

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Медико-профилактический факультет с отделением микробиологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии**

Валиева Лилия Анваровна

**Количественная оценка противомикробной
активности новых лекарственных настоев и экстрактов**

Руководитель:
профессор, д.м.н.

А.Р. Мавзютов

Уфа 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Методы определения антибиотикоустойчивости.....	6
1.2. Общая характеристика исследуемого объекта. Морфологическая характеристика кровохлебки лекарственной.....	16
1.2.1. Ареал и распространение.....	17
1.2.2. Химический состав.....	18
1.2.3. Применение в научной и народной медицине.....	18
1.3. Современные методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам и их общая характеристика.....	20
1.3.1. Диско-диффузионный метод (ДДМ).....	23
1.3.2. Метод серийных разведений.....	28
1.3.3. Е-тест.....	32
1.3.4. Метод «колодцев».....	34
1.4. Ускоренные методы определения чувствительности микроорганизмов к АБП.....	35
1.5. Экспресс-метод определения чувствительности микроорганизмов к АБП.....	38
1.5.1. Полимеразная цепная реакция(ПЦР).....	38
1.5.2. ДНК-ДНК гибридизация.....	42
1.5.3. Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА).....	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1. Объекты исследования.....	45
2.2. Характеристика используемых тест-культур.....	45
2.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	45
2.2.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	47
2.2.3. <i>Pseudomonas aeruginos</i>	48
2.2.4. <i>Klebsiella pneunoniae</i>	50
2.2.5. <i>Candida albicans</i>	51
2.3. Методы исследования.....	52
ГЛАВА 3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	
3.1. Определение микробиологической активности сырья кровохлебки лекарственной.....	54
3.1.1. Определение микробиологической активности травы и корневищ с корнями кровохлебки лекарственной в отношении <i>Staphylococci</i>	

<i>aureus</i>	54
3.1.2. Определение микробиологической активности травы и корневищ с корнями кровохлебки лекарственной в отношении <i>Enterococcus faecalis</i>	55
3.1.3. Определение микробиологической активности травы и корневищ с корнями кровохлебки лекарственной в отношении <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57
3.1.4. Определение микробиологической активности травы и корневищ с корнями кровохлебки лекарственной в отношении <i>Klebsiella pneumoniae</i>	59
3.1.5. Определение микробиологической активности травы и корневищ с корнями кровохлебки лекарственной в отношении <i>Candida albicans</i>	60
ВЫВОДЫ	63
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	64
ПРИЛОЖЕНИЕ	68

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ (СОКРАЩЕНИЙ)

АБП-Антибактериальный препарат

МПК- Минимальная подавляющая концентрация

МИК-минимальная ингибирующая (подавляющая) концентрация

ДДМ-Диско –диффузионный метод

КОЕ- Колониеобразующая единица

ДНК-Дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР- Полимеразная цепная реакция

rH_2 -окислительно-восстановительный потенциал среды

мг/л – миллиграмм на литр

мкг/мл – микрограмм на миллилитр

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важных задач фармацевтической науки является поиск, исследование и разработка новых эффективных средств растительного происхождения для лечения и профилактики острых и хронических заболеваний, особенно вызванных различными микроорганизмами.

В последние десятилетия, как в России, так и во всем мире наблюдается повышенный интерес к использованию лекарственного растительного сырья и препаратов на их основе. Это обусловлено тем, что в растениях содержатся ценные биологически активные вещества, оказывающие разностороннее влияние на организм человека. Потребность в заготовке сырья в естественных условиях год от года растет. Поэтому актуальным является более подробное изучение химического состава известных и уже используемых лекарственных растений с целью расширения возможностей их использования.

Жизнь человека теснейшим образом связана с растительным миром. В ходе своего эволюционного развития организм человека надежно приспосабливался к белкам, углеводам, жирам и самым разнообразным биологически активным веществам (витамины, макро- и микроэлементы, органические кислоты и др.) растительного происхождения, без которых невозможно нормальное течение жизненных процессов и развитие организма в целом. Изучение терапевтической активности лекарственных растений показало, что в лечебной практике целесообразно их применение без химической обработки в виде настоев, отваров, настоек и т. д., поэтому актуальным вопросом остается более подробное изучение химического состава водных извлечений из лекарственного растительного сырья и определение их активности. Перспективным растением в этом плане является кровохлебка лекарственная. Отвар и экстракт корневищ и корней кровохлебки применяют как вяжущее, противовоспалительное и кровоостанавливающее средство. Спиртовые и водные вытяжки корневищ и

корней губительно действуют на различные микроорганизмы, возбудителей заболеваний.

Цель работы: Целью исследования является сравнительное изучение микробиологической активности травы и корневищ с корнями кровохлебки лекарственной из флоры Башкортостана в зависимости от использованной части растения и варианта извлечения действующих субстанций.

Для осуществления поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Осуществить постановку диско-диффузионного метода для оценки противомикробной активности травы и корневищ с корнями кровохлебки лекарственной.

2. Провести анализ антимикробной активности разных видов сырья кровохлебки, а также водных и спиртовых извлечений в отношении пяти микроорганизмов: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*.

3. Установить антимикробную активность разных видов сырья кровохлебки лекарственной.

ГЛАВА1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1.МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТ

И

Антибиотики относятся к наиболее часто используемым препаратам для лечения инфекционных заболеваний человека и животных и в большинстве развитых стран занимают ведущее место по объему производства и потребления среди всех других групп лекарственных веществ.

До настоящего времени общепринятая формулировка понятия «антибиотики» еще не сложилась. На сегодня под этим термином понимают химиотерапевтические средства, образуемые микроорганизмами или получаемые из иных природных источников, а также их производные, обладающие способностью избирательно подавлять в организме больного возбудителей заболеваний или задерживать развитие злокачественных новообразований.

По направленности действия антибиотики можно разделить на следующие основные группы:

1. Антибактериальные антибиотики:

активные в отношении грамположительных микроорганизмов;
широкого спектра действия;
противогрибковые.

2. Противоопухолевые антибиотики.

3. Противовирусные антибиотики.

Антибиотики, как правило, являются продуктами жизнедеятельности микроорганизмов или их полусинтетическими аналогами. Эти вещества выделяются микроорганизмами в процессе антибиоза как результат антагонистических взаимоотношений между видами. Идея практического использования антибиоза была выдвинута Л. Пастером и И. Мечниковым. В частности, И. Мечников рекомендовал регулярно принимать продукты,

содержащие молочнокислые бактерии, для подавления гнилостной микрофлоры кишечника. Сам термин «антибиотик» был предложен З. Ваксманом в 1942 году. Однако первый антибиотик - тиротрицин - был получен в чистом виде Дюбо еще в 1939 году. К настоящему времени в биологии и медицине используется более 800 антибиотиков, без учета лекарственных форм. Всего описано и исследовано более 6000 различных антибиотиков, однако практическое значение в медицинской практике имеют только 2-3 % из них.

В настоящее время основными источниками получения антибиотиков являются:

биосинтетический - из культуральной жидкости, в которой развивается микроорганизм-продуцент;

полусинтетические антибиотики - получают на основе биосинтетических, путем модификации макромолекулы антибиотика (отщепление определенных конечных группировок ферментами и присоединение химическим путем к остатку макромолекулы различных радикалов). Это приводит к изменениям физико-химических и антибактериальных свойств модифицированной молекулы антибиотика. Данным способом получены тысячи новых антибиотиков;

синтетический путь - полностью синтезируется молекула антибиотика. Этим путем получают сравнительно мало антибиотиков (синтомицин, хлорамфеникол, пуромицин, циклосерин), так как синтетический путь получения антибиотика не всегда высоко рентабельно.

Антибиотикорезистентность

В последние годы при проведении антибиотикотерапии возникли две большие проблемы: возрастание частоты выделения антибиотикорезистентных штаммов и постоянное внедрение в медицинскую практику новых антибиотиков и их новых лекарственных форм, активных в отношении таких возбудителей. Антибиотикорезистентность коснулась всех

видов микроорганизмов и является основной причиной снижения эффективности антибиотикотерапии. Особенно распространенными являются устойчивые штаммы стафилококка, кишечной палочки, протей, синегнойной палочки.

По данным клинических исследований частота выделения устойчивых штаммов составляет 50-90 %. К разным антибиотикам резистентность микроорганизмов развивается неодинаково. Так, к пенициллинам, хлорамфениколу, полимиксинам и циклосерину устойчивость развивается медленно и параллельно снижается терапевтический эффект этих препаратов. К тетрациклинам, цефалоспорином, аминогликозидам устойчивость развивается медленно и параллельно понижается терапевтическая эффективность этих препаратов. К стрептомицину, эритромицину, олеандомицину, рифампицину, линкомицину, фузидину устойчивость развивается очень быстро, иногда даже во время проведения одного курса лечения.

В чем же причины появления резистентности микроорганизмов к химиотерапевтическим средствам? Среди причин появления резистентности микроорганизмов выделяют следующие:

1. Модификация антибиотика с образованием неактивной формы. Это происходит тогда, когда микроорганизм вырабатывает ферменты, способные разрушать активный антибиотик. Так, стафилококки вырабатывают бета-лактамазу, которая размыкает бета-лактамное кольцо пенициллинов. Грамотрицательные микроорганизмы, устойчивые к аминогликозидам, способны вырабатывать ацетилирующие и фосфорилирующие ферменты, которые разрушают антибиотик. Фермент ацетилтрансфераза, вырабатываемый грамотрицательными микробами, разрушает хлорамфеникол.

2. Может произойти модификация мишени, на которую действует антибиотик. Происходит инактивация белковой молекулы, с которой связывается антибиотик, образуя стабильный комплекс. Хромосомная

резистентность к аминогликозидам связана с потерей или изменением специфического белка на 308 субъединице бактериальной хромосомы, которая одновременно является рецептором для чувствительных микроорганизмов. Устойчивость к пенициллинам и цефалоспорином связывают с потерей или изменением свойств пенициллинсвязывающего белка.

3. Весьма часто повышение резистентности микроорганизмов обусловлено изменением проницаемости микробной клетки для антибиотиков. У стрептококков имеется естественный барьер проницаемости для аминогликозидов. Тетрациклины накапливаются в чувствительных бактериях и совершенно не проникают в резистентные.

4. В ответ на применение антибиотика бактерии могут начать интенсивно вырабатывать ферменты, способные не только ингибировать действие антибиотика, но и разрушать его. Микроорганизмы, устойчивые к Циклосерину, синтезируют больше чем нужно аланинтрансферазы.

5. В развитии резистентности не последнюю роль играет способность микроорганизмов развивать новые альтернативные пути их метаболизма, происходит формирование метаболического шунта, что позволяет обходиться без реакций, на которые воздействует химиотерапевтическое средство.

6. Иногда антибактериальную резистентность связывают с понятием эффлюкс, которое заключается в активном выведении антибиотика из микробной клетки. Такой активностью обладает синегнойная палочка, которая активно выводит карбапенемы из резистентных штаммов.

Классификация антибиотиков

В настоящее время, согласно литературным данным, нет единой общепринятой классификации антибиотиков. В основу этой предлагаемой классификации была взята классификация антибиотиков по С.М. Навашину, И.П. Фоминой (1982) с дополнениями.

По спектру антибактериального действия антибиотики делятся на:

1. **антибиотики узкого спектра действия:**

- угнетающие грамположительные бактерии и грамотрицательные кокки: соли бензилпенициллина, бициллины, оксациллин, макролиды, линкомицин, фузидин, ванкомицин, ристомидин, цефалоспорины 1-го поколения;
- угнетающие грамотрицательные бактерии: полимиксины, азтреонам, цефалоспорины 3-го и 4-го поколений;

2) **на антибиотики широкого спектра действия**, которые действуют одновременно на грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы: ампициллин, карбенициллин, цефалоспорины 2-го поколения, хлорамфеникол, тетрациклины, аминогликозиды, рифамицины, имипенем.

Наиболее удобная для пользования и общепринятая классификация антибиотиков построена по химическому строению:

1. **Лактамные**

А. Пенициллины.

1. Природные пенициллины: бензилпенициллин натриевая и калиевая соли, феноксиметилпенициллин, бензатина-бензилпенициллин (бициллин 1), бициллин V.

2. Полусинтетические пенициллины:

а) пенициллиназоустойчивые с преимущественной активностью в отношении грамположительных микроорганизмов и некоторых грамотрицательных кокков: оксациллин, диклоксациллин, флуклоксациллин, клоксациллин, нафциллин;

б) широкого спектра действия:

- активные в отношении большинства грамотрицательных (кроме синегнойной палочки) и грамположительных (за исключением пенициллиназообразующих) микроорганизмов: ампициллин, амоксициллин, пивампициллин;

- активные в отношении синегнойной палочки и других грамотрицательных бактерий: карбенициллин, пиперациллин, тикарциллин, азлоциллин, мезлоциллин;

- с преимущественной активностью в отношении грамотрицательных бактерий: мециллинам, пивмецилдинам, ацидоциллин.

3. Комбинированные препараты пенициллинов с ингибиторами В-лактамаз: аугментин, тиментин, уназин и др.

Б. Цефалоспорины:

- первого поколения (1-й генерации), высокоактивные против грамположительных кокков (цефалотин, цефадроксил, цефазолин, цефрадин, цефалексин);

- второго поколения (2-й генерации) - широкого спектра действия, высокоактивны против грамположительных кокков кишечной палочки, менее активны против грамположительных анаэробов (цефамандол, цефуроксим, цефаклор, цефметазол, цефоницид, цефоранид, цефотетан, цефокситин, цефпрозил, цефподоксим, лоракарбеф);

- третьего поколения (3-й генерации) - высокоактивны против грамотрицательных аэробов и менее активны против грамположительных анаэробов (цефтазидим, цефтриаксон, цефотаксим, цефтизоксим, цефиксим);

- четвертого поколения (4-й генерации) - высокоактивные против грамположительных кокков, энтеробактера и синегнойной палочки (цефеперазон, цефепим, цефпиром).

В. Монобактамы: азтреонам.

Г. Карбапенемы: имипенем-циластатин, меропенем.

2. Макролиды и азалиды (14-членные, 15-членные, 16-членные):

- природные - эритромицин, спирамицин, джозамицин, олеандомицин, китасамицин, йозамицин;

- полусинтетические - диритромицин, рокситромицин, азитромицин, спирамицин, кларитромицин, мидекамицин.

3. Аминогликозиды (аминоциклитолы):

- первого поколения: стрептомицин, мономицин, канамицин, неомицин, фрамицетин;

- второго поколения: гентамицин, тобрамицин, сизомицин, амикацин, нетилмицин, спектиномицин.

4. Хлорамфеникол: левомецетина сукцинат, синтомицин.

5. Тетрациклины:

- природные - тетрациклин, окситетрациклин;
- полусинтетические - метациклин, доксициклин, моноциклин.

6. Антибиотики пептидного строения:

- полипептиды - полимиксины В, Е, М;
- гликопептиды - бацитрацин, ванкомицин, тейкопланин.

7. Антибиотики разного химического строения:

фузидин-натрия, линкозамины (линкомицин, клиндамицин), фосфомицин, фузафунжин.

8. Антибиотики полиеновой (нистатин, амфотерицин В, амфоглюкамин) **и неполиеновой** (гризеофульвин) **структуры.**

9. Рифамицины (ансамицины) - рифамицин, рифампицин, рифак.

Таблица 1.

Основные (антибиотики выбора) и резервные антибиотики.

Антибиотики выбора	Резервные антибиотики
ГРАММПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ КОККИ	
Streptococcus A,B,C,G. S. Bovis	
Пенициллин, ампициллин	Эритромицин, азитромицин, кларитромицин, ванкомицин, цефазолин
Streptococcus pneumoniae	
Пенициллин-чувствительные-пенициллин или ампициллин; Пенициллин-резистентные-ванкомицин, цефепим, имипинем, грепафлоксацин, левофлоксацин, спарфлоксацин, тровафлоксацин.	Эритромицин, цефотаксим, цефтриаксон, цефазолин, хлорамфеникол.

Антибиотики выбора	Резервные антибиотики
Streptococcus, зеленая группа	
Пенициллин + гентамицин	Ванкомицин + гентамицин, цефазолин.
Enterococcusfaecalis (общая группа не чувствительные к антибиотикам)	
Тяжелые инфекции (эндокардиты, менингиты, бактериальные пиелонефриты):	
Ампициллин (пенициллин) + гентамицин или стрептомицин	Ванкомицин с гентамицин или стрептомицин
Инфекции мочеполового тракта:	
Ампициллин, амоксициллин, доксициклин, ципрофлоксацин, левофлоксацин	
Streptococcus aureus	
чувствительные	
Метициллин, оксациллин, Метициллин, оксациллин, нафциллин	Ко-тримоксазол, имипенем. Клиндамицин, ванкомицин, ампициллин \сульбактам, амоксициллин \клавулан
нечувствительные	
Метициллин, оксациллин, Ванкомицин ± рифампин или гентамицин	Ко-тримоксазол, доксициклин, рифампин
ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ КОККИ	
Moraxellacatarrhalis	
Амоксициллин/ клавуланат	Ко-тримоксазол, эритромицин, азитромицин, доксициклин, кларитромицин, цефуроксим, цефиксим, цефаклор
Nisseriagonorrhoeae	
Неосложненная инфекция:	
Цефтриаксон, цефиксим, цефподоксим.	Ципрофлоксацин, пенициллин, офлоксацин, цефотаксим, стрептомицин
Осложненная инфекция:	
Цефтриаксон + доксициклин	Цефотаксим, цефтриаксон + доксициклин
Neisseriameningitidis	
Пенициллин	Хлорамфеникол, цефотаксим, цефтризоксим, цефтриаксон
ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ БАЦИЛЛЫ	
Clostridiumperfringens	
Пенициллин + клиндамицин	Клиндамицин, доксициклин, метронидазол, цефазолин, имипенем, хлорамфеникол
Clostridiumdifficile	
Метронидазол (через рот)	Ванкомицин, бацитрацин (оральные формы)

Антибиотики выбора	Резервные антибиотики
Acinetobacter	
Имипенем/имеропенемредко + амикацин	Ципрофлаксин, левофлаксин, ко-тримоксазол, тровофлаксоцин, ампициллин\сульбактам + амикацин
Bacteroidesfragilis	
Метронидазол	Клиндамицин, цефамицин, имипенем, ампициллин \сульбактам
Enterobacter	
Имипенем, меропенем, цефепим + аминогликозиды	Ко-тримоксазол, тикарциллин, мезлоциллин, пиперацillin + аминогликозиды или цефексим, цефподоксим, цефтриаксон
Escherichia coli	
Цефалоспориныпервой генерации – цефалексин,цефрадин, цефадроксил	Гентамицин, тобрамицин, амикацин, цефуросим, цефаклор, цефрозил, цефиксим, цефподоксим, цефтрибутин, ампициллин, фторхинолоны
Gardnerella vaginalis	
Метронидазол	Клиндамицин
Haemophilusinfluenzae	
Ампициллин\сульбактам тикарциллин \клавуланат, пиперацillin \тазобактам, азитромицин, ампициллин \амоксциллин	Цефотаксим, цефтризоксим, цефтриаксон, ко-тримоксазол, эритромицин,хлорамфеникол, кларитромицин,цефтриаксон, цефуросим,экстил, цефаклор, цефпрозил,флоксацин, имипенем
Klebsiellapneumoniae	
Цефотаксин, цефтризоксим, цефтриаксон, иногда гентамицин, тобрамицин,амикацин	Ко-тримоксазол, цефазолин, цефуросим, экстил, цефаклор, цефпрозил, имипенем, ампициллин \ сульбактам, тикарциллин, мезлоциллин, фторхинолоны
Legionella	
Эритромицин + рифампин	Ко-тримоксазол, ципрофлаксацин, офлоксацин, кларитромицин, азитромицин
Pasteurellamultocida	
Пенициллин	Доксициклин, КО-тримоксазол,ампициллин\сульбактам, цефтриаксон, оксациллин
Proteusmirabilis	
Ампициллин	Ко- тримоксазол,

Антибиотики выбора	Резервные антибиотики
	большинство антибиотиков, исключая нафциллин и оксациллин
Proteus (иидол-позитивные)	
Цефиксим, цефподоксим,цефтибутин, цiproфлаксин	Ко-тримоксазол, имипенем, ампициллин\сульбактам, тикарциллин\клавуланат, азтреонам
Providencia stuartii	
Цефиксим, сефподоксим, цефтибутин, цiproфлаксин, фторхинолоны	Ко- тримоксазол, тикарциллин, мезлоциллин, пиперациллин, азтреонам, имипенем
Pseudomonas aeruginosa	
Тикарциллин, мезлоциллин, перациллин, цефтридизин + аминогликозиды	Цiproфлаксим, азтреонам, имипенем, меропенем+ аминогликозиды
Salmonella typhi	
Цiproфлаксин, Ко-тримоксазол	Ко- тримоксазол, хлорамфеникол, ампициллин\амоксициллин
Salmonella	
Цефтриаксон	Ко-тримоксазол, хлорамфеникол, цiproфлаксин, ампициллин\амоксициллин
Serratiamarcescens	
Цефотаксим, цефтризоксим, цефтриаксон + гентамицин	Ко- тримоксазол, цiproфлаксин, тикарциллин, мезлоциллин, ампициллин\сульбактам, азтреонам, имипенем, меропенем, , тикарциллин мезлоциллин, тикарциллин
Stentrophomonasmaltophilia	
Ко- тримоксазол	Цiproфлаксин, офлоксацин
СМЕШАННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ	
Nocardia	
Ко- тримоксазол (большие дозы)	Доксициклин, циклосерин, имипинем, цефтриаксон
Chlamydia pneumoniae	
Доксициклин, эритромицин	Азитромицин, кларитромицин
Chlamydia trachomatis	
Доксициклин, азитромицин	
Mycoplasma pneumoniae	
Эритромицин, ,азитромицин, кларитромицин	
SPIROCHETES	
Treponema pallidum	
Пенициллин	Доксициклин, цефтриаксон
Borrelia burgdorferii	
Доксициклин, амоксициллин	Пенициллин (высокие дозы), цефтриаксон, цефотаксим,

Антибиотики выбора	Резервные антибиотики
	цефуроксим, азитромицин, кларитромицин

[Хоменко А.И, Шадурская С.К. 2002]

1.2 Общая характеристика исследуемого объекта. Морфологическая характеристика кровохлебки лекарственной.

Кровохлебка лекарственная (*Sanguisorba officinalis*)

Семейство: Rosaceae



Рисунок 1. Кровохлебка лекарственная

Кровохлебка лекарственная многолетнее травянистое растение семейства розоцветных с укороченными вегетативными и удлиненными генеративными побегами, развивающимися в пазухах розеточных листьев. Подземные органы представлены горизонтальным корневищем с придаточными корнями, стержневым корнем, иногда клубнями. Генеративные побеги прямостоячие, высотой до 200 см.

Листья очередные непарноперистые с 49 парами эллиптических пальчато-зубчатых листочков. Соцветия сложные, состоят из многочисленных овальных или овально-цилиндрических колосовидных соцветий длиной 1230 мм и диаметром 815 мм.

Цветки обоеполые, темно-красные, в продолговато — овальных головках (1.5 -3 см длиной) на длинных прямых цветоносах. Цветки мелкие, тёмно-красного цвета, они собраны в овальные, иногда колоски 1—3 см, на

длинных прямых цветоносах. Чашечка из четырёх чашелистиков, опадающих при плодах. Тычинок четыре. Пестик с нитевидным столбиком и головчатым рыльцем, покрытым сосочками, и с нижней завязью. Цветёт с июля до августа. Размножается кровохлебка лекарственная семенами (в основном) и вегетативно (отрезками корневищ).

Плоды: односемянные сухие четырёхгранные орешки длиной 3—3,5 мм, коричневого цвета — созревают в августе — сентябре. Цвет плодов — коричневый

1.2.1. Ареал и распространение

Кровохлебка лекарственная распространена в европейской части страны, Западной и Восточной Сибири, а также на Дальнем Востоке. При заготовке для восстановления популяций рекомендуется часть растений оставлять. Повторные заготовки проводят через 10 лет.

Кровохлебку лекарственную успешно выращивают в ботанических садах и питомниках, в том числе в Западной Сибири. Рекомендуется проводить весенний посев семенами, прошедшими двухнедельную стратификацию (при хранении в комнатных условиях семена сохраняют всхожесть в течение 1,5 лет). На второй год культуры масса подземных органов одного экземпляра достигает 1727г.

Она растет на черноземных, лесных оподзоленных, реже солонцеватых почвах. Кровохлебка выносит лишь незначительное затенение, при более сильном генеративные побеги не развиваются. Она очень чувствительна к выпасу скота даже умеренный выпас ее сильно угнетает. Кровохлебка доминирует в луговых степях и на остепненных лугах лесостепи, на пойменных суходольных лугах, является постоянным видом разнотравно-злаковых и кустарниковых луговых степей, лиственничных, сосновых и вторичных березовых лесов, суходольных лугов, низинных заболоченных

лугов и долинных болот. Кровохлебка может расти по обочинам дорог, по краям полей, а также по берегам рек на галечниках и отмелях.

1.2.2. Химический состав

В качестве сырья в **кровохлебке лекарственной** используют корневища с корнями. Корневище с корнями кровохлебки лекарственного содержат дубильные вещества смешанного типа, с преобладанием гидролизныхтанидов (около 20-23%). Кроме того, у них есть свободная галловая и эллаговая кислоты, тритерпеновые сапонины (около 4%), красящие вещества, эфирное масло. (Рис.2)

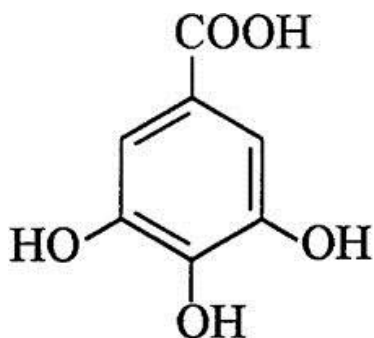


Рисунок2.Галловая кислота

Корни растения содержат крахмал (30%), оксалат кальция, стерины (смесь ситостерина и стигмастерин), аскорбиновую кислоту, эфирное масло и фитонциды. В надземных органах содержится до 6% флавоноидов.

1.2.3. Применение в научной и народной медицине

Большое количество дубильных веществ, содержащихся в **кровохлебке лекарственной**, проявляет вяжущие, противовоспалительные и кровоостанавливающие свойства растения.

Препараты кровохлебки лекарственного проявляют обезболивающий и достаточно сильное бактерицидное влияние на микроорганизмы

дизентерийной и паратифозной групп, губительно действуют на простейшие организмы.

Отвар корневищ с корнями и настой травы кровохлебки лекарственной прекращают различного происхождения кровотечения, сужают кровеносные сосуды, уменьшают воспалительные процессы, ослабляют перистальтику кишок, прекращают судороги.

Клинические наблюдения свидетельствуют об эффективности отвара кровохлебки лекарственной при остром энтероколите. Жидкий экстракт растения успешно применяют для остановки кровотечения при фибромиоме матки и после аборта, а также при эрозии шейки матки. При этом экстракт принимают по 1 чайной ложке внутрь и вводят в матку с помощью специального шприца по 3-5 г. Достаточно хорошие результаты дает спринцевания 20% настоем корней кровохлебки лекарственной или применения смоченных ним тампонов при трихомонадном кольпите.

При лямблиозном холецистите рекомендуют вводить больным через дуоденальный зонд по 100 г 33% отвара корня. На курс лечения назначают 3-8 таких вливаний, а через 1-2 мес его повторяют. В комплексе средств лечения холецистита рекомендуют принимать внутрь 10% отвар (по 1 столовой ложке 3-4 раза в день).

Кровохлебку лекарственную применяют при незначительном кровотечении из легких и кишок. Готовят отвар корня из расчета 20-30 г на 1 стакан воды, принимают по 1 столовой ложке 3-4 раза в день. Из него также изготавливают порошки по 0,5 г. Принимают их по 1 порошку 3-6 раз в день.

В народной медицине отвар кровохлебки лекарственной назначают при кровохарканье у больных туберкулезом, при выпадении прямой кишки, язвенном колите, геморрое, дизентерии, метроррагии.

Как вяжущее и кровоостанавливающее средство препараты растения употребляют при всех тяжелых расстройствах функциональной деятельности желудка и кишечника, при диарее, даже кровавой. Чаще всего в этих случаях

назначают по 1-2 чайные ложки 3-4 раза в день 20% настойку или по 400 - 500 мл в сутки 10% отвар растения.

Отвар корневищ и корней кровохлебки лекарственной используют для полоскания при воспалительных процессах во рту и горле, влажных компрессов при различных воспалительных процессах кожи. Крепким отваром промывают кровоточащие и гнойные раны, пролежни, язвы на ногах (при варикозном расширении вен). Из отвара корневищ или травы делают теплые сидячие ванны при геморрое, а также применяют его для спринцеваний при эрозии шейки матки и трихомонадном кольпите.

1.3.Современные методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам и их общая характеристика.

Определение чувствительности микроорганизмов - возбудителей инфекционных заболеваний человека к антибактериальным препаратам (АБП) - приобретает все более важное значение в связи с появлением и широким распространением антибиотико-резистентности у бактерий. Стандартные методы определения чувствительности микроорганизмов к АБП (диско-диффузионный и серийных разведений) были разработаны во второй половине 60-х - начале 70-х годов XX века и с тех пор с методической точки зрения не претерпели принципиальных изменений.

Однако внедрение в клиническую практику значительного количества новых АБП и появление новых механизмов антибиотико-резистентности у микроорганизмов потребовало более строгой стандартизации процедуры тестирования, разработки новых подходов к интерпретации результатов, внедрения современной системы внутреннего контроля качества на каждом этапе исследования.

Исследования чувствительности микроорганизмов к АБП осуществляются для решения следующих задач:

- обоснование целенаправленной индивидуальной антибактериальной терапии для лечения конкретной инфекционной болезни отдельным пациентам;
- обоснование эмпирической терапии отдельных нозологических форм инфекционных болезней в пределах лечебных учреждений или географических регионов;
- осуществление наблюдения за распространением антибиотикорезистентности в отдельных учреждениях или географических регионах;
- исследование новых химических соединений на наличие антибактериальной активности.

Все существующие методы оценки антибиотикочувствительности микроорганизмов можно разделить на 2 группы: **фенотипические** предполагают оценку влияния АБП на жизнедеятельность микроорганизмов по таким препаратам, как скорость роста или биохимическая активность (методы серийных разведений и диффузионные) и **генотипические** основаны на прямой детекции генов, кодирующих детерминанты устойчивости к АБП (ДНК-ДНК гибридизация, ПЦР и другие методы).

Современные стандартизованные методы определения чувствительности микроорганизмов к АБП подразделяют на методы **серийных разведений** и **диффузионные**.

Методы серийных разведений основаны на прямом определении основного количественного показателя, характеризующего микробиологическую активность АБП - величины его минимальной подавляющей концентрации (МПК).

МПК - минимальная концентрация, подавляющая видимый рост исследуемого микроорганизма в бульонной культуре или на плотной среде.

Для определения МПК заданные концентрации АБП вносят в питательную среду, которую затем засевают культурой исследуемого

микроорганизма и после инкубации оценивают наличие или отсутствие видимого роста.

В зависимости от характера используемой питательной среды различают методы серийных разведений в агаре или в бульоне. В зависимости от объема используемой жидкой питательной среды выделяют методы серийных макро- и микроразведений.

Разновидностью метода серийных разведений является также метод, основанный на использовании только двух концентраций АБП, соответствующих пограничным значениям МПК. Этот принцип исследования широко используется в автоматизированных системах для определения чувствительности микроорганизмов.

Диффузионные методы определения чувствительности основаны на диффузии АБП из носителя в плотную питательную среду и подавлении роста исследуемой культуры в той зоне, где концентрация АБП превосходит МПК.

В настоящее время существуют две основные модификации диффузионного метода: диско-диффузионный и E-тест.

В диско-диффузионном методе в качестве носителя АБП используют бумажный диск. Образование зоны подавления роста происходит в результате диффузии АБП из носителя в питательную среду. В определенных пределах величина диаметра зоны подавления роста обратно пропорциональна МПК. Однако диско-диффузионный метод позволяет лишь косвенно судить о величине МПК, а результатом исследования является отнесение микроорганизма к одной из категорий чувствительности (чувствительный, промежуточный или резистентный).

E-тест представляет собой узкую полоску полимера (0,5 x 6,0 см), на которую нанесен градиент концентраций АБП (от минимальных до максимальных). Подавление роста микроорганизма вокруг полоски E-теста происходит только в той зоне, где концентрация АБП, диффундирующего из носителя, выше МПК, при этом образуется каплевидная зона ингибиции.

Значения концентрации АБП в каждом участке носителя типографским способом нанесены на наружной (обращенной к исследователю) поверхности Е-теста. Величину МПК учитывают в том месте, где граница зоны подавления роста вплотную подходит к носителю. Детальные инструкции по определению чувствительности с использованием Е-тестов прилагаются изготовителем к набору реактивов.

Оценка антибиотикочувствительности, независимо от конкретного метода, предполагает последовательное выполнение нескольких этапов:

- приготовление питательных сред;
- приготовление суспензии исследуемых микроорганизмов (инокулюма);
- инокуляция;
- инкубация;
- учет и интерпретация результатов, формулировка рекомендаций по лечению.

Диффузионные методы включают также этап наложения дисков или полосок Е-теста на плотную питательную среду. [Семина Н.А, Сидоренко С.В.2004]

1.3.1 Диско-диффузионный метод (ДДМ)

Принцип метода. ДДМ определения чувствительности основан на способности АБП диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности агара.

Питательная среда. Для определения чувствительности ДДМ используют такую же, как и для метода разведений в агаре, питательную среду. К качеству питательных сред для постановки диско-диффузионного метода выдвигают те же требования, что и к плотным питательным средам для

постановки метода серийных разведений в агаре, соответственно используют и те же методы контроля качества.

Приготовление чашек Петри с плотной питательной средой связано с некоторыми особенностями. Плотную питательную среду готовят в соответствии с инструкцией изготовителя. Важным показателем при определении чувствительности ДДМ является толщина слоя агара в чашке. Она должна составлять $4,0 \pm 0,5$ мм, что достигается при внесении в чашку Петри диаметром 90 мм строго 20 мл агара, диаметром 100 мм — 25 мл агара, а диаметром 150 мм — 60 мл агара. Перед заполнением расплавленной средой чашки Петри устанавливают на строго горизонтальную поверхность (выверенную по уровню, без впадин и выпуклостей). Соблюдение указанных предосторожностей необходимо в связи с тем, что размер и форма зоны ингибиции роста зависят от глубины и равномерности агарового слоя.

После заполнения чашки оставляют при комнатной температуре для застывания. Хранить чашки можно запаянными в полиэтиленовые пакеты при 4—8 °С, в течение 7–10 суток. При использовании свежеприготовленных чашек или чашек после хранения в холодильнике их необходимо подсушить перед инокуляцией, что достигается инкубацией при 35 °С с приоткрытой крышкой в течение 10—20 мин. Перед инокуляцией необходимо проконтролировать отсутствие конденсата жидкости на внутренней поверхности крышек.

Диски с антибиотиками. Для определения чувствительности ДДМ следует использовать только стандартизированные качественные диски. Изготовление дисков с АБП, необходимых для определения чувствительности диско-диффузионным методом, в лабораторных условиях нецелесообразно. Это связано с жесткими требованиями к исходным материалам (субстанциям АБП, картону) и со значительной трудоемкостью методов контроля качества дисков.

Для получения правильных результатов определения чувствительности ДДМ необходимо строго соблюдать правила хранения и использования

коммерческих дисков, в противном случае содержание в них антибиотиков может снизиться ниже допустимого уровня (прежде всего в результате увлажнения) еще до истечения срока годности.

Долговременное хранение дисков с АБП осуществляют в герметичной упаковке в морозильной камере при температуре -18°C и ниже. Небольшие партии дисков, используемые при повседневной работе, можно хранить в холодильнике при температуре $4-8^{\circ}\text{C}$, плотно укупоренными так, чтобы гарантировать невозможность попадания во флакон влаги, кроме того для дополнительной защиты от влаги во флаконах (картриджах) с дисками содержится специальный влагопоглотитель (силикагель).

Флаконы с дисками следует извлекать из холодильника за 1 ч. до начала работы и выдерживать герметично закрытыми до достижения ими комнатной температуры, что предотвращает образование конденсата на дисках после открывания флаконов.

Приготовление бактериальной суспензии и инокуляция. При определении чувствительности ДДМ используют стандартный инокулюм, соответствующий по плотности 0,5 по стандарту Мак-Фарланда и содержащий примерно $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Инокулюм следует использовать в течение 15 минут после приготовления. Для инокуляции приготовленных чашек с агаром можно использовать два способа.

1. Наиболее удобным способом инокуляции является использование стерильных ватных тампонов. Тампон необходимо погрузить в стандартную суспензию микроорганизма, затем избыток инокулюма удалить, отжав тампон о стенку пробирки. Инокуляцию проводят штриховыми движениями в трех направлениях, поворачивая чашку Петри на 60° .

2. При использовании второго способа стандартный инокулюм наносят пипеткой на поверхность чашки Петри с питательной средой в объеме 1—2 мл, равномерно распределяют по поверхности покачиванием, после чего удаляют избыток инокулюма пипеткой. Приоткрытые чашки

подсушивают при комнатной температуре в течение 10—15 минут.

Аппликация дисков и инкубаци. Не позднее чем через 15 минут после инокуляции на поверхность питательной среды наносят диски с АБП. Аппликацию дисков проводят с помощью стерильного пинцета или автоматического диспенсера. Расстояние от диска до края чашки и между дисками должно быть 15–20 мм. Таким образом, на одну чашку диаметром 100 мм следует помещать не более 6 дисков с АБП. Диски должны равномерно контактировать с поверхностью агара, для чего их следует аккуратно прижать пинцетом.

Непосредственно после аппликации дисков чашки Петри помещают в термостат вверх дном и инкубируют при температуре 35 °С в течение 18—24 часов, в зависимости от вида тестируемого микроорганизма. Увеличение интервала времени между нанесением дисков на поверхность среды и началом инкубации (а соответственно — началом роста исследуемой культуры микроорганизма) приводит к предциффузии АБП в агар и к увеличению диаметра зоны подавления роста.

Учет результатов. После окончания инкубации чашки помещают вверх дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом в 45° (учет в отраженном свете). Диаметр зон задержки роста измеряют с точностью до 1 мм, предпочтительнее пользоваться штангенциркулем или кронциркулем.

При измерении зон задержки роста следует ориентироваться на зону полного подавления видимого роста. Не следует обращать внимания на очень мелкие колонии, выявляемые в пределах зоны задержки роста только при особых условиях освещения или увеличении, и едва заметный налет у края зоны. Исключение составляют случаи учета результатов определения чувствительности стафилококков к оксациллину, когда необходимо учитывать и самые мелкие колонии, выявляемые в пределах четкой зоны подавления роста.

Крупные колонии, выявляемые в пределах четкой зоны подавления

роста, свидетельствуют о наличии посторонней микрофлоры или о гетерорезистентности популяции микроорганизмов, в этом случае необходимо повторить идентификацию микроорганизма, формирующего эту колонию, и определение чувствительности этого штамма.

При определении чувствительности ДДМ роящихся штаммов протея зона подавления роста может быть затянута тонкой вуалеобразной пленкой, которая не мешает установлению границы зоны и не учитывается при регистрации результатов.

При определении чувствительности к сульфаниламидам и их комбинации с триметопримом границу зоны подавления роста следует учитывать на уровне ингибиции роста на 80 %. Это связано с тем, что под действием этих препаратов перед полным подавлением роста возможно завершение 1—2 циклов пролиферации микроорганизма. [Меньшикова В. В. 2009]



Рисунок 3. Определение антибиотикочувствительности диско-диффузионным методом.

Техника проведения. Клинический материал или культуру микроорганизмов, выделенную от больного, засевают на поверхность

питательного агара сплошным газоном. После посева крышку чашки приоткрывают не более чем на 15 мин и дают поверхности среды подсохнуть. Затем стерильным пинцетом следует положить на поверхность агара бумажные диски, пропитанные раствором определенного антибиотика, и слегка придавить. Расстояние между дисками и краем чашки должно быть не менее 15 мм. Чашки инкубируют около 18 ч при 37°C в перевернутом положении. При наличии чувствительной к антибиотику флоры вокруг соответствующих дисков отмечается зона угнетения роста микроорганизмов. Диаметр зоны измеряют с точностью до 1 мм. Соотношение чувствительности микроорганизмов к антибиотику и диаметра зоны его угнетения зависит при соблюдении стандартных условий испытания от антибиотика и вида тест-культуры.

Этот метод точнее, чем метод серийных разведений, поэтому он чаще используется на практике. Однако методу диффузии присущи определенные недостатки. Критерии для оценки данных, полученных с быстрорастущими микроорганизмами, не применимы к медленно растущим штаммам. Поэтому если в качестве тест-культуры необходимо использовать медленно растущий микроорганизм, применяют метод разведений или условия испытания отрабатывают в специальных экспериментах. То же можно сказать и о медленно диффундирующих антибиотиках (например, полимиксине). [Блинова Н. П. 1988]

1.3.2. Метод серийных разведений

Серийный метод титрования может быть выполнен в разных объемах среды (от 1 до 10 мл). Эксперименты выполняются в асептичных условиях при использовании стерильных пипеток для каждого ингредиента реакции. Титрование можно проводить в плотных и жидких средах.

При титровании в жидких средах в ряд пробирок наливают питательную среду в строго определенном объеме. Количество пробирок

определяется количеством разведений препарата, которое необходимо взять в опыт. В 1-ю пробирку вносят определенное количество раствора антибиотика, перемешивают, затем определенный объем смеси из 1-й пробирки переносят во 2-ю, перемешивают и переносят то же количество смеси из 2-й в 3-ю и т. д. Из последней пробирки, содержащей антибиотик, такой же объем смеси выливают, чтобы во всех пробирках объем жидкости был одинаков. Пробирка, не содержащая антибиотика, является контрольной. После этого во все пробирки, содержащие серийно разведенный антибиотик, и в контрольную пробирку вносят одинаковое количество взвеси тест-культуры. Штатив с пробирками встряхивают и ставят в термостат при 37°C на 18—20 ч.

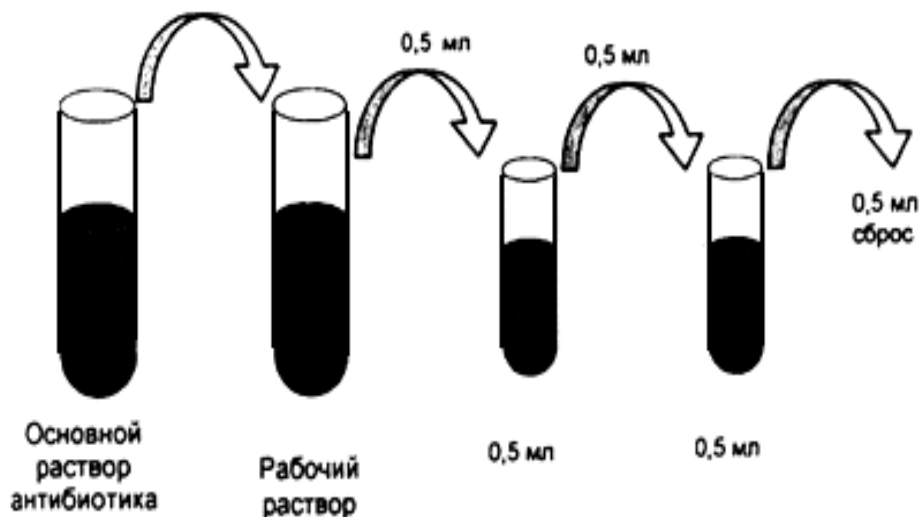


Рисунок 4. Определение антибиотикочувствительности серийным методом.

Кратность разведения антибиотика обычно выбирают равной двум, для этого в каждую пробирку наливают, например, по 1 мл бульона, в 1-ю пробирку вносят 1 мл раствора антибиотика и переносят из пробирки в пробирку по 1 мл смеси. При этом точность определения активности препарата составляет $\pm 50\%$. Точность определения можно повысить путем дополнительных разведений антибиотика, например используя кратности 1 : 1,1; 1 : 1,15; 1 : 1,20 и т. д.

Таблица 2.Схема определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом серийных разведений.

Ингредиенты	Пробирки						
	Опыт						к
	1	2	3		5		8
МПБ, МЛ 1		1	1				1
Пенициллин, 2		1			0		0,
СтафилококкПо одной петле							
Результат							
Заключение							

Взвесь клеток тест-культуры готовят на изотоническом растворе хлорида натрия при обязательном сравнении со стандартами мутности. При титровании антибактериальных антибиотиков микробная нагрузка обычно составляет $2,5 \cdot 10^5$ микробных клеток на 1 мл раствора антибиотиков в питательном бульоне. Для этого готовят взвесь тест-культуры по стандарту 10 ед. мутности, что составляет 1 млрд микробных тел в 1 мл. Взвесь разводят изотоническим раствором до концентрации $2,5 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл и вносят в пробирки с серийно разведенным антибиотиком по 0,1 мл на 1 мл питательного бульона. При использовании в качестве тест-культуры дрожжей микробная нагрузка составляет $4 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл.

Метод серийных разведений в плотных средах отличается тем преимуществом, что микробы-загрязнители при этом легко выявляются и по существу не изменяют общих результатов титрования, тогда как на жидких средах весь опыт может оказаться безрезультатным из-за попадания в пробирки хотя бы единичных клеток посторонних устойчивых микроорганизмов. Этот метод используют также при работе с микроорганизмами, которые не растут на обычных жидких средах, например, микобактерии туберкулеза, которые выращивают на среде, содержащей свернутую сыворотку. Вначале готовят ряд серийных разведений

антибиотика, а затем вносят по 1 мл каждого разведения в пробирку, содержащую 4 мл расплавленной и охлажденной до 45—50°C агаризованной среды. Затем пробирки скашивают до застывания агара, а на поверхность плотной среды петлей засевают взвесь тест-культуры.

Для выявления бактерицидного действия препарата делают высев на МПА из всех пробирок, где визуально не отмечен рост микроорганизма. Для стойких антимикробных веществ, которые адсорбируются на микробных клетках и препятствуют их росту даже в свежей питательной среде, применяют соответствующие нейтрализаторы. [Блинова Н. П. 1988]

Различают метод серийных разведений в бульоне и агаре:

1) Метод серийных разведений в бульоне

Различают два основных варианта метода серийных разведений в бульоне: макрометод (пробирочный) и микрометод (при величине конечного объема 0,2 мл и меньше). Область применения макрометода из-за низкой производительности ограничивается случаями необходимости оценки чувствительности единичных штаммов.

2) Метод серийных разведений в агаре

Метод серийных разведений в агаре позволяет одновременно определить МПК партии штаммов (от 15 до 30 клинических штаммов + контрольные штаммы, в зависимости от используемой модели инокулятора).

Принцип метода заключается в посеве тестируемых микроорганизмов на чашки Петри с агаром, содержащим последовательные двойные разведения антибиотиков. Одновременно проводят тестирование партии клинических штаммов и соответствующих контрольных штаммов, а также контроль роста микроорганизмов на чашках без АБП и контроль чистоты культуры путем высева образцов инокулята на неселективные питательные среды. [Семина Н.А, Сидоренко С.В.2004]

1.3.3. Е-тест

Е-тест — уникальная градиентная техника исследования эффективности антибактериальных препаратов. 15 разведений антибиотика для определения МПК размещаются с помощью инновационной технологии сухой химии на пластмассовой полоске. Заданный градиент обеспечивает точную оценку антибактериальной активности препарата как по отношению к капризным, так и по отношению к обычным микроорганизмам.

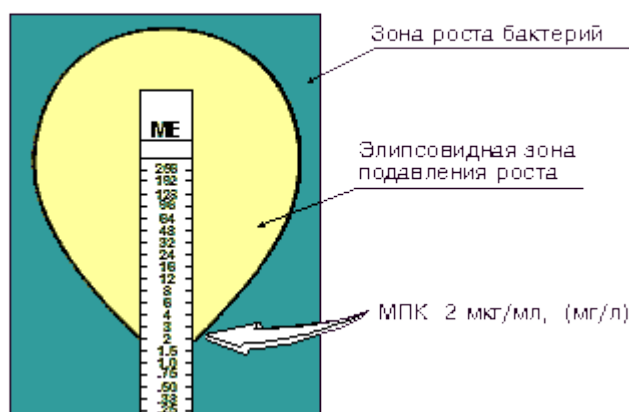


Рисунок 5. Определение антибиотикочувствительности с применением Е-теста.

Процедура оценки является прямой. Полоска с препаратом помещается на поверхность засеянного клиническим изолятом агар. Устойчивый и непрерывный градиент антибиотика формируется под полоской. После инкубации образовавшийся эллипс подавленного роста возбудителя пересекает шкалу значений концентрации антибиотика, в результате чего получают значение минимальной подавляющей концентрации (МПК) в мкг/мл.

Е-тест метод, имеющий особые преимущества при наблюдении за резистентностью, поскольку в нем используется непрерывный градиент концентрации, что дает возможность продемонстрировать тонкие изменения чувствительности. Широкие диапазоны градиентов концентрации антимикробных препаратов в этих тестах покрывают диапазоны МПК при определении чувствительности большого спектра болезнетворных микроорганизмов и позволяют обнаруживать резистентность как высокого,

так и низкого уровня

Метод градиентных полосок Е-тест основан на уникальной комбинации двух концепций — дилуции и диффузии, используемых в современных методах оценки чувствительности микроорганизмов к антимикробным агентам. Однако, в отличие от диско-диффузионного метода, фактически являющегося качественным, Е-тест дает числовые значения МПК, а в сравнении с методом двойных разведений — числовой результат значительно более точный и воспроизводимый, благодаря линейному градиенту концентраций антимикробного препарата на полоске.

Чувствительность Е-теста составляет 99,1—99,6%, специфичность — 97,9—98,9 %, тогда как эти показатели неприменимы для диско-диффузионного метода ввиду его принадлежности к качественным тестам. При сравнительной характеристике метода градиентных полосок Е-теста и метода двойных разведений в агаре чувствительность последнего достигает 97,5—98 %, а специфичность — 98—99 %.

Е-тест — метод выбора для капризных микроорганизмов, таких как

S. pneumoniae, другие стрептококки, анаэробы, *H. influenzae* и многие другие. Он часто используется как первичный метод для проверки ключевых препаратов на изолятах из крови пациентов, находящихся в критическом состоянии. Е-тест идеальный метод для случаев, когда определенная комбинация препарат/микроорганизм может быть противопоказана или когда получены необычные или сомнительные результаты.

Техника проедения. Используют стандартные пластиковые полоски с нанесенным на них экспоненциально. Готовят суспензию тест-микроорганизмов в концентрации 10^8 КОЕ/мл, погружают в нее стерильный тампон, равномерно штриховыми движениями распределяют суспензию по поверхности среды Мюллер-Хинтона или АГВ (pH $7,2 \pm 0,1$), поверхность среды высушивают. На чашку диаметром 90 мм наносят не более 2 полосок Е-теста (на чашку диаметром 150 мм - не более 6), инкубируют при 35⁰С 16–18 часов убывающим градиентом концентрации антибиотика, например от

256 до 0,016 мкг/мл.

Антибиотик из Е-теста центробежно диффундирует в среду, в месте его активного действия рост микроорганизмов подавляется и образуется эллипсоидная (каплевидная) зона задержки роста. Так как концентрация антибиотика в полоске убывает, то получается не концентрическая, а эллипсоидная зона задержки роста. Место пересечения основания эллипса со шкалой концентраций Е-теста соответствует МИК антибиотика.

Ингибция роста микроорганизма вокруг полоски-носителя происходит только в той зоне, где концентрация антибиотика выше МИК. Определяют МИК тест-культуры и сравнивают со стандартными величинами МИК. Относят тест-культуру к чувствительным, умеренно чувствительным или резистентным.

Простой, не трудоемкий, позволяет тестировать привередливые микроорганизмы (стрептококки, пневмококки, гемофилы, гонококки, анаэробы). Не получил широкого распространения из-за дороговизны.[Меньшикова В. В.2009]

1.3.4. Метод «колодцев».

Определение антибактериальных свойств вытяжек проводили на двух слоях плотной питательной среды, разлитой в чашки Петри. В нижнем слое использовали «голодную» незасеянную среду (агар-агар, вода, соли). Нижний слой представляет собой подложку высотой 10 мм на которую строго горизонтально устанавливают 6 тонкостенных цилиндра из нержавеющей стали диаметром 8 мм и высотой 10 мм. Вокруг цилиндров заливают верхний слой, состоящий из питательной агаризованной среды, расплавленной и охлажденной до 40 °С в которую вносили соответствующую взвесь суточной культуры тест-микроба. Предварительно, верхний слой хорошо перемешивался до образования однородной массы. После застывания

цилиндры стерильным пинцетом извлекали и в образовавшиеся лунки помещали испытуемое вещество с учетом его объема (0.3 мл).

Чашки подсушивали 30-40 минут при комнатной температуре и ставили в термостат на 18-24 часа.

Оценку антибактериальных свойств, осуществляли по следующим критериям:

- отсутствие зоны задержки роста микроорганизмов вокруг лунки, а также диаметры зон задержки роста до 10 мм указывают на то, что микроорганизмы не чувствительны к внесенному в лунку образцу или его концентрации;

- зоны задержки роста микроорганизмов диаметром 10-15 мм указывают на малую чувствительность культуры

К испытываемой концентрации антимикробного вещества;

- зоны задержки роста диаметром 15-25 мм расцениваются, как показатель чувствительности микроорганизма к концентрации испытываемого средства;

- зоны задержки роста микроорганизмов, диаметр которых превышает 25 мм, свидетельствует о высокой чувствительности микроорганизмов к изучаемым образцам.

1.4. Ускоренные методы определения чувствительности микроорганизмов к АБП.

Эффективность химиотерапии повышается при раннем назначении этиотропного лечения, которое можно обеспечить использованием методов и средств быстрого определения чувствительности к антибиотикам возбудителей заболеваний. Проведено ряд исследований, достоверно подтверждающих преимущества ускоренных методов. Так, в исследованиях Barenfanger и Doern с соавт. показано, что сокращение среднего времени исследования от 44,4 до 39,2 ч. сопровождалось сокращением койко-дня с

12,6 до 10,7 суток, снижением средней стоимости лечения пациента с 6677 до 4927 долларов США и летальности – от 9,6% до 7,9%.

Разработанные для этой цели методы могут быть разделены на **ускоренные**, в которых исследуются выделенные чистые культуры возбудителей и **экспресс-методы**, позволяющие устанавливать антибиотикограмму возбудителей непосредственно в нативном материале или первичном посеве, т.е. без выделения чистых культур.

Ускоренные методы определения чувствительности микроорганизмов к химиопрепаратам дают возможность получить ответ спустя 2-6 ч. от начала исследования чистых культур.

Размещено на реф.рф. По принципу и механизму реакций, возникающих в результате действия антибиотиков, можно выделить 5 групп ускоренных методов, которые основаны на:

- 1) выявлении изменений ферментативной активности бактерий;
- 2) выявлении изменений окислительно-восстановительного потенциала среды развивающимися микроорганизмами;
- 3) цитоморфологической оценке изменений бактериальных клеток и формирования микроколоний;
- 4) определении изменений оптической плотности среды растущей популяцией или включения радиоизотопов в микробные клетки;
- 5) использовании специальных питательных сред с ростовыми стимуляторами.

1. Сущность методов 1-й группы состоит в следующем: в мясо-пептонный бульон с глюкозой добавляют антибиотик в крайне важной концентрации, а затем засевают испытуемый штамм микробов. Устойчивые к данному антибиотику микроорганизмы усваивают глюкозу, что проявляется изменением кислотно-щелочного потенциала (рН) среды. Для определения изменений рН среды предложено использовать индикаторы, которые изменяют свой цвет при снижении рН – феноловый красный, индикатор Андрее и бромтимоловый синий.

2.Методы 2-й группы, получившие наибольшее распространение, основаны на выявлении изменений окислительно-восстановительного потенциала среды (rH_2) развивающимися микроорганизмами в присутствии антибиотиков с помощью биологических или химических редокс-индикаторов. В связи с этим для определения чувствительности бактерий разных видов возможно использование одних и тех же индикаторов. Микроорганизмы, которые устойчивы к антибиотику, растут и размножаются в среде и снижают rH_2 – потенциал, благодаря чему индикатор, добавленный к питательной среде, изменяет свой цвет. Чувствительные микроорганизмы в зоне диффузии антибиотиков не размножаются и не изменяют rH_2 , вследствие этого цвет среды вокруг дисков не изменяется.

В качестве таких индикаторов нашли применение резузарин, суспензии человеческих, кроличьих или бараньих эритроцитов, 2,6-дихлорфенолиндифенол, 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид, водные растворы красной кровяной соли и железосаммиачных квасцов, метиленовый синий, водный голубой с розоловой кислотой, молибденовоокислый аммоний, соли азотной кислоты.

3.Цитоморфологические ускоренные методы основаны на том принципе, что микроорганизмы, чувствительные к антибиотикам при 3-4- часовом росте на средах с химиопрепаратами, не увеличивают размеров микробной клетки или не образуют микроколоний на специальных препаратах с питательными средами. Необходимость использования в методах этой группы либо специальных препаратов для установления изменений величины клеток, либо микрокамер, целлофановых пластинок или мембранных фильтров с последующим микроскопическим изучением формирования на них микроколоний в световом, фазово-контрастном или люминесцентном микроскопах делает эти методы трудоемкими и требующими специального технического оснащения.

4.Предложены ускоренные методы, основанные на выявлении динамики оптической плотности культур в присутствии антибиотика с помощью нефелометра или спектрофотометра.

5.Пятая группа ускоренных методов основана на использовании специальных питательных сред с ростовыми стимуляторами для достижения быстро регистрируемых изменений в среде. В качестве таких стимуляторов используют экстракт бычьего сердца и глюкозу, кровь и глюкозу, индолилмасляную и индолилуксусную кислоты, гиббереллин.[Дьяков С.И. в соавт.,1983; Дьяков С.И. в соавт.,1996; Змушко Л.С. в соавт.,1980].

1.5. Экспресс-метод определения чувствительности микроорганизмов к АБП.

1.5.1. Полимеразная цепная реакция(ПЦР).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – искусственный процесс многократного копирования (амплификации) специфической последовательности ДНК, осуществляемый *invitro*. Копирование ДНК при ПЦР осуществляется специальным ферментом – ДНК-полимеразой, как и в клетках живых организмов. ДНК-полимераза, двигаясь по одиночной цепи ДНК (матрице), синтезирует комплементарную ей последовательность ДНК. Важно, что ДНК-полимераза не может начать синтез цепи ДНК "с нуля", ей необходима короткая "затравочная" цепь РНК или ДНК, к которой она может начать присоединять нуклеотиды.

Основной принцип ПЦР состоит в том, что реакция полимеризации (синтеза полимерной цепи ДНК из мономерных нуклеотидных звеньев) инициируется специфическими *праймерами* (короткими фрагментами "затравочной" ДНК) в каждом из множества повторяющихся циклов. Специфичность ПЦР определяется способностью праймеров "узнавать"

строго определенный участок ДНК и связываться с ним согласно принципу молекулярной *комплементарности*.

В обычной реакции ПЦР используется пара праймеров, которые "ограничивают" амплифицируемый участок с двух сторон, связываясь с противоположными цепями ДНК-матрицы. Для многократного увеличения количества копий исходной ДНК нужна цикличность реакции. Как правило, каждый из последовательно повторяющихся циклов ПЦР состоит из трех этапов:

1. *денатурации*, или "плавления" ДНК, когда двухцепочечная ДНК под действием высокой температуры переходит в одноцепочечное состояние;
2. связывания (*отжига*) праймеров с матричной ДНК;
3. *элонгации*, или удлинения цепи.

Смена этапов каждого цикла осуществляется путем изменения температуры реакционной смеси. Сначала праймеры могут связаться только с определенной последовательностью исходной ДНК, но в последующих циклах они связываются с копиями этой последовательности, синтезированными в предыдущих циклах. При этом количество основного продукта ПЦР (копии последовательности ДНК, ограниченной праймерами) теоретически удваивается в каждом цикле, то есть растет с числом циклов экспоненциально.

В последнее время ПЦР все чаще используется для исследования различных свойств патогенных микроорганизмов, в частности для выявления устойчивости отдельных видов возбудителей к определенным лекарственным препаратам. Как правило, использование ПЦР для определения чувствительности микроорганизмов является целесообразным лишь в тех случаях, когда традиционные фенотипические методы неприменимы или недостаточно эффективны. Например, определение

чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам с помощью культуральных методов занимает обычно от 4 до 8 нед. Кроме того, результаты фенотипических тестов в подобных случаях могут быть искажены в связи со снижением активности антимикробных препаратов в процессе длительного культивирования микроорганизмов.

Исследование молекулярных механизмов лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* и некоторых других возбудителей позволило разработать методы на основе ПЦР для быстрого выявления генетических маркеров резистентности.

Таблица 3.

Примеры использования ПЦР для выявления резистентности к антимикробным препаратам у различных видов микроорганизмов.

Микроорганизм	Антимикробные препараты	Генетические механизмы резистентности	Методы обнаружения
Стафилококки (обычно <i>S.aureus</i> и <i>S.epidermidis</i>)	Метициллин, (оксациллин) и другие β -лактамы	Наличие гена <i>mecA</i> , кодирующего дополнительный пенициллинсвязывающий белок (ПСБ-2a)	ПЦР-электрофорез, ПЦР-гибридизация
Энтеробактерии (обычно <i>E.coli</i> и <i>K.pneumoniae</i>)	ЦС III*, другие β -лактамы, кроме карбапенемов	Мутации в генах β -лактамаз TEM-, SHV-, и OXA-типа, расширяющие спектр активности этих ферментов	ПЦР-ПДРФ, ПЦР-SSCP
<i>M.tuberculosis</i>	Изониазид	Мутации в гене каталазы-пероксидазы (<i>katG</i>), реже в генах <i>inhA</i> и <i>ahpC</i>	ПЦР-ПДРФ, ПЦР-SSCP, ПЦР-сиквенирование, другие методы.
	Рифампицин	Мутации в гене β субъединицы РНК-полимеразы (<i>rpoB</i>)	
	Этамбутол	Мутации в гене <i>embB</i> , кодирующем синтез арабиногалактана	

Микроорганизм	Антимикробные препараты	Генетические механизмы резистентности	Методы обнаружения
	Стрептомицин	Мутации в генах 16S рРНК (<i>rrs</i>) и рибосомного белка S12 (<i>rpsL</i>)	
	Пиразинамид	Мутации в гене пиразинамидазы (<i>pncA</i>)	
	Фторхинолоны	Мутации в гене А субъединицы ДНК-гиразы (<i>gyrA</i>)	
Вирус простого герпеса (ВПГ)	Ацикловир	Мутации в гене тимидинкиназы (<i>tk</i>), реже в гене ДНК-полимеразы	ПЦР-сиквенирование
Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ)	Ингибиторы обратной транскриптазы	Мутации в гене полимеразы (<i>pol</i>)	ОТ-ПЦР**-сиквенирование

Для подобного анализа обычно используется ДНК или РНК возбудителя, выделенного в чистой культуре. Однако в некоторых случаях имеется возможность прямого ПЦР-анализа на антибиотикорезистентность без предварительно культивирования возбудителя. Исследуемый образец клинического материала при этом используется как источник ДНК-мишени для ПЦР, а откопированный ПЦР-продукт подвергается анализу с целью выявления мутаций, связанных с антибиотикорезистентностью. Разработан, например, метод, позволяющий с помощью ПЦР обнаружить у пациентов, страдающих туберкулезным менингитом, устойчивость возбудителя к рифампицину.

Существуют, однако, естественные ограничения для использования генетических методов оценки лекарственной устойчивости микроорганизмов:

- данные о конкретных генетических механизмах резистентности могут отсутствовать;

- резистентность к определенным препаратам часто бывает связана с различными механизмами и мутациями в различных генах, которые независимо влияют на фенотип.

Например, резистентность грамотрицательных бактерий к аминогликозидным антибиотикам может быть вызвана продукцией различных аминогликозидмодифицирующих ферментов или изменением проницаемости клеточной стенки. В этом случае результаты ПЦР-анализа, который всегда характеризует строго определенный специфический участок ДНК, не могут служить основанием для оценки чувствительности микроорганизма в целом.

Кроме того, отсутствие международных стандартов и рекомендаций по использованию ПЦР для определения чувствительности к антимикробным препаратам является дополнительным фактором, ограничивающим возможность широкого применения этого подхода в практической диагностике. [Лопухов Л.В., Эйдельштейн М.В.2000].

1.5.2. ДНК-ДНК гибридизация.

Принципиально новый метод экспрессного определения лекарственной устойчивости микроорганизмов разработан на базе использования реакции ДНК-ДНК гибридизации. Принцип метода состоит в применении ДНК-зондов, выявляющих у микробов генетические детерминанты, кодирующие плазмидную или хромосомную резистентность микробной популяции к определённым типам или группам антибиотиков. ДНК-зонды метятся радиоактивной, люминесцентной или ферментной меткой. При использовании ДНК-зондов не требуется выделение чистой культуры микробов или подрачивания материала на питательных средах, что значительно сокращает сроки исследования.

Чувствительность реакции ДНК-ДНК гибридизации должна быть значительно повышена при предварительном использовании полимеразной цепной реакции, в которой за 30-40 циклов в течение часа из одного ДНК-фрагмента можно получить до 108 ампликонов. После накопления ДНК и ее рестрикции эндонуклеазами генетический анализ фрагментов проводят в реакции ДНК-ДНК гибридизации. Благодаря высокой специфичности и чувствительности совместного применения полимеразной цепной реакции и метода молекулярной гибридизации обеспечивается возможность получения результатов в течение 6-8 часов от начала исследования нативного материала. При этом, крайне важность наличия сложного и дорогостоящего оборудования и реактивов ограничивает использование методов молекулярной диагностики в практике.[Hancock R.E.;1997;Lee Y.L.;1986;Meyer R.;1994].

1.5.3. Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)

Более удобным методическим приемом экспресс-анализа антибиотикочувствительности возбудителей ОИЗ оказалась РНГА. Так по данным Л.Н. Ферстер с соавт. [Ферстер Л.Н. с соавт., 1986] и В.Н. Метлиной с соавт. [Метлин В.Н с соавт, 1991.], для анализа с использованием РНГА минимальное содержание возбудителя в пробе должно быть не ниже 2×10^5 микробных клеток в 1 мл, время инкубации посевов в зависимости от вида возбудителя составляло 10-22 часа. О чувствительности возбудителей к антибактериальным препаратам свидетельствует не менее чем четырехкратное снижение титра антигена соответствующего возбудителя в опытных (с определенной концентрацией антибиотика) посевах по сравнению с контрольными (без антибиотика). Близкие условия и сроки проведения анализа получены и при использовании иммуноферментного твердофазного метода [Желудков М.М., с соавт., 1991; Метлин В.Н. с соавт., 1991; Леви М.И. с соавт., 1999]. Предложен экспресс-метод определения чувствительности к антибиотикам возбудителей гнойно-септических

инфекций. Для экспресс-анализа использован метод серийных разведений антибиотиков в цветной питательной среде, содержащей 0,002% индикатора бромкрезолпурпурного и 0,5% глюкозы. При росте устойчивых к антибиотикам микроорганизмов снижается рН питательной среды, и индикатор изменяет свой цвет, чувствительные к антибиотикам микроорганизмы цвет среды не изменяют. Исследования проводили в пластмассовых планшетах, в луночках которых приготавливали разведения антибиотиков на цветной питательной среде. В контрольные лунки вносили только цветную питательную среду. Гнойное отделяемое из ран больных забирали ватным тампоном, смоченным цветной питательной средой, готовили разведения материала и по 0,05 мл добавляли в луночки планшетов с различными разведениями антибиотиков. Планшеты помещали в термостат до изменения исходного цвета питательной среды в контрольных лунках (без антибиотиков) в желтый (обычно 3-6 часов). Затем учитывали результаты анализа. Сохранение исходного цвета питательной среды в опытной луночке свидетельствовало о чувствительности микрофлоры к данной концентрации антибиотика, появление желтого цвета – об устойчивости микрофлоры к такой концентрации препарата.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования служили водные и спиртовые настои кровохлебки лекарственной:

1. Настой травы и отвар корневищ с корнями кровохлебки лекарственной;
2. Спиртовые извлечения, приготовленные из травы и корневищ с корнями кровохлебки лекарственной, которые были упарены досуха и затем разведены в воде 1:10.

2.2. Характеристика используемой тест-культур

2.2.1. *Staphylococcus aureus*

Таксономия: относятся к отделу *Firmicutes*, семейству *Micrococcaceae*, роду *Staphylococcus*. К данному роду относятся 3 вида: *S.aureus*, *S.epidermidis* и *S.saprophyticus*.

Стафилококки представляют собой неподвижные шарообразные клетки диаметром от 0,5 до 1,5 мкм, располагающиеся одиночно, парами или гроздьями. Не образуют спор.

Стафилококки лучше других бактерий переносят воздействие высокой температуры, света, высушивания и химических агентов. Они выдерживают нагревание до 60°C в течение часа, а отдельные штаммы — до 80°C в течение получаса и 10 минут при нагревании до 150°C, солнечный свет в течение 10–12 часов, сухой жар — до 2-х часов. Стафилококки устойчивы к повышенному содержанию хлористого натрия (поэтому они хорошо сохраняются в консервированных продуктах), чистому этанолу и фенолу. Оптимальная температура для развития стафилококков 30–37 °C.

Стафилококк – основной возбудитель инфекций опорно-двигательного аппарата (остеомиелиты, артриты и др.); в частности, он вызывает 70–80% случаев септических артритов у подростков, реже – у взрослых.

У большинства людей стафилококки обитают на коже и слизистых оболочках носа или глотки. Даже если кожа будет очищена от стафилококков (например, при экземе), почти немедленно произойдет реинфекция микроорганизмами, находящимися в воздухе. Патогенные микроорганизмы легко переносятся из одного очага поражения (например, из фурункула) на другие участки кожи пальцами или одеждой.

Морфологические свойства: Все виды стафилококков представляют собой округлые клетки. В мазке располагаются несимметричными гроздьями. Клеточная стенка содержит большое количество пептидогликана, связанных с ним тейхоевых кислот, протеин А. Грамположительны. Спор не образуют, жгутиков не имеют. У некоторых штаммов можно обнаружить капсулу. Могут образовывать L-формы.

Культуральные свойства: Стафилококки — факультативные анаэробы. Хорошо растут на простых средах. На плотных средах образуют гладкие, выпуклые колонии с различным пигментом, не имеющим таксономического значения. Могут расти на агаре с высоким содержанием NaCl. Обладают сахаролитическими и протеолитическими ферментами. Стафилококки могут вырабатывать гемолизины, фибринолизин, фосфатазу, лактамазу, бактериоцины, энтеротоксины, коагулазу.

Стафилококки пластичны, быстро приобретают устойчивость к антибактериальным препаратам. Существенную роль в этом играют плазмиды, передающиеся с помощью трансдуцирующих фагов от одной клетки к другой. R-плазмиды детерминируют устойчивость к одному или нескольким антибиотикам, за счет продукции бета-лактамазы.

Антигенная структура

Около 30 антигенов, представляющих собой белки, полисахариды и тейхоевые кислоты. В составе клеточной стенки стафилококка содержится

протеин А, который может прочно связываться с Fc-фрагментом молекулы иммуноглобулина, при этом Fab-фрагмент остается свободным и может соединяться со специфическим антигеном. Чувствительность к бактериофагам (фаготип) обусловлена поверхностными рецепторами. Многие штаммы стафилококков являются лизогенными (образование некоторых токсинов происходит с участием профага).

Факторы патогенности: Условно – патогенные. Микрокапсула защищает от фагоцитоза, способствует адгезии микробов; компоненты клеточной стенки – стимулируют развитие воспалительных процессов. Ферменты агрессии: каталаза – защищает бактерии от действия фагоцитов, бета-лактамаза – разрушает молекулы антибиотиков.

Резистентность. Устойчивость в окружающей среде и чувствительность к дезинфектантам обычная.

Патогенез

Источником инфекции стафилококков - человек и некоторые виды животных (больные или носители). Механизмы передачи — респираторный, контактно-бытовой, алиментарный.

Микробиологическая диагностика

Материал для исследования – гной, кровь, моча, мокрота, испражнения.

Бактериоскопический метод: из исследуемого материала (кроме крови) готовят мазки, окрашивают по Граму. Наличие грам«+» гроздевидных кокков, располагающихся в виде скоплений.

2.2.2. *Enterococcus faecalis*

Энтерококки, входящие в состав нормальной микрофлоры пищеварительного тракта человека, играют важную роль в обеспечении колонизационной резистентности слизистых. В то же время они являются представителями группы условно-патогенных бактерий, способных вызывать аутоинфекцию, а при накоплении в окружающей среде – приводить к экзогенному инфицированию. В последние годы изучение энтерококков как

биологических объектов и оценка их роли в физиологии и патологии человека чаще всего рассматриваются сквозь призму участия энтерококков в возникновении инфекционных заболеваний, количество которых постоянно нарастает. Однако односторонняя оценка микроорганизмов зачастую не позволяет объективно оценить их значение, так как многие из них являются составной частью нормальной микрофлоры и обязательными компонентами привычных пищевых продуктов. Обнаружение у больного энтерококков часто ставит неразрешимые вопросы перед клиницистами в плане определения врачебной тактики. Возник вопрос о безопасности применения в медицинской практике препаратов-пробиотиков, содержащих жизнеспособные симбиотические энтерококки. В данной книге мы постарались рассмотреть проблему энтерококков с разных точек зрения и объяснить причины, определяющие их способность вызывать развитие инфекционного процесса, т.е. возможность проявления патогенных свойств энтерококками различных штаммов одного и того же вида.

Энтерококки, ранее относимые к стрептококкам группы D, — многочисленная группа бактерий рода *Enterococcus*, включающая виды *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus*, *E. irae*, *E. malodoratus* и *E. mundtii*. В клиническом материале от человека встречаются *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gilvus* и *E. pallens*. Энтерококки содержат групповой антиген, который реагирует с антисывороткой стрептококков серогруппы D по Лэнсфилду. Энтерококки других видов, как правило, не обнаруживаются в клиническом материале от людей.

2.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Синегнойная палочка (лат. *Pseudomonas aeruginosa*) - это грамотрицательная подвижная бактерия палочковидной формы, является облигаторным (строгим) аэробом. Имеет размеры 0,5-0,8 мкм в толщину и 1,5-3 мкм в длину. Относится к роду *Pseudomonas* (насчитывающему более

140 видов бактерий) семейства *Pseudomonadaceae* (Псевдомонады). Известна также под названием "синегнойная палочка".

Широко распространена в природе: встречается в почве, в воде, на растениях, в желудочно-кишечном тракте человека и животных. Может встречаться как в биопленке, прикрепленной к какой-либо поверхности или субстанции, так и в планктонной форме, т.е. в виде отдельной бактерии, передвигающейся с помощью своего полярного жгутика. Причем синегнойная палочка является одним из самых подвижных микроорганизмов, наблюдаемых в образцах воды из природных источников. Способна не только длительное время сохраняться в окружающей среде (влажной атмосфере или воде), но и успешно размножаться. Растет при 42 °С (оптимум — 37 °С), селективная среда — ЦПХ-агар (питательный агар с цетилперидиниум-хлоридом). Образует протеазы. На твердых питательных средах диссоциирует на три формы- R-, S- и M- форму. Продуцирует характерные пигменты: пиоцианин (феназиновый пигмент, окрашивает питательную среду в сине-зеленый цвет, экстрагируется хлороформом), пиовердин (желто-зелёный флюоресцирующий в ультрафиолетовых лучах пигмент) и пиорубин(бурого цвета). Некоторые штаммы осуществляют биодеструкцию углеводов, в том числе формальдегида.

Прямая или искривлённая с закруглёнными концами палочка, 1—5 × 0,5—1,0 мкм, монотрих или лофотрих. Хемоорганогетеротроф, облигатный аэроб (денитрификатор). Растёт на МПА (среда окрашивается в сине-зелёный цвет), МПБ (в среде помутнение и пленка, также сине-зелёный цвет). Растёт при 42 °С (оптимум — 37 °С), селективная среда — ЦПХ-агар (питательный агар с цетилперидиниум-хлоридом). Образует протеазы. На твёрдых питательных средах диссоциирует на три формы — R-, S- и M-форму. Продуцирует характерные пигменты: пиоцианин (феназиновый пигмент, окрашивает питательную среду в сине-зелёный цвет, экстрагируется хлороформом), пиовердин (желто-зелёный флюоресцирующий в ультрафиолетовых лучах пигмент) и пиорубин

(бурого цвета). Некоторые штаммы осуществляют биодеструкцию углеводов и формальдегида.

Pseudomonas aeruginosa обнаруживается при абсцессах и гнойных ранах, ассоциирована с энтеритами и циститами. *P.aeruginosa* является одним из распространённых возбудителей нозокомиальных инфекций ввиду того, что *P.aeruginosa* особенно легко поражает лиц с ослабленным иммунным статусом. Факторами патогенности *P.aeruginosa* является наличие подвижности, токсинообразование, продукция гидролитических ферментов. Прогноз ухудшается высокой резистентностью к действию антибиотиков. *P.aeruginosa* устойчива к действию многих беталактамов, аминогликозидов, фторированных хинолонов.

Лабораторная диагностика. Культуральная диагностика с последующей бактериоскопией не представляет трудностей, поскольку синегнойной палочки хорошо растёт на различных питательных средах. С помощью серологической диагностики в относительно короткие сроки можно правильно поставить диагноз путём выявления как антигенов возбудителя инфекции, так и антител, вырабатываемые в ответ на антигенную стимуляцию иммунной системы.

2.2.4. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae — вид грамотрицательных факультативно-анаэробных палочковидных бактерий. Выделена в 1882 году немецким микробиологом Карлом Фридлендером (1847—1887).

Один из возбудителей пневмонии, также ассоциирована с инфекциями мочеполовой системы, внутрибольничными инфекциями.

Грамотрицательная, мелкая (0,5—0,8 × 1—2 мкм) коккобацилла. Спор не образует, неподвижна. Способна к образованию капсулы. Располагаются одиночно, попарно и скоплениями. Легко окрашиваются анилиновыми красителями.

Хемоорганогетеротроф, факультативный анаэроб. Культивируется на простых питательных средах (МПА, МПБ). На агаризованных питательных средах образует круглые слизистые серовато-белые колонии. В МПБ — равномерное помутнение среды с образованием тягучего слизистого осадка и плёнки. Сбраживает лактозу, не образует индола.

K. pneumoniae является одним из возбудителей пневмонии, а также урогенитальных инфекций, гнойных абсцессов печени, селезёнки. Вызывает гнойные и фиброзные плевриты, перикардиты, гаймориты, эндофтальмиты. Важный возбудитель нозокомиальных инфекций. Микроорганизм также патогенен и для некоторых животных. Некоторые штаммы обладают полирезистентностью к антибиотикам, обусловленную наличием R-плазмиды, также проявляется устойчивость к карбапенемам за счёт наличия карбапенем-гидролизующих β-лактама. Капсула является фактором вирулентности.

2.2.5. *Candida albicans*

Кандидаальбиканс (*Candida albicans*) относится к дрожжеподобным грибам, местом обитания которых являются тонкий кишечник, половой тракт, полость рта, пищевод, гортань. В норме существует баланс между *Candida* и другими бактериями и дрожжами в организме. Однако при врожденных или приобретенных нарушениях иммунитета, гормональном дисбалансе или при длительном применении антибактериальных препаратов возможно активное размножение этих грибов, нарушающее баланс микрофлоры и приводящее к развитию инфекции, которая называется кандидоз.

Candida albicans - это одноклеточные микроорганизмы. Они широко распространены в природе, большинство из них сапрофиты. Кандиды - постоянные обитатели кожи здорового человека. За последние 20-30 лет их выявляемость на слизистых оболочках полости рта и зева выросла в 10 раз и достигает 53-57% обследованных.

Кандида (*C. albicans*) относится к условно-патогенным микроорганизмам и является наиболее распространенной грибковой инфекцией.

Клетки гриба имеют округлую форму, размером до 10 мкм. Кандида достаточно стойкий микроорганизм и способен обитать не только на слизистых оболочках, но и на коже и в окружающей среде. Грибы кандиды (*C. albicans*) аэробны и наиболее благоприятными характеристиками среды их обитания является РН 6,0-6,5 при температуре 21-37°C.

2.3. Методы исследования

Для оценки чувствительности бактерий к исследуемым растениям использовали диско-диффузный метод.

Посев колоний производили в чашки Петри. Для приготовления бактериологической суспензии используется метод прямого суспензирования в стерильном изотоническом растворе колоний в 18-24 часов культуры бактерий, выросшей на плотной неселективной питательной среде. Для этого стерильной бактериологической петлей или ватным тампоном собрали несколько морфологически сходных колоний и суспензировали полученный материал в стерильном изотоническом растворе. Бактериальную суспензию засекали на агар в течении 15 минут. Для получения сплошного газона равномерно наносили суспензию штриховыми движениями по всей поверхности агара в трех направлениях, поворачивая чашку Петри на 60°.

Не позднее, чем через 15 мин после инокуляции на поверхность питательной среды наносили диски с исследуемым раствором. Аппликацию дисков проводили с помощью стерильного пинцета. Расстояние от диска до края чашки и между дисками было - 20 мм. В одну чашку Петри помещали не более 6 дисков. Диски аккуратно прижимали пинцетом. После аппликации дисков чашки Петри помещали в термостат кверху дном и инкубировали при температуре 35°C в течение 18 - 24 ч.

После окончания инкубации чашки помещали кверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом в 45° . Диаметр зон задержки роста измеряли с точностью до 1 мм, штангенциркулем.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.2. Определение микробиологической активности сырья кровохлебки лекарственной

3.2.1. Определение микробиологической активности травы и корневищ с корнями кровохлебки лекарственной в отношении *Staphylococcus aureus*

Объекты исследования: 1-отвар корневищ с корнями

2-спиртовой экстракт корневищ с корнями

3-настой травы

4-спиртовой экстракт травы.

Результаты исследования представлены на рисунках 1 и 2, и в табл. 1.



Рис. №1 — активность исследуемых образцов в отношении к *Staphylococcus aureus* в сравнении с фузидином (мм)

Рис. №2 — активность исследуемых образцов в отношении к *Staphylococcus aureus* в сравнении с нитрофурантоином (мм)

Таблица 1

Влияние растительных вытяжек на задержку роста *Staphylococcus aureus*

Культура микроорганизма	Диаметр зоны задержки роста микроорганизмов в мм					
	отвар корневищ с корнями	спирт.экстр. корневищ с корнями	настой травы	спирт.экстр.травы	контроль	
					фузидин	нитрофурантоин
№1 – <i>Staphylococcus aureus</i>	10	11	7	7	17	20
№ 2 – <i>Staphylococcus aureus</i>	7,5	7	7	6		
Среднее значение	8,75	9	7	6,5		

В результате исследования установлено, что в среднем зоны задержки роста микроорганизма больше при использовании спиртового экстракта из корневищ с корнями кровохлебки (9мм), затем на втором месте – водный экстракт из корневищ с корнями кровохлебки (8,75 мм). В меньшей степени задерживают рост извлечения из травы (6,5 мм и 7 мм) спиртовый и водный экстракт соответственно.

3.2.2. Определение микробиологической активности травы и корневищ с корнями кровохлебки лекарственной в отношении *Enterococcus faecalis*.

Объекты исследования: 1-отвар корневищ с корнями

2-спиртовой экстракт корневищ с корнями

3-настой травы

4-спиртовой экстракт травы.

Результаты исследования представлены на рисунках 3 и 4, и в таблице 2

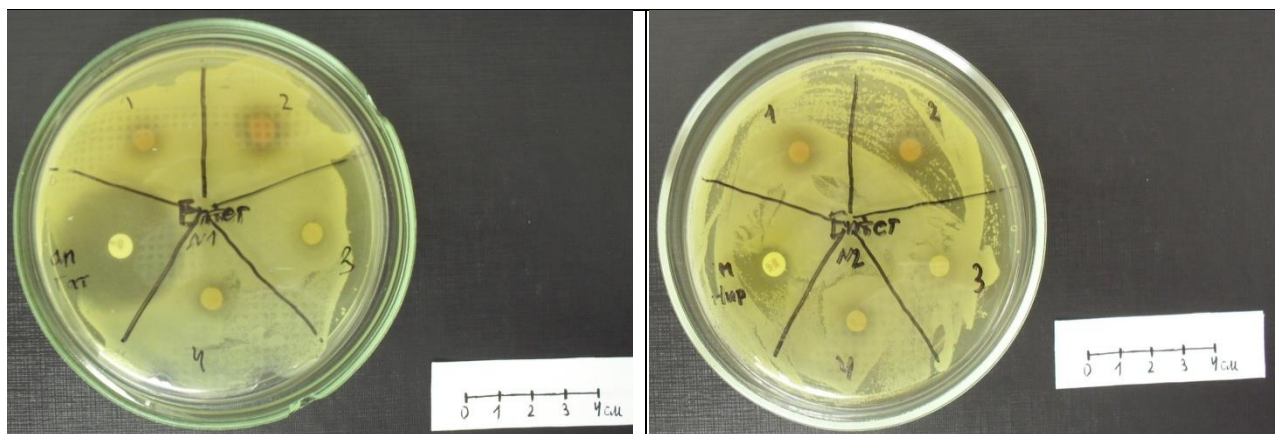


Рис.№3 – активность исследуемых образцов в отношении к *Enterococcus faecalis* в сравнении с гатифлоксацином (мм)

Рис.№4 – активность исследуемых образцов в отношении к *Enterococcus faecalis* в сравнении с нитрофурантоином (мм)

Таблица 2

Влияние растительных вытяжек на задержку роста *Enterococcus faecalis*

Культура микроорганизма	Диаметр зоны задержки роста микроорганизмов в мм					
	отвар корневи щ с корням и	спирт.экс тр. корнев.с корнями	насто й трав ы	спирт. экстр.тра вы	контроль	
					гатифлоксац ин	нитрофурант оин
№1 – <i>Enterococcus faecalis</i>	8	9	7	7	27	8
№ 2 – <i>Enterococcus faecalis</i>	7,5	8,5	7	7		
Среднее значение	7,75	8,5	7	7		

В данном опыте также отмечается более активное влияние спиртовых экстрактов на задержку роста микроорганизмов по сравнению с травой. В среднем зоны задержки роста микроорганизма больше при использовании спиртового экстракта из корневищ с корнями кровохлебки (8,5 мм), затем на втором месте – водный экстракт из корневищ с корнями кровохлебки (7,75 мм). В меньшей степени задерживают рост извлечения из травы (7 мм и 7мм) спиртовый и водный экстракт соответственно.

3.2.3. Определение микробиологической активности травы и корневищ с корнями кровохлебки лекарственной в отношении *Pseudomonas aeruginosa*.

Объекты исследования: 1-отвар корневищ с корнями

2-спиртовой экстракт корневищ с корнями

3-настой травы

4-спиртовой экстракт травы.

Результаты исследования представлены на рисунках 5 и 6, и в таблице 3.

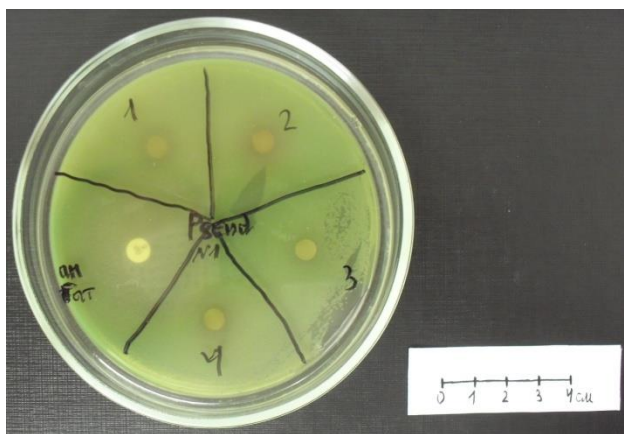


Рис.№5 – активность исследуемых образцов в отношении к *Pseudomonas aeruginosa* в сравнении с гатифлоксацин (мм)

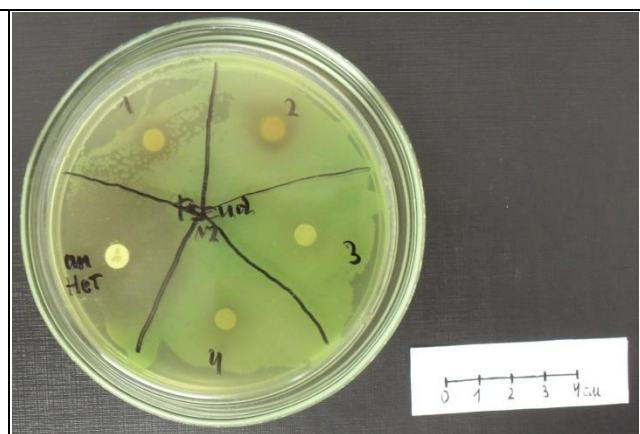


Рис.№6 – активность исследуемых образцов в отношении к *Pseudomonas aeruginosa* в сравнении с нитрофурантоином (мм)

Таблица 3

Влияние растительных вытяжек на задержку роста *Pseudomonas aeruginosa*

Культура микроорганизма	Диаметр зоны задержки роста микроорганизмов в мм					
	отвар корневищ с корнями	спирт.экстр. корнев.с корнями	настой травы	спирт.экстр.травы	контроль	
					гatifлоксацин	гatifлоксацин
№1 – <i>Pseudomonasaeruginosa</i>	9	8	-	7	30,5	28
№ 2 – <i>Pseudomonasaeruginosa</i>	8	9	-	7		
Среднее значение	8,5	8,5	-	7		

В данном опыте также отмечается более активное влияние спиртовых экстрактов на задержку роста микроорганизмов по сравнению с травой. В среднем зоны задержки роста микроорганизма при использовании спиртового и водного экстракта из корневищ с корнями кровохлебки имеют равные значения и составляют 8,5 мм. В меньшей степени задерживают рост извлечения из травы спиртовый экстракт задерживает рост на 7мм, а водный – показал отрицательный результат, т.е. задержки роста нет.

3.2.4. *Определение микробиологической активности травы и корневищ с корнями кровохлебки лекарственной в отношении Klebsiella pneumoniae.*

Объекты исследования: 1-отвар корневищ с корнями

2-спиртовой экстракт корневищ с корнями

3-настой травы

4-спиртовой экстракт травы.

Результаты исследования представлены на рисунках 7 и 8, и в таблице 4.

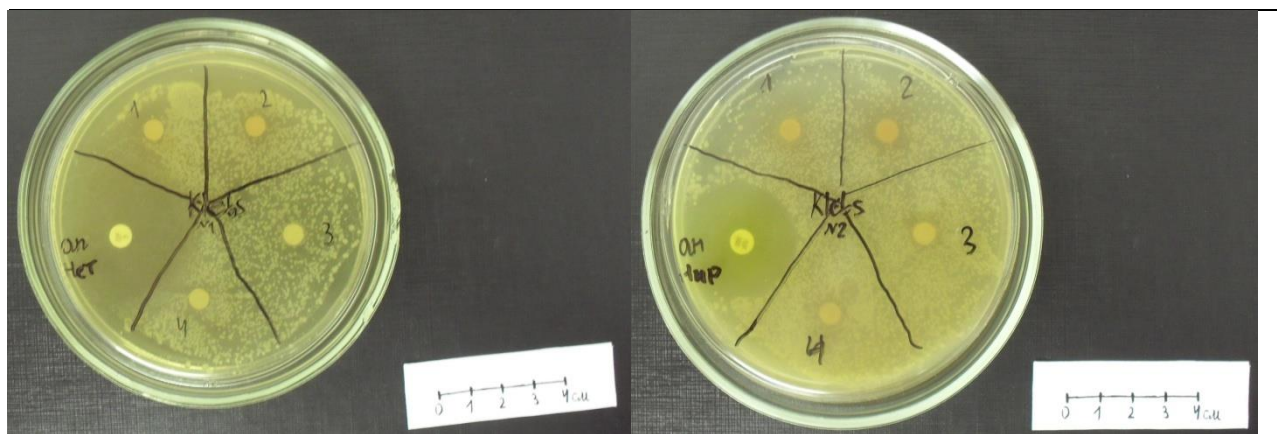


Рис.№7 – активность исследуемых образцов в отношении *Klebsiella pneumoniae* в сравнении с гатифлоксацин (мм)

Рис.№8 – активность исследуемых образцов в отношении *Klebsiella pneumoniae* в сравнении с нитрофурантоином (мм)

Таблица 4

Влияние растительных вытяжек на задержку роста *Klebsiella pneumoniae*

Культура микроорганизма	Диаметр зоны задержки роста микроорганизмов в мм					
	отвар корневищ с корнями	спирт.экстр. корнев.с корнями	настой травы	спирт. экстр.травы	контроль	
					Гатифл оксацин	нитроф урантоин
№1 – <i>Klebsiellapneumoniae</i>	6	7	-	-	31	29
№ 2 – <i>Klebsiellapneumoniae</i>	7	7	7	7		
Среднее значение	6,5	7	3,5	3,5		

В данном опыте также отмечается более активное влияние спиртовых экстрактов на задержку роста микроорганизмов по сравнению с травой. В среднем зоны задержки роста микроорганизма больше при использовании спиртового экстракта из корневищ с корнями кровохлебки (7 мм), затем на втором месте – водный экстракт из корневищ с корнями кровохлебки (6,5 мм). В меньшей степени задерживают рост извлечения из травы: при использовании спиртового и водного экстракта из корневищ с корнями кровохлебки имеют равные значения и составляют 3,5 мм.

3.2.5. Определение микробиологической активности травы и корневищ с корнями кровохлебки лекарственной в отношении *Candida albicans*.

Объекты исследования: 1-отвар корневищ с корнями

2-спиртовой экстракт корневищ с корнями

3-настой травы

4-спиртовой экстракт травы.

Результаты исследования представлены на рисунках 9 и 10, и в таблице 5.

Таблица 5

Влияние растительных вытяжек на задержку ростам *Candida albicans*

Культура микроорганизма	Диаметр зоны задержки роста микроорганизмов в мм					
	отвар корневищ с корнями	спирт.экстр . корнев.с корнями	насто й травы	спирт. экстр.т равы	контроль	
					гатифло ксацин	нитроф урантои н
№1 - <i>Candidaalbicans</i>	7	7	6	6	37	14
№ 2 - <i>Candidaalbicans</i>	6	7	6	6		
Среднее значение	6,5	7	6	6		

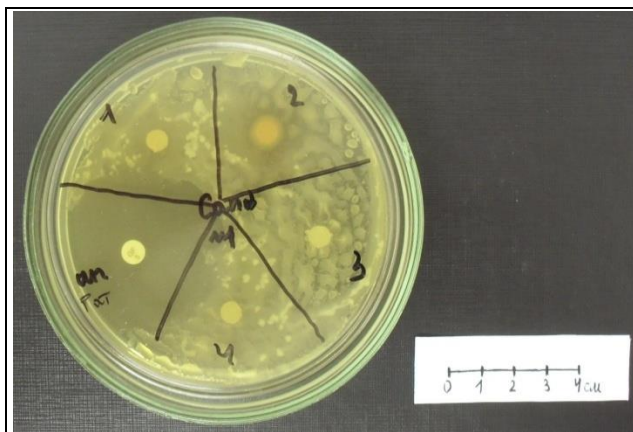


Рис.№9 — активность исследуемых образцов в отношении к *Candida albicans* в сравнении с гатифлоксацином (мм)

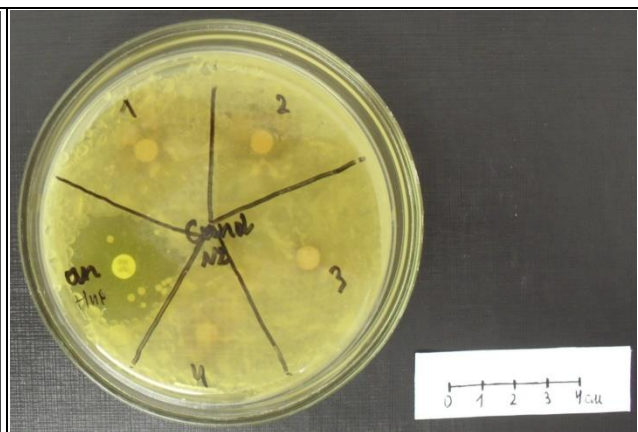


Рис.№10 — активность исследуемых образцов в отношении к *Candida albicans* в сравнении с нитрофурантоином (мм)

В данном опыте также отмечается более активное влияние спиртовых экстрактов на задержку роста микроорганизмов по сравнению с травой. В среднем зоны задержки роста микроорганизма больше при использовании спиртового экстракта из корневищ с корнями кровохлебки (7 мм), затем на втором месте – водный экстракт из корневищ с корнями кровохлебки (6,5 мм). В меньшей степени задерживают рост извлечения из травы: при использовании спиртового и водного экстракта из корневищ с корнями кровохлебки имеют равные значения и составляют 6 мм.

Анализируя полученные результаты можно отметить, что наиболее выраженную антимикробную активность проявили экстракты из корневищ с корнями кровохлебки лекарственной в отличие от травы. Если сравнивать извлечения водные и спиртовые, то преимущество принадлежит спиртовым экстрактам. Это связано с тем, что в корневищах с корнями кровохлебки содержится большее количество полифенольных соединений (дубильных веществ), чем в траве. Кроме того, в спиртовые экстракты, в отличие от водных, переходят кроме дубильных веществ и другие фенольные соединения, лучше растворимые в водно-спиртовых растворах, например флавоноиды, фенолкарбоновые и оксикоричные кислоты, принимающие участие в проявлении общей антимикробной активности.

При анализе зон задержки роста микроорганизмов под влиянием извлечений из кровохлебки более высокие показатели отмечались при влиянии на культуры *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, меньшие значения наблюдались при влиянии на *Klebsiella pneumoniae* и *Candida albicans*.

ВЫВОДЫ:

1. Установлено, что антимикробная активность разных видов сырья кровохлебки различается в зависимости от использованной части растения и варианта извлечения действующих субстанций.
2. При анализе зон задержки роста микроорганизмов под влиянием кровохлебки антимикробная активность была наиболее выражена в отношении культуры *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* и *Pseudomonas aeruginosa*, менее значимым было влияние на *Klebsiella pneumoniae* и *Candida albicans*.
3. Установлено, что наиболее выраженную антимикробную активность проявили экстракты из корневищ с корнями кровохлебки лекарственной в отличие от травы
4. При сравнении водных и спиртовых извлечений наиболее эффективными в противомикробном отношении были спиртовые экстракты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Атлас лекарственных растений СССР. М., Изд-во мед. лит., 1976
2. Бандюков В.А. Антибактериальная активность извлечений в Некоторых видов цветковых растений \ \ Раст. Ресурсы, вып. 2, 1989, т. 26, с. 169-178.
3. Басарева О. И., Костров С. В., Букреева Е. М., Хапчаева Д. А., Лосицкая О. С., Зими́на Я. В. Сравнительный анализ антимикробной активности новых биологически активных соединений и лекарственных форм на их основе // Современные проблемы науки и образования. –2011.– №5.
- 4.Блинова. Н. П.Руководство к лабораторным занятиям по микро- Е51 биологии: Учебное пособие/Под ред.— М.: Медицина, 1988.— 208 с.: ил.— Учеб. лит. Для студ. мед. ин-тов. Фармац. фак.
- 5.Ботанико-фармацевтический словарь/ Под ред. К.Ф. Блиновой и Г.П. Яковлева - М.: Высшая школа, 1990. - 272 с.
6. Вавилова Н.М. Гомеопатическая фармакодинамика в 2-х частях. Смоленск, Гомеопатический центр. - М.: Эверест, 1994.
- 7.Воробьев А.В., Быков А.С., Пашков Е.П., Рыбакова А.М. Микробиология: Учебник. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 2003. — 336 с.: ил. — (Учеб. лит. Для студ. фарм. вузов)
- 8.Гринкевич М.А. Информационный поиск перспективных лекарственных растений.- Ленинград, 1980.- 140с
9. Дербенцева Н.А., Бондаренко А.С. и др.. Антимикробные свойства лекарственных растений., \ \ Фармацевтический журнал, 1989 № 4.Кретович В.Л. Биохимия растений. М., Высш. Школа, 1980.-445с
- 10.Елинов Н.П. и др. Руководство по лабораторным занятиям по микробиологии / М. Медицина, 1988

11. Козлов Р.С., Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Иванчик Н.В., Склеенова Е.Ю., Тимохова А.В., Дехнич А.В. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам/ Клинические рекомендации, 2014
12. Кузнецова М. А. Лекарственное растительное сырье и препараты. М., 1987., с 127-128
11. Куркин В.А. Фармакогнозия: учебник для студентов фармацевтических вузов. - Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ», 2004. – 1200 с.
13. Лопухов Л.В, Эйдельштейн М.В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике/ Том 2 2000-106 с.
14. Лысак В.В., Желдакова Р.А. Микробиология: Методические рекомендации к лабораторным занятиям, контроль самостоятельной работы студентов. – Мн.: БГУ, 2002. – 97с.
15. Мамчур Ф.И. Справочник по фитотерапии, М.:, 1984. - 264 с.
16. Меньшиков В.В. Методики клинических лабораторных исследований / Том III. Клиническая микробиология 2009.
17. Навашин С.М., Фомина И.П. Рациональная антибиотикотерапия.- М.: Медицина, 1982. - 495с.
18. Неграш А.К. Развитие устойчивости у золотистого стафилококка к антибиотикам растительного происхождения и свойстве устойчивых вариантов. В кн.: Наукова думка, 1981, с 260-262
19. Орлова Н. И. Rosaceae Juss.- Розоцветные.- В кн.: Флора Мурманской области. Вып. 4. М.- Л., Изд-во АН СССР, 1959
20. Пяткина Д., Кривошеин Ю.С. Микробиология, К., Высшая школа, 1992
21. Практикум по фармакогнозии: Учеб. пособие для вузов / В.Н.Ковалев, Н.В.Попова, В.С. Кисличенко и др.; Под общ. ред. В.Н.Ковалева. - Харьков: Изд-во НфаУ: Золотые страницы: МТК - Книга, 2004. - 512 с.

22.Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. ПЦР в реальном времени/2-е изд.,2009-223с.

23. Решедько Г. К., Рябкова Е. Л., Фаращук А. Н., Страчунский Л. С. Неферментирующие грамотрицательные возбудители нозокомиальных инфекций в ОРИТ России: проблемы антибиотикорезистентности // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2006; 8 (3): 243-59.

24. СеминаН.А., СидоренкоС.В.Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам/ Методические указания. МУК 4.2.1890-04

25. Сидоренко С.В. Механизмы антибиотикарезистентности-2002

26. Соколов С.Я., Замотаев И.П. Справочник по лекарственным растениям: Фитотерапия./С.Я. Соколов, И.П. Замотаев – 2-е изд. – М.: Медицина, 1988.- 462с.

27. Товстуха Е.С. Фитотерапия, М.:, 1990. - 304с

28. Черных И. В. Интродукция пряно-ароматических и эфиромасличных растений в условиях лесостепной зоны Южного Предуралья и их использование в экопротективной помощи населению : дис. – Уфа, 2004 142-164 с. РГБ ОД, 61: 05-3/341, 2004.

29. Струпан Е.А., Струпан О.А., Типсина Н.Н., Туманова А.Е. Анатомическое строение органов растения кровохлебки лекарственной и локализация в них дубильных веществ // Вестник Красноярского государственного аграрного университета - №11 – 2010 – С. 107-109.

30. Ходарева Е. С. Эколого-физиологическое исследование фенольного комплекса кровохлебки лекарственной (*Sanguisobraficinalis* L.): автореферат магистерской диссертации: направление подготовки 020400.68 "Биология" (магистерская программа "Экология") /Елена Сергеевна Ходарева.- Вологда: [б.и.], 2013.-4 с.

31.ХоменкоА.И., Шадурская С.К. Антибиотики:химиотерапия инфекционных заболеваний / учебники и учебное пособие -2002- 192с.

32.Чанышева А.Р., Василова Л.Я. (сост.) Действие антибактериальных препаратов на микроорганизмы

33. Шапиро А.В. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методами серийных разведений и-теста (лекция).

34. Bergeron M.G., Ouellette M. Preventing antibiotic resistance using rapid DNA based diagnostic tests // Infect. Cont. and Hosp. Epidemiol. – 1998. – Vol. 19, N 8. – P. 560-564.

35.Hancock R.E. The role of fundamental research and biotechnology in funding solutions to the global problem of antibiotic resistance / Clin.Infect.Dis.-1997-Vol.24,N 1-P. 148-150.

36.Meyer R. Antibiotica-resistenzen weltweit of dem Vormach / Internist prax.-1994.-Bd.34,N 1-S. 197-208.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Справка об антиплагиате студентки МБ 401 Валиевой Л.А.

Информация о документе:

Имя исходного файла:	антиплагиат.docx
Имя компании:	Башкирский государственный медицинский университет
Тип документа:	Прочее
Имя документа:	диплом Валиева
Текстовые статистики:	
Индекс читаемости:	сложный
Неизвестные слова:	в пределах нормы
Макс. длина слова:	выше нормы!
Большие слова:	выше нормы!
Оригинальные блоки: 82.52%	
Заимствованные блоки: 17.48%	
Заимствование из "белых" источников: 0%	
Итоговая оценка оригинальности: 82.52%	



Отзыв
научного руководителя на дипломную работу
«КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ПРОТИВОМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ
НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ НАСТОЕВ И ЭКСТРАКТОВ», выполненную
студенткой 4 курса обучения медико-профилактического факультета с
отделением микробиологии ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Валиевой Лилии Анваровны

Студентка Валиева Л.А. проходила дипломную практику в Башкирском государственном медицинском университете, на кафедре фундаментальной и прикладной микробиологии, и выполнила комплексную совместную работу с кафедрой фармакогнозии БГМУ.

В ходе выполнения дипломного проекта Валиева Л.А. проработала значительный объем научно-методической литературы, освоила практически все методы лабораторной оценки противомикробной активности антибактериальных препаратов и применяемых при разработке новых лекарственных настоев и экстрактов.

При выполнении дипломной работы показала себя как ответственный, исполнительный, инициативный экспериментатор. Она овладела основными микробиологическими методами исследований, что позволило ей решить все поставленные задачи. Особо следует отметить уровень освоения Валиевой Л.А. культуральных методов работы с различными группами микроорганизмов, включая грибы, хорошо ориентируется по современным биологическим базам данных и имеет хорошую теоретическую подготовку.

Резюмируя вышеизложенное необходимо заключить, что Валиева Л.А. освоила весь объем теоретических данных и приобрела необходимые навыки, подпадающие под компетенции бакалавра по направлению 06.03.01 Биология, и заслуживает положительной оценки.

Научный руководитель:
д.м.н., проф., заведующий кафедрой
фундаментальной и прикладной микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава
России



А.Р. Мавзютов

РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Валиевой Лилии Анваровны

На рецензию представлена дипломная работа на тему «Количественная оценка противомикробной активности новых лекарственных настоев и экстрактов».

Изучение терапевтической активности лекарственных растений показало, что в лечебной практике целесообразно их применение без химической обработки в виде настоев, отваров, настоек и т. д., поэтому актуальным вопросом остается более подробное изучение химического состава водных извлечений из лекарственного растительного сырья и определение их активности. Перспективным растением в этом плане является кровохлебка лекарственная.

План работы выстроен по традиционной схеме и включает следующие разделы: введение, литературный обзор, описание методов исследований, представление полученных данных и их обсуждение, выводы, список цитируемой литературы, приложения. Во введении четко поставлены цель и задачи исследования, показаны актуальность, научная новизна и практическая значимость результатов исследования. Литературный обзор широко освещает современное положение изучаемой проблемы. В главах, посвященных результатам исследования, подробно изложены основные итоги проведенной работы.

Дипломная работа Валиевой Л.А. соответствует требованиям, предъявляемым к дипломным работам, может быть допущена к защите и заслуживает положительной оценки.

Рецензент

д.фарм.н., профессор кафедры фармакогнозии
с курсом ботаники и основ
фитотерапии ГБОУ ВПО БГМУ
Минздрава России



К.А.Пупыкина.

РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Валиевой Лилии Анваровны

На рецензию представлена дипломная работа на тему:
«Количественная оценка противомикробной активности новых
лекарственных настоев и экстрактов».

Работа построена по традиционной схеме и включает следующие
разделы: введение, литературный обзор, описание методов исследований,
представление полученных данных и их обсуждение, выводы, список
цитируемой литературы, приложения.

Во введении показана актуальность темы, обосновывается цель и
задачи исследования. Литературный обзор отличается тщательностью, однако,
необходимо отметить его излишне большой объем, свыше 35 страниц.
Вместе с тем материал изложен хорошо и широко освещает современное
положение изучаемой проблемы. В главах, посвященных результатам
исследования, подробно изложены основные итоги проведенной работы.
Работа хорошо иллюстрирована, что существенно облегчает её восприятие.

Дипломная работа Валиевой Л.А. соответствует всем требованиям,
предъявляемым к дипломным работам, содержит новые научно-практические
данные, может быть допущена к защите и заслуживает положительной
оценки.

Ученый секретарь ФБУН
Институт биохимии и генетики
УНЦ РАН, д.б.н.



Ф.Р.Гималов