. Пневмококковая инфекция. Новые возможности вакцинопрофилактики. Вопросы современной педиатрии. 2008; 3: 103-105.
9. Галкина-Лазарева. Эффективность профилактики пневмококковых инфекций у иммунокомпрометированных больных. Вопросы современной педиатрии. 2012; 3: 12-16.

10. Деревянко И.И. Бактериальный простатит: этиология клиника, лечение .Consilium medicum. 2004; 7: 576-532.
11. Дьяченко С. В., Мятлик Е. А., Топалов К. П. Методологические аспекты сдерживания резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Тихоокеанский медицинский журнал. 2007; 4: 20-29.
12. Егоров И.С. Основы учения об антибиотиках: Учебник. 6-е изд., М.: Изд-во МГУ; 2004.
13. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Высшая школа; 2009.
14. Картель Н.А., Макеева Е.Н., Мезенко А.М. Генетика. Энциклопедический словарь. Минск: Белорусская наука; 2011.
15. Катлинский А.В., Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Курс лекций «Биотехнология». 3-е изд. М.: Академия; 2008
16. Кафтырева Л.А., Егорова С.А., Макарова М.А., Сужаева Л.В., Забровская А.В., Светличная Ю.С. Аналитические возможности лабораторий стационаров в детекции механизмов резистентности к антибактериальным препаратам штаммов энтеробактерий. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014; 1: 24-28.
17. Королева И. С., Белошицкий Г. В. Менингококковая инфекция и гнойные бактериальные менингиты. Под ред. В.И.Покровского. М.: Медицинское информационное агентство. 2007; 112.
18. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. 5е изд. СПб.: СпецЛит; 2012
19. Крупин А.В., Крупин В.Н., Артифексова А.А. Значение микробного фактора в патогене хронического бактериального простатита. Медицинский вестник Башкортостана. 2013;2: 106-110.
20. Лабниская А.С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований – М.:Медицина; 2008г.

21. Лопухов Л.В., Эйдельштейн М.В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000; 3: 96-105.
22. Медведева Т.В., Скворцова Р.Г., Кузьменко В.В., Огарков О.Б. ПЦР-анализ в клинической лаборатории. Учебное пособие; 2009.
23. Меньшиков В.В. Методики клинических лабораторных исследований. Том III. Клиническая микробиология; 2009.
24. Онищенко Г.Г. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: МУК 4.2.1890-04; утв. Главным государственным санитарным врачом РФ; 2004.
25. Орадова А.Ш. Полимеразная цепная реакция в лабораторной. Вестник Казахского Национального медицинского университета. 2013; 4(1): 306-309
26. Пашиян А.Г. Лечение пиодермитов у пациентов с чувствительной кожей. Медицинский совет. 2007; 4: 30-35.
27. Пономарев С.И., Яковлев С.А. Инфекционные заболевания как медико-социальная проблема. Медицина и здравоохранение. 2017;1: 110-118.
28. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Ю.Д. ПЦР «реального времени». 4-е изд. М.:БИНОМ. Лаборатория знаний; 2013
29. Решедько Г.К. Механизмы резистентности к аминогликозидам у нозокомиальных грамотрицательных бактерий в России: результаты многоцентрового исследования. НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии; 2001; 2: 111-125
30. Решедько Г.К., Стецюк О.У. Особенности определения чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом. Клиническая микробиология и антимикробная химотерапия. 2001; 3: 348-354.

31. Свистушкин В.М., Мустафаев Д.М. Проблема антибактериальной резистентности при инфекциях ЛОР-органов: возможно ли решение? Регулярные выпуски «РМЖ». 2016; 4: 212-216.
32. Семенова В. М., Дмитраченко Т. И., Козин В. М., Жильцов И. В., Пискун Д. В., Зенькова С. К., Семенов Д. М., Кучко И. В.. Руководство по инфекционным болезням. М.: МИА; 2008.
33. Сидоренко С.В., Колупаев В.Е. Антибиотикограмма: Диско-диффузионный метод. Интерпретация результатов; 2003.
34. Фаращук Н.Ф., Цюман Ю.П. Современные, наиболее употребляемые лабораторные методы исследования антибиотиков. Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2012;4: 58-62.
35. Федоренко А.С., Гайковая Л.Б., Лукьянова П.М., Бурбелло А.Т., Елисеев А.В. Индивидуальный подход к диагностике и лечению хронических инфекционно-воспалительных заболеваний различной локализации. Биомедицина. 2010; 3: 155-157.
36. Харит С.М., Перова А.Л. Современные подходы к профилатике пневмококковой инфекции. Медицинский совет. 2015; 16: 64-67.
37. Харкевич Д.А. Фармакология. 10-е изд. М.:ГЭОТАР-Медиа; 2010.
38. Чанышева А.Р., Василова Л.Я. (сост.) Действие антибактериальных препаратов на микроорганизмы. Учебно-методическое пособие предназначено для проведения лабораторных работ по курсу «Химическая микробиология и иммунопрепараты»; 2014.
39. Челпан Л.Л., Прохоров Е.В. Стрептококковая инфекция: вопросы патогенеза, роль в формировании соматической патологии у детей. Актуальная инфектология. 2014;3: 82-86
40. Albrich W.C., Monnet D.L., Harbarth S. Antibiotic selection pressure and resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. Emerg. Infect. Dis. 2004; 10: 514-517.

41. Arya M., Shergill I. S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel H.R. Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert Review of Molecular Diagnostics. 2014; 2: 209-219.
42. Asghar A. H. Frequency and antibiotic susceptibility of gram-positive bacteria in Makkah hospitals. Ann Saudi Med. 2011; 31(5): 462-468.
43. Ashtiani M.T., Abutorabi S., Mahjoub F., Mamishi S., Asgari F. Comparison of disc diffusion and E test methods for antimicrobial susceptibility testing of vancomycin in coagulase negative Staphylococcus isolated from blood culture. Iranian J. Pathol. 2008; 3: 61-66.
44. Conrads G., Johannes J. de Soet, Song L., Henne K., Sztajer H., Irene Wagner-Döbler. An-Ping Zeng. Comparing the cariogenic species Streptococcus sobrinus and S. mutans on whole genome level. J Oral Microbiol. 2014; 6: 245-250.
45. Davila D., Tambić T., Djokić S., Kolacny-Babić L. Disk diffusion sensitivity testing and antibacterial activity of azithromycin. 1992; (2):156-159.
46. Deepak S.A., Kottapalli K.R., Rakwal R., Oros G., Rangappa K.S., Iwahashi H., Masuo Y. Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. Curr Genomics. 2007; 8(4): 234-251.
47. Depardieu F., Podglajen I., Leclercq R., Collatz E., Courvalin P. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. Clin. Microbiol. Rev. 2007; 20: 79-114.
48. Edelmann A., Pietzcker T., Wellinghausen N. Comparison of direct disk diffusion and standard microtitre broth dilution susceptibility testing of blood culture isolates. Journal of Medical Microbiology 2007; 56: 202-207.
49. Erfani Y., Rasti A., Mirsalehian A., Mirafshar S.M., Ownegh V. E-test versus disk diffusionmethod in determining multidrug resistant strains of Escherichia coli in urinary tract infection. Afr. J. Microbiol. Res. 2011; 5: 608-611.
50. Fish DN; Ohlinger MJ. Antimicrobial resistance: factors and outcomes. Crit. Care Clin. 2006;22:291-311

51. Fredborg M., Andersen K. R., Jørgensen E., Droce A., Olesen T., Jensen B. B., Rosenvinge F. S, Sondergaard T. E. Real-Time Optical Antimicrobial Susceptibility Testing *J Clin Microbiol.* 2013; 51(7): 2047–2053.
52. Garibyan L., Avashia N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol.* 2013 ;133(3): 1-4.
53. Hecini-Hannachi A., Bentchouala C., Lezzar A., Laouar H., Benlabed K., Smati F. Multidrug-resistant bacteria isolated from patients hospitalized in Intensive Care Unit in University Hospital of Constantine, Algeria (2011 - 2015). *2016; 10(33): 1328-1336.*
54. Helegbe G.K., Anyidoho L.Y., Gyang F.N. Screening of the Efficacy of Some Commonly Used Antibiotics in Ghana. *Research Journal of Microbiology.* 2009; 4 (6): 214-221.
55. Igarashi T., Yamamoto A., Goto N. PCR for detection and identification of *Streptococcus sobrinus*. *J.Med. Microbiol.* 2000;2: 1069-1074.
56. Johnson A.P., Henwood C., Mushtaq S., James D., Warner M., Livermore D.M. Susceptibility of Gram-positive bacteria from ICU patients in UK hospitals to antimicrobial agents. *J Hosp Infect.* 2003; 54(3):179-87.
57. Johnson A.P., Livermore D.M., Tillotson G.S. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria: What's current, what's anticipated? *Journal of Hospital Infection.* Volume. 2001; 1: 3-11.
58. Karimzadeh I., Mirzaee M., Sadeghimanesh N., Sagheb M.M. Antimicrobial resistance pattern of Gram-positive bacteria during three consecutive years at the nephrology ward of a tertiary referral hospital in Shiraz, Southwest Iran *J Res Pharm Pract.* 2016; 5(4): 238–247.
59. Khalili H., Soltani R., Negahban S., Abdollahi A., Gholami K. Reliability of Disk Diffusion Test Results for the Antimicrobial Susceptibility Testing of Nosocomial Gram-positive Microorganisms: Is E-test Method Better? *2012; 11(2): 559-563.*

60. Kralik P., Ricchi M. Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Front Microbiol.* 2017; 8: 108.
61. Lee C.Y., Chen P.Y., Huang F.L., Lin C.F. Microbiologic spectrum and susceptibility pattern of clinical isolates from the pediatric intensive care unit in a single medical center - 6 years' experience. *J Microbiol Immunol Infect.* 2009; 42:160-165.
62. Marie B. Coyle. *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing.* 2005.
63. Owen R J. Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. 2002; 50(3): 285–289.
64. Rice L.B. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *Am. J. Infect. Control.* 2006; 34: 11–19.
65. Rice L.B. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. Send to Am J Med. 2006 ; (2): 62-70.
66. Rolain J. M., Mallet M. N., Fournier P. E., Raoult D. Real-time PCR for universal antibiotic susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2004; 2: 538–541.
67. Sader H.S., Streit J.M., Fritsche T.R., Jones R.N. Antimicrobial activity of daptomycin against multidrug-resistant Gram-positive strains collected worldwide. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004; 50: 201-204.
68. Santajit S., Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International.* 2016; 2(1): 1-8.
69. Soltani R., Khalili H., Shafiee F. Double-disk synergy test for detection of synergistic effect between antibiotics against nosocomial strains of *staphylococcus aureus*. *J Res Pharm Pract.* 2012; 1(1): 21-24.
70. Tunkel A.R. Scheld W.M. Острый бактериальный менингит 1999; 3: 5-6.

71. VanGuilder H.D, Vrana K.E, Freeman W.M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*. 2008; 44(5): 619–626.
72. Wong W.F., Santiago M. Microbial approaches for targeting antibiotic-resistant bacteria. *Microb. Biotechnol.* 2017; 10: 1047-1053.
73. Yuan J. S., Reed A., Chen F., Stewart C. N., Jr corresponding author. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*. 2006; 7: 85-90.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ОТЗЫВ

на выпускную квалификационную работу студента группы БМ-201Б
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)

Алибакова Салавата Халиловича
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Формирование тест-системы для определения факторов патогенности *Streptococcus spp.*»

1. Объем текстовой части (пояснительной записи) и графического материала, соответствие работы заданию

Полностью соответствует

2. Актуальность темы выпускной квалификационной работы (ВКР).

Актуальность работы связана с подбором праймеров для *Streptococcus spp.*, которые в дальнейшем могут быть использованы для создания ПЦР тест-системы

3. Умение самостоятельно и творчески решать задачи, поставленные в задании на выполнение ВКР, подготовленность к выполнению профессиональных задач Выпускник проявил отличное умение самостоятельно и творчески решать поставленные задачи, практическая и теоретическая подготовленность на отличном уровне, выпускник готов к выполнению профессиональных задач.

4. Использование современных информационных технологий при выполнении и оформлении ВКР. при написании работы использовались следующие программы: Microsoft Word, MegAlign, PrimerSelect, владение программами хорошее

5. Умение пользоваться справочной, научной, научно-технической и патентной литературой, в том числе зарубежной. Выпускник показал отличное умение использовать справочную, научную, научно-техническую и патентную литературу

6. Соблюдение календарного графика подготовки ВКР.

7. Качество оформления текстовой части (пояснительной записи) и иллюстрационно-графического материала ВКР в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов. Работа оформлена в соответствие с требованиями оформления, предъявляемые к оформлению содержания выпускных квалификационных работ (ВКР) студентов выпускных курсов БГМУ

8. Дополнительные сведения о ВКР и работе студента в период ее подготовки (при необходимости).

Работа выполнена в соответствии с требованиями

(дополнительные сведения представлены на _____ листах приложения)

9. Апробация и реализация результатов, полученных в ВКР: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др. Автором тема глубоко проработана, и глубоко изучена, заслуживает внимания результаты и обсуждения

10. Возможность использования результатов, полученных в ВКР, в учебном процессе и в производстве, а также возможность опубликования в открытой печати результатов, полученных в ВКР или другое

11. Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно") и рекомендация о присвоении квалификации. «Отлично»

Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки отлично при успешной сдаче

Руководитель выпускной квалификационной работы

Научный руководитель:

д. б. н., профессор кафедры фундаментальной биологии и прикладной микробиологии

Баймиев.А.Х.



РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студента группы БМ-201Б группы
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)

Алибакова Салавата Халиловича
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Формирование тест-системы для определения факторов патогенности *Streptococcus spp.*»

1. Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой. Полностью соответствует.

2. Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения. Тема выпускной квалификационной работы очень актуальна.

3. Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы. Выпускная квалификационная работа выполнена в соответствии с требованиями, проведен большой анализ литературных источников по заявленной тематике.

4. Технико-экономические, социально-экономические, экологические обоснования, обоснования вопросов безопасности жизнедеятельности, разработанные в выпускной квалификационной работе. Имеет социально-экономическое значение в микробиологической науке.

5. Уровень использования вычислительной техники и программных средств. Освоены методы планирования и анализа.

6. Апробация и реализация результатов, полученных в выпускной квалификационной работе: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др.

7. Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач. Хороший уровень подготовки.

8. Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов. Работа оформлена в соответствии с требованиями.

9. Обоснованность выводов и предложений. Автором тема глубоко изучена и проработана, заслуживают внимания результаты и обсуждение.

10. Замечания по усмотрению рецензента. Замечаний нет (дополнительные замечания представлены на листах приложения).

11. Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др. Результаты могут быть использованы в дальнейшем в учебном процессе и для публикаций.

12. Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно") и рекомендация о присвоении (не присвоении) студенту-выпускнику квалификации (степени). Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки отлично и студенту выпускнику рекомендуется присвоить квалификацию магистр.

Рецензент:

ФГБУ БО БГМУ Минздрава России,
к.м.н., заведующая кафедрой фундаментальной
и прикладной микробиологии



Гимранова.И.А.
Гимрановой
Заверяю.
Ученый секретарь ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России *Гимрановой*
Гимранова
подпись

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студента группы БМ-201Б группы
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)

Алибакова Салавата Халиловича
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Формирование тест-системы для определения факторов патогенности *Streptococcus spp.*»

1. Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой. Полностью соответствует.

2. Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения. Тема выпускной квалификационной работы очень актуальна.

3. Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы. Выпускная квалификационная работа выполнена в соответствии с требованиями, проведен большой анализ литературных источников по заявленной тематике.

4. Технико-экономические, социально-экономические, экологические обоснования, обоснования вопросов безопасности жизнедеятельности, разработанные в выпускной квалификационной работе. Имеет социально-экономическое значение в микробиологической науке.

5. Уровень использования вычислительной техники и программных средств. Освоены методы планирования и анализа.

6. Апробация и реализация результатов, полученных в выпускной квалификационной работе: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др.

7. Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач. Хороший уровень подготовки.

8. Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов. Работа оформлена в соответствии с требованиями.

9. Обоснованность выводов и предложений. Автором тема глубоко изучена и проработана, заслуживают внимания результаты и обсуждение.

10. Замечания по усмотрению рецензента. Замечаний нет (дополнительные замечания представлены на листах приложения).

11. Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др. Результаты могут быть использованы в дальнейшем учебном процессе и для публикаций.

12. Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно") и рекомендация о присвоении (не присвоении) студенту-выпускнику квалификации (степени). Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки отлично и студенту выпускнику рекомендуется присвоить квалификацию магистр.

Рецензент

к.б.н., н.с. лаборатории
биоинженерии растений
и микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН



Матниязов Рустам Тахирович

Познакомил с работой Матниязов Р. В.
Заверяю Степан Чагодашево
зам. директора по научной
работе ИБГ УФИЦ РАН



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.ВУЗ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
"БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ"
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Автор работы: Алибаков Салават Халилович

Самоцитирование

рассчитано для: Алибаков Салават Халилович

Название работы: ФОРМИРОВАНИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ
STREPTOCOCCUS spp.

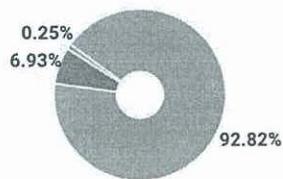
Тип работы: Магистерская диссертация

Подразделение: ФГБОУ ВО БГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ

РЕЗУЛЬТАТЫ

■ ВНИМАНИЕ, ДОКУМЕНТ ПОДОЗРИТЕЛЬНЫЙ: обнаружены попытки маскировки заимствований. Рекомендуется проверить полный отчет

СОВПАДЕНИЯ	6.93%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	92.82%
ЦИТИРОВАНИЯ	0.25%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%



ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 20.06.2025

Структура документа: Проверенные разделы: основная часть с.9-30, 42-49, введение с.4-9, методы с.31-41, выводы с.49

Модули поиска: Интернет Плюс; Перефразирования по коллекции IEEE; Цитирование; Коллекция НБУ; СМИ России и СНГ; Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования); СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация; Переводные заимствования; Диссертации НББ; Сводная коллекция ЭБС; Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика; Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте; Шаблонные фразы; ИПС Адилет; Патенты СССР, РФ, СНГ; Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; Рувики; IEEE; Кольцо вузов; СПС ГАРАНТ: аналитика; Медицина; Кольцо вузов (переводы и перефразирования); Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; Публикации eLIBRARY; Публикации РГБ; Переводные заимствования IEEE; Перефрази...

Работу проверил: Халилова Рита Камилевна

ФИО проверяющего

Дата подписи:

20.06.2025 г.

Подпись проверяющего



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.
Представленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.

ФГБОУ ВО БГМУ

Минздрава России

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

Работа была проверена в другой организации, ФГАОУ ВО
«Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоно-
сова». Со слов автора отчетаируется, что нет места
гроверко, в другой организации была проведена 20.06.2025.



16-22 июня 2025

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ
НЕДЕЛЯ ОНКОУРОЛОГИИ В УФЕ

INTERNATIONAL UROONCOLOGY WEEK IN UFA



СЕРТИФИКАТ

участника

Конкурса Молодых ученых

Андрей Сафаров

Проректор по учебной работе

Изосимова В.Е.



16.06.2025

г. Уфа



16-22 июня 2025

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ

НЕДЕЛЯ ОНКОУРОЛОГИИ В УФЕ

INTERNATIONAL UROONCOLOGY WEEK IN UFA



Конкурс Молодых ученых

БЛАГОДАРСТВЕННОЕ

ПИСЬМО

Изосимов Валерий Константинович

Проректор по учебной работе

Изосимова В.Е.



16.06.2025

г. Уфа