

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ
РАБОТА

ОПТИМИЗАЦИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ
КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ

Выполнила: Хайретдинова Майя
Анваровна
Направление подготовки 06.03.01 —
Биология, профиль — Микробиология

Руководитель: Борцова Юлия Львовна,
к.б.н., доцент кафедры
фундаментальной и прикладной
микробиологии

Выпускная квалификационная работа
допущена к защите:

«04» июня 2025 г.

Выпускная квалификационная работа
защищена с оценкой «отлично»

«23» июня 2025 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	3
АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ	4
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	7
1.1 Состав и общая характеристика микрофлоры кишечника	7
1.2 Функции микрофлоры кишечника	9
1.3 Дисбактериоз кишечника: понятие, норма, классификация, причины и факторы развития.....	11
1.4 Обзор на современные методы исследования кишечной микрофлоры (культуральные, молекулярные и т.д)	13
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	16
2.1 Объект исследования	16
2.2 Оптимизация микробиологического исследования микрофлоры толстого кишечника.....	16
2.3 Подбор и приготовление питательных сред.....	17
2.4 Использование тиогликолевой кислоты для переноса биологического материала	22
2.5 Приготовление биологического материала, посеvy и инкубация	23
2.6 Использование масс-спектрометрии	27
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	31
3.1. Сравнение эффективности питательных сред и условий доставки биологического материала	31
3.2. Использование масс-спектрометрии и полученные спектры со сред	34
3.3. Выбор оптимального метода и рекомендации.....	38
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	39
ВЫВОДЫ.....	40
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	41
ПРИЛОЖЕНИЕ	51

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ТФМ – трансплантация фекальной микробиоты

E.coli – *Escherichia coli*

P.aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*

S.oralis – *Streptococcus oralis*

C.krusei – *Candida krusei*

C.parapsilosis – *Candida parapsilosis*

S.mitis – *Streptococcus mitis*

S.gallolyticus – *Streptococcus gallolyticus*

C.parapsilosis – *Candida parapsilosis*

C.krusei – *Candida krusei*

ПЦР – полимеразно-цепная реакция

АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дисбактериоз – это нарушение состава и количественного соотношения микроорганизмов определённых органов. Он является не заболеванием, а следствием определенной болезни, нарушение деятельности органа и приводит к развитию различных инфекций [35].

Дисбактериоз выражается следующими показателями:

Общее снижение количества микроорганизмов вплоть до их отсутствия;

Общее увеличение количества микроорганизмов;

Изменение нормального соотношения одних микроорганизмов с угнетением или увеличением количества других, в том числе и патогенных;

Попадание микроорганизмов в несвойственную для них среду обитания.

Дисбактериоз возможен у всех органов живых организмов. Важно подчеркнуть, что дисбактериоз не ограничивается только кишечником. Практически все поверхности тела, контактирующие с внешней средой, имеют свои уникальные микробные сообщества. Сюда относится кожа, влагалище, верхние дыхательные пути, ротовая полость и, соответственно, кишечник [16].

Возникновение дисбактериоза может быть вызвано различными факторами, включая антибиотикотерапию, стресс, неправильное питание и прочее. У маленьких детей же дисбактериоз может вызываться по-разному. Это недоношенные дети, у которых имеется слабая иммунная система и неполноценная микрофлора органов, в том числе и кишечника; дети, рожденные путём кесарева сечения: ребёнок, который родился обычным путём получает свои первые бактерии, проходя через родовые пути матери; дети, принимающие антибиотики, это приводит к нарушению баланса микрофлоры) [17].

На сегодняшний день дисбактериоз считается одним из наиболее распространенных синдромов, его диагностика и лечение требуют высокой точности и скорости методов исследования. Однако существующие

классические культуральные методы часто недостаточно информативны, не позволяют выявлять некультивируемые микроорганизмы и требуют совершенствования.

На практике применяется пересадка фекалий от здорового донора пациенту (трансплантация фекальной микробиоты, ТФМ). Часто данный метод применяется при тяжёлых формах дисбактериоза кишечника, в том числе и лечении заболеваний, вызванных клостридиями. ТФМ является экспериментальным методом при лечении более тяжёлых заболеваний, к ним относятся колиты (болезнь Крона), неврологические заболевания (болезнь Паркинсона), психологические заболевания (депрессия), печёночные и т.д. В некоторых странах, например, в США, человеческий кал применяется как лекарство [7]. Однако существуют и побочные действия, которые не до конца изучены. К предполагаемым последствиям можно отнести: метеоризм, диарея, повышение температуры тела. Наблюдается тошнота и рвота, нарушение работы перистальтики кишечника, возможно непринятие чужеродной микрофлоры организмом (воспалительный ответ). При своевременном лечении прогноз благоприятный.

Профилактика дисбактериоза кишечника для здоровых людей подразумевает правильное питание с соблюдением режима, присутствие в рационе продуктов, содержащих полезные микроорганизмы (кисломолочные продукты, вещества, содержащие бифидобактерии, ацидофильные бактерии, пища и напитки, на основе заквасок). Обязательна сбалансированность питания по составу необходимых организму веществ, витаминов и микроэлементов. При длительном лечении антибиотиками обязательно включать в терапию специальную диету, содержащую продукты, богатые полезными бактериями, противогрибковую и иммуностимулирующую, а также антигистаминную терапию. Это поможет восстановить микрофлору кишечника без неблагоприятных последствий, восстановить иммунитет.

Актуальность исследования заключается в оптимизации методов диагностики кишечной микрофлоры. Это позволит повысить точность и скорость выявления нарушений, своевременно назначать терапию и контролировать ее эффективность. Необходимо изучать новые штаммы микроорганизмов для улучшения методов лечения пациентов, изобретения новых лекарственных препаратов и иметь понимание влияния данных микроорганизмов на человеческий организм.

Целью работы являлась характеристика важности отдельных факторов, влияющих на эффективность и качество бактериологической диагностики дисбактериоза толстого кишечника и дальнейшая разработка на этой основе рекомендаций, направленных на упрощение техники исследования и повышение достоверности результатов. В работе были использованы микробиологические методы исследования.

Задачами исследования являются:

1. Выполнить обзор литературных данных и сбор биологического материала по теме исследования;
2. Проведение сравнительного анализа различных методов культивирования и определения микроорганизмов в кишечной микрофлоре.
3. Разработка и рационализация методов микробиологического анализа кишечной микрофлоры.
4. Оценка полученных результатов, эффективности оптимизированных методов на клинических образцах и разработка рекомендаций для улучшения диагностики и лечения пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

Для постановки диагноза «Дисбактериоз толстого кишечника» проводится микробиологическое исследование биологического материала — кала, который переносился в лабораторию в тиогликолевой среде, свойства которой тоже были изучены. После этого была изучена методика разведения кала и различные методы посевов и их информативность и эффективность.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Состав и общая характеристика микрофлоры кишечника

Микрофлора кишечника – это совокупность микроорганизмов, которые живут в желудочно-кишечном тракте. В нём уживается от 300 до 1000 видов различных бактерий, грибов.

Все микробы толстой кишки подразделяются на три группы:

главную (бифидобактерии и бактероиды), составляющую 70% всех бактерий;

сопутствующую (молочно-кислые и кишечные палочки, энтерококки)

остаточную (стафилококки, грибы, протей) [65].

Практически всю микрофлору составляют анаэробные микроорганизмы: лактобактерии, бифидобактерии, энтерококки, эубактерии, клостридии, бактероиды и пропионовокислые бактерии. Они усиливают гидролиз белков, сбраживают углеводы, омыляют жиры, растворяют клетчатку и стимулируют перистальтику кишечника [29].

Бифидобактерии (*Bifidobacterium*) и эубактерии (*Eubacterium*) подавляют развитие гнилостных и болезнетворных микроорганизмов, улучшают переваривание углеводов; обеспечивают физиологическую защиту; утилизируют пищевые субстраты; участвуют в синтезе аминокислот, белков и витаминов; улучшают процесс всасывания важных минералов.

Лактобактерии (*Lactobacillus*) выполняют антагонистическую роль по отношению к патогенным микроорганизмам с помощью выделяемого ими вещества реутерина; помимо этого они стимулируют образование иммуноглобулинов, цитокинов, что тоже подавляет деятельность чужеродных микроорганизмов. Лактобактерии улучшают обмен веществ в организме, предотвращает развитие кишечных заболеваний, повышает резистентность организма.

Энтерококки (*Enterococcus spp*) являются важной частью кишечной микрофлоры, так как они участвуют в синтезе витаминов; расщепляют сложные углеводы; не дают размножаться другим патогенным микроорганизмам; усиливают иммунитет. Данные бактерии входят в состав для улучшения работы кишечника: Линекс, Симбиофор. [11] Помимо этого они вызывают инфекции брюшной полости, циститы, отиты, пневмонию, бронхиты, воспаления мочеполовых путей.

Бактероиды (*Bacteroides*) – микроорганизмы, способные активно расщеплять углеводы, синтезировать важные для организма витамины: витамин С, витамин Н, витамин В [49]. Также, данные микроорганизмы вступают в конфликт с фагоцитами, это позволяет лимфоцитам воспринимать антигенное раздражение; принимают участие в пищеварении, в процессах липидного обмена, расщепляют желчные кислоты. Вызывают воспаление органов малого таза, септицемию, абсцессы брюшной полости, лёгких и мозга.

Клостридии (*Clostridium*) расщепляют белки с образованием скатола индола. В небольшой концентрации данные токсичные метаболиты стимулируют перистальтику кишечника. При значительном увеличении количества микроорганизмов в кишечнике или в случае их размножения в несвойственных для них условиях в организме могут развиваться гнойно-септические заболевания различной локализации. [44]. Клостридии (*Clostridium*) являются возбудителями таких заболеваний, как: газовая гангрена, ботулизм, а также столбняк.

Пропионовокислые бактерии (*Propionibacterium*), благодаря образованию пропионовой и уксусной кислот, окисляют окружающую среду и играют антагонистическую роль против патогенных микроорганизмов. Некоторые виды являются патогенными, они могут вызывать акне. [32]

Типичной аэробной бактерией микрофлоры толстого кишечника является кишечная палочка (*Escherichia coli*). Реже в незначительном количестве обнаруживают стафилококки (*Staphylococcus spp*), стрептококки (*Streptococcus*

spp), клебсиеллы (*Klebsiella spp*), протей (*Proteus spp*) и дрожжеподобные грибы (*Candida spp*).

Кишечная палочка (*Escherichia coli*) помогает вырабатывать витамины, такие как B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12 и K, также активно участвует в обмене жирных и желчных кислот, холестерине, билирубине и т.д. Помимо этого данная бактерия входит в состав препаратов. При попадании в другие органы кишечная палочка вызывает заболевания: кольпит, простатит.

Стафилококки (*Staphylococcus*) являются аэробными грамположительными бактериями. Появляются в первые дни жизни человека в его кишечной микрофлоре. При снижении иммунитета патогенные виды данных бактерий могут быть причиной воспалительных инфекций. Это происходит при передаче их от здоровых носителей людям со слабым иммунитетом или иммунодефицитом.

Стрептококки (*Streptococcus*) также присутствуют в микрофлоре кишечника [44]. Участвуют в ферментации углеводов, протеолизе белков, образуют водород, который затем в кишечнике превращается в перекись водорода. При смене окружающих условий данные микроорганизмы становятся патогенными: вызывают абсцессы при операциях, воспаления ротовой полости и гинекологические заболевания.

Клебсиеллы (*Klebsiella spp*) и протей (*Proteus spp*) являются представителями условно-патогенной группы факультативной микрофлоры кишечника. Дрожжеподобные грибы рода *Candida* усиливают бродильные процессы в кишечнике и различные кандидозы (к ним можно отнести молочницу, стоматит, вульвовагинит и уретрит).

1.2 Функции микрофлоры кишечника: её роль в жизнедеятельности организма

Нормальная микрофлора кишечника выполняет ряд следующих функций [32]:

Обеспечение резистентности.

Совокупность микроорганизмов, обеспечивающих стабильность нормальной микрофлоры кишечника, предотвращают заселение организма чужеродными микроорганизмами. Это происходит из-за антагонистической активности кишечной микрофлоры, конкуренции за питание и рецепторы, адгезивной способности.

Антиаллергическое действие.

Микробы разрушают продукты, которые могут вызвать воспаление, аллергическую реакцию благодаря деятельности собственных метаболитов.

Иммуномоделирующее действие.

Имеющиеся в нормальной микрофлоре кишечника бифидо-, лактобактерии участвуют в синтезе иммуноглобулинов, интерферона, цитокинов, также повышают деятельность лизоцима.

Детоксикация ксенобиотиков.

Микроорганизмы, входящие в состав нормофлоры кишечника являются сорбентом, благодаря чему они дезактивируют токсичность ксенобиотиков.

Участие в процессах пищеварения и всасывания; процессах синтеза.

Микроорганизмы нормальной флоры кишечника участвуют в следующих процессах: гидролиз белков, омыление жиров, брожение углеводов, растворение клетчатки. Они улучшают работу перистальтики кишечника, участвуют в циркуляции желчных кислот и холестерина, способствуют выработке и всасыванию витаминов группы В и витамина К.

Благодаря микроорганизмам нормофлоры кишечника синтезируются незаменимые аминокислоты, происходит процесс адсорбции солей различных минералов. Анаэробные бактерии нормальной флоры кишечника синтезируют биологически активные вещества и медиаторы, которые стимулируют работу ЖКТ, печени, сердечно сосудистой системы, кроветворения, а также обменные процессы.

Выделительная.

В процессе жизнедеятельности микроорганизмы, входящие в состав нормальной флоры кишечника, выделяют слизь, благодаря чему поддерживается работа слизистой оболочки кишечника, моторики ЖКТ, а также способствует дефекации.

1.3. Дисбактериоз кишечника: понятие, норма, классификация, причины и факторы развития

Дисбактериоз кишечника – патологическое состояние, характеризующееся нарушением баланса микрофлоры. Это связано с количественными и/или качественными изменениями состава нормальной микрофлоры; расширяется её среда обитания, это обычно связано с нарушением адаптационных процессов, защитных и компенсаторных механизмов. Дисбактериоз кишечника является вторичным признаком, свидетельствующим о наличии инфекции [16].

Кузнецовой Г. Г в 1972 была предложена классификация дисбиоза кишечника по степени тяжести [44]:

I стадия – снижение количества бифидобактерий и/или лактобактерий. Анаэробная микрофлора преобладает над аэробной;

II стадия – выраженное увеличение, а потом и преобладание/резкое снижение, колибактерий; атипичные и ферментно неполноценные *E.coli*. Количество аэробов и анаэробов одинаковое; увеличение числа атипичных штаммов; возможно появление колоний гемолизирующей кишечной палочки и стафилококка.

III стадия – резкое увеличение количества факультативной микрофлоры, атипичных кишечных палочек на фоне низкого содержания бифидобактерий и лактобактерий;

IV стадия – высокие титры бактерий рода *Proteus*, или синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*). Преобладание гемолизирующего стрептококка, стафилококка, протей.

По материалам Пенегина Б.Ф, написанных в 1987, выделили следующие стадии дисбактериоза [44]:

Начальная – увеличение числа симбионтов;

Вторая – исчезновение некоторых симбионтов, отмечено небольшое увеличение числа тех микроорганизмов, которые не состоят в нормофлоре;

Третья – бактерии расширяют границы и появляются там, где отсутствуют в нормальных условиях;

Четвёртая – увеличение числа факультативных штаммов и их ассоциаций.

При компенсированном дисбактериозе отсутствуют какие-либо клинические проявления. При субкомпенсированном дисбактериозе наблюдается развитие локального воспалительного процесса в кишечнике. Декомпенсированный дисбактериоз проявляется инфекцией с очагами воспаления в различных органах, развивается интоксикация и сепсис.

Существует классификация дисбиоза по виду доминантного возбудителя: стафилококковый, клебсиеллезный, протейный, бактериоидный, клостридиозный, кандидомикозный и смешанный [44].

Микрофлора толстой кишки здорового человека подавляет рост патогенных микроорганизмов. При дисбактериозе создаются комфортные условия для размножения патогенных микробов, нарушается всасывание желчных и жирных кислот, повышается всасывание аминов. Это приводит к аутоинтоксикации [44].

Важно отметить, что при различных заболеваниях необходимо брать анализ на наличие дисбактериоза. В норме у человека имеется определённая концентрация тех или иных видов бактерий.

С. Н. Бондаренко и другими учёными была составлена таблица, имеющую информацию о содержании микрофлоры кишечника в норме. Она представлена ниже.

Таблица 1

Содержание микрофлоры кишечника в норме (по С.Н. Бондаренко и др)

Наименование микроорганизмов	КОЕ на 1 г фекалий
Бифидобактерии	$10^8 - 10^{10}$
Лактобактерии	$10^6 - 10^9$
Бактероиды	$10^7 - 10^9$
Пептококки и пептострептококки	$10^5 - 10^6$
Эшерихии	$10^6 - 10^8$
Стафилококки гемолитические	Не более 10^3
Стафилококки негемолитические	$10^4 - 10^5$
Стрептококки	$10^5 - 10^7$
Клостридии	$10^3 - 10^5$
Эубактерии	$10^9 - 10^{10}$
Дрожжеподобные грибы	Не более 10^3
Условно-патогенные бактерии	Не более $10^3 - 10^4$

При получении биоматериала, а именно кала, проводят определённые методы микробиологического исследования микрофлоры.

1.4. Обзор на современные методы исследования кишечной микрофлоры (культуральные, молекулярные и т.д.)

В современное время существует целый ряд исследования кишечной микрофлоры. Классическим методом является бактериологическое исследование фекалий [27]. Часть биоматериала предварительно десятикратно разводят и производят посев на различные питательные среды на чашки Петри: определяют 20 видов различных представителей микрофлоры кишечника, как анаэробов, так и аэробов. Количественное содержание микроорганизмов в одном грамме исследуемого биоматериала определяют путём подсчёта колоний,

которые выросли на чашках Петри, а затем полученное число умножают на соответствующее разведение.

Результаты выражаются в КОЕ/г и сравнивают с количественными показателями различных возрастов, указанных в таблице 1 [27]. Также, в настоящее время, учёными были разработаны разные биохимические и физико-химические экспресс-методы, которые активно применяются в диагностике. Они называются так, потому что, позволяют узнать результат в день исследования. При помощи этих методов наблюдают изменения микрофлоры, а именно изменение состава соответствующих метаболитов.

Наибольшую популярность среди экспресс-методов имеют газово-жидкостная хроматография и жидкостная хроматография. Благодаря первому методу можно определить в фекалиях летучие вещества: летучие жидкие кислоты и ароматические соединения (фенолы, индолы); благодаря второму в фекалиях выявляются нелетучие соединения, к ним можно отнести простые или сложные амины, карбоновые кислоты и тому подобные метаболиты. Однако эти методы не позволяют идентифицировать вид микроорганизма, находящегося в исследуемом биоматериале [26].

Экспресс-методы могут применяться во время массовых обследований (скрининга), для этого применяется специальная аппаратура. Полученные данные можно сопоставить с данными, которые были получены бактериологическим методом. Во многих странах экспресс-методы могут заменить классический метод исследования и имеет огромную популярность. В Российской Федерации основной метод исследования нормальной микрофлоры – бактериологический. Экспресс-методы применяют в основном при научных исследованиях и сравнительно редко на практике. Помимо этого большую роль в исследовании микробиома играет ПЦР и ПЦР в реальном времени.

Как известно, в ПЦР в реальном времени совершается мониторинг амплификации ДНК посредством флуоресценции. Во время этого процесса флуоресценция измеряется после каждого цикла, а её интенсивность отражает

количество специфических продуктов амплификации ДНК – ампликонов в биологическом образце в конкретное время. Для усиления флуоресценции применяется краситель SYBR Green [10]. У микробиоты толстого кишечника разнообразный состав и многие из исследуемых культур являются некультивируемыми, следовательно, помимо вышеперечисленных методов исследования большую роль играет секвенирование 16S рРНК. В настоящее время секвенируются те участки ДНК микробиома, благодаря которым можно получить информацию о видовой принадлежности [28].

Из-за изменяющихся условий окружающей среды, появления новых биотопов, неправильному применению антибиотиков, несоблюдению гигиены, вредных привычек людей у многих микроорганизмов развиваются новые характеристики, появляются новые штаммы, особенности культивирования – это одна из причин, затрудняющих микробиологическое исследование. Таким образом, необходимо оптимизировать методы для конкретного объекта исследования.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

В качестве объектов исследования на дисбактериоз толстого кишечника был выбран кал 10 здоровых и 20 больных пациентов клиники БГМУ.

2.2 Оптимизация микробиологического исследования микрофлоры толстого кишечника

Для повышения эффективности диагностики кишечного дисбактериоза необходимо провести системную оптимизацию всех этапов микробиологического исследования — от сбора образцов до интерпретации результатов. Основные направления оптимизации включают:

Преаналитический этап:

Улучшение сбора и транспортировки образцов: использование стерильных контейнеров, строгое соблюдение правил асептики, минимизация времени между взятием и доставкой в лабораторию (не более 1-2 часов).

Правильное хранение: транспортировка при температуре 2–8°C, исключение воздействия факторов, способных изменить микрофлору.

Учет факторов, влияющих на состав микробиоты: прием антибиотиков, диета, стрессовые ситуации, что позволяет правильно интерпретировать результаты.

Аналитический этап:

Использование селективных и дифференциальных питательных сред: подбор оптимальных сред для культивирования различных групп микроорганизмов, таких как Эндо, Сабуро, Левина, ВСА, энтерококкагар.

Стандартизация условий инкубации: температурный режим (37°C), уровень кислорода (аэробные и анаэробные условия), влажность.

Автоматизация процесса подсчета колоний: применение автоматических систем для подсчета и оценки роста, что снижает вероятность ошибок.

Идентификация микроорганизмов:

Внедрение масс-спектрометрии MALDI-TOF: позволяет быстро и точно определить видовую принадлежность микроорганизмов прямо из колоний, сокращая время диагностики.

Молекулярные методы: секвенирование 16S рРНК, ПЦР позволяют выявлять некультивируемые и редкие виды, а также определять их количественный состав.

Постаналитический этап:

Стандартизация отчетов и интерпретации данных: использование унифицированных протоколов и таблиц для оценки нормальных и патогенных уровней микроорганизмов.

Клиническая интерпретация: внедрение алгоритмов и рекомендаций по лечению на основе полученных данных, что повышает эффективность терапии

2.3 Подбор и приготовление питательных сред

Для культивирования биологического материала с целью постановки диагноза «Дисбактериоз кишечника» используются следующие среды.

Висмут-сульфитный агар. Селективная среда предназначена для идентификации бактерий рода *Salmonella spp* по их способности продуцировать сероводород, что проявляется в виде характерных черных колоний с металлическим блеском. Также бактерии, не вырабатывающие сероводород (*Shigella spp*), проявляются в виде зелёных колоний. Рост *E.coli* подавляется, бактерии образуют тусклые колонии. Данную среду приготовить достаточно трудно, а исследуемые колонии растут медленно. Агар является агрессивной средой в плане селективности и может подавлять некоторые штаммы *Salmonella spp*.

Среда Плоскирева. Строгая селективная среда для культивирования бактерий рода *Salmonella* и *Shigella*. Принцип действия: ингибирующие вещества (желчные соли, бриллиантовый зелёный, йод), входящие в состав среды, полностью подавляют рост грамположительной микрофлоры и в 2–3 раза рост кишечной палочки, не препятствуя росту шигелл и сальмонелл.

Среда Левина. Её основное назначение — изоляция и предварительная идентификация грамотрицательных бактерий кишечной группы (семейство *Enterobacteriaceae*), особенно дифференциация лактозоферментирующих и неферментирующих организмов и выделение коагулазоположительных микроорганизмов. Идеальна для культивирования *Escherichia coli*.

Желточно-солевой агар. Среда для культивирования стафилококков (особенно *Staphylococcus aureus*). Позволяет выявлять бактерии, способные расщеплять желток (лизис и осадок). Наблюдается высокая селективность по отношению к стафилококкам. Имеется ограниченная селективность.

Энтерококкагар. Среда для селективного выращивания энтерококков (род *Enterococcus*). Используется для диагностики и подсчёта энтерококков в клинических и пищевых образцах, кроме крови. Является токсичной средой.

Среда Эндо. Среда, используемая для выявления *E. coli* и других энтеробактерий в воде и пище. Данная среда подавляет рост грамотрицательных бактерий. Благодаря кристаллизации фуксина, на колониях *E. coli* появляется металлический блеск.

Кровяной агар. Универсальная питательная среда для культивирования большинства бактерий и некоторых грибов. НЕ является селективной. Позволяет определить гемолитические свойства микроорганизмов.

Среда Сабуро. Специальная среда для культивирования дрожжевых грибов и плесневых грибов (род *Candida*, *Aspergillus* и др.). Имеет кислую реакцию, подавляющую рост бактерий. Лишь в редких случаях возможен рост определённых бактерий.

Тиогликолевая среда. Селективная среда, которая обеспечивает анаэробные условия для культивирования анаэробных бактерий (например, *Clostridium*, *Bacteroides*). Благодаря данной среде контролируется стерильность лекарств, пищевых продуктов, клинического материала.

Лактобакагар. Среда для культивирования и подсчёта молочнокислых бактерий (род *Lactobacillus*). Поддерживает рост полезной микрофлоры, характерной для кишечника и молочных продуктов.

Сульфитный агар. Селективная среда для выделения сульфитредуцирующих клостридий (*Clostridium spp.*). Позволяет обнаруживать бактерии, восстанавливающие сульфиты. Индикатором восстановления сульфита до сульфида является почернение среды (образование преципитата соответствующего оттенка).

Бифидум-среда. Селективная среда для культивирования бифидобактерий (род *Bifidobacterium*). С помощью неё оценивается микрофлора кишечника качество пищевых продуктов и лекарственных средств.

Однако, несмотря на широкий выбор сред, чаще всего используют только кровяной агар. Причинами этого являются:

Универсальность: среда не является селективной и подходит для выращивания очень широкого спектра микроорганизмов.

Диагностическая ценность: агар позволяет не только культивировать бактерии, но и оценивать их гемолитические свойства (альфа-, бета-, гамма-гемолиз или его отсутствие), что важно для идентификации многих видов, например, стрептококков (*Streptococcus spp.*).

Широкое применение: используется и в клинической диагностике, и в научных исследованиях, и в контроле качества продуктов.

Остальные среды являются селективными и применяются для культивирования определённой группы микроорганизмов. Помимо этого, большинство данных сред являются сложными в их приготовлении.

Тиогликолевая среда требует тщательного создания анаэробных условий (удаления кислорода), что обычно достигается с помощью специальных реактивов (тиогликолят натрия) и/или использования анаэробных камер. Приготовление и стерилизация должны проходить с соблюдением строгих условий, чтобы сохранить восстановительную способность среды. Необходим контроль pH и стерильности, чтобы обеспечить жизнеспособность анаэробных бактерий. Бифидум-среда специфическая по составу, содержит компоненты, стимулирующие рост бифидобактерий (например, специфические углеводы и пребиотики). Она может требовать длительного времени нарастания микробной массы, что связано с медленным ростом бифидобактерий. Приготовление требует точного соблюдения рецептуры и стерильности, так как эти бактерии чувствительны к загрязнениям.

Для быстрой диагностики дисбактериоза чаще всего применяют среду Левина или среду Эндо, так как они обеспечивают быстрый рост и дифференциацию основных кишечных бактерий в течение 18–24 часов. Эти среды позволяют оперативно получить важную информацию о составе микрофлоры и выявить дисбаланс.

Для MALDI-TOF MS критично иметь изолированную культуру, а универсальные среды, как КрА и Сабура, способствуют этому. Если требуется анализ именно бактерий, то предпочтение — Кровяному агару; если грибов — Сабура. Также необходимо приготовить среду Эндо для выделения энтеробактерий, однако анаэробы подавляются.

КрА (Кровяной агар)

Растворяют 39,0 г основы в 1000 мл дистиллированной воды при нагревании. Автоклавируют при 121 °C в течение 15 минут. Охлаждают нагретую среду до 45–50 °C. Затем идёт добавление дефибрированной бараньей крови до концентрации 5–10%, перемешать и перенесут среду в стерильные чашки. Кровяной агар применяют для выделения из клинического материала

микроорганизмов, их культивирования и выявления гемолитической активности.

Среда Сабуро. Есть два варианта приготовления среды: жидкая и плотная. Приготовление жидкой среды:

54 г сухой среды развести в 1 л очищенной воды.

Довести до кипения, кипятить 1–3 минуты до полного растворения.

Охладить, откорректировать рН (5,5–5,7), разлить по 5 мл в стерильные пробирки

Стерилизовать в течение 20 минут при температуре 112 °С.

Приготовление плотной среды:

66 г сухой среды развести в 1 л очищенной воды.

Довести до кипения, кипятить 1–3 минуты до полного растворения.

Охладить, откорректировать рН (5,5–5,7).

Снова довести до полного расплавления агара, при необходимости профильтровать через ватно-марлевый фильтр.

Стерилизовать при температуре 112 °С в течение 20 минут.

Среду охладить до температуры 50 °С, разлить в стерильные чашки Петри.

Оставить чашки открытыми при комнатной температуре для застывания и подсушивания на 1,5 часа в асептических условиях. Сабуро является основной средой для выделения грибов.

Среда Эндо. 40 г питательной среды размешивают в 1 л дистиллированной воды и кипятят 2 минуты до полного расплавления агара. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр, затем охлаждают до 45–50 °С и разливают в стерильные чашки Петри. После застывания поверхность среды подсушивают при температуре 18–25 °С в течение 40–60 минут. Готовую среду используют в

день приготовления. До посева хранят в темноте, так как на свету данная среда окисляется. Среда Эндо предназначена для выделения энтеробактерий.

2.4 Использование тиогликолевой кислоты для переноса биологического материала

Тиогликолевая кислота используется в транспортных средах для кала, предназначенных для бактериальных анализов. Она используется из-за ряда преимуществ.

Создание анаэробной среды.

Тиогликолевая среда является восстанавливающим агентом. Она удаляет анаэробные и микроаэрофильные условия

Ингибирование роста нежелательных бактерий.

Некоторые бактерии в образце кала могут быстро размножаться при комнатной температуре, что может привести к искажению результатов анализа. Тиогликолевая кислота, наряду с другими компонентами транспортной среды (например, буферами и антибиотиками), может подавлять рост этих оппортунистических или быстрорастущих бактерий, тем самым сохраняя относительное соотношение между различными бактериальными видами в образце, как оно было на момент сбора. Это особенно важно для выявления патогенов, которые могут быть в меньшинстве.

Поддержание pH.

Транспортная среда с тиогликолевой кислотой обычно содержит буферы, которые помогают поддерживать стабильный pH. Изменения уровня кислотности могут негативно влиять на жизнеспособность бактерий, поэтому поддержание его стабильности является важным для сохранения образца.

Сохранение жизнеспособности широкого спектра бактерий.

Тиогликолевая кислота, в сочетании с другими компонентами транспортной среды, позволяет сохранить жизнеспособность как аэробных, так и анаэробных бактерий, а также факультативных анаэробов. Это важно, поскольку в кале

присутствует широкий спектр микроорганизмов, и необходимо сохранить жизнеспособность всех потенциально важных видов.

Предотвращение окисления.

Тиогликолевая кислота предотвращает окисление других компонентов среды и бактериальных клеток, тем самым защищая их от повреждения.

2.5 Приготовление биологического материала, посеvy и инкубация

Разведение кала в микробиологии — часть бактериологического исследования, которое помогает определить качественный и количественный состав микрофлоры кишечника. Все пациенты за несколько дней до взятия кала на анализ должны соблюдать диету, для исключения продуктов, вызывающие брожение в кишечнике, исключить употребление алкоголя и противомикробных препаратов. Между последним приёмом пищи и взятием материала должно пройти примерно 12 часов.

Испражнения собирают в стерильный герметичный контейнер с широким горлышком и плотно закрывающейся крышкой без консерванта [43].

Материал берут из средней порции кала стеклянной или деревянной палочкой в количестве не менее 1 г. Если в испражнениях есть слизь, хлопья, гной, то данные патологические выделения следует включать в исследуемую пробу. В лабораторию материал доставляют за 1-2 часа после его взятия у пациента, при необходимости в холодильной сумке. Важно отметить, что между взятием и посевом материала должно пройти не более, чем четыре часа [43].

Взвешивают 1 г кала (без добавления консервантов), разводят в 9 мл физиологического раствора (0,85% раствор хлорида натрия), получая исходное разведение материала (10^{-1}). Содержимое контейнера тщательно перемешивают стеклянной палочкой и оставляют при комнатной температуре (18-25 °C) на 10-15 минут [43].

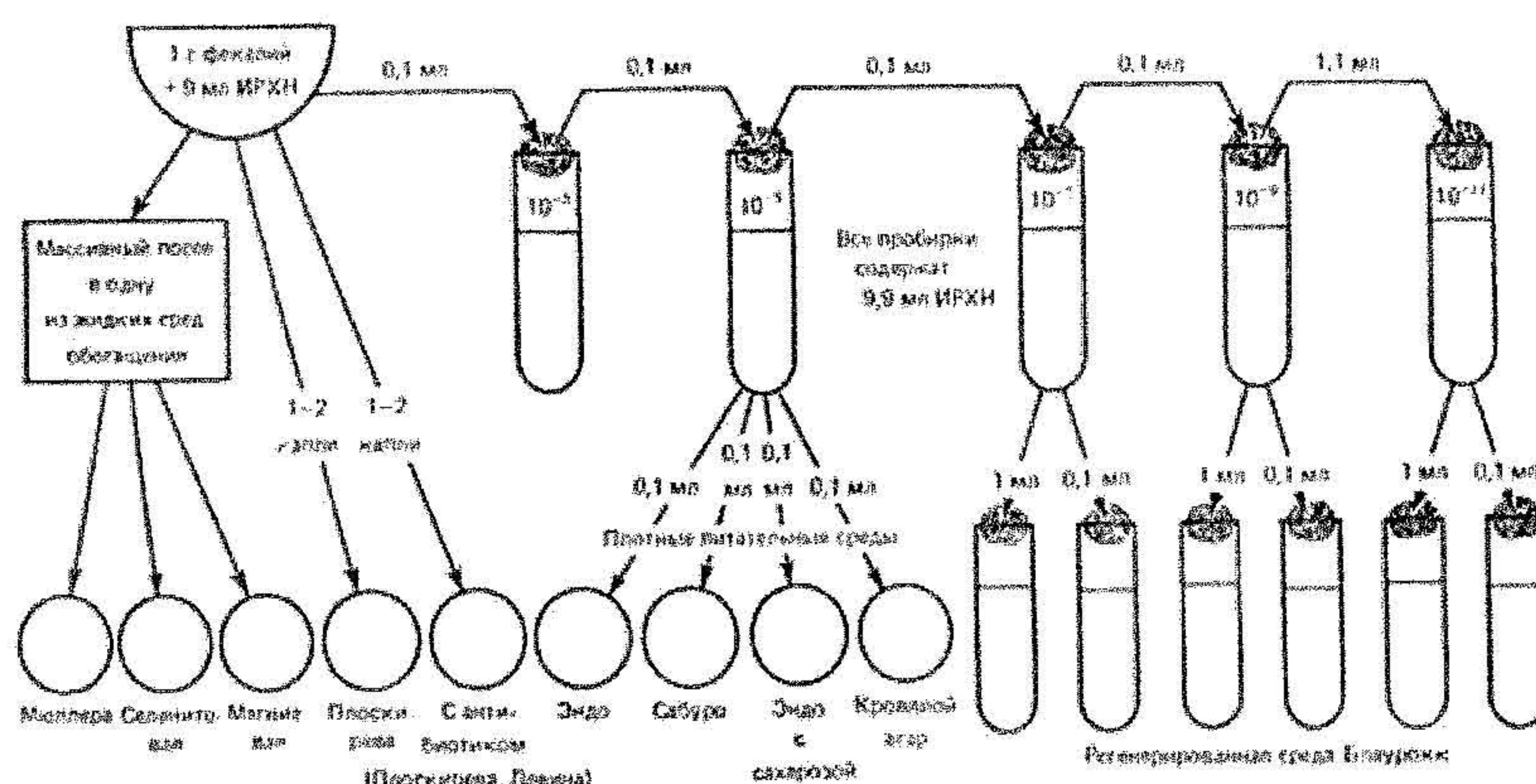


Рисунок 1. Схематичное изображение метода разведения кала для посева на дисбактериоз.

Из исходного разведения делают высев на среды, которые используются для выделения патогенных энтеробактерий и жидкие среды обогащения для выделения патогенных кишечных палочек. К ним относятся среда Плоскирева, Левина и висмут-сульфит агар (ВСА). Далее готовят ряд последующих разведений материала в физиологическом растворе до 10^{-11} . В конце 1 мл сбрасывают. Каждое разведение кала готовят новой стерильной пипеткой.

Таблица 2.

Группы микроорганизмов и необходимое разведение для посева

<i>Candida</i>	До 10^5
<i>Enterococci</i>	До 10^7
<i>E.coli</i>	До 10^7-10^8
<i>Staphylococcus</i>	До 10^5
<i>Streptococcus</i>	До 10^5
Анаэробы	До 10^4
Клостридии	До 10^5

Из приготовленных разведений делают посевы на питательные среды для культивирования различных групп микроорганизмов. На плотные среды в чашках Петри наносят 0,1 мл взвеси из соответствующих разведений с

последующим втиранием материала шпателем (метод Дригальского). В жидкие, полужидкие и плотные среды, разлитые в пробирки высоким столбиком вносят 1 мл (см. табл 2). После предварительного разведения биологического материала (кала) пациентов до 10^{11} , каждое разведение, кроме 10^8 и 10^{10} , было культивировано на определённые питательные среды, из последней колбы 1 мл ушёл на сброс.

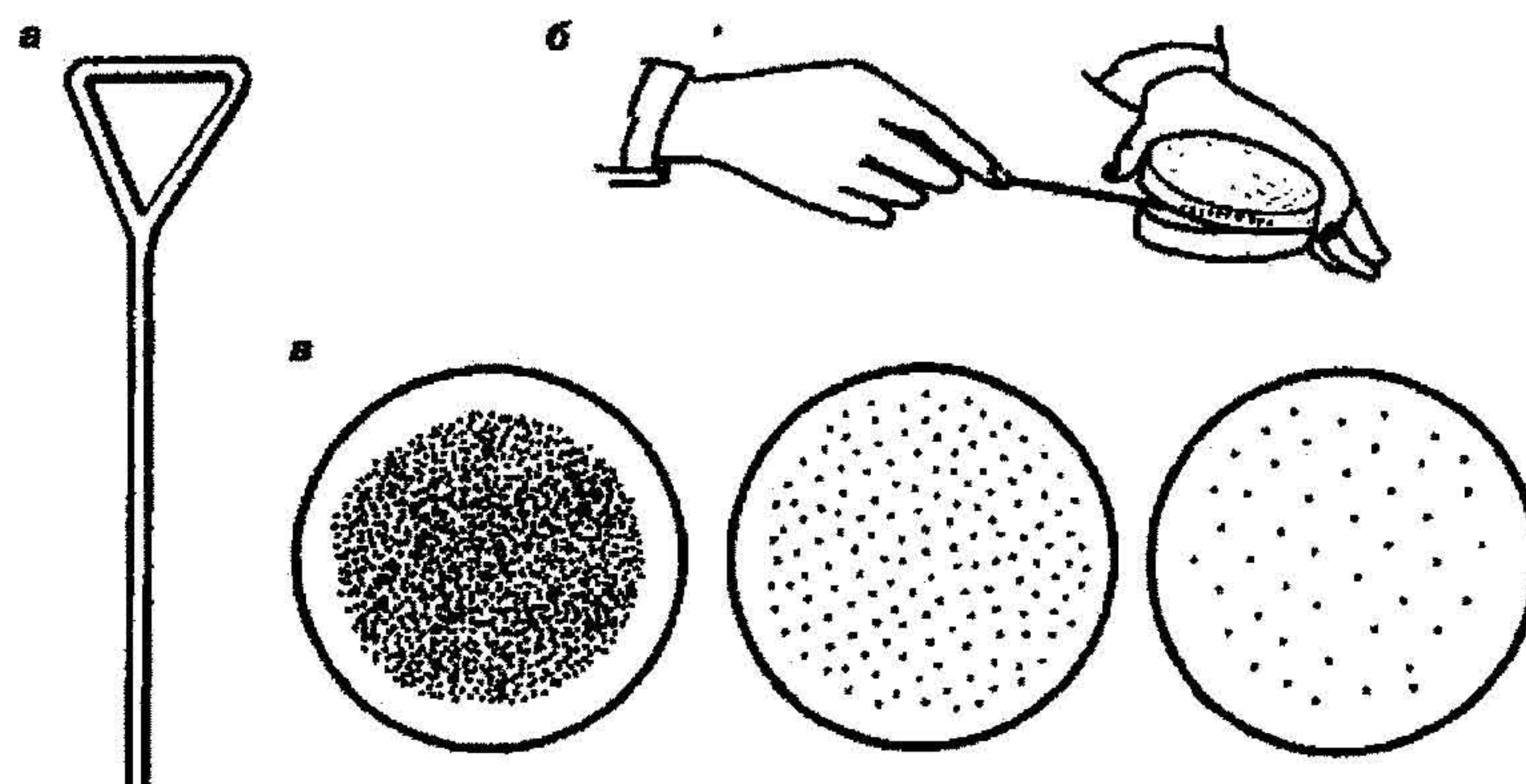


Рисунок 2. Рассев культуры на питательные среды с помощью шпателя Дригальского (метод Дригальского). *а– шпатель Дригальского; б–рассев; в–рост микроорганизмов*

Помимо посева с помощью шпателя Дригальского, нами были произведены следующие посевы:

Метод параллельных штрихов – посев культуры штрихами по поверхности агара.

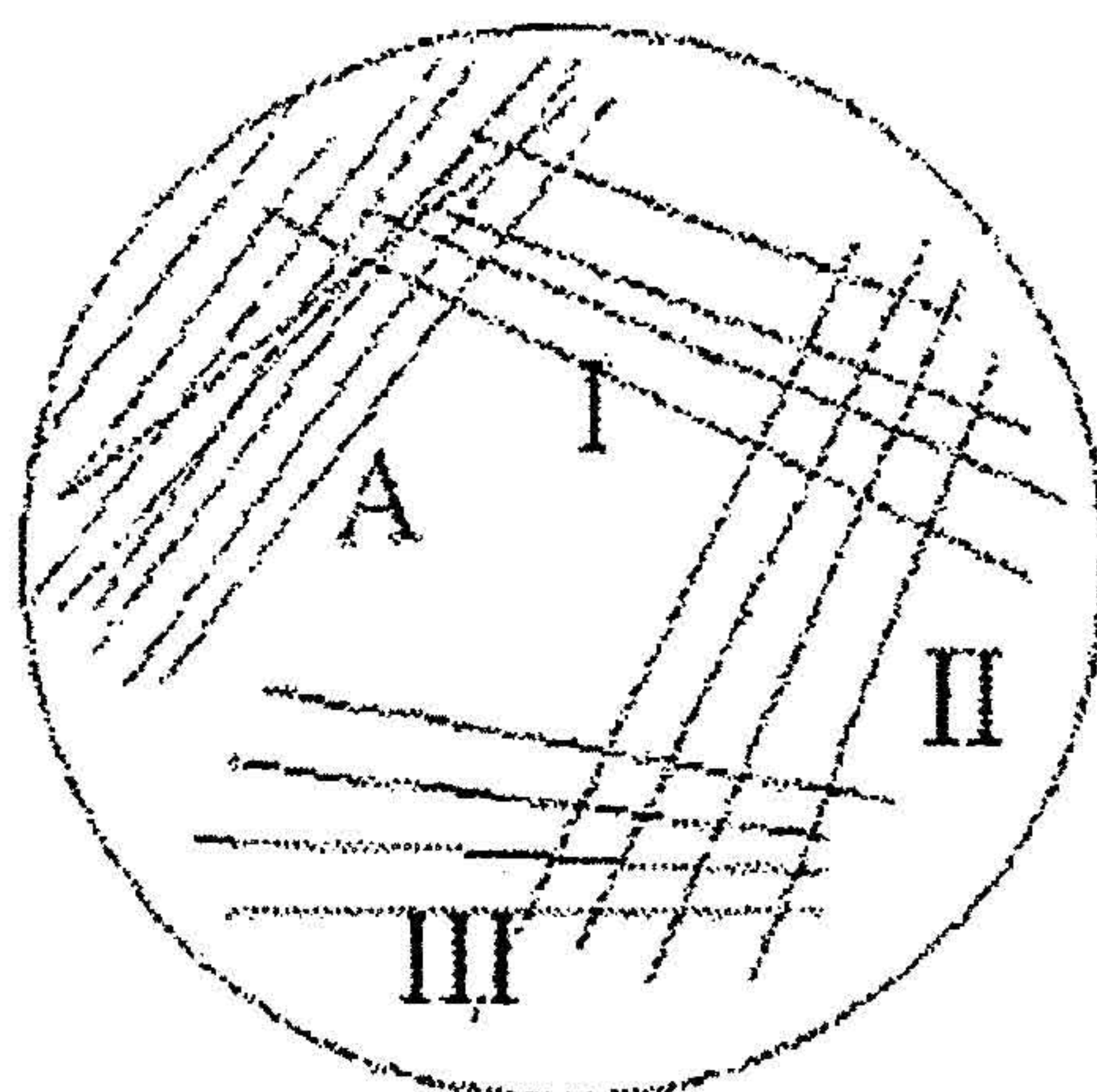


Рисунок 3. Схема бактериального посева по Голду.

Метод Голда, или же метод секторных посевов. При данном методе чашку Петри с агаром делят на 3 сектора. На первый засевают культуру петлей частыми штрихами, после чего петлю стерилизуют. Затем стерильной петлей уже более редкими параллельными штрихами переносят микроорганизмы из первого сектора во второй, после чего вновь стерилизуют петлю над горелкой. Таким же способом переносят микроорганизмы из второго сектора в третий.

Метод Коха (метод рассева в глубине среды). Культуру последовательно разводят в расплавленном агаре в пробирках. Затем содержимое пробирок переносят в чашки Петри и инкубируют в термостате. Изолированные колонии вырастают в толще агара. В настоящее время этот метод используется редко.

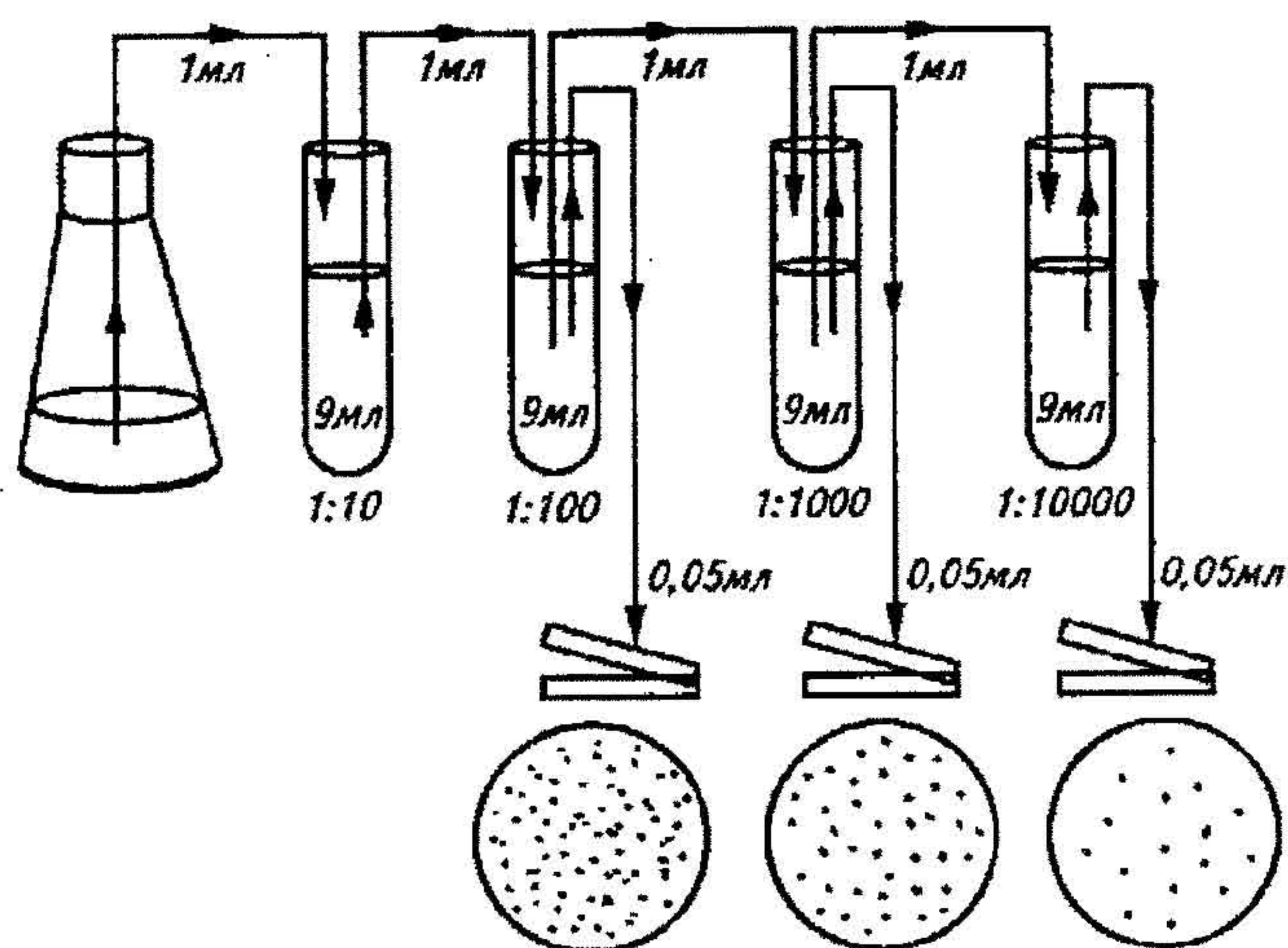


Рисунок 4. Посев по методу Коха (метод разведений, количественный метод)

Для создания комфортных условий для роста микроорганизмов, посевы помещают в термостаты, обеспечивающие определённый диапазон температуры. Колонии на чашках находились в термостате при 37°C на протяжении недели. Каждый день проводилась проверка роста культивированного биологического материала. Для культивирования анаэробов используются специальные анаэроостаты, эксикаторы, которые обеспечивают благоприятные условия для роста данных микроорганизмов [43].

2.6 Использование масс-спектрометрии

Масс-спектрометрия произвела революцию в микробиологии благодаря своей скорости, точности и широкому спектру применения. Она позволяет быстро и надежно идентифицировать микроорганизмы, обнаруживать антибиотикорезистентность и проводить другие важные анализы.

Основное преимущество метода масс-спектрометрии в микробиологии: быстрая и точная идентификация микроорганизмов. Масс-спектрометрия обеспечивает быструю идентификацию микроорганизмов – результаты часто доступны в течение нескольких минут после подготовки образца. Также ещё одно из преимуществ — точность: масс-спектрометрия позволяет идентифицировать микроорганизмы на уровне видов и даже штаммов с высокой точностью. Она анализирует уникальный белковый профиль каждого микроорганизма, создавая своего рода "отпечаток пальца", который сравнивается с базой данных известных микроорганизмов. С помощью данного метода мы можем идентифицировать широкий спектр микроорганизмов, включая бактерии, грибы, вирусы и паразиты.

Каждая чашка Петри с колониями подвергалась исследованию с помощью масс-спектрометрии, что является незаменимым инструментом в фундаментальной и прикладной микробиологии. Одним из основных преимуществ масс-спектрометрии MALDI-TOF перед другими методами исследования является её способность быстро и надежно идентифицировать широкий спектр микроорганизмов непосредственно из селективной среды [8].

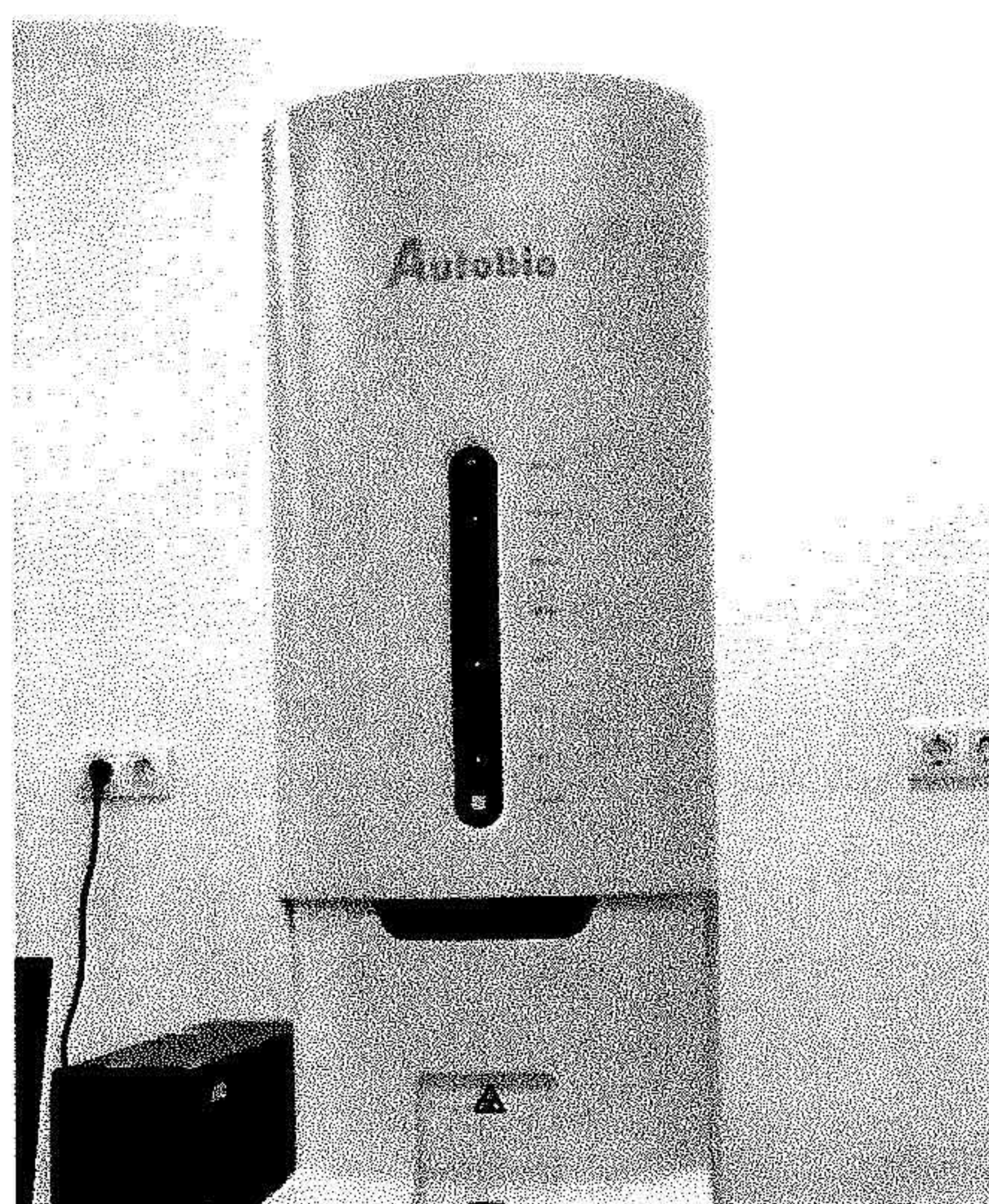


Рисунок 5. Масс-спектрометр Autobio AutoF MS 2600.

Перед запуском непосредственно самого устройства и компьютера, куда производится вывод спектров, необходимо приготовить планшет с исследуемыми культурами в лунках. Стерильной зубочисткой, предварительно достав её из упаковки, забирают часть нужной культуры для исследования, стараясь не задеть агар.

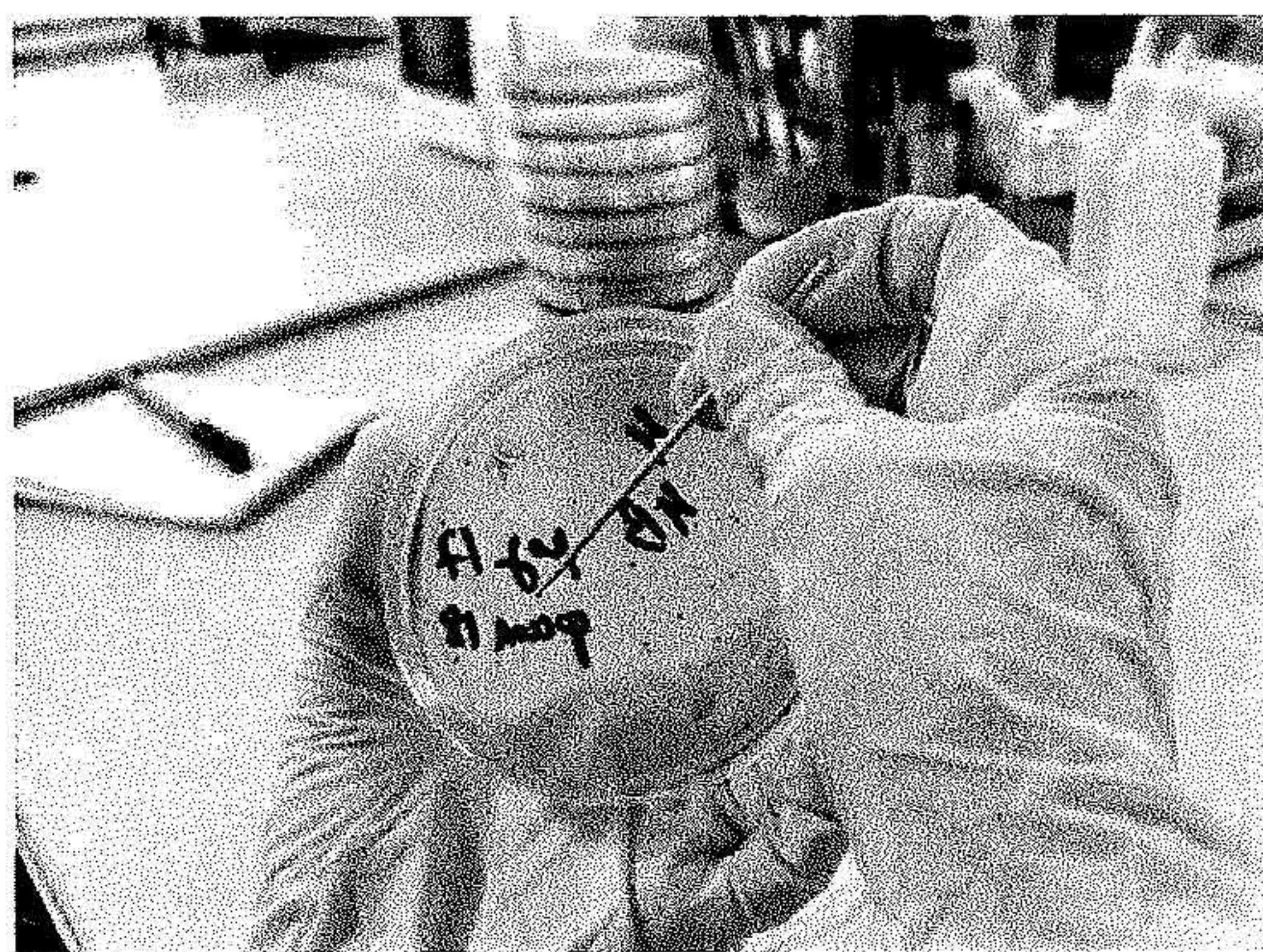


Рисунок 6. Забор колонии на масс-спектрометрию.

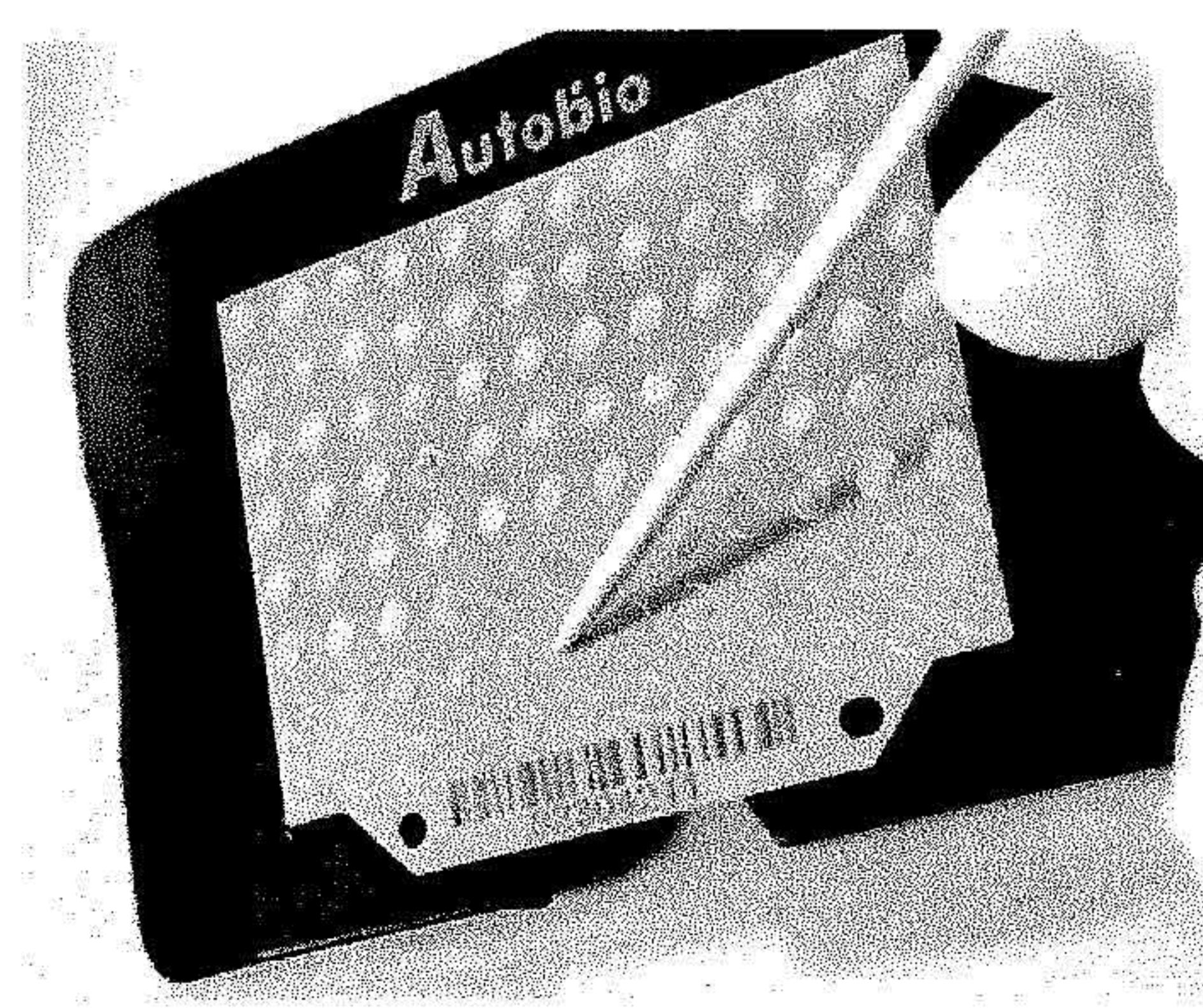


Рисунок 7. Планшет с ячейками с нанесением бактериологических культур на них

В стерильную лунку на специальном планшете зубочисткой наносится исследуемая культура. Каждая лунка предназначена для одной культуры и обозначена цифрой и буквой. Под этим номером записывается исследуемая

культура с обозначением её морфологических характеристик и питательной среды, на которой она выросла.

После внесения колоний на планшет с ячейками наносится специальный буфер (матрица) для более точного выявления микроорганизменных липидов, которые составляют видовое разнообразие микроорганизмов [15]. Добавляется 1 микролитр матрицы с помощью дозатора в каждую ячейку.

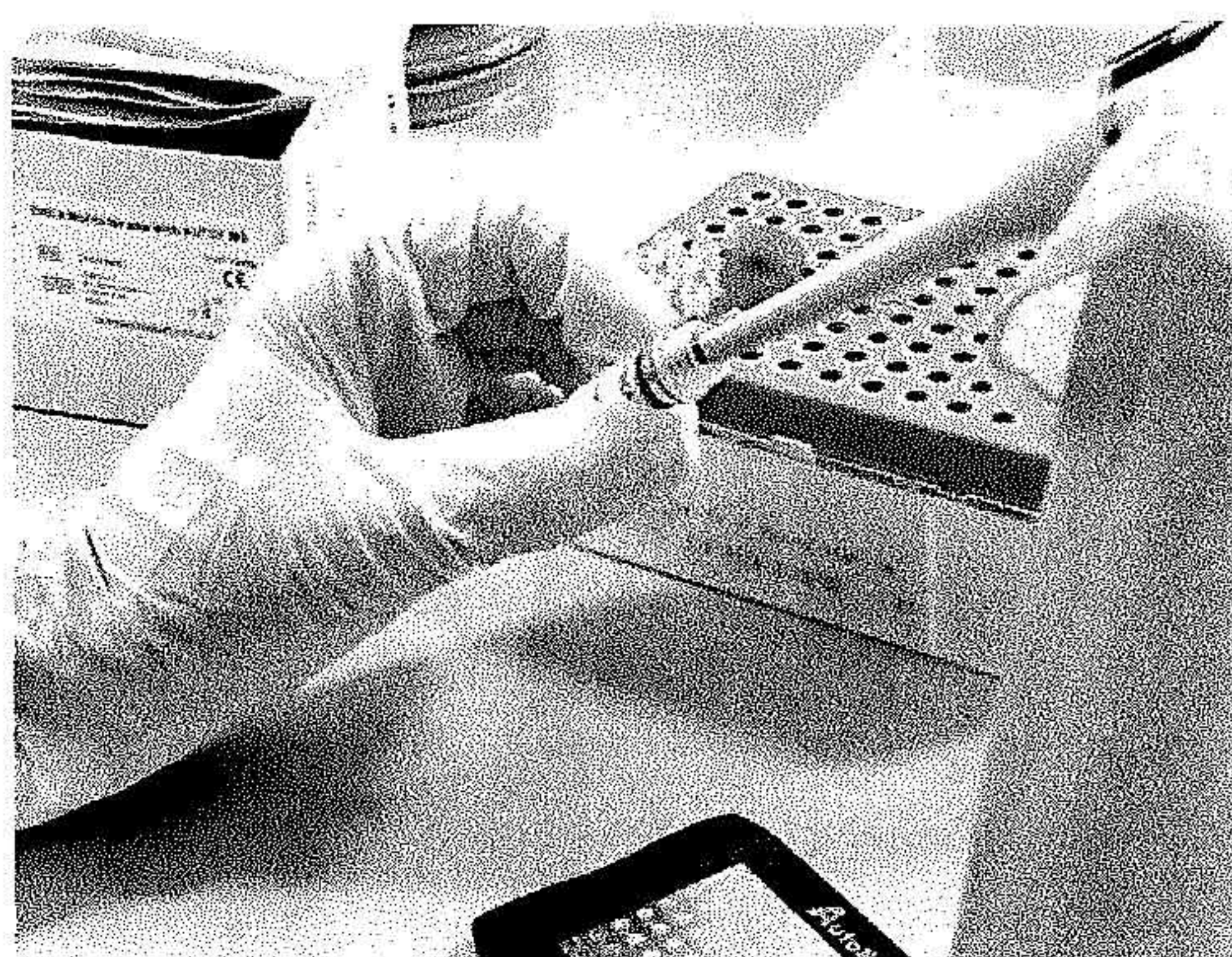


Рисунок 8. Забор матрицы из сосуда.

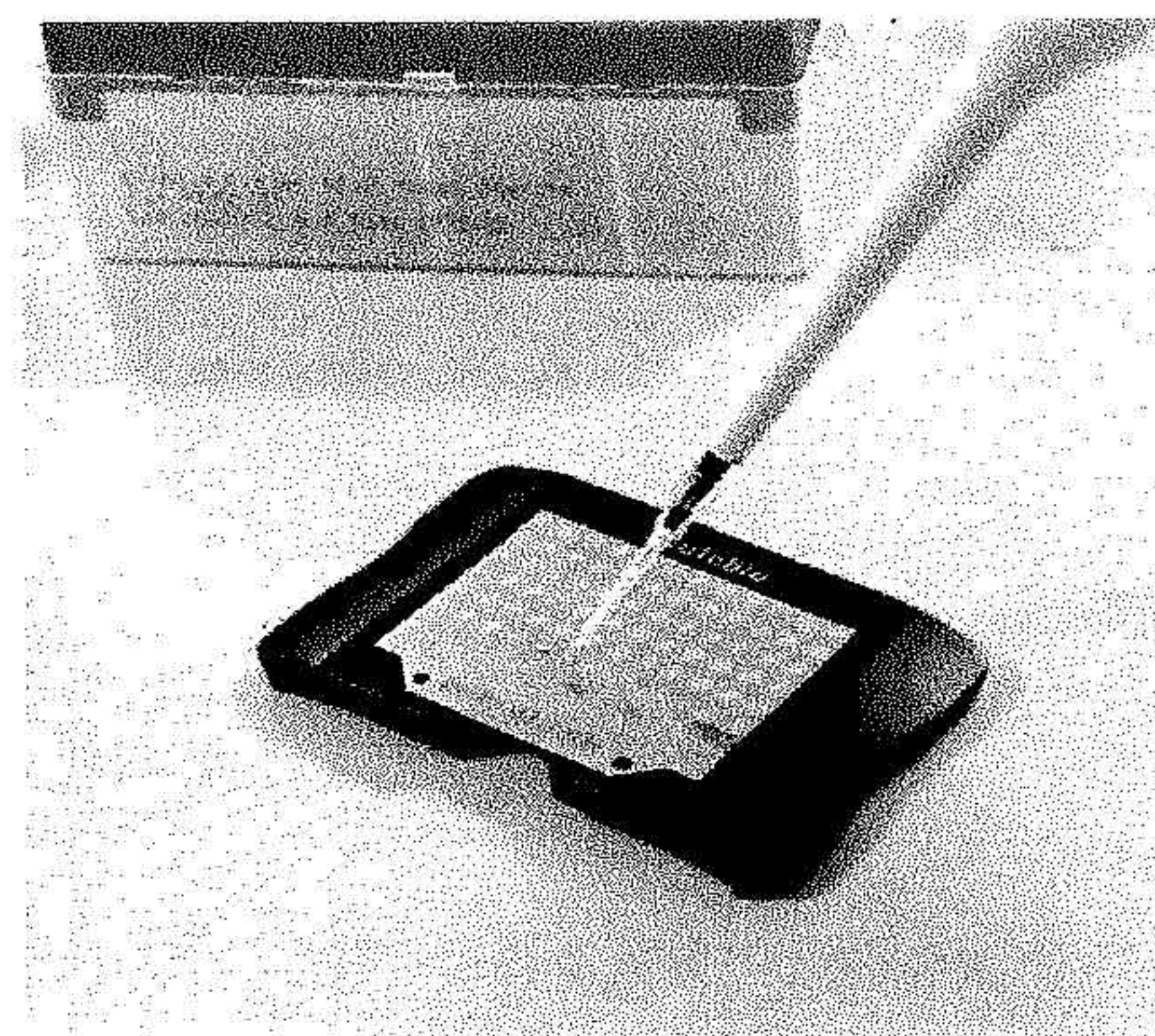


Рисунок 9. Добавление матрицы в лунки с колониями.

После этого включают масс-спектрометр вместе с запущенной на компьютере программой. После щелчка открывается небольшое окошко, в которое необходимо поместить планшет.

После этого, данное окошко закрывается и после нажатия на кнопку масс-спектрометр поднимает планшет к лазерам. Во время этого необходимо обозначить необходимые для пропуска лазером ячейки, обозначая их конкретным названием питательной среды и морфологическими характеристиками неизвестной колонии. На экран будут выводиться спектры с выведенными результатами.

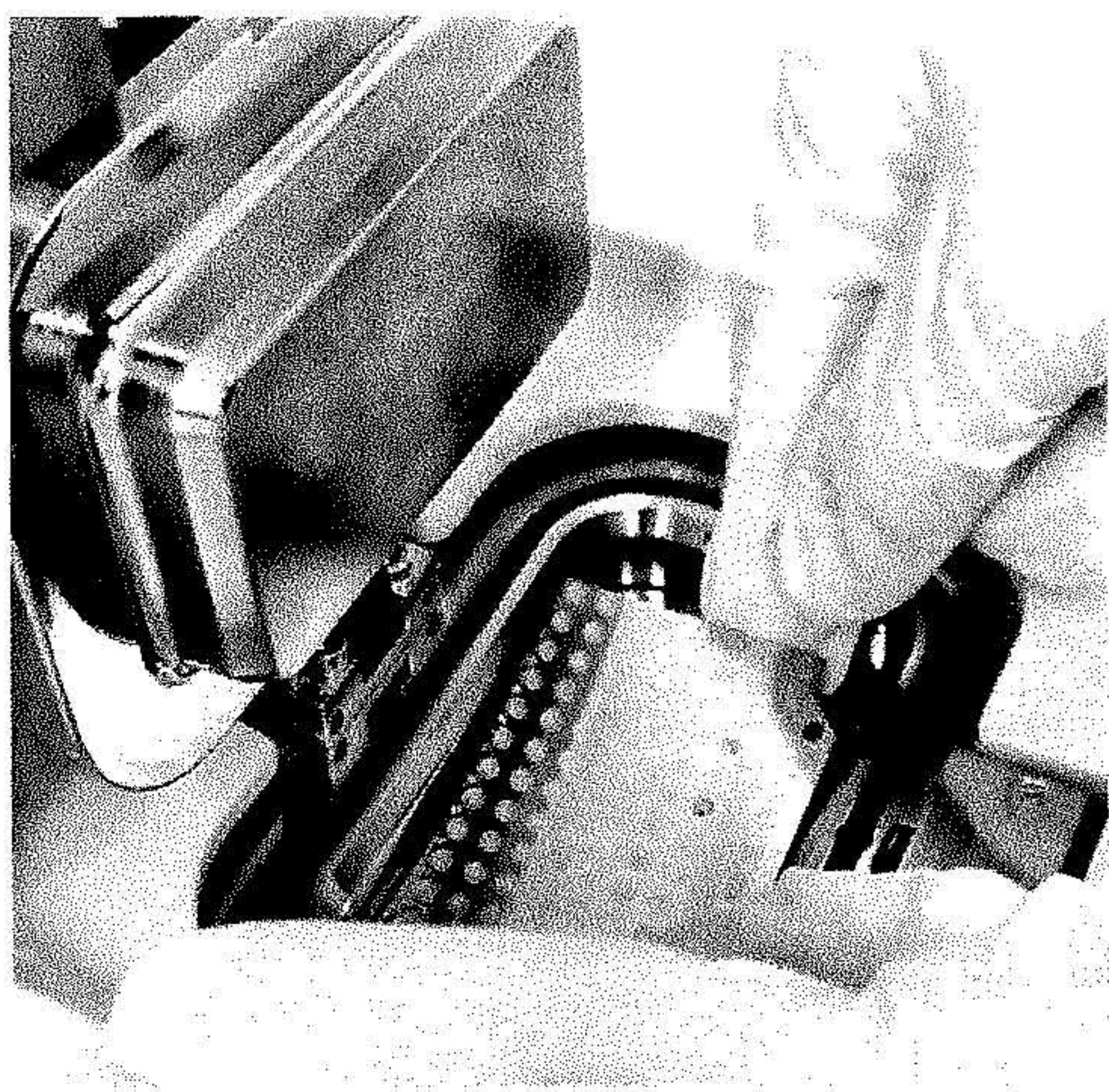


Рисунок 10. Помещение планшета в масс-спектрометр.

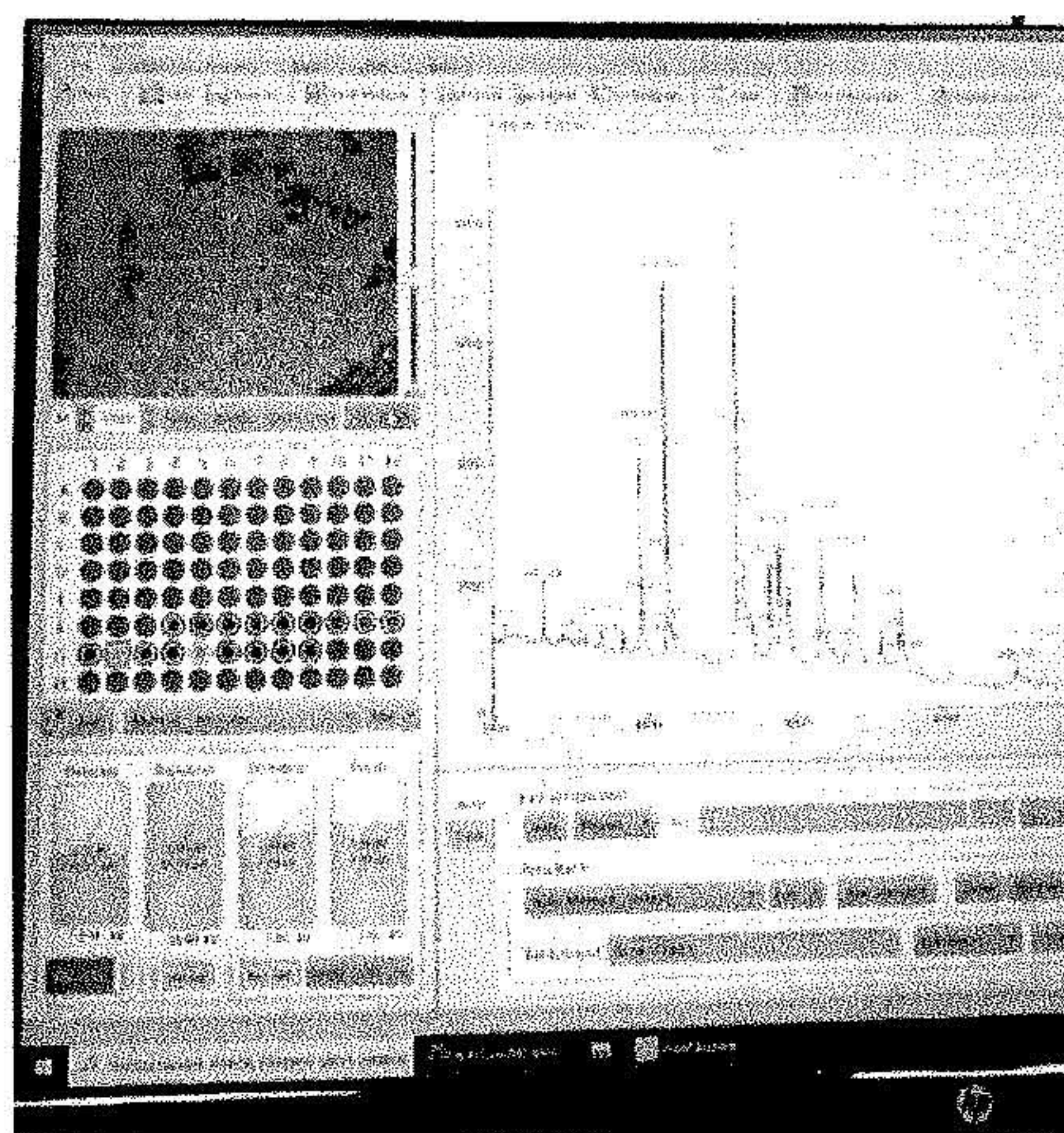


Рисунок 11. Компьютер с выведенным спектром.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Сравнение эффективности питательных сред и условий доставки биологического материала

На чашки Петри первоначально с помощью шпателя Дригальского втиралась смесь биологического материала с физическим раствором. После культивирования нами было принято решение сделать пересев для выделения чистой культуры. Использовался метод по Голду для подтверждения его высокой информативности. Идентификация проводилась с помощью метода масс-спектрометрии.

У представителей здоровых пациентов была выявлена стабильная, характерная для данного биоценоза, популяция микроорганизмов, составляющая аутохтонную микробиоту.

На кровяном агаре выросли серые и полупрозрачные колонии *Escherichia coli* (*E.coli*). На нём же был культивирован биологический материал, выросли серые крупные колонии *E.coli*, белые колонии с отрицательным гемолизом бактерии группы *Neisseria spp* и мелкие колонии с альфа-гемолизом бактерии *Streptococcus oralis* (*S.oralis*). На Сабуро наблюдался рост ярко-фиолетовых колоний *Candida krusei* (*C.krusei*) и бледно-фиолетовых колоний *Candida parapsilosis* (*C.parapsilosis*) размером. На среде Эндо была выделена кишечная палочка *E.coli* в виде розовых крупных колоний; в некоторых случаях отсутствовал рост каких-либо колоний.

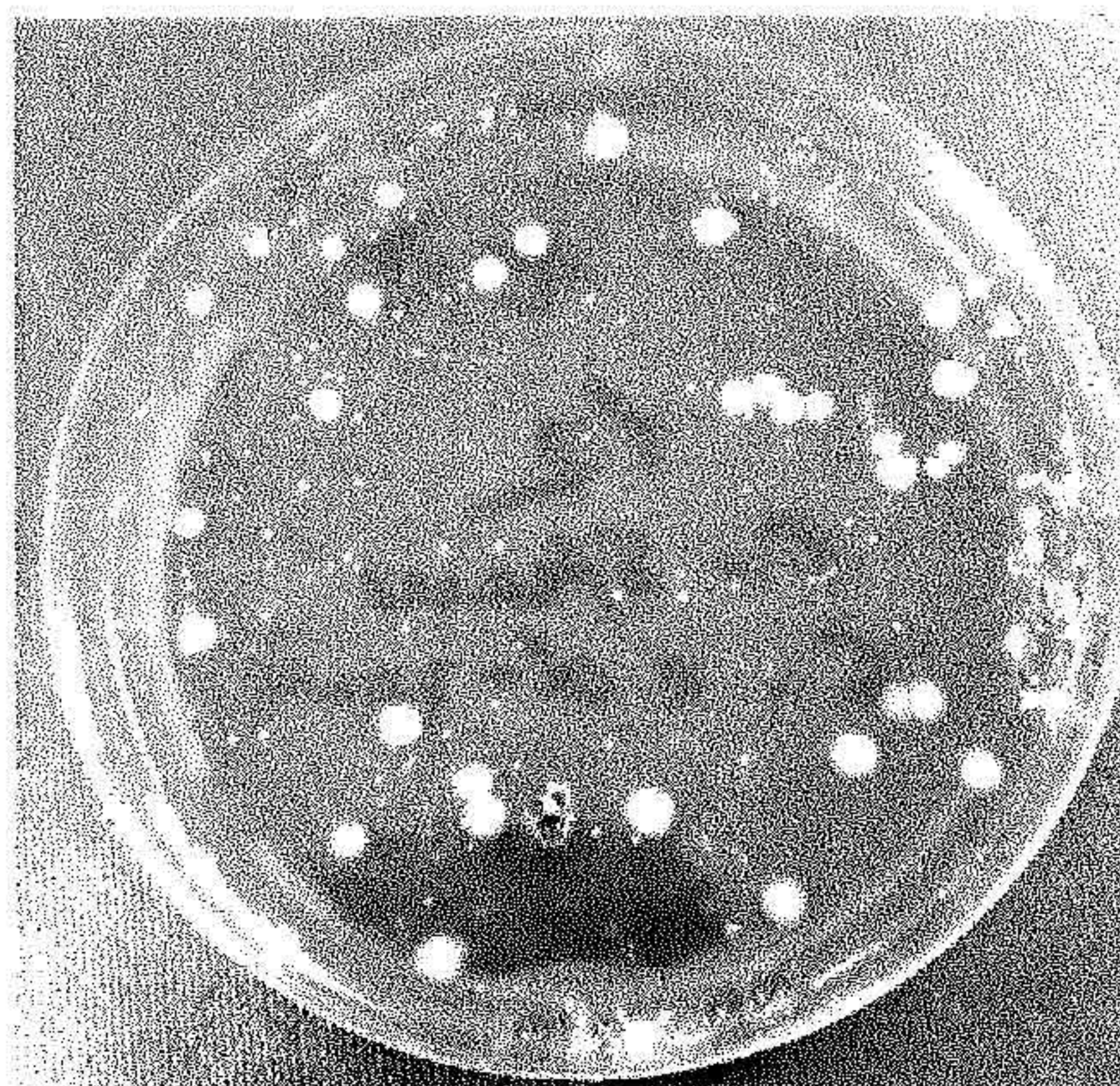


Рисунок 12. Кровяной агар с колониями *Neisseria spp* и *S.oralis*.

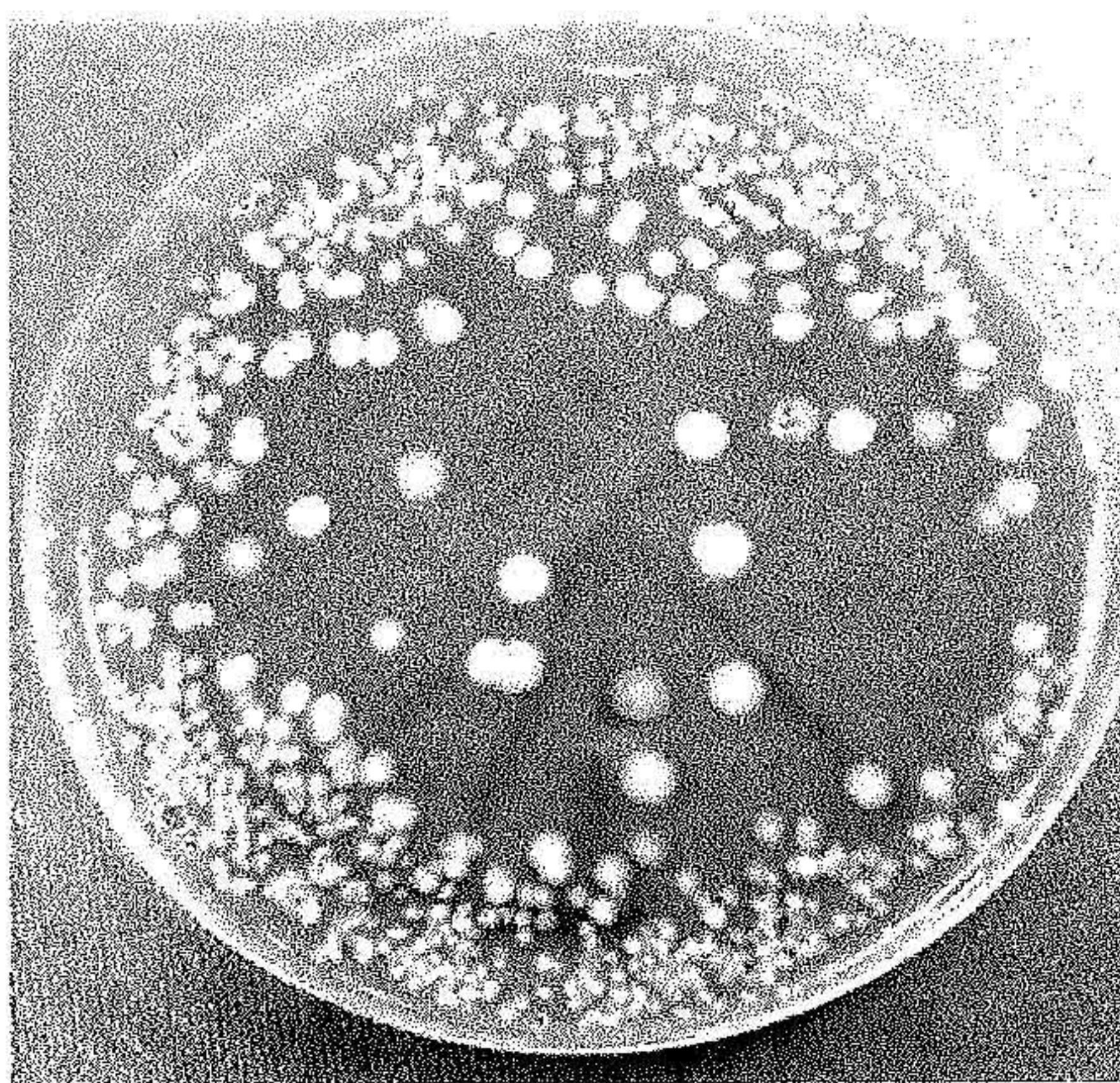


Рисунок 13. Кровяной агар с колониями *E.coli*

У пациентов с диагнозом дисбактериоз толстого кишечника нами были выявлены различия в средах культивирования у колоний микроорганизмов и их количестве.

На чашках Петри со средой Эндо выросли колонии *E.coli* с металлическим блеском, крупная розовая колония *Pseudomonas aeruginosa*, перламутро-розовые колонии *E.coli* с металлическим блеском.

На чашках Петри с кровяным агаром нами были выделены: серые гемолиз-отрицательные колонии *E.coli*, мелкие альфа-гемолизные колонии *Streptococcus mitis* (*S.mitis*) и крупные белые колонии с бета-гемолизом *Neisseria spp.* Также нами были выделены крупные белые гемолиз-положительные колонии *Kocuria carniphila* [32]. Бактерии этого рода распространены повсеместно, они имеют высокую устойчивость к воздействию различных стрессовых факторов и на данный момент плохо изучены. Также были выделены мелкие колонии *S.gallolyticus*, альфа-гемолизные колонии *S.mitis* и белые гемолиз-отрицательные колонии *Corynebacterium spp.*

На среде Сабуро были выделены бело-розовые мелкие слизистые колонии *C.parapsilosus*. Данный гриб является условно-патогенным для кишечника и вызывает кандидоз. Также наблюдался рост тёмно-фиолетовых колоний с розовым центром относящихся к грибу *C.krusei*.

Из результатов можно сделать вывод, что посев по Голду является эффективным и позволяет выделить ряд микроорганизмов из биологического материала. Кровяной агар отличается своим разнообразием результатов. Он не является селективной средой, позволяет выявлять гемолитическую активность микроорганизмов, что помогает дифференцировке бактерий. Минус данного агара — вероятное подавление ряда патогенных микроорганизмов. Данную среду можно использовать как универсальную.

Эндо предназначена для энтеробактерий и в большинстве своём подавляет анаэробные микроорганизмы, из-за чего невозможно использовать данную среду при быстрой диагностике дисбактериоза толстого кишечника, так как большую часть микрофлоры данного органа составляют анаэробные микроорганизмы.

Среда Сабуро является универсальной средой для выделения грибов. Она широко применяется в медицине. Однако, на ней не растут определённые бактерии. Встречались лишь редкие случаи.

Важно отметить, что качественный состав, составляющий кал, не подвергся негативным влиянием внешних факторов. Это из-за того, что в качестве транспортной среды для данного биологического материала использовалась тиогликолевая среда, имеющая ряд полезных качеств, в том числе поддержание условий для анаэробов и уровня кислотности для предотвращения смерти микроорганизмов.

Также, тиогликолевая среда позволяет сохранить биологический материал в изначальном составе на более шести часов. При условии неправильной транспортировки кала в лабораторию, входящие в него микроорганизмы погибнут, и состав не будет таким, каким он был при заборе на анализ и исследование. Также кал в изначальном составе способен сохраняться лишь на два часа и не меньше.

Вследствие этого, можно сделать вывод — внедрение тиогликолевой среды в качестве транспортной является важным и необходимым решением. Это

сохранит прежний состав определённого биологического материала, что пойдёт в пользу микробиологического исследования.

3.2. Использование масс-спектрометрии и полученные спектры со сред

Масс-спектрометрия является одним из важнейших и инновационных инструментов в научной и клинической практике. Благодаря принципу работы данного механизма, можно точно определить видовую принадлежность микроорганизмов, его наличие в лаборатории является одним из преимуществ и улучшает диагностику и идентификацию микроорганизмов. Её внедрение необходимо для ускорения диагностики, отчего был разработан примерный протокол (см Приложение 3).

Для масс-спектрометрии исследуемых колоний использовались чашки Петри с кровяным агаром. Для масс-спектрометрии необходимо иметь изолированную культуру.

Сначала нами рассматривались колонии, выделенные из биологического материала здоровых пациентов, а именно чашки Петри с кровяным агаром.

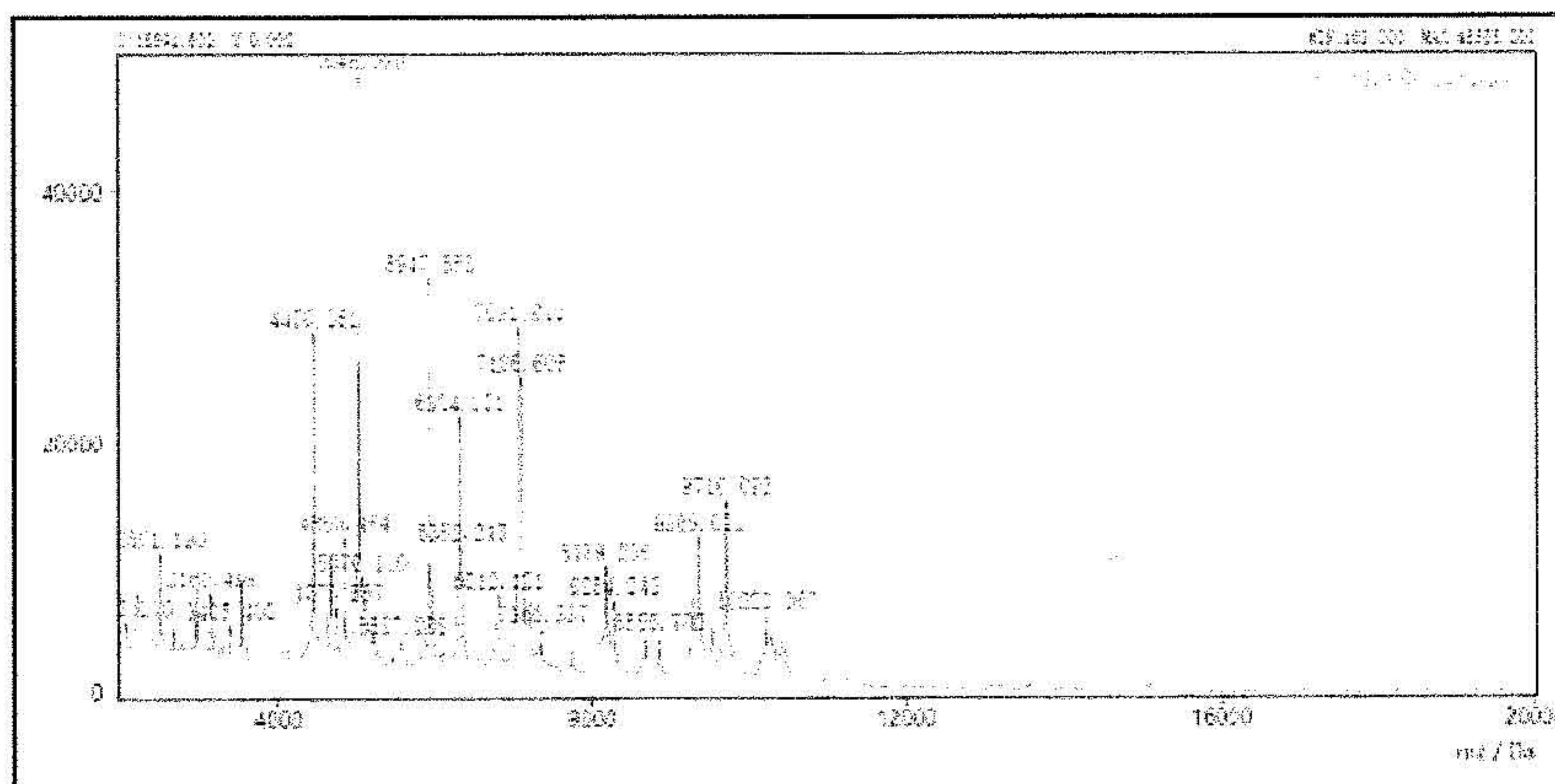


Рисунок 14. Масс-спектрометрия *Neisseria spp* на кровяном агаре.

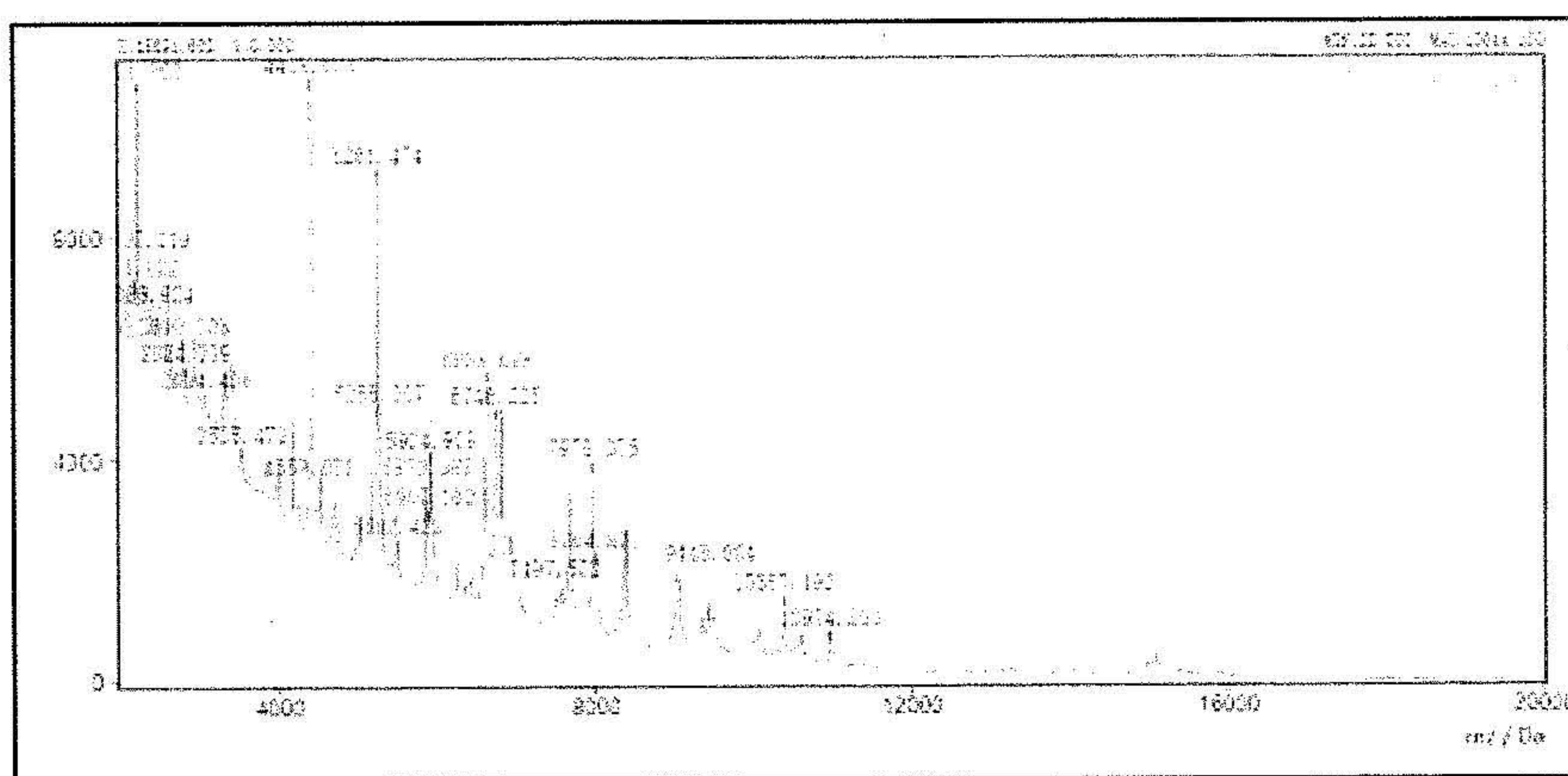


Рисунок 15. Масс-спектрометрия *Streptococcus oralis*

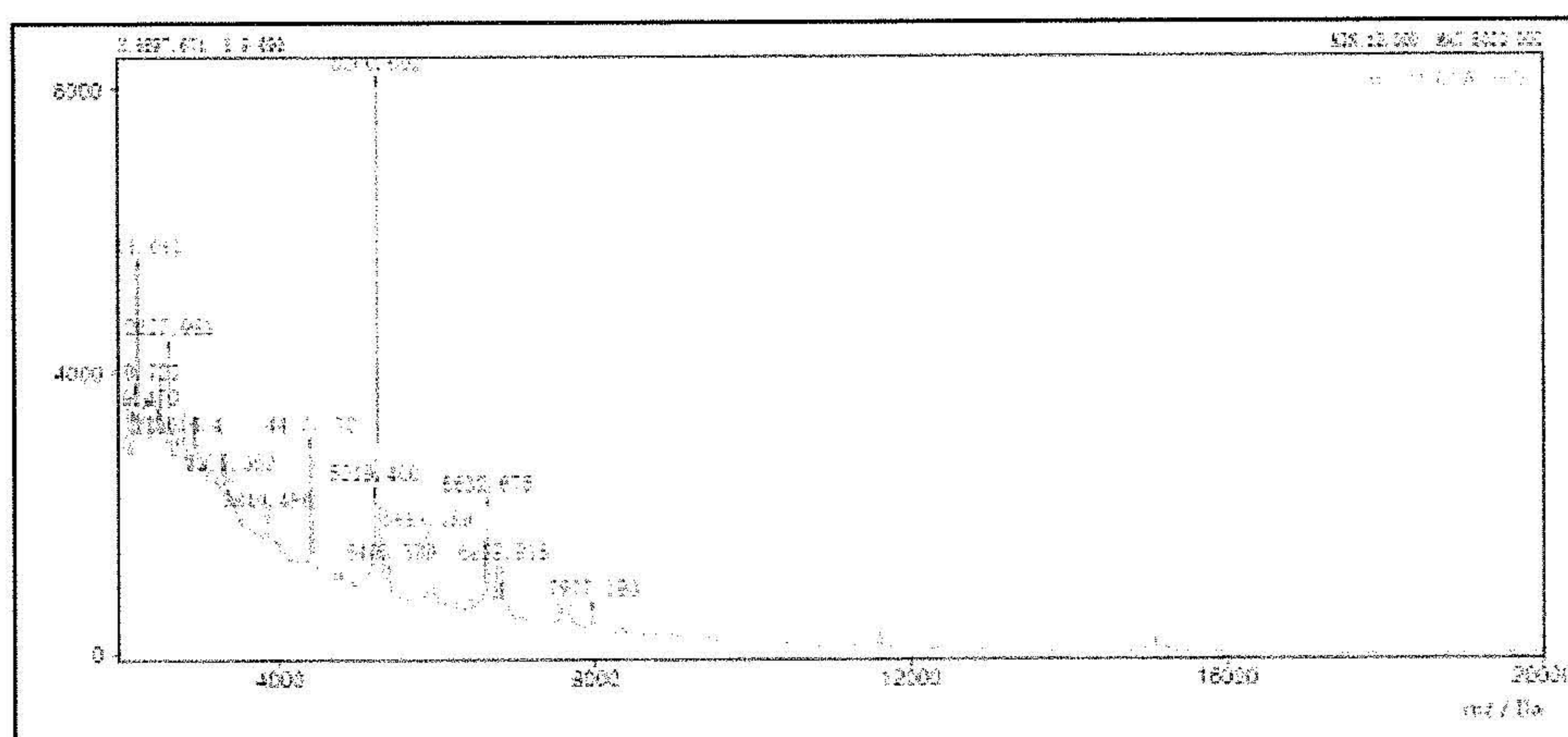
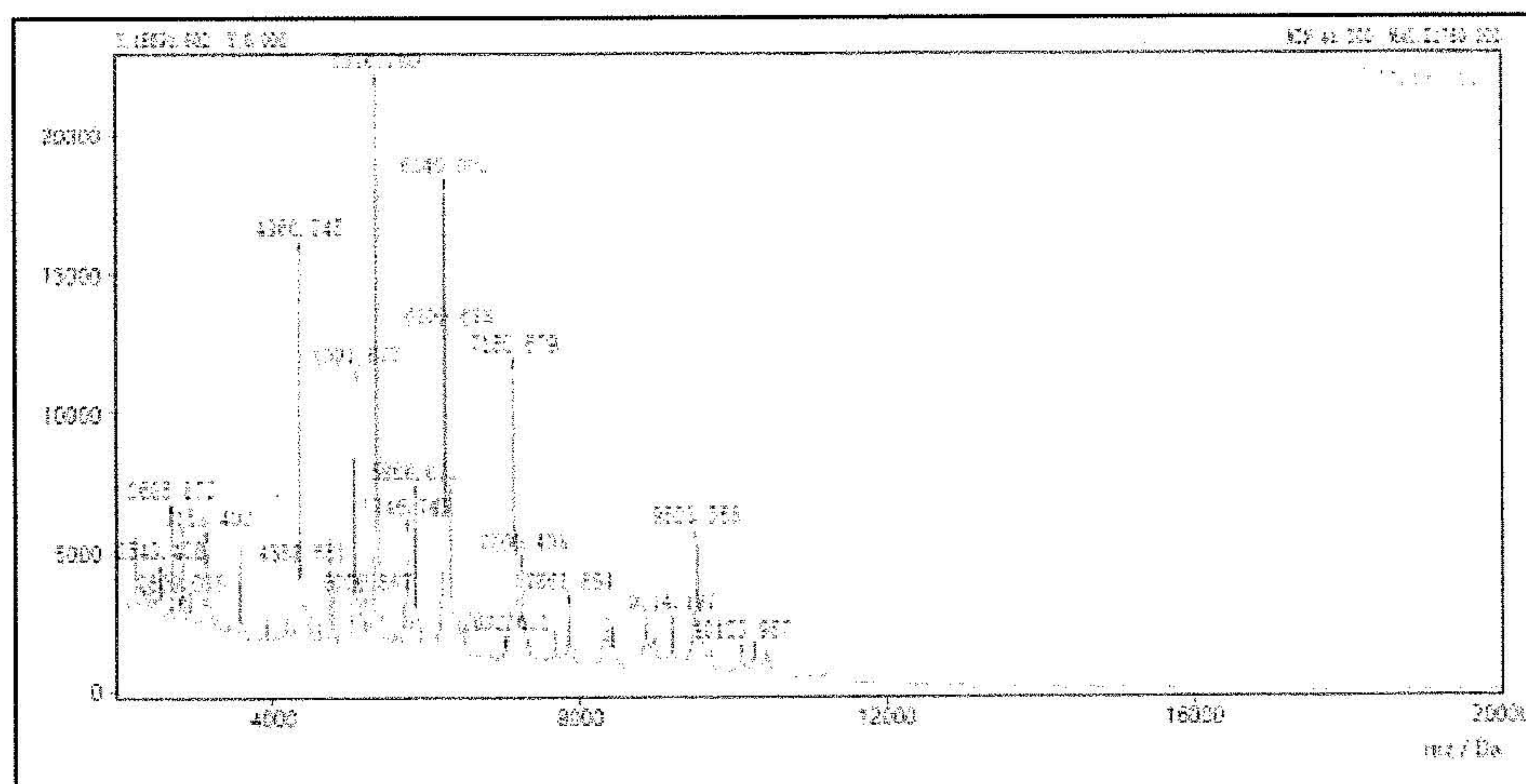


Рисунок 16. Масс-спектрометрия *Streptococcus mitis*



представителями нормальной микрофлоры слизистой оболочки ротовой полости, верхних дыхательных путей и мочеполового тракта. Стрептококки являются грамположительными факультативным анаэробом. Является частью нормальной микрофлоры ротовой полости, дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта.

Далее нами исследовались колонии, выделенные из биологического материала, взятые у пациентов с диагнозом «Дисбактериоз толстого кишечника». В силу универсальности кровяного агар, больший интерес вызывала идентификация колоний, выделенных на нём.

Большее разнообразие колоний микроорганизмов нами были культивированы на чашках Петри с кровяным агаром.

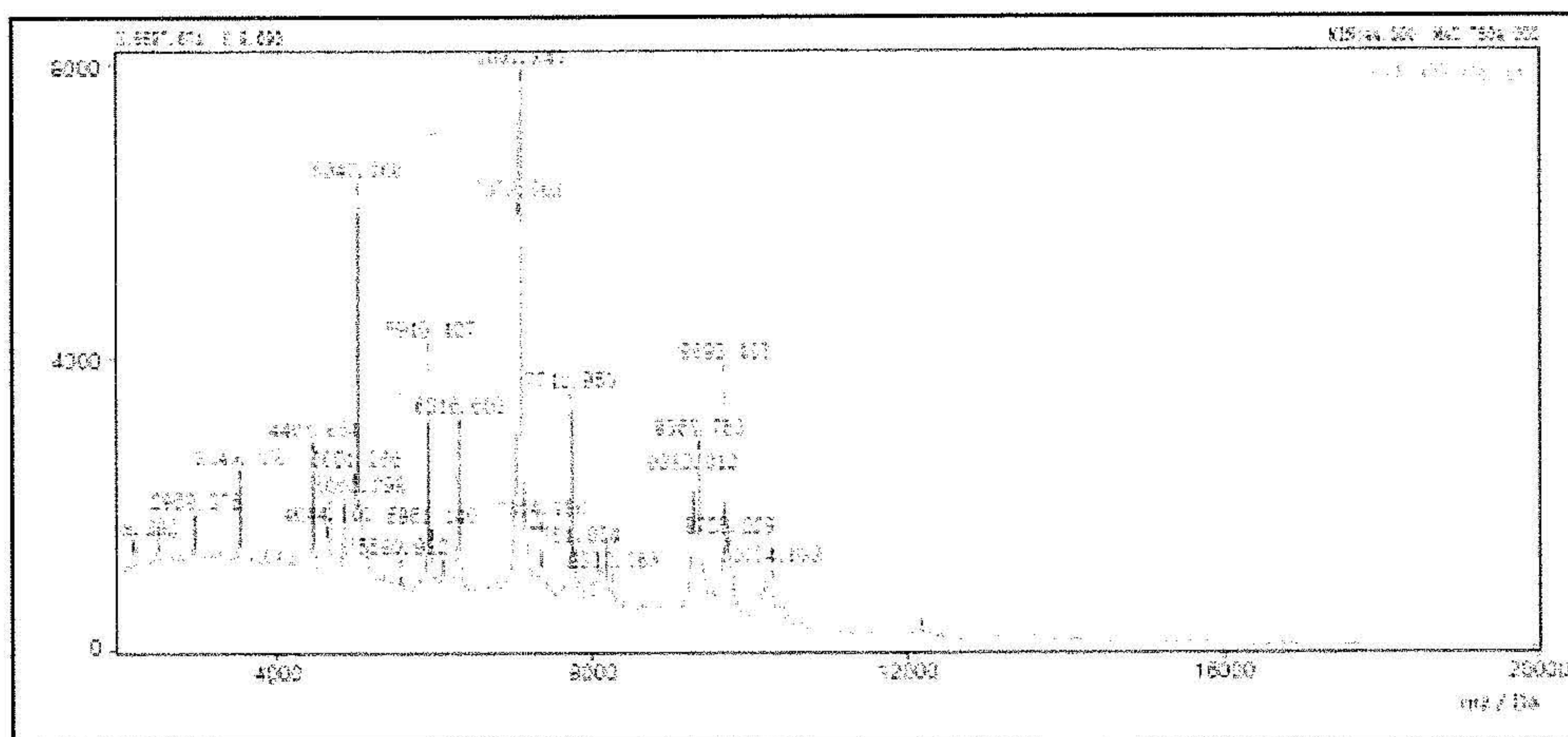
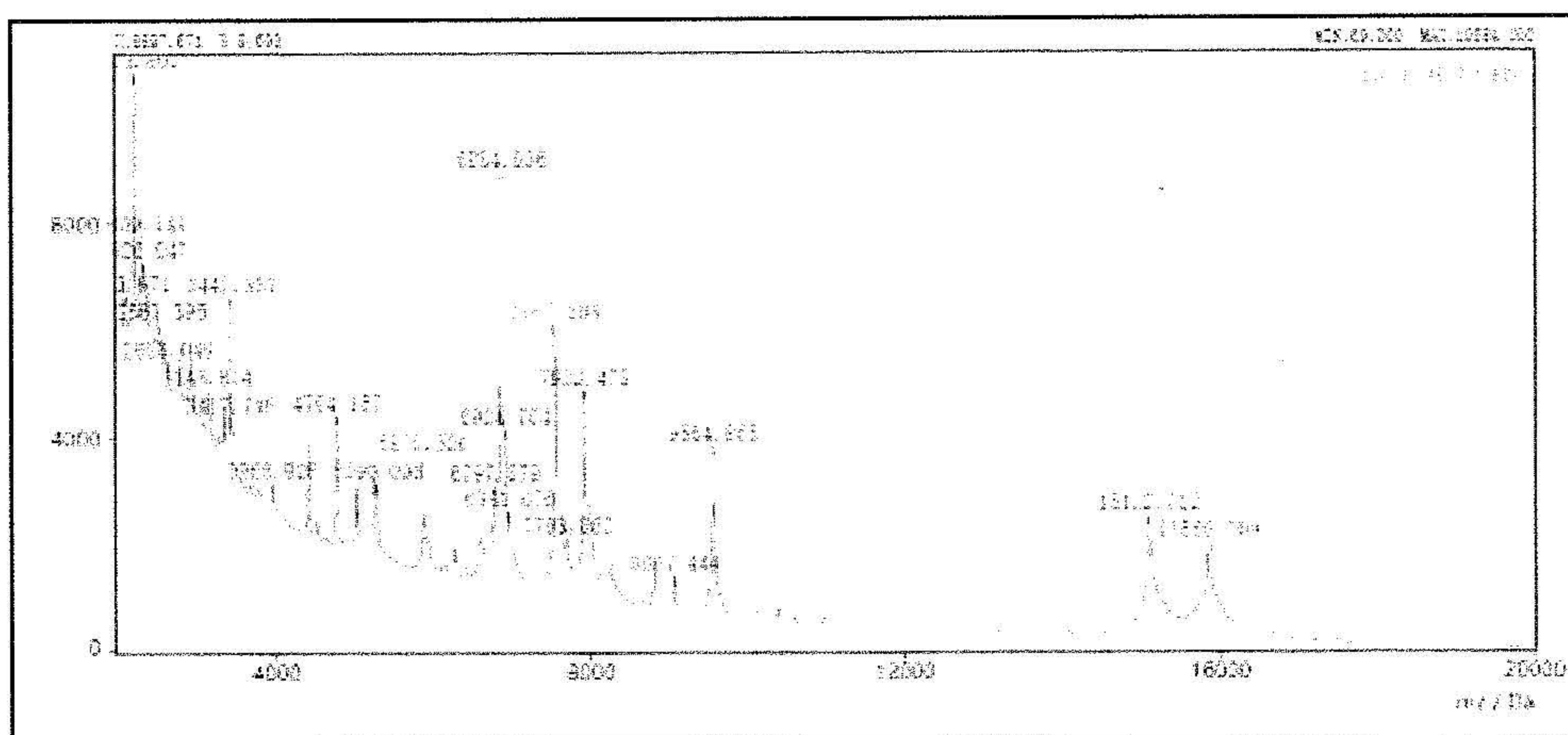


Рисунок 18. Масс-спектрометрия *Neisseria spp*



Как упоминалось ранее, *Streptococcus mitis* при определённых условиях вызывает определённые оппортунистические заболевания. Штаммы данного микроорганизма также способны образовывать биоплёнки.

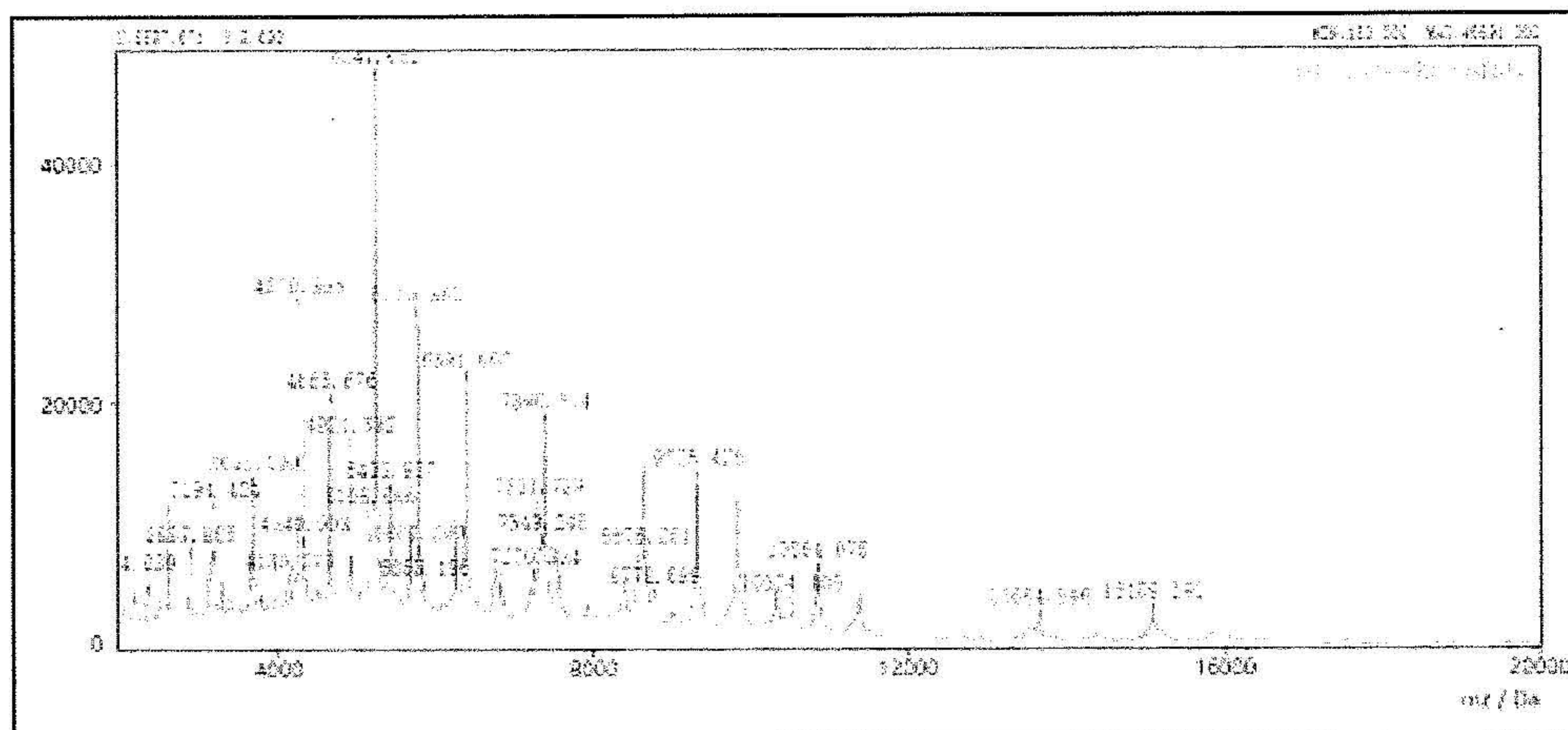


Рисунок 20. Масс-спектрометрия *Kocuria carniphilia*.

Kocuria carniphilia — малоизученный микроорганизм и ранее был выделен из мяса крупного рогатого скота

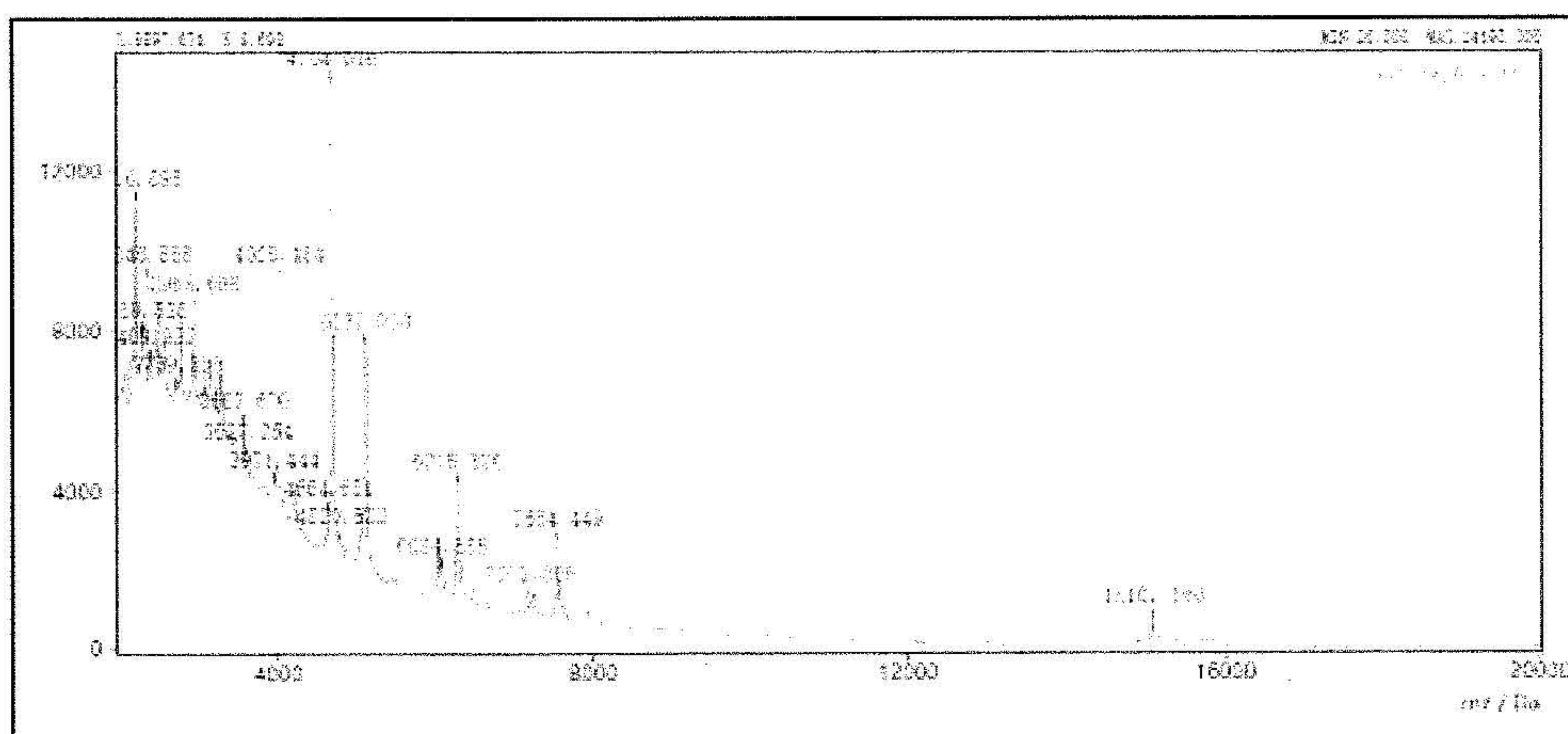


Рисунок 21. Масс-спектрометрия *Corynebacterium spp.*

Corynebacterium spp — это грамположительные факультативно анаэробные палочки. Вызывают ряд заболеваний, в том числе и дифтерию.

Однако важно понимать, что культура может быть смешанной, на планшет может попасть агар – необходимо стерильное исследование, правильная

методика посева. Вероятно и возникновение случаев, где идентификация результатов невозможна. Из-за этого и необходимо внедрять в микробиологическое исследование новые методы посевов, благодаря которым можно выделить культуры качественно, а также масс-спектрометрию.

3.3. Выбор оптимального метода и рекомендации

Фактор добавления тиогликолевой кислоты в транспортную среду для кала обеспечивало получение более точных результатов микробиологического анализа кала, что важно для диагностики и лечения инфекционных заболеваний и в свою очередь имеет решающее значение для обеспечения целостности образца во время транспортировки и хранения.

Полученный результат также зависит от метода посева. Самыми оптимальными являлись посев по методу Дригальского и затем произвести пересев по методу Голда. Благодаря последнему мы можем получить отдельные изолированные колонии.

Посев совершается на питательные среды, которые могут быть совершенно разными, как по предназначению, так и по другим характеристикам. В случае исследования дисбактериоза кишечника, существует целый список сред (см. Приложение 2). Однако, чаще всего используют кровяной агар, Эндо и Сабуро. Кровяной агар и Сабуро отличаются своей универсальностью, отсутствием агрессивности, и скоростью выделения колоний на них. Эндо относится к выделению энтеробактерий, видовое разнообразие которых очень широко, однако, данная среда подавляет анаэробные микроорганизмы.

Вследствие этого следует сделать вывод, что необходимо совершать посевы на все необходимые питательные среды в стерильных условиях, подобрав правильный посев для культивирования. Необходима доставка кала в тиогликолевой среде для сохранения актуального состава после испражнения.

Для улучшения и ускорения диагностики, рекомендуется внедрять применение масс-спектрометрии и ПЦР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из-за неграмотного применения препаратов, влияния окружающих условий появляются новые штаммы микроорганизмов. Они несут за собой возникновение новых заболеваний, из-за этого появляются новые симптомы, которые диагностировать становится труднее. Также не исключается и вероятность неправильной транспортировки нужного для исследования биологического материала, который из-за этого испортится или в него попадут микроорганизмы из окружающей среды, а также при работе уже с самим материалом и культивированными бактериями. Из-за того, что биологический материал переносится не в тиогликолевой среде, микрофлора, входящая туда, меняется. При прибытии кала в лабораторию и после его посева, результаты не будут считаться правильными — качество кала испортилось после его забора. Вследствие данных ошибок в ходе исследования появляются ложные и неправильные результаты, мешающие микробиологическому исследованию. Из-за этого необходимо совершенствовать имеющиеся на данный момент методики микробиологических исследований, новые способы посева (например, метод Голда), внедрять использование тиогликолевой среды в качестве транспортной, а также использование герметичных баночек для анализа.

ВЫВОДЫ

1. Обзор литературных данных и сбор биологического материала позволили систематизировать существующие знания о кишечной микрофлоре, её особенностях и обеспечить базу для дальнейших исследований.

2. Сравнительный анализ методов транспортировки, культивирования и идентификации микроорганизмов выявил их преимущества, что позволило определить наиболее эффективные и точные подходы для изучения кишечной микрофлоры. Подобранный состав транспортной среды с тиогликолевой кислотой, выбор простых, универсальных, диагностических микробиологических сред (Кровяной агар, Сабуро, Эндо) имеет решающее значение для обеспечения целостности образца во время транспортировки и хранения.

3. Разработка и рационализация методов микробиологического анализа способствуют оптимизации процесса исследования, повышению его достоверности и эффективности, а также сокращению времени и затрат на проведение анализа. Внедрение новых методик улучшило качество диагностики и позволило более детально изучать состав и функциональное состояние микрофлоры и выявить в исследуемых образцах условно-патогенные микроорганизмы – *Candida spp*, *Corynebacterium spp*, *Neisseria spp*, *Clostridium spp*.

4. Предложенные оптимизированные методы на клинических образцах и разработка рекомендаций на основе полученных результатов могут способствовать улучшению диагностики и дальнейшей терапии заболеваний ЖКТ. Полученные результаты могут быть внедрены в клиническую практику, что позволит более точно определять состояние микрофлоры и подбирать индивидуализированные лечебные стратегии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агар Сабуро (Sabouraud Agar) // BioMedia URL: <https://bio-media.ru/> (дата обращения: 23.11.2024).
2. Ардатская М. Д., Бельмер С. В., Добрица В. П., Захаренко С. М., Лазебник Л. Б., Минушкин О. Н., Орешко Л. С., Ситкин С. И., Ткаченко Е. И., Суворов А. Н., Хавкин А. И., Шендеров Б. А. Дисбиоз (дисбактериоз) кишечника: современное состояние проблемы, комплексная диагностика и лечебная коррекция. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2015. № 117(5). С.13–50.
3. Багненко С. Ф., Захаренко А. А., Суворов А. Н., Шлык И. В., Тен О. А., Джамилов Ш. Р., Беляев М. А., Трушин А. А., Натха А. С., Зайцев Д. А., Вовин К. Н., Рыбальченко В. А. Периоперационные изменения кишечного микробиоценоза у больных раком толстой кишки. // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 2016. № 175(6). С. 33–7.
4. Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника. Инструкция по применению. Учреждения-разработчики: государственное учреждение “Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии” Министерства здравоохранения Республики Беларусь, учреждение здравоохранения “Городская детская инфекционная клиническая больница г.Минска”
5. Бактериологический метод лабораторной диагностики : учеб. пособие / А. С. Есаулов, Н. Н. Митрофанова, В. Л. Мельников. – Пенза : Изд-во ПГУ, 2015 – 84 с.
6. Балабанцева А. П., Ткач С. М., Кляритская И. Л. Трансплантация фекальной микробиоты как эффективный метод лечения кишечной патологии, некоторых метаболических и аутоиммунных заболеваний // Крымский терапевтический журнал. 2016. №1 (28).
7. Бисенова Неля Михайловна, Ергалиева А. С. Анализ микробиоценоза кишечника взрослых пациентов // J Clin Med Kaz. 2015. №3 (37). URL:

<https://cyberleninka.ru/article/n/analiz-mikrobiotsenoza-kishechnika-vzroslyh-patsientov> [Электронный ресурс]

8. Борщев Ю.Ю., Ермоленко Е.И. Метаболический синдром и микроэкология кишечника. Трансляционная медицина. 2014,(1):19-28.

9. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.

10. В чем разница между изотермической флуоресцентной ПЦР и ПЦР в реальном времени // Laobao URL: <https://ru.labao.com> (дата обращения: 22.12.24).

11. В. Л. Земляков. Дисбактериоз кишечника - миф, синдром или болезнь! URL: <http://www.med74.ru/articlesprint278.html> [Электронный ресурс]

12. Вахитов Т. Я., Ситкин С. И. Концепция суперорганизма в биологии и медицине. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2014. № 7. С. 72–85.

13. Выделение чистой культуры // НПО "Альтернатива" URL: <https://alternativa-sar.ru/> (дата обращения: 14.01.25).

14. Гапон М. Н. О новых подходах к диагностике дисбактериоза толстой кишки // Кубанский научный медицинский вестник. 2016. №6

15. Дисбактериоз кишечника // Гемотест URL: <https://gemotest.ru> (дата обращения: 23.02.25).

16. Дисбактериоз кишечника // Пропионикс URL: <https://propionix.ru/> (дата обращения: 19.10.2024).

17. Дисбактериоз, недоношенность ребенка и пробиотики // Пропионикс URL: <http://propionix.ru/> (дата обращения: 06.11.24).

18. Домотенко Л.В., Шепелин А.П., Морозова Т.П. Питательные среды для основных представителей нормофлоры кишечника. Бактериология. 2016; 1(1): 48–53. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-48-53

19. Домотенко Любовь Викторовна, Шепелин А. П. Бифидум-среда для выделения и культивирования бифидобактерий // Инфекция и иммунитет. 2014.

№3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/bifidum-sreda-dlya-vydeleniya-i-kultivirovaniya-bifidobakteriy>

20. Журина М.В, Плешко Е.В. Полный геном нового штамма актиномицета *Kocuria carniphila* 988 // Конференция «Ломоносов-2024»

21. Идентификация микроорганизмов с помощью MALDI-TOF MS // Pharm-community URL: <https://pharm-community.com/> (дата обращения: 25.10.24).

22. Исмаилова С. М. Особенности микробиоценоза кишечника и системы иммунитета у детей больных вульгарными бородавками / С. М. Исмаилова, М. И. Абдуллаев, Х. Х. Ахраров. – Текст: непосредственный // Молодой ученый. 2016. № 21 (125). С. 63–67.

23. Красненко А.Ю., Елисеев А.Ю., Борисевич Д.И., Цуканов К.Ю., Давыдова А.И., Ильинский В.В. Особенности подготовки библиотек для метагеномного секвенирования образцов на платформе Illumina. Вестник РГМУ. 2017, (2): 30–6. DOI: 10.24075/brsmu.2017-02-04

24. Масс-спектрометрия: что это, применение и принцип работы // 5drops.ru URL: [https://](https://5drops.ru) (дата обращения: 07.03.25).

25. Медицинская микробиология. — М., 1998. — 1200 с. — ISBN 5-88816-048-2.

26. Метод масс-спектрометрии микробных маркеров в клинической практике // Пропионикс URL: <https://propionix.ru/> (дата обращения: 12.12.2024).

27. Методы лабораторной диагностики дисбактериоза кишечника // ФГБОУ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Марий Эл» URL: <https://12sanepid.ru/> (дата обращения: 03.02.25).

28. Методы оценки микробиоты кишечника. Кара В.В, Грачев А.Н. // Журнал "Научное образование" URL: <https://na-obr.ru> (дата обращения: 26.12.2024).

29. Микрофлора толстой кишки. Роль микрофлоры толстой кишки в процессе пищеварения и формировании иммунологической реактивности организма. // Медунивер URL: <https://meduniver.com> (дата обращения: 24.11.24).

30. Микрофлора желудочно-кишечного тракта // Пропионикс URL: <https://propionix.ru/> (дата обращения: 19.10.2024).

31. МУК 4.2.1887—04 Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов. rospotrebnadzor.ru. Архивировано <https://meganorm.ru/Data2/1/4293755/4293755981.html> 1 апреля 2017 года.

32. О пропионовокислых бактериях (Автор: Воробьева Л. И.) // Пропионикс URL: <https://propionix.ru> (дата обращения: 13.11.24).

33. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: клинические рекомендации. URL: www.antibiotics.ru — 2015.

34. Орунбаева Б. М. Особенности биоценоза желудочно-кишечного тракта у рожениц и новорожденных в условиях среднегорья и высокогорья / Б. М. Орунбаева, Р. Р. Тухватшин, С. Т. Жолдошев, А. А. Жумабаева. – Текст : непосредственный // Молодой ученый. 2011. № 11 (34). Т. 2. С. 186-188.

35. Парфенов А.И. Микробная флора кишечника и дисбактериоз. // Русский медицинский журнал (РМЖ) URL: https://www.rmj.ru/articles/gastroenterologiya/MIKROBNAYa_FLORA_KIShEChNIKA_I_DISBAKTERIOZ/#ixzz8xQhfBIAV — 1998 [Электронный ресурс]

36. Питательная среда для выделения сальмонелл сухая (Висмут-сульфит агар)/ Питательные среды // Микроген URL: <https://www.microgen.ru/> (дата обращения: 03.01.2025).

37. Питательная среда с эозин-метиленовым синим сухая (Среда Левина-ГРМ) // Элтемикс URL: <https://eltemiks-lab.ru/> (дата обращения: 13.01.2025).

38. Приказ Минздрава СССР ОТ 22.04.85 N 535 Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования,

применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. lawrussia.ru.

39. Селиверстов П. В., Ситкин С. И., Радченко В. Г., Лазебник Л. Б., Авалуева Е. Б., Вахитов Т. Я., Демьянова Е. В., Скворцова Т. Э., Приходько Е. М., Суворова М. А. *Saccharomyces boulardii* модулируют состав микробиоты кишечника у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени, препятствуя прогрессированию заболевания. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2018. № 2. С. 4–18.

40. Сереброва С. Ю. Ятрогенный дисбиоз кишечника у гастроэнтерологических больных / С.Ю. Сереброва // Русский медицинский журнал. 2006. Т 14. № 29. С. 2110–2116.

41. Ситкин С. И., Вахитов Т. Я., Ткаченко Е. И., Орешко Л.С., Жигалова Т. Н. , Радченко В. Г., Селиверстов П. В., Авалуева Е. Б., Суворова М. А., Комличенко Э. В. Микробиота кишечника при язвенном колите и целиакии. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2017. № 1. С. 8–30

42. Смирнов А. М. Рост и метаболизм изолированных корней в стерильной культуре. М.: Наука, 1970. 455 с.

43. Способ исследования кала на дисбактериоз кишечника // Эренбург А.В, Карпушева М.Е // Google Patents URL: <https://patents.google.com/> (дата обращения: 26.02.25).

44. Характеристика нормофлоры, производство лекарственных средств и их применение в медицине: учебное пособие / И. А. ми, В. М. Мирович, А. А. Маркеев; Иркутский государственный медицинский университет, Кафедра фармакогнозии и фармацевтической технологии. – Иркутск: ИГМУ, 2023 – 99 с

45. About Modified Sabouraud Agar (PDF). www.bd.com. Archived from the original (PDF) on 19 April 2009.

46. Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev.

1995 Mar, 59(1):143-69. doi: 10.1128/mr.59.1.143-169.1995. PMID: 7535888; PMCID: PMC239358.

47. Atlas, R.M. (2010). Handbook of Microbiological Media (4th ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/EBK1439804063>

48. Atlas, Ronald M., 1946-. Handbook of microbiological media. — Taylor & Francis, 2010-01-01. — ISBN 9781439804087.

49. Bacteroides (бактероиды, род бактерий) // ГастроСкан URL: <https://gastroscan.ru/> (дата обращения: 19.04.25).

50. Bartram A.K., Lynch M.D., Stearns J.C., Moreno-Hagelsieb G., Neufeld J.D. Generation of multimillion-sequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end illumina reads [published correction appears in Appl Environ Microbiol. 2011 Aug, 77(15):5569]. Appl Environ Microbiol. 2011, 77(11):3846-3852. doi:10.1128/AEM.02772-10.

51. Cain, Donna. "Fluid Thioglycollate [sic] Broth". Collin College.

52. Capocéfalo M., Ridley E. V., Tranfield E. Y. & Thompson K. C. (2015). "Ch. 9 - MALDI-TOF: A rapid microbiological confirmation technique for food and water analysis". In Cook N.; D'Agostino M.; Thompson K. C. (eds.). Molecular Microbial Diagnostic Methods - Pathways to Implementation for the Food and Water Industries. Elsevier. ISBN 978-0-12-416999-9.

53. Chan BK, Abedon ST, Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy. Future Microbiol. 2013 Jun;8(6):769-83.

54. Cheesbrough, Monica (2006). District Laboratory Practice in Tropical Countries, Part 2. Cambridge University Press. p. 126. ISBN 0-521-67631-2.

55. Chou KF, Dennis AM. Förster Resonance Energy Transfer between Quantum Dot Donors and Quantum Dot Acceptors. Sensors (Basel). 2015, 15(6):13288-13325. Published 2015 Jun 5. doi:10.3390/s150613288.

56. Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin

Microbiol Rev. 2004 Oct, 17(4):840-62, table of contents. doi: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004. PMID: 15489351, PMCID: PMC523561.

57. David L.A., Maurice C.F., Carmody R.N., Gootenberg D.B., Button J.E., Wolfe B.E., Ling A.V., Devlin A.S., Varma Y., Fischbach M.A., Biddinger S.B., Dutton R.J., Turnbaugh P.J. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014 Jan 23;505(7484):559-63. doi: 10.1038/nature12820. Epub 2013 Dec 11. PMID: 24336217, PMCID: PMC3957428.

58. DeGruttola A.K., Low D., Mizoguchi A., Mizoguchi E. Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. *Inflamm Bowel Dis*. 2016, 22(5):1137-1150. doi:10.1097/MIB.0000000000000750.

59. Detection of Species-Specific Lipids by Routine MALDI TOF Mass Spectrometry to Unlock the Challenges of Microbial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing // *Frontiersin* URL: <https://www.frontiersin.org/> (дата обращения: 12.03.25).

60. Dethlefsen L., Relman D.A. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 Mar 15, 108 Suppl 1(Suppl 1):4554-61. doi: 10.1073/pnas.1000087107. Epub 2010 Sep 16. PMID: 20847294, PMCID: PMC3063582

61. Díaz-Sánchez S, Perrotta AR, Rockafellow I, Alm EJ, Okimoto R, Hawken R, Hanning I. Using fecal microbiota as biomarkers for predictions of performance in the selective breeding process of pedigree broiler breeders. *PLoS One*. 2019 May 7;14(5):e0216080. doi: 10.1371/journal.pone.0216080. PMID: 31063485; PMCID: PMC6504170.

62. Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005 Jun 10;308(5728):1635-8. doi: 10.1126/science.1110591. Epub 2005 Apr 14. PMID: 15831718, PMCID: PMC1395357.

63. Einar Leifson. Types of Bacteria on Blood and Chocolate Agar and the Immediate Cause of These Types // *Journal of Bacteriology*. — 1932. — Т. 24, вып. 6. — С. 473–487. — ISSN 0021-9193.

64. Fecal sample collection for clinical microbiome research // *BioTechniques* URL: <https://www.biotechniques.com/> (дата обращения: 17.12.24).

65. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003 Feb 8;361(9356):512-9. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12489-0. PMID: 12583961.

66. Guinea J, Peláez T, Alcalá L, Bouza E (December 2005). "Evaluation of Czapeck agar and Sabouraud dextrose agar for the culture of airborne *Aspergillus* conidia". *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 53 (4): 333–334. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2005.07.002. PMID 16263232.

67. Hardy H, Harris J, Lyon E, Beal J, Foey AD. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients*. 2013 May 29;5(6):1869-912.

68. Hare JM (9 December 2012). "15. Sabouraud agar for fungal growth". In Gupta VK, Tuohy MG, Ayyachamy M, Turner KM, O'Donovan A (eds.). *Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology*. Springer. p. 212. ISBN 978-1-4614-2355-3.

69. Hütt P, Shchepetova J, Lõivukene K, Kullisaar T, Mikelsaar M. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. *J Appl Microbiol*. 2006 Jun;100(6):1324-32.

70. Ji Sook Kim, M.D., Yoo Ra Hong, M.D., Hee Yeong Yang, M.D.*, Chi Eun Oh, M.D. A Case of Late Onset Neonatal Bacteremia and Meningitis Caused by *Streptococcus lutetiensis* // *Korean J Pediatr Infect Dis* 2014;21(3):219-224. DOI: <https://doi.org/10.14776/kjpid.2014.21.3.219>

71. Khanna S, Assi M, Lee C, Yoho D, Louie T, Knapple W, Aguilar H, Garcia-Diaz J, Wang GP, Berry SM, Marion J, Su X, Braun T, Bancke L, Feuerstadt P. Efficacy and Safety of RBX2660 in PUNCH CD3, a Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial with a Bayesian Primary Analysis for the

Prevention of Recurrent *Clostridioides difficile* Infection. *Drugs*. 2022 Oct;82(15):1527-1538. doi: 10.1007/s40265-022-01797-x. Epub 2022 Oct 26. Erratum in: *Drugs*. 2022 Oct;82(15):1539. doi: 10.1007/s40265-022-01805-0. PMID: 36287379; PMCID: PMC9607700.

72. Leijh PC; van Zwet TL; ter Kuile MN; van Furth R (November 1984). "Effect of thioglycolate on phagocytic and microbicidal activities of peritoneal macrophages". *Infection and Immunity*. 46 (2): 448–452. doi:10.1128/iai.46.2.448-452.1984. PMC 261553. PMID 6500699

73. Meng X, Zhang G, Cao H, Yu D, Fang X, de Vos WM, Wu H. Gut dysbiosis and intestinal disease: mechanism and treatment. *J Appl Microbiol*. 2020 Oct;129(4):787-805. doi: 10.1111/jam.14661. Epub 2020 May 19. PMID: 32277534; PMCID: PMC11027427.

74. Odds FC (January 1991). "Sabouraud('s) agar". *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 29 (6): 355–359. doi:10.1080/02681219180000581. PMID 1815027.

75. Omnipresence of Microorganisms in the Environment. Waksman Foundation For Microbiology. Archived from the original on 2008-10-06. Retrieved 2008-10-24.

76. Podstawka, Adam. "Kocuria carniphila | Type strain | CCUG 55751, JCM 14118, DSM 16004, CCM 132, NBRC 110786 | BacDiveID:7658". bacdive.dsmz.de

77. Recipes. University of Sydney. 2004. Archived from the original on 14 December 2012.

78. Robles Alonso V, Guarner F. Linking the gut microbiota to human health. *Br J Nutr*. 2013 Jan;109 Suppl 2:S21–6. Review.

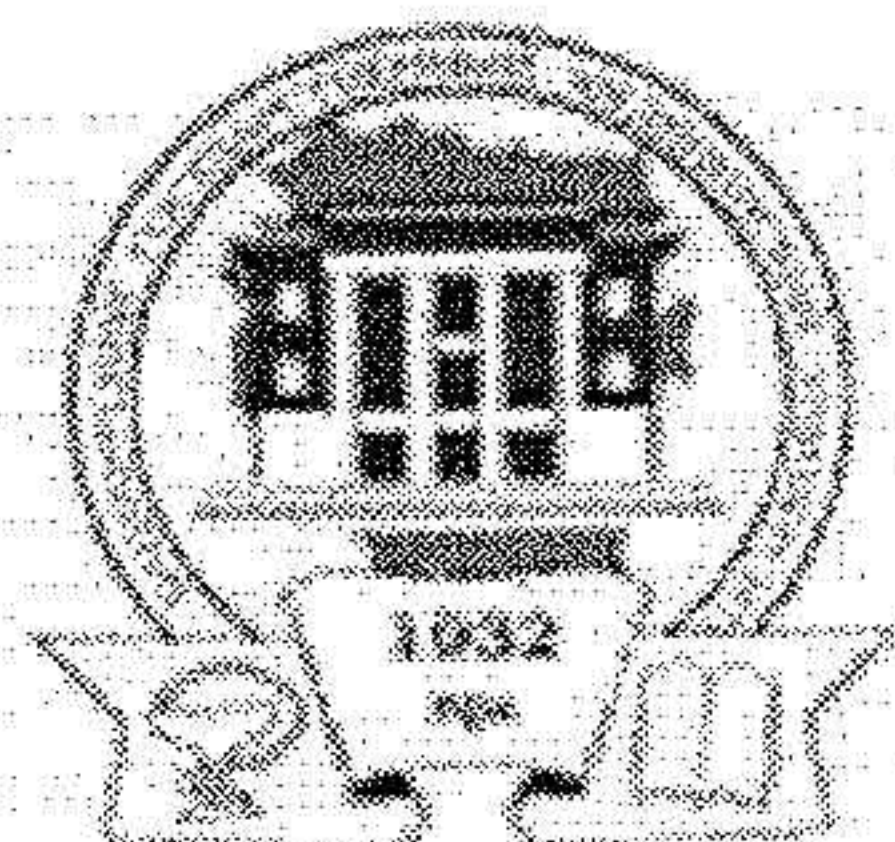
79. Sandven P, Lassen J (November 1999). "Importance of selective media for recovery of yeasts from clinical specimens". *Journal of Clinical Microbiology*. 37 (11): 3731–3732. doi:10.1128/JCM.37.11.3731-3732.1999. PMC 85742. PMID 10523586.

80. Scognamiglio T, Zinchuk R, Gumpeni P, Larone DH (May 2010). "Comparison of inhibitory mold agar to Sabouraud dextrose agar as a primary medium for isolation of fungi". *Journal of Clinical Microbiology*. 48 (5): 1924–1925. doi:10.1128/JCM.01814-09. PMC 2863941. PMID 20220162.

81. Thomas, Vincent & Clark, James & Dore, Joel. (2015). Fecal Microbiota Analysis: An Overview of Sample Collection Methods and Sequencing Strategies. *Future microbiology*. 10. 10.2217/fmb.15.87.

82. Victor Lorian, Bodun Popoola. Pneumococci Producing Beta Hemolysis on Agar (англ.) // *Applied Microbiology*. — 1972-07-01. — Vol. 24, iss. 1. — P. 44–47. — ISSN 0099-2240.

83. WHO Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by neisseria meningitidis, streptococcus pneumoniae, and haemophilus influenzae : WHO manual. — 2. — 2011. — 323 с.



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ДИПЛОМ

награждается

Хайретдинова Майя Анваровна

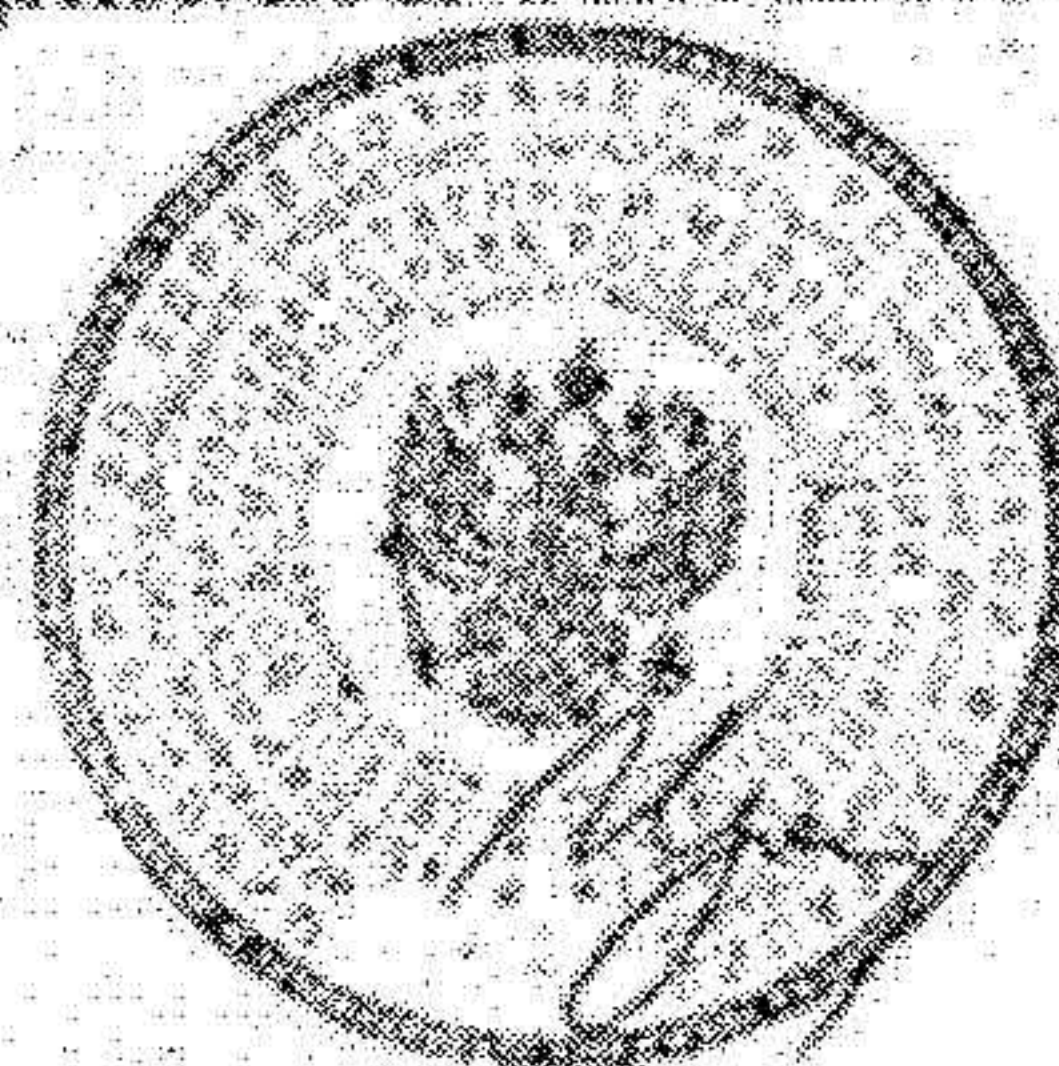
Занявшая II МЕСТО

во Внутривузовской олимпиаде "Прикладная микробиология",
приуроченной к 80-летию Победы в Великой Отечественной Войне
1941-1945 гг.

г. Уфа, 13 мая 2025 г.

Уникальный номер: PB09196-239d1-3e74-2d1e-5d9c3ec2c079

Проректор
по учебной работе



В.Е. Изосимова

Протокол исследования микробиологического состава фекалий при кишечном дисбиозе

1. Информация о пациенте - ФИО: _____

Возраст: _____

Пол: _____

Дата сбора материала: _____

Клинические данные: _____

2. Материал исследования

Тип материала: фекалии

Объем/масса: _____

Условия сбора и транспортировки: _____

3. Подготовка образца:

Приготовление 10% взвеси фекалий в стерильном физиологическом растворе (0,85% NaCl). -
Последовательное десятикратное разведение: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ...

4. Посев на питательные среды и условия инкубации

Среда	Цель исследования	Условия инкубации	Время инкубации
Среда Левина	Выделение кишечных палочек (E. coli и др.)	Аэробно, 37 °C	18-24 часа
Среда Эндо	Дифференциация грамотрицательных бактерий	Аэробно, 37 °C	18-24 часа
ВСА (висмут-сульфитный агар)	Выделение сульфитредуцирующих анаэробов	Анаэробно, 37 °C	24-48 часов
Желточно-солевой агар	Выделение стафилококков	Аэробно, 37 °C	24 часа
Тиогликолевая среда	Культивирование анаэробных бактерий	Анаэробно, 37 °C	48 часов
Среда Лакто (Лактобакагар)	Выделение молочнокислых бактерий	Аэробно, 37 °C	48 часов
Бифидум-среда	Выделение бифидобактерий	Анаэробно, 37 °C	48 часов
Кровяной агар (Кра)	Универсальный посев, оценка гемолиза	Аэробно, 37 °C	24 часа
Среда Сабуро	Выделение грибов (Candida и др.)	Аэробно, 28-30 °C	48-72 часа

5. Оценка роста

Количество колоний (КОЕ/г): _____

Морфология колоний (описание): _____

Гемолитические свойства (для кровяного агара): _____

6. Выделение чистых культур

Пересев типичных колоний на свежие среды (например, кровяной агар) для получения чистых культур.

Количество выделенных изолятов: _____

7. Идентификация микроорганизмов (MALDI-TOF MS)

Подготовка образцов: _____

Полученные виды микроорганизмов: _____

Количественные показатели (если применимо): _____

8. Анализ и интерпретация результатов

Нормальные показатели микрофлоры: _____

Обнаруженный дисбаланс: _____

Выявленные патогены/условно-патогенные микроорганизмы: _____

Состояние анаэробной флоры: _____

Наличие грибковой микрофлоры: _____

9. Заключение

Краткое резюме состояния микробиоты кишечника: _____

Выводы о наличии дисбиоза и степени выраженности: _____

10. Рекомендации

Медикаментозные (пробиотики, пребиотики и др.): _____

Диетические рекомендации: _____

Дополнительные обследования (при необходимости): _____

Контрольное исследование (срок): _____

Подпись лаборанта: _____ Дата: _____

Протокол подготовки образцов для анализа на Autobio AutoF MS

1. Выращивание микроорганизмов:

- Выберите питательную среду, подходящую для изоляции нужного микроорганизма (например, кровяной агар для бактерий, среда Сабуро для грибов).
- Инкубируйте посев при оптимальной температуре (обычно 35–37 °С для бактерий, 28–30 °С для грибов) в течение 18–48 часов, в зависимости от скорости роста микроорганизма.
- Убедитесь, что колонии хорошо выражены, чистые и имеют диаметр 1–2 мм.

2. Подготовка образца

- Используйте стерильную зубочистку, петлю или шпатель для аккуратного соскоба одной хорошо выраженной колонии с поверхности питательной среды.
- Перенесите соскоб на тарелку или планшет для анализа, предназначенный для Autobio AutoF MS.

3. Методы подготовки для анализа.

Существует два основных метода подготовки образцов:

А) Прямое нанесение (Direct Transfer Method).

- Нанесите микробный материал непосредственно на выбранное поле на тарелке для анализа.
- Дайте образцу высохнуть на воздухе (обычно несколько минут).
- Нанесите 1–2 капли матрицы (чаще всего α -цианокобаламин, НССА) на образец.
- Дождитесь высыхания матрицы при комнатной температуре.

В) Метод экстракции (Extraction Method) — рекомендуется для трудных в идентификации микроорганизмов или грибов.

- Перенесите соскоб колонии в микропробирку с 300 мкл деионизированной воды.
- Взболтайте или аккуратно перемешайте.
- Добавьте 900 мкл 99% этанола, перемешайте.
- Центрифугируйте при 13,000×g в течение 2 минуты.
- Удалите супернатант, оставив осадок.
- Высушите осадок при комнатной температуре или в термощкафу (~37 °С).
- Добавьте 20–30 мкл 70% формата кислоты (формовой кислоты) и тщательно перемешайте для растворения осадка.
- Перенесите 1–2 мкл полученного раствора на тарелку для анализа, дайте высохнуть.
- Нанесите каплю матрицы (НССА) и дайте высохнуть.

4. Запуск и калибровка прибора

- Включите Autobio AutoF MS и выполните калибровку прибора в соответствии с инструкцией производителя (используйте стандартные калибровочные образцы).
- Убедитесь, что прибор готов к работе и параметры настроены корректно.

5. Анализ образца

- Поместите подготовленную тарелку с образцами в прибор. - Запустите программу анализа.
- Получите спектры и произведите идентификацию с использованием встроенной базы данных.

6. Обработка и интерпретация результатов

- Оцените качество полученных спектров (чистота, интенсивность).
- Интерпретируйте результаты идентификации по баллам соответствия, рекомендованным производителем.
- При необходимости повторите подготовку и анализ для сомнительных результатов.

7. Документирование

- Запишите все данные по подготовке образцов, условиям инкубации, использованным средам и результатам анализа.
- Сформируйте отчёт с результатами идентификации.

ОТЗЫВ РУКОВОДИТЕЛЯ ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ

обучающейся Хайретдиновой Майи Анваровны группы Б-401
Выпускная квалификационная работа на тему: «Оптимизация микробиологического
исследования кишечной микрофлоры»

Обучающийся Хайретдинова Майя Анваровна успешно закончила курс обучения по направлению подготовки 06.03.01. Биология (бакалавриат). Итогом обучения явилось выполнение выпускной квалификационной работы, которая является исследовательской работой обучающегося.

При написании обзора литературы по теме выпускной квалификационной работы были освоены навыки реферирования и анализа данных источников литературы, а также обобщения полученной информации. В процессе выполнения экспериментальной части были проведены самостоятельные исследования, освоены методы группировки, сравнения и другие. Тема раскрыта полно, выводы отражают основные результаты исследования и могут быть использованы в практической деятельности.

В период выполнения выпускной квалификационной работы обучающийся показала себя трудолюбивым, добросовестным исследователем, проявила самостоятельность и творческую инициативу.

Работа отвечает требованиям, предъявляемым к выпускным квалификационным работам, аккуратно оформлена и может быть рекомендована к защите

на присвоение квалификации бакалавр по направлению подготовки 06.03.01. Биология (бакалавриат).

Научный руководитель:

к.б.н., доцент кафедры

фундаментальной и

прикладной микробиологии

ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России



(подпись)

Борцова Ю.Л.

ОТЗЫВ РЕЦЕНЗЕНТА О ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЕ

обучающегося Хайретдиновой Майи Анваровны группы Б-401
по теме: «Оптимизация микробиологического исследования кишечной микрофлоры».

Целью данной работы являлось приобретение навыков по сбору и обработке биологической информации, умений обобщать результаты исследования в конкретные выводы и предложения, проявление творческого подхода к решению проблемы, подготовка к самостоятельной работе по специальности. Тема и содержание выпускной квалификационной работы соответствуют положениям федерального государственного образовательного стандарта высшего образования по направлению подготовки 06.03.01. Биология (бакалавриат). Работа заслуживает положительной оценки, так как решены все поставленные задачи. При выполнении выпускной квалификационной работы были освоены методы группировки, сравнения и др. Работа выполнена на должном научном уровне, тема раскрыта достаточно полно, сделаны выводы. При написании обзора литературы по теме выпускной квалификационной работы были освоены навыки реферирования литературных данных, их обобщения и анализа. Обзор литературы написан профессионально грамотно, так как автором учтены требования действующих нормативных и правовых актов, использованы материалы, опубликованные за последние пять лет. Экспериментальная часть содержит результаты самостоятельных исследований по изучаемой теме, которая являлась базой производственной практики обучающихся. Для решения поставленных задач обучающимся была проявлена личная творческая инициатива в сборе информации, выполнены расчеты, произведен анализ результатов исследований и сделаны выводы. Выводы отражают основные результаты проведенных исследований. Работа проиллюстрирована таблицами и рисунками, оформлена аккуратно, практически отсутствуют ошибки, материал изложен четко и грамотно. Результаты проведенной работы имеют практическую значимость. На основании вышеизложенного считаю, что работа может быть допущена к защите на присвоение квалификации бакалавр по направлению подготовки 06.03.01. Биология.

Рецензент:

к.б.н., доцент кафедры фундаментальной
и прикладной микробиологии
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России

Дата _____

Миз

Мочалов К.С.

Подпись:	<i>К.С. Мочалов</i>
Заверяю:	<i>К.С. Мочалов</i>
Ученый секретарь ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России	



ОТЗЫВ РЕЦЕНЗЕНТА О ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЕ

обучающегося Хайретдиновой Майи Анваровны группы Б-401
по теме: «Оптимизация микробиологического исследования кишечной микрофлоры».

Целью данной работы являлось приобретение навыков по сбору и обработке биологической информации, умений обобщать результаты исследования в конкретные выводы и предложения, проявление творческого подхода к решению проблемы, подготовка к самостоятельной работе по специальности. Тема и содержание выпускной квалификационной работы соответствуют положениям федерального государственного образовательного стандарта высшего образования по направлению подготовки 06.03.01. Биология (бакалавриат). Работа заслуживает положительной оценки, так как решены все поставленные задачи. При выполнении выпускной квалификационной работы были освоены методы группировки, сравнения и др. Работа выполнена на должном научном уровне, тема раскрыта достаточно полно, сделаны выводы. При написании обзора литературы по теме выпускной квалификационной работы были освоены навыки реферирования литературных данных, их обобщения и анализа. Обзор литературы написан профессионально грамотно, так как автором учтены требования действующих нормативных и правовых актов, использованы материалы, опубликованные за последние пять лет. Экспериментальная часть содержит результаты самостоятельных исследований по изучаемой теме, которая являлась базой производственной практики обучающихся. Для решения поставленных задач обучающимся была проявлена личная творческая инициатива в сборе информации, выполнены расчеты, произведен анализ результатов исследований и сделаны выводы. Выводы отражают основные результаты проведенных исследований. Работа проиллюстрирована таблицами и рисунками, оформлена аккуратно, практически отсутствуют ошибки, материал изложен четко и грамотно. Результаты проведенной работы имеют практическую значимость. На основании вышеизложенного считаю, что работа может быть допущена к защите на присвоение квалификации бакалавр по направлению подготовки 06.03.01. Биология.

Рецензент:

с.н.с. лаборатории прикладной
микробиологии УИБ УФИЦ РАН, к.б.н.

Ясаков Т.Р.

Дата 17.06.2025





АНТИПЛАГИАТ
ОБНАРУЖЕНИЕ ЗАИМСТВОВАНИЙ

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

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

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.ВУЗ

Автор работы: Хайретдинова М. А.
Самоцитирование
рассчитано для: Хайретдинова М. А.
Название работы: ОПТИМИЗАЦИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ
Тип работы: Выпускная квалификационная работа
Подразделение: ФГБОУ ВО БГМУ МИНЗДРАВА РОССИИ

РЕЗУЛЬТАТЫ

■ ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ: НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ

СОВПАДЕНИЯ	17.13%	СОВПАДЕНИЯ	14.3%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	82.87%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	85.7%
ЦИТИРОВАНИЯ	0%	ЦИТИРОВАНИЯ	0%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 18.06.2025

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 18.06.2025 10:38

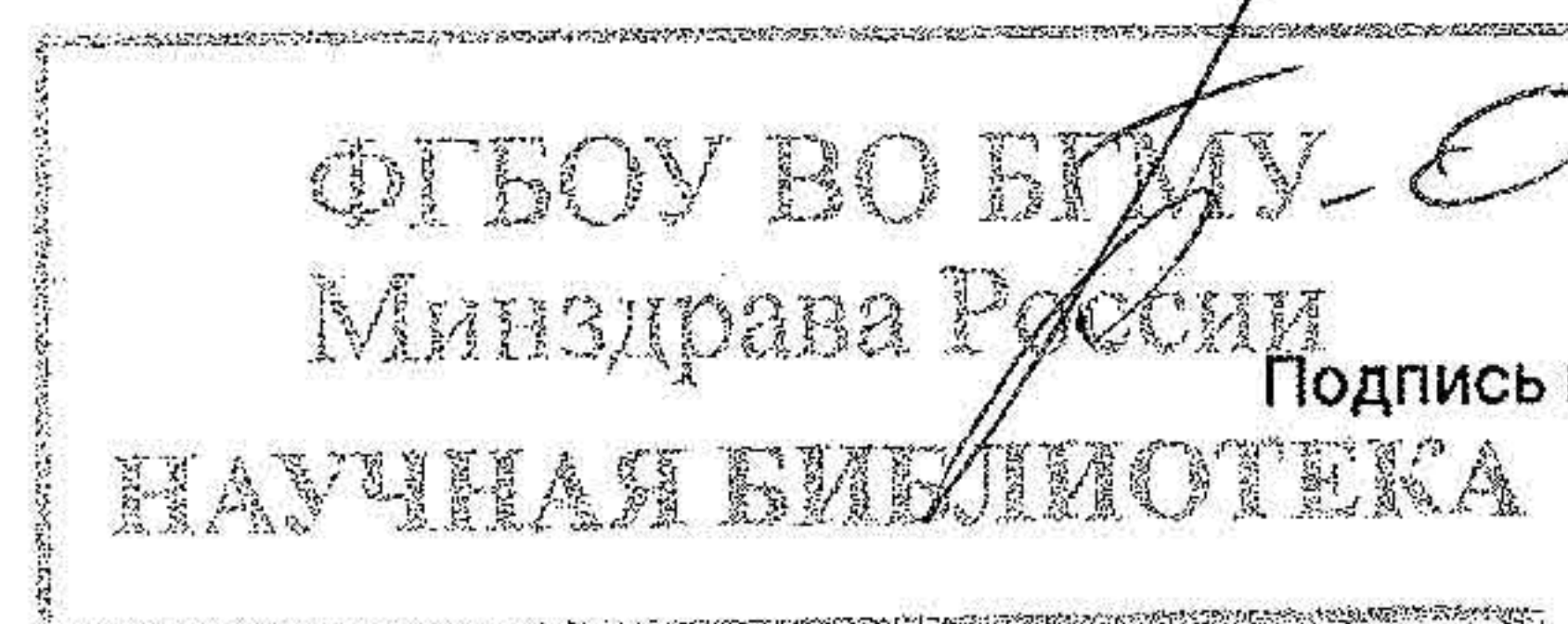
Структура
документа:
Модули поиска:

Проверенные разделы: основная часть с.3-6, 16-38, 53, титульный лист с.1, содержание с.2, приложение с.51-53, 54-57, введение с.7-15, выводы с.39-40, 53
Переводные заимствования; СПС ГАРАНТ: аналитика; Цитирование; Шаблонные фразы; Рувики; СМИ России и СНГ; Патенты СССР, РФ, СНГ; ИПС Адилет; IEEE; Публикации РГБ; Медицина; Перефразирования по коллекции IEEE; Коллекция НБУ; Публикации eLIBRARY; Переводные заимствования IEEE; Публикации РГБ (переводы и перефразирования); Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; Кольцо вузов; Диссертации НББ; Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте; Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; Кольцо вузов (переводы и перефразирования); Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте; Сводная коллекция ЭБС; СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация;...

Работу проверил: Банникова Ольга Сергеевна
ФИО проверяющего

Дата подписи:

18.06.2025



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.
Предоставленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.