

**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**

**Фахретдинова Виктория Рафаэлевна**

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ  
АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ -  
КАНДИДАТОВ В ПРОБИОТИКИ**

Руководитель:  
профессор, д.б.н.

Т.В.Маркушева

Уфа–2016

# ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	7
1.1. Современные представления о пробиотиках.....	7
1.2. Пробиотики в лечении инфекций влагалища.....	9
1.3. Методы оценки антагонистической активности .....	17
1.4. Анаэробные микроорганизмы и биопленки.....	21
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	28
2.1. Взятие материала.....	28
2.2. Выделение чистых культур условно-патогенных микроорганизмов.....	29
2.3. Бактериоскопическое исследование микроорганизмов.....	29
2.4. Идентификация по биохимическим признакам.....	30
2.5. Определение антагонистической активности.....	32
2.6. Исследование адгезивности пробиотических бактерий.....	34
2.7. Выделение ДНК.....	35
2.8. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.....	37
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ ...	39
3.1. Выделение чистых культур условно-патогенных микроорганизмов и лактобактерий.....	39
3.2. Микроскопическое исследование микроорганизмов.....	51
3.3. Результаты идентификации по биохимическим признакам.....	54
3.4. Оценка антагонистической активности лактобактерий.....	57
3.5. Исследование адгезии лактобактерий и УПМ к клеткам Hela.....	59
3.6. Оценка активности лактобактерий в отношении <i>Atopobium vaginae</i> на клеточных культурах по способности пробиотиков разрушать биопленку и адгезироваться на поверхности.....	61
ВЫВОДЫ .....	66
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	67
ПРИЛОЖЕНИЕ .....	76

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

БАД – биологически активные добавки

ББП – бактериальные биологические препараты

БВ – бактериальный вагиноз

БП - биопленка

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

КА – кровяной агар

КОЕ – колониеобразующая единица

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

МСА – молочно-солевой агар

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

УПМ – условно-патогенный микроорганизм

# ВВЕДЕНИЕ

## Актуальность проблемы

Значительное распространение бактериального вагиноза (БВ), сопровождающихся значительными нарушениями микробиоценоза (главным образом снижением общего количества лактобактерий), предопределило поиск новых альтернативных методов их лечения.

В настоящее время известно много различных пробиотиков. Их основу составляют живые культуры представителей нормальной микрофлоры человека. Эффективность препаратов в первую очередь зависит от входящих в их состав штаммов лактобактерий.

Впервые использовал вагинальный пробиотик Stanley Thomas в 1928 г. после того, как провел исследование и выявил, что лактобактерии отсутствовали в среде с гонококками. Он сослался на два опыта – один, проведенный в пробирке, а другой в естественных условиях – в которых добавление малого количества сыворотки *L. acidophilus* уничтожало *Neisseria gonorrhoeae*. Было предложено использовать для восстановления нормальной вагинальной микрофлоры экзогенные штаммы лактобактерий. Использование пробиотических штаммов *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus rhamnosi* при лечении урогенитальных инфекций имело слабые результаты, возможно потому что в обычной флоре они не распространены. Лучше применять *L. crispatus* в подобной ситуации, потому что она доминирует в здоровой вагинальной микрофлоре, и 95% штаммов производят H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Lactobacillus crispatus* может дольше выживать в вагинальной флоре.

Традиционно активность пробиотических бактерий в отношении клинических изолятов (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Bacillus subtilis*) определяется методом отсроченного антагонизма на питательной среде.

Благодаря развитию молекулярно-генетических методов обнаружены анаэробные микроорганизмы: *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia amnionii*, *Sneathia sanguinegens* и *Eggerthella spp.*, против которых не проверялась антагонистическая активность.

Поведение микроорганизмов *in vitro* и *in vivo* отличается, тем более что данные микроорганизмы образуют биопленку на поверхности эпителия влагалища, что невозможно увидеть на питательной среде. Поэтому необходима разработка нового метода оценки антагонистической эффективности пробиотиков на культурах клеток против анаэробных микроорганизмов. Данный метод позволит контролировать образование биопленки, производство  $H_2O_2$  и молочной кислоты, выживание лактобактерий на эпителии влагалища.

### **Цель исследования**

Оценка антагонистической активности лактобактерий по спектру и уровню антагонистической активности к условно-патогенным штаммам бактерий.

### **Задачи исследования**

1. Получение чистых культур штаммов пробиотиков, наиболее часто использующихся для лечения БВ, и условно-патогенных микроорганизмов;
2. Оценка активности пробиотических бактерий в отношении условно-патогенных микроорганизмов методом отсроченного антагонизма на питательной среде;
3. Определение способности лакто- и условно-патогенных анаэробных бактерий образовывать биопленку;
4. Оценка активности пробиотических бактерий в отношении анаэробных микроорганизмов на клеточных культурах по способности пробиотиков разрушать биопленку и адгезироваться на поверхности.

### **Научная новизна.**

Проведена оценка антагонистической эффективности штаммов-кандидатов в пробиотики *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* в отношении условно-патогенных микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vagina*.

### **Практическая значимость.**

Полученные данные позволят оптимизировать и индивидуализировать лечение БВ. Результаты работы могут быть применены в медицине, в практическом здравоохранении, в клинико-диагностических лабораториях государственных лечебных учреждений, лабораториях научно-исследовательских центров и ВУЗов.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Современные представления о пробиотиках

Совокупность полезных микроорганизмов, населяющих влагалище, является важным фактором, обеспечивающим физиологическую деятельность организма. Нормальная микрофлора участвует в многообразных функциях обмена веществ и витаминного баланса, в стимуляции иммуногенеза, обеспечении резистентности, клеточного барьера против проникновения патогенных микроорганизмов и др. В целом бактериоценоз женских половых органов — сложная составная часть микрoэкологической системы, все участники которой, находясь в строго сбалансированном равновесии и симбиозе, обеспечивают так называемое состояние эубиоза.

Бактерийные биологические препараты (ББП) — пробиотики, пребиотики, эубиотики, синбиотики, симбиотики обладают антагонистической активностью в отношении многих патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, способствуют восстановлению нормального микробиоценоза влагалища, полости рта, кишечника, влагалища и клиническому выздоровлению.

В настоящее время известно много различных ББП. Их основу составляют живые культуры представителей нормальной микрофлоры человека — молочнокислых бактерий и бифидобактерий. ББП — это обезвоженные культуры производственных штаммов названных систематических групп в соответствующих ростовых и суспензионных средах. Как правило, указанные препараты получают путем лиофилизированной сушки различных штаммов молочнокислых бактерий.

Пробиотиками называют препараты, содержащие живые микроорганизмы в управляемом достаточном количестве, благодаря которым поддерживается оптимальный уровень здоровья хозяина. При назначении в адекватных количествах они оказывают благотворное влияние на состояние

макроорганизма путем изменения свойств нормальной микрофлоры. Концепция пробиоза была предложена в начале XX века Нобелевским лауреатом в области физиологии и медицины И.И. Мечниковым (1908). M. Vanbelle и соавт. (1990) определили понятие «пробиотик»: в переводе с греческого «*pro-*» значит для, «*bios*» — жизнь, т.е. препарат для жизни. Этимологически пробиотик является антонимом термина антибиотик: «*anti-*» — против; «*bios*» — жизнь, т.е. препарат против жизни. В отличие от антибиотиков пробиотики не оказывают отрицательного воздействия на нормальную микрофлору, поэтому их широко применяют для профилактики и лечения дисбиозов. И.И. Мечников еще в 1903 г. предложил использовать микробные культуры-антагонисты для борьбы с болезнетворными бактериями. Он рекомендовал употреблять простоквашу, обогащенную культурой *Lactobacillus bulgaricus*, для профилактики различных заболеваний.

Термин «пробиотики» в настоящее время применяют преимущественно для обозначения фармакологических препаратов или биологически активных добавок (БАД), содержащих штаммы нормальной микрофлоры человека или микробные метаболиты, благотворно влияющие на организм. Основные пробиотики — это микроорганизмы - продуценты молочной кислоты, которые являются наиболее типичными представителями нормальной микрофлоры человека [Андреева И.В. 2007]. Пробиотические виды лактобактерий главным образом используются в пищевых добавках, о чем имеются весьма ограниченные клинические данные.

В Европе есть доступные фармацевтические препараты из пробиотических штаммов лактобактерий, тогда как в США ни один подобный препарат не одобрен Управлением по контролю над пищевыми продуктами и лекарственными препаратами (FDA). Увеличение интереса к пробиотическим лекарствам связано, прежде всего, с низкой эффективностью стандартных методов терапии в отдаленном периоде. Например, эффективность терапии БВ вагинальным или оральным

метронидазолом или клиндамицином через 4—6 нед после лечения колеблется от 36 до 85%. [Eriksson K. 2005]

Современные пробиотики являются результатом селекции и комбинации различных составляющих, главными среди которых являются лактобактерии, обладающие протективными свойствами. Вот основные критерии, которым должны отвечать пробиотики:

1) жизнеспособность: в момент использования бактерии должны быть живыми;

2) сверхжизнеспособность: бактерии могут выжить в соляной кислоте желудка;

3) рост: возможен рост этих бактерий, изменения pH могут быть неблагоприятными для патогенных штаммов;

4) продукция молочной кислоты — это главная характеристика влагалищных пробиотиков;

5) продукция бактерицидов очень важна в отношении качества неспецифической резистентности;

6) колонизация: пробиотические штаммы лактобактерий могут стать постоянными обитателями влагалища. Пробиотики действуют следующим образом:

— восстанавливают вагинальную флору после различных ее нарушений;

— поддерживают и сохраняют микробное равновесие во влагалище;

— предупреждают расстройства, связанные с приемом антибиотиков;

— предупреждают рекуррентные инфекции.

## **1.2. Пробиотики в лечении инфекций влагалища**

В 20-е годы XX столетия в Ленинграде профессором А.А. Смородинцевым (ученик Д.О. Отта) был изобретен вагозан — культура собственных лактобактерий, выделенных из влагалища или желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и выращенных в достаточном количестве в

питательном бульоне. В СССР лактобактериями и препаратами из них активно занимался профессор А.А. Ленцнер из Тарту (Эстония). Он считал, что одной из немаловажных возможностей усиления защитной функции лактофлоры влагалища является использование пробиотиков (эубиотиков). Эффективность препаратов в первую очередь зависит от входящих в их состав штаммов лактобактерий. Перспективными представляются пробиотики, содержащие высокоактивные к определенным возбудителям штаммы. А.А. Ленцнер и Х.П. Ленцнер [Ленцнер А.А. 1996] рекомендовали соединять пробиотики с гормонами и некоторыми антимикробными химиопрепаратами. В последнем случае необходимы штаммы лактобацилл, устойчивые к соответствующему препарату. Однако в последующем было установлено, что пробиотические микроорганизмы чувствительны к большинству групп антимикробных препаратов. Вследствие этого целесообразность одновременного применения пробиотиков с большинством используемых в клинической практике антибиотиков сомнительна.

Таблица 1. Современные пробиотики, используемые в акушерстве и гинекологии

Название препарата	Состав
Ацилакт	<i>L. acidophilus</i>
Вагилак (лактогин, БАД)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 и <i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14
Генофлор Э	<i>L. acidophilus</i> + экстриол 0,03 мг
Лактобактерин	<i>L. acidophilus</i>
Экофемин	<i>L. acidophilus</i>
Lactin-V	<i>L. crispatus</i>
NormoVagin	<i>L. acidophilus</i> + Эхинацея пурпурная + L-лейцин + L-валин и др.
PreGyn	<i>L. acidophilus</i>
Progyn	<i>L. brevis, L. acidophilus, L. rhamnosus</i>

Интересные исследования были проведены McLean N.W. и McGroaty J.A. [McLean N.W. 1996]. Они культивировали в присутствии метронидазола чувствительные к нему штаммы *G. vaginalis*, после чего последние приобрели к данному препарату устойчивость. Было установлено, что

метронидазолустойчивые штаммы в меньшей степени подавляют рост культуры лактобацилл. Кроме того, авторы показали, что низкие значения pH и наличие молочной кислоты подавляют активность культуры лактобацилл на 60—95%, в то время как подавляющая активность перекиси водорода составляет всего 0—30%. Однако при наличии миелопероксидазы лактобациллы, продуцирующие  $H_2O_2$ , снижают жизнеспособность метронидазол-чувствительных штаммов *G. vaginalis* в 2000 раз. Однако в другом исследовании высказано предположение, что  $H_2O_2$ -продуцирующие лактобациллы предотвращают развитие только БВ, но не защищают от кандидоза или трихомоноза.

В настоящее время основным приемом коррекции нарушенного вагинального микробиоценоза женщин является применение пробиотических препаратов. В России производство таких препаратов основано на использовании лактобацилл и бифидобактерий - представителей нормофлоры желудочно-кишечного тракта человека и использовании отдельных штаммов вагинальных лактобацилл без учета особенностей структуры и функций микробиоценоза репродуктивного тракта женщин. Микробиоценоз влагалища динамично изменяется с возрастом и в зависимости от циклических процессов, происходящих в женском организме. Особенностью этого микробиоценоза является его многокомпонентность. Структура микробиоценоза влагалища у женщин репродуктивного возраста характеризуется сочетанием резидентной и транзитной микрофлоры. Резидентная микрофлора делится на облигатную и факультативную. К облигатным резидентным микроорганизмам микробиоценоза влагалища относятся лактобактерии. Они преобладают во влагалище здоровой женщины, в то время как доминирование уропатогенов имеет место у пациенток с уроинфекционным анамнезом. Использование только культуральных методов в изучении видового спектра лактобацилл у здоровых женщин репродуктивного возраста позволяет обнаружить один, два и реже три штамма в вагинальном биотопе одной женщины. Сочетание

культуральных и других альтернативных методов идентификации позволяет обнаружить в вагинальном эпителие одной женщины более трех видов лактобацилл. К факультативной резидентной флоре относятся *Gardnerella vaginalis* и грибы рода *Candida*. Эти микроорганизмы в низких концентрациях часто выделяются из здорового женского полового тракта. Наиболее сильное влияние на вагинальный микробиоценоз оказывают гормональные изменения, которые определяют репродуктивные фазы жизни женщины [Farage M., 2010]. Действие гормонов на микробиоценоз влагалища происходит опосредованно, в первую очередь, через фермент лактатдегидрогеназу (ЛДГ), который катализирует превращение продукта бактериального метаболизма молочной кислоты в пировиноградную, являющуюся субстратом для глюконеогенеза и синтеза гликогена. Повышение активности ЛДГ приводит к усилению пролиферации влагалищного эпителия и накоплению гликогена, что обеспечивает оптимальные условия существования нормального микробиоценоза. Неотъемлемым условием этих процессов является закисление среды влагалища за счет образования молочной кислоты в результате бактериальной утилизации гликогена. Это и обуславливает формирование определенного спектра бактерий, которые могут существовать в здоровом влагалище и составляют нормальный микробиоценоз. Малейшее изменение pH слизистой оболочки приводит к повышенной уязвимости влагалища к патогенным микроорганизмам и усилению патогенности условно-патогенной флоры. При рождении девочки и на протяжении первых 1-2 месяцев жизни на ее организм еще продолжают действовать материнские гормоны, поэтому вагинальный эпителий новорожденных соответствует таковому у женщин фертильного возраста, а микробиоценоз в норме представлен в основном лактобактериями. В этом периоде у ребенка формируется иммунологическая толерантность. Штаммы лактобацилл, полученные от матери в процессе родов и заселившие вагинальный биотоп девочки, воспринимаются ее иммунной системой как «свои». Такие штаммы бактерий получили название

- аутоштаммы. После окончательного распада гормонов матери (к концу второго месяца жизни) и до периода полового созревания у девочки имеет место выраженная атрофия влагалищного эпителия, который представлен монослоем базальных клеток и характеризуется щелочной средой слизистой оболочки. Микрофлора такого влагалища состоит из скудного количества грамположительных кокков, преимущественно анаэробов. После полового созревания эпителий становится многослойным, происходит закисление влагалищной среды, микробиоценоз соответствует микробному составу вагинальной слизистой оболочки женщин фертильного возраста. В менопаузе постепенно происходят обратные процессы: развиваются атрофические изменения эпителия, имеют место повышение рН влагалищной среды, снижение количества лактобактерий, увеличение популяции грамположительных кокков. Отсутствие лактобацилл в составе микробиоты влагалища женщин репродуктивного возраста служит серьезным предвестником преждевременных родов.

Изменения микрофлоры влагалища женщины репродуктивного возраста происходят постоянно, но в здоровом организме нормальный микробиоценоз быстро восстанавливается. Дисгормональные и иммунологические нарушения закономерно сказываются на количественном и качественном составе микробиоценоза влагалища, при этом часто требуется медикаментозная коррекция. Пероральное применение антибиотиков приводит к развитию у женщин не только дисбиоза желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), но и к нарушению микроэкологии вагинального тракта, что свидетельствует о серьезном повреждении микробиоценоза всего организма. В связи с тем, что лактобациллы являются важным фактором в предупреждении колонизации влагалища женщины репродуктивного возраста уропатогенными бактериями, уменьшение их количества или отсутствие может predispose к инфекциям мочевыводящих путей. Если ранее инфекционная патология в акушерстве и гинекологии была обусловлена мономикробным возбудителем, то в

настоящее время в клинической практике все чаще встречается полимикробная ассоциация микроорганизмов. К числу таких заболеваний относится бактериальный вагиноз (БВ) - инфекционный невоспалительный синдром, характеризующийся резким снижением или отсутствием лактобацилл и их заменой на полимикробные ассоциации условно-патогенных бактерий *G. vaginalis* со строгими анаэробами *Atopobium vaginae*, *Prevotella*, *Mobilincus* и др., концентрация которых возрастает в несколько раз и достигает  $10^9$ - $10^{11}$  КОЕ/мл [Ан кирская А.С. 2005]. Вторым наиболее распространенным инфекционным заболеванием женской половой сферы является кандидозный вульвовагинит (КВВ). Он относится к оппортунистическим инфекциям, развивающимся на фоне иммунологической недостаточности. В связи с этим КВВ весьма актуален во время беременности, отличается рецидивирующим и резистентным к терапии течением. К факторам риска кандидозной инфекции относятся также гипофункция яичников, частое лечение антибиотиками, особенно пенициллинового ряда. В последние годы у человека все чаще КВВ вызывается не *Candida albicans*, а другими разновидностями грибов рода *Candida* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*). Если раньше такие случаи были редки, то сейчас на долю этих грибов приходится 30-50% всех кандидозных инфекций. В настоящее время довольно часто встречаются БВ и КВВ одновременно в качестве смешанной инфекции, составляя от 10 до 39% всех случаев инфекционных заболеваний влагалища [Redondo-Lopez V. 1990]. При лечении пациенток со смешанной инфекцией используется двухэтапная схема - элиминация возбудителя и поддерживающая противорецидивная терапия, которая проводится на протяжении нескольких месяцев. Но есть пациентки, которым требуется постоянная (пожизненная) поддерживающая терапия, поскольку при отмене антимикотиков у них обязательно происходит рецидив кандидозного воспаления, и эта проблема на сегодня не решена. Установлено, что отсутствие в вагинальном биотопе женщины штаммов лактобацилл, продуцирующих  $H_2O_2$ , значительно повышает риск заболевания

БВ и КВВ с хроническим рецидивирующим течением [В. Vitali 2007.]. В связи с вышеизложенным актуальным является создание новых пробиотических препаратов, в состав которых будет входить консорциум, состоящий из различных видов лактобацилл, продуцирующих  $H_2O_2$ .

Ключ к решению проблемы БВ - нормализация вагинальной микрофлоры. На первом этапе с помощью системных и местных антибактериальных препаратов (метронидазол, клиндамицин) проводится санация влагалища, целью которой является элиминация *G. vaginalis* и строгих анаэробных условно-патогенных бактерий. Несмотря на высокую эффективность данной терапии в 30-40% случаев отмечается развитие рецидивов БВ и в 20% случаев заболевание осложняется развитием КВВ. На втором этапе для восстановления нормальной микрофлоры используются местные пробиотические препараты. Однако существующие в России пробиотические препараты (Ацилакт, Лактобактерин и др.) содержат лакто- и бифидобактерии кишечного происхождения или монопрепараты на основе отдельных вагинальных лактобацилл, которые не способны эффективно приживаться во влагалище из-за низких адгезивных свойств по отношению к вагинальным эпителиоцитам [Кира Е.Ф. 2001.]. В результате лечение приводит к нестойкому эффекту. В отличие от вышеупомянутых отечественных пробиотиков зарубежный препарат Вагилак (Лактогин) является первой в мире комбинацией двух пробиотических штаммов орального применения с целью нормализации вагинальной микрофлоры и снижения вагинальной колонизации патогенными и условно-патогенными бактериями. Препарат представляет собой консорциум *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 и *Lactobacillus reuteri* RC-14, выделенных из дистальных отделов уретры и влагалища здоровых женщин. Оба штамма обладают адгезивными свойствами в отношении к вагинальным эпителиоцитам [Reid G. 2001]. Исследования показали, что Вагилак можно принимать перорально, ежедневно, в течение двух месяцев, и при этом не отмечается никаких побочных явлений. [Reid G. 2003, Gardiner G. 2002] Прием этого препарата

женщинами, страдающими БВ, приводит к восстановлению вагинальной флоры в 82% случаев. [Reid G. 2001] Целесообразность орального применения пробиотических лактобацилл для коррекции вагинального микробиоценоза объясняется тем, что толстый кишечник представляет собой резервуар, из которого постоянно происходит высвобождение микроорганизмов микробиоты человека, в том числе и лактобацилл. Благодаря анатомической близости анального отверстия и преддверия влагалища лактобациллы соответствующего видового спектра, важнейшими представителями которого являются *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* и др., легко проникают во влагалище, колонизируют его и дистальные отделы уретры [Reid G. 2003]. Первые три вида (*Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii*), продуцирующие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, являются доминирующими представителями и детектируются примерно в 90% случаев у здоровых женщин методами посева содержимого влагалища на питательные среды, используемые при культивировании лактобактерий [Hillier S. 2008; Pavlova S. 2002]. Другие виды, например *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus reuteri*, обнаруживаются в 1,5% и 0,3% случаев. Количество лактобацилл в норме составляет 10<sup>5</sup>-10<sup>7</sup> КОЕ/мл, что соответствует 95-98% от всей микрофлоры влагалища [Сафронова М.М. 2009].

Известен штамм *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, входящий в состав препарата Лактобактерин, имеющего показания к применению при заболеваниях женской половой сферы интравагинально. Однако по данным препарат малоэффективен при лечении БВ. Известен штамм *Lactobacillus crispatus* CTV-05, продуцирующий перекись водорода, который либо в составе интравагинальных капсул или суппозиториях [Czaja S. 2007; Stapleton A. 2011] предлагается к использованию для коррекции вагинальной микрофлоры. Недостатком штамма *Lactobacillus crispatus* CTV-05 является

ограничения по его использованию при пероральном применении, или в составе кисломолочных продуктов функционального питания.

Наиболее близким техническим решением (прототипом) является препарат Вагилак, представленный консорциумом штаммов лактобактерий *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 и *Lactobacillus reuteri* RC-14 [US Patent 705160]. Показано, что штаммы *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 и *Lactobacillus reuteri* RC-14 колонизируют влагалище после приема в пероральной форме, способствуют восстановлению естественной кислой среды во влагалище (рН 3,8-4,5), повышают устойчивость слизистой к воздействию патогенных микроорганизмов, создавая условия для улучшения качества (нормализации) микрофлоры.

Штаммы *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus plantarum* выделены из влагалища здоровых женщин репродуктивного возраста, идентифицированы методом секвенирования гена 16S rRNA и депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (Московская обл., г. Пущино).

### **1.3. Методы оценки эффективности и антагонистической активности штаммов-кандидатов в пробиотики**

Важнейшим критерием отбора пробиотических штаммов является изучение их антагонистической активности по отношению к патогенным и условно - патогенным микроорганизмам.

Антагонистическая активность лактобацилл связана с продуцированием в больших количествах органических кислот, антибиотикоподобных субстанций различного химического состава, спектра и механизма действия, перекиси водорода.

P. Hütt показал, что подавление роста *Shigella sonnei* является результатом действия внеклеточных и диффундирующих субстанций *L.casei* rhamnosus, таких как молочная и уксусная кислоты [Hütt P. 2006].

Штамм *L.casei rhamnosus* подавлял рост следующих патогенных бактерий: энтеротоксигенный штамм *E.coli*, энтеропатогенный штамм *E.coli*, *K.pneumoniae*, *S. flexneri*, *S. typhimurium*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* и *Clostridium difficile* [Forestier C. 2001]. В последних исследованиях J. Lee обнаружил низкомолекулярную термостабильную ингибирующую субстанцию, выделяемую *L. casei rhamnosus* GG, которая проявляет активность по отношению к *Pseudomonas spp.*, *Clostridium spp.*, *Bacteroides spp.*, *Staphylococcus spp.* и *Streptococcus spp.* [Lee J. 2011].

С.В. Черкасов изучил продукцию перекиси водорода у 45 штаммов лактобацилл в реакции разложения перекиси водорода ферментом пероксидазой с окислением тетраметилбензидина в качестве субстрата. В результате исследований было установлено, что 67% изученных штаммов лактобацилл продуцируют перекись водорода. Количество продуцируемой мкмоль/мл. Все перекись-продуцирующие штаммы *L.acidophilus* в разной степени обладали способностью ингибировать бактериальную каталазу, что было установлено после контакта тест - штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P с культуральной жидкостью лактобацилл [Черкасов С.В. 2011.].

Известно, что антагонистическая активность бактерий осуществляется с помощью разных (зачастую очень тонких) молекулярных механизмов, а ее проявление зависит от ряда факторов, среди которых прежде всего следует назвать разнообразие взаимодействий антагониста и его жертвы в конкретных условиях внешней среды [Ирkitова А.Н. 2011]. Неудивительно поэтому, что исследователи, определяя антагонистическую активность микроорганизмов, используют разные методы, различающиеся по сложности выполнения, производительности, сравнимости и точности получаемых результатов.

Все разработанные к настоящему времени методы определения антагонистической активности микроорганизмов традиционно принято делить на две группы: методы *in vitro* (в искусственных условиях) и методы *in vivo* (в живом организме). Однако, поскольку, строго говоря, термин *in vivo*

касается только тех случаев, когда внешней средой взаимодействия микроорганизмов (антагониста и его потенциальной жертвы) является организм хозяина (в роли которого выступает человек или подопытное животное), а примеры практического использования явления микробного антагонизма значительно шире, на наш взгляд, более справедливо делить эти методы на методы *in vitro* и методы *in situ*. Термин «*in situ*» применительно к биологии означает, что явление изучается там, где оно естественно и происходит (например, непосредственно в сыре или в ферментере), то есть, без перемещения его в искусственную среду. Таким образом, методы *in vivo* можно рассматривать как частный случай методов *in situ*.

На первых этапах исследования используют в основном методы *in vitro*. Они позволяют отсеять не представляющие интереса не активные или малоактивные штаммы. Дальнейшее исследование с помощью методов *in situ* (*in vivo*) проводят, как правило, с единичными наиболее перспективными штаммами. Зачастую на этом этапе используют уже не чистые культуры молочнокислых бактерий-антагонистов, а препараты на их основе.

Методы *in vitro*. Эти методы позволяют довольно просто и быстро проверить большой массив штаммов молочнокислых бактерий и/или тест-культур нежелательных микробов (санитарно-показательных, патогенных или технически-вредных). Различают диффузионные методы и тестирование в жидких питательных средах.

Диффузионные методы (метод перпендикулярных штрихов, метод блоков или лунок, метод капель и т.п.) основаны на диффузии антибиотических веществ, образуемых испытуемыми штаммами лактобактерий, в толщу агаровой среды, содержащей тест-культуру и подавляющей рост последней.

Согласно широко используемому в микробиологии методу перпендикулярных штрихов [Нетрусов А.И. 2005; Аникиев В.В. 1977; Глушанова Н.А. 2005], на поверхности агаровой среды в чашке Петри высевают штрихом экспоненциальную культуру исследуемого штамма

лактобактерий и инкубируют при оптимальной для него температуре (30 и 37°C соответственно для мезофильных и термофильных форм) в течение определенного времени (например, 24 или 48 ч) для образования и диффузии в агар ингибиторных соединений. Затем перпендикулярно от края чашки к штриху выросшей культуры лактобактерий подсевают штрихом экспоненциальную культуру тест-штамма (например, *E. coli*), слегка касаясь штриха лактобактерии. Чашку вновь инкубируют, но теперь при условиях (температура и продолжительность), благоприятных для роста тест-культуры. О наличии и степени антагонистической активности у испытуемой лактобактерии судят по величине зоны ингибирования тест-штамма на границе со штрихом роста лактобактерии. На одной чашке к лактобактерии можно подсеять несколько тест-культур и, таким образом, выявить спектр антагонистического действия данной лактобактерии. Используемая агаровая среда должна обеспечивать хороший рост как испытуемого штамма лактобактерий, так и тест-штамма (или тест-штаммов). Чашки можно инкубировать в аэробных условиях, либо (при необходимости) в анаэробном состоянии. Для исключения влияния молочной кислоты и pH на результаты тестирования, в агаровую среду вносят подходящие буферные соли. Аналогичным образом, влияние перекиси водорода снимают добавлением в среду каталазы. Так как размер зон ингибирования тест-культуры в значительной степени зависит от толщины слоя питательного агара, чашки Петри перед розливом среды располагают на строго горизонтальной поверхности и в каждую чашку наливают одинаковое количество расплавленной среды. Для объективной оценки антагонистического действия лактобактерий, выявляемого этим методом, необходимо учитывать, что он дает преимущество штаммам, продуцируемым ингибиторные соединения небольшой молекулярной массы, которые быстрее диффундируют в толще агарового слоя и, следовательно, дают более обширные зоны ингибирования роста тест-культуры. Этот метод имеет, однако, существенный недостаток: продуцент антибиотического вещества и тест-организм выращивают на

одной среде, хотя известно, что не всегда одна и та же среда одинаково благоприятна как для продуцента и образования им антибиотика, так и для роста тест-организма.

#### **1.4. Анаэробные микроорганизмы и биопленки**

В последние годы большое внимание исследователей привлечено к изучению совокупностей микроорганизмов, объединенных в биопленки, в которых бактерии взаимодействуют друг с другом и приобретают повышенную устойчивость к факторам внешней среды [Лаврова Л.В. 2011; Лобанов В.В. 2004]. Согласно классическому определению микробные биопленки – это сообщества микроорганизмов, прикрепленных к эпителиальным, погруженным в матрикс, клеткам, образованный внеклеточными полимерными субстанциями [Tetz V.V. 1996]. Отличительным свойством биопленки является наличие гликокаликса биосинтетического полимерного конгломерата, окружающего бактерии и состоящего из внеклеточной ДНК, белков, полисахаридов, нуклеиновых кислот и гликопротеидов [Тец В.В. 1998]. Биопленки в природе обычно состоят из смешанных видов бактерий и выполняют защитную и функциональную роль в различных нишах. Формирование биопленок рассматривается как способность микроорганизмов адаптироваться к особым условиям выживания [Costerton J.W. 1999; Davies D. 2003; Shah K.D. 2004;]. Выделяют пять стадий развития биопленки [Watnick P. 2000]:

1. Закрепление отдельных бактерий на поверхности эпителия. Вначале происходит первичное прикрепление микроорганизмов к поверхности (адгезия, сорбция) из окружающей среды. Эта стадия обратима.

2. Взаимодействие бактерий друг с другом. Окончательное (необратимое) прикрепление, фиксация микроорганизмов. На этой стадии микробы выделяют внеклеточные полимеры, обеспечивающие прочную адгезию.

3. Формирование зрелой биопленки. Первые бактерии, прикрепившиеся к поверхности, облегчают прикрепление последующих клеток, а внеклеточный матрикс удерживает вместе всю колонию. На этой стадии происходит накопление питательных веществ и клетки начинают делиться.

4. Рост. Образование зрелой биопленки в белково-полисахаридном каркасе и изменение ее размера и формы. Внеклеточный матрикс служит защитой клеток от внешних факторов.

5. Дисперсия. На этой стадии происходит отщепление бактерий-спор, которые способны через некоторое время прикрепляться к поверхности эпителиальных клеток для образования новых колоний биопленок.

Для биопленок описан феномен кворумной сигнализации – сетевой коммуникации бактерий (Quorum Sensis), координирующей экспрессию бактериальных генов в зависимости от условий внешней среды [O’Toole G.A. 2000]. Такая организация обеспечивает ее физиологическую и функциональную стабильность и является основой конкурентного выживания в экологической нише. Сообщество микроорганизмов организует единую генетическую систему в виде плазмид-кольцевых ДНК, несущих поведенческий код, для компонентов биопленки, определяющих их пищевые, энергетические и другие связи между собой и внешним миром [Плахова К.И. 2007]. Предполагается, что при достижении некоторого количества бактерий в биопленке происходит разделение и выход ряда бактерий для создания новых колоний биопленок. По влиянию на здоровье человека микробные биопленки можно разделить на нормальные и патологические. Примером нормальных биопленок является влагалищная индигенная флора. Важным компонентом индигенной флоры являются лактобациллы, бифидобактерии и пропионобактерии. Влагалищные лактобациллы способны синтезировать перекись водорода, подавляющую рост облигатных анаэробов родов *Mobiluncus*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Clostridium* и др. Важным защитным фактором влагалищной индигенной микрофлоры является ее

способность синтезировать лизоцим и бактериоцины. Колонизационные свойства индигенной флоры в наибольшей степени зависят от ее адгезивных свойств. Прикрепление к поверхности эпителиоцитов и формирование на слизистой оболочке влагалища биопленки, состоящей из влагалищной слизи, колоний индигенной микрофлоры и ее метаболитов, являются мощными защитными факторами, предупреждающими адгезию и чрезмерное развитие условно-патогенных микроорганизмов, а также проникновение их клеток и продуктов обмена за пределы влагалищного биотопа [Мавзютов А.Р. 2007]. Патологические биопленки это биопленки, образованные микроорганизмами, являющимися возбудителями инфекционного процесса. Около 60% микробных инфекций человека сопровождается образованием биопленок. К особенностям биопленочных инфекций относятся:

1. Затяжное течение процесса и склонность к его хронизации.
2. Повышенная вероятность диссеминации возбудителя, приводящая к генерализации инфекционного процесса. Биопленки, образованные грамотрицательными бактериями, могут продуцировать эндотоксин, что может приводить к развитию инфекционно-токсического шока.
3. Неэффективность методов традиционной антимикробной терапии. Бактерии в биопленках могут обмениваться плазмидами резистентности (передача резистентности от вида к виду).
4. Бактерии в биопленке не поддаются воздействию иммунной системы хозяина.

У пациенток с БВ биопленки выявляются в 90% случаев. Наиболее распространенными микроорганизмами, входящими в состав биопленок при БВ, являются *G. vaginalis* (от 60 до 90% массы биопленки), *Sneathia sanguinegens*, *Porphyromonas assaccharolytica*, *Megasphaera spp.*, *A. vaginae* (от 1 до 40% массы биопленки), а также вагиноз-ассоциированные бактерии, родственные *Clostridium phylum*, *Megasphaera* и/или *Leptotrichia* и др. Биопленка повышает степень адгезии бактерий к поверхности эпителия, что позволяет им достигать более высоких концентраций и препятствовать

проникновению лекарственных препаратов к бактериям, находящимся в пленке в неактивном состоянии. Подтверждено наличие постоянной и адгезивной бактериальной биопленки *A. vaginae* совместно с *G. vaginalis*, что может являться причиной отсутствия эффекта от лечения БВ при использовании метронидазола [Тихомиров А.Л. 2010]. Установлено, что в основе повышенной выживаемости лежат свойства клеток и внеклеточного матрикса. Матрикс биопленки может связывать и не пропускать и/или инактивировать антибиотики [Costerton J.W. 1999]. Устойчивость, обусловленную свойствами биопленки, объясняют уменьшением свободной поверхности за счет контактов друг с другом и формированием особых бактерий, получивших название персистеров. Персистеры в силу дифференцировки временно становятся устойчивыми практически ко всем антибактериальным препаратам [Sandoe J. 2006; Shah K.D. 2004]. Основными же механизмами повышения устойчивости бактерий к антибиотикам в биопленках являются:

1. Ограничение проникновения антибиотиков через биопленки.
2. Ограничение питания и измененная микросреда в биопленке приводят к уменьшению скорости деления бактерий, вследствие чего остается меньше мишеней для действия антибиотиков.
3. Адаптивные реакции.
4. Генная изменчивость у персистирующих в биопленке бактерий.

Терапия биопленочных инфекций должна сочетать антимикробные и антибиопленочные препараты. Нельзя нарушить биопленку без применения эффективных антимикробных препаратов, т.е. нельзя использовать антибиопленочные препараты без антимикробных препаратов либо с антимикробными препаратами, в эффективности которых нет уверенности. В связи с тем, что по данным последних исследований, *G. vaginalis* имеет сниженную адаптивную способность по отношению к кислотности среды, т.е. генетически не приспособлена к выживанию в кислой среде, необходимым компонентом терапии БВ должно быть восстановление и

поддержание кислой среды влагалища – без этого этапа терапии не устраняются патофизиологические факторы, приводящие к рецидиву [Березовская 2013].

Оптимальными для лечения бактериального вагиноза сегодня признают средства, которые физиологично восстанавливают нормоценоз влагалища. К таковым в первую очередь относят закисляющие влагалищную среду препараты. Они создают оптимальный pH влагалищной среды — важнейшее условие для формирования «здоровой» биоплёнки. Действительно, кислотно-щелочной баланс — это одно из неперемных условий нормоценоза, и смещение этого равновесия до значений, превышающих 4,5, незамедлительно отражается на микрофлоре. Во-первых, с увеличением pH многие патогенные микроорганизмы встречают благоприятные условия для своей жизнедеятельности и размножения: Во-вторых, превышающий физиологичные значения pH нарушает электростатические взаимоотношения лактобактерий с эпителием, в результате чего последние теряют способность к адгезии на слизистой оболочке и к образованию биоплёнки. Логическая подоплёка здесь довольно проста: лактобациллы и эпителиоциты заряжены отрицательно, и одним из условий, при котором лактобактерии смогли бы удержаться на эпителии, считают нормальный кислотно-щелочной баланс — 3,7–4,5. К примеру, молочная кислота обладает доказанно разрушающим действием на патогенные биоплёнки. При местном использовании она действует аналогично эндогенной, которую вырабатывают лактобактерии в процессе своей жизнедеятельности. Однако весьма любопытно, что её концентрации, которые могли бы служить смертельными для биоплёночных *Gardnerella vaginalis*, очень высоки и превышают таковые для планктонных видов бактерий в 4–8 раз. Впрочем, факт остаётся фактом: биоплёнки молочная кислота разрушает. Необходимо отметить, что вопрос о достижении «смертельной» для биоплёночных бактерий концентрации молочной кислоты специалисты по проблеме бактериального вагиноза уже решили, и весьма

успешно. Большой смысл они увидели в одномоментной терапии заболевания молочной кислотой и хлоргексидином. Как оказалось, хороших клинических результатов можно достичь, если придерживаться двухкомпонентной схемы «закисляющее влагалищную среду средство + антисептик». Целесообразность такого терапевтического воздействия, превышающего по клинической эффективности антибиотики, состоит в следующем: введённая утром интравагинально молочная кислота («Фемилекс») разрушает биоплёночные микроорганизмы и ослабляет патогенные микроорганизмы, создаёт защитное облако из лактата вокруг лактобактерий. Последовательно вводимый вечером хлоргексидина биглюконат («Гексикон», также местно), соль, растворяясь во влагалище, высвобождает положительно заряженные катионы, которые притягиваются к отрицательно заряженным патогенным бактериям и нарушают тем самым осмотический эффект и целостность клеточной мембраны микробных клеток *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*. Успешность двухкомпонентной схемы терапии бактериального вагиноза была доказана в клиническом исследовании 2012 года. Женщин с бактериальным вагинозом (n=120) рандомизировали в четыре группы: больным первой группы интравагинально вводили молочную кислоту, пациенткам второй — аскорбиновую, третьей — молочную кислоту и хлоргексидин («Гексикон»), четвёртой — клиндамицин, также интравагинально. Результаты лечения оценивали спустя 1 мес: максимальная частота излечения (как по клинико-лабораторным показателям, так и по мнению самих женщин) была характерна для третьей группы, в которой выздоровели 96% женщин, использовавших молочную кислоту и хлоргексидин. Итак, лечить бактериальный вагиноз без антибиотиков можно, и даже с большей эффективностью, если отдавать предпочтение двухкомпонентной терапии антисептиком и закисляющим средством. Кроме молочной кислоты и хлоргексидина следует вспомнить и о средстве доставки этих веществ во влагалище — полиэтиленоксидной основе, которую в силу её свойств можно

считать самостоятельным лекарственным веществом, а терапевтическую схему — трёхкомпонентной. Потенциал полиэтиленоксидной основы состоит в её способности абсорбировать продукты жизнедеятельности условно-патогенной микрофлоры, разрушать биоплёнки и оставаться при этом физиологически индифферентной. Ко всему прочему, она просто растворяется в вагинальной жидкости и обезвоживает биоплёнку и микробную клетку, способствует закрытию каналов для транспорта кислорода и питательных веществ. Это не только облегчает проникновение лекарственных веществ через биологические барьеры до глубоких слоёв бактериальных биоплёнок, но и усиливает действие антимикробных агентов в десятки раз. [Маклецова 2013]

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Взятие материала

Материал для исследования – отделяемое с заднего свода влагалища.

После введения одноразового зеркала Куско, отделяемое брали стерильным одноразовым урогенитальным зондом из заднего свода. Материал из влагалища берут в достаточном количестве. Рабочей частью зонда вращательным движением проводят по поверхности боковых стенок влагалища, максимально полно собирая материал. Зонд помещают в стерильную пробирку. Рабочую часть зонда, содержащую исследуемый материал, обламывают и оставляют в пробирке. Пробирку плотно закрывают крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, маркируют и немедленно отправляют в лабораторию для проведения ПЦР-анализа.

С целью микроскопии взятую другим стерильным урогенитальным зондом биопробу переносят на предметное стекло, перекачивая рабочую часть зонда всеми сторонами по стеклу, стараясь, чтобы материал распределился равномерно, сохраняя естественное взаиморасположение всех компонентов биоценоза. Микропрепарат высушивают на воздухе, фиксируют 96 % этиловым спиртом (2-3 капли на мазок до полного испарения), маркируют стекло и в закрытой емкости отправляют в лабораторию.

При взятии биоматериала для микробиологического исследования были соблюдены следующие требования:

— брать материал из очага инфекции, где возбудитель находится в максимальном количестве;

— брать материал до проведения мануального влагалищного исследования; удостовериться, что пациентка не использовала местного лечения по крайней мере в течение последних трех суток;

— брать материал до начала антимикробной терапии, а при невозможности выполнить это требование — непосредственно перед введением следующей дозы препарата, когда концентрация его становится минимальной;

— брать материал у женщин, не проводивших спринцевание и влагалищные орошения,

— брать материал у женщин, не использующие химические методы контрацепции;

— соблюдать правила асептики, то есть не допускать контаминации забираемой пробы сопутствующей транзитной микрофлорой;

— использовать для взятия пробы стерильные одноразовые инструменты.

Транспортировку в лабораторию взятого материала проводили в адекватном температурном режиме (20 – 37°C), в максимально короткие сроки (не более 1 – 1,5 часов).

Каждому пациенту присваивается свой порядковый номер, который дублируется на направлении, эппендорфе и микропрепарате микрофлоры отделяемого заднего свода влагалища.

## **2.2. Выделение чистых культур условно патогенных микроорганизмов**

Для выделения чистой культуры микроорганизмов был произведен забор биологического материала из влагалища. Затем были приготовлены серийные разведения в чашках Петри из расчета 1:10. Посев производился на ряд питательных сред, позволяющих максимально выявить возможный спектр микроорганизмов. Посевная доза составляла на жидких питательных средах – 0,5-1,0 мл, на плотных – 0,1 мл.

## **2.3. Бактериоскопическое исследование (микроскопия) выделенных микроорганизмов**

Окрашивание проводили согласно патенту РФ «Способ дифференцирования грамположительных и грамотрицательных бактерий и простейших рода *Trichomonas*» (Мавзютов А.Р. с соавт., 2002).

Способ дифференцировки осуществляли следующим образом: исследуемый материал фиксировали ацетоном, затем наносили насыщенный щелочной раствор метиленового синего. Окрашивание препарата проводили в течение 20-25 мин в эксикаторе, при температуре 37°C. Щадящая фиксация мазка и продолжительное инкубирование в условиях термостата обеспечивали максимально эффективную картину его окрашивания. Грамположительные микроорганизмы при этом окрашивались в серо-голубой цвет, а грамотрицательные - в иссиня-черный. Простейшие окрашивались в голубой цвет, с иссиня-черными ядрами и четко видимым контуром. Способ обеспечивает повышение информативности и диагностической ценности, сокращение времени исследования и стоимости за счет одномоментной дифференцировки грамположительных и грамотрицательных бактерий и простейших [Мавзютов А.Р., 2002].

Препараты исследовали методом световой микроскопии под иммерсией (увеличение  $\times 1000$ ) на микроскопе Люмам-Р8 (ЛОМО, г. Санкт-Петербург) и дифференцировали микроорганизмы.

#### **2.4. Идентификация по биохимическим признакам**

Изучение физиолого-биохимических свойств включает, прежде всего, установление способа питания исследуемой бактерии (фото/хемо-, авто/гетеротрофия) и типа энергетического метаболизма (способность к брожению, аэробному или анаэробному дыханию или фотосинтезу). Важно определить такие признаки, как отношение бактерии к молекулярному кислороду, температуре, рН среды, солености, освещенности и другим факторам среды. В данную группу признаков входит также перечень субстратов, утилизируемых в качестве источников углерода, азота и серы, потребность в витаминах и других факторах роста, образование характерных

продуктов метаболизма, наличие некоторых ферментов. Для этого используют специальные тесты.

Многие тесты, применяемые для обнаружения перечисленных признаков (их иногда называют рутинными тестами), важны для диагностики и широко используются в медицинской микробиологии. Их постановка требует значительных затрат времени, большого количества сложных сред и реактивов, соблюдения стандартных условий проведения, аккуратности выполнения. Для ускорения и облегчения процесса идентификации некоторых микроорганизмов, имеющих главным образом медицинское значение, разработаны различные тест-системы, например, системы Oxi/Ferm Tube, Mycotube и Enterotube II фирмы Hoffmann-La Roche (Швейцария) и др. Так, система Enterotube II, предназначенная для идентификации энтеробактерий, представляет собой пластиковую камеру с 12 ячейками, содержащими окрашенные диагностические среды. Засев всех сред производится поступательно-вращательными движениями через камеру иглы с посевным материалом. Инкубацию проводят в течение 24 ч при температуре 37 °С. О положительном или отрицательном результате теста судят по изменению цвета среды, разрыву агара (тест на газообразование) или после введения специальных реактивов (тест на образование индола, реакция Фогес–Проскау-эра). Каждый признак обозначают определенной цифрой, поэтому полученные данные можно ввести в компьютер с соответствующей программой и получить ответ о таксономическом положении исследуемого штамма.

При идентификации симбиотических и паразитических (патогенных) бактерий важно установить специфичность симбионта к хозяину, а также устойчивость к антимикробным веществам и фагам (фаготипирование).

Определение состава клеток бактерий также имеет значение для их систематики (хемотаксономатика). Хемотаксономические методы могут быть важными, в частности, для тех групп бактерий, у которых морфологические и физиологические характеристики широко варьируются и недостаточны для

проведения их удовлетворительной идентификации. В состав клеточных стенок разных прокариот входит несколько классов уникальных гетерополимеров: муреин (или псевдомуреин), липополисахариды, миколовые и тейхоевые кислоты. Состав клеточной стенки определяет и серологические свойства бактерий. Это лежит в основе иммунохимических методов их идентификации.

В качестве хемотаксономического маркера иногда используют также липидный и жирнокислотный состав клеток бактерий. Интенсивное изучение жирных кислот стало возможным с развитием метода газохроматографического анализа. Различия в составе липидов используют для идентификации бактерий на уровне рода и даже вида. Этот метод, однако, имеет определенные ограничения, поскольку содержание жирных кислот в клетках может зависеть от условий культивирования и возраста культуры.

## **2.5. Определение антагонистической активности**

Способность молочнокислых бактерий образовывать антибиотические вещества и за счет этого оказывать бактерицидное и бактериостатическое действие на вредную микрофлору широко используется в медицине.

Известно, что антагонистическая активность бактерий осуществляется с помощью разных (зачастую очень тонких) молекулярных механизмов, а ее проявление зависит от ряда факторов, среди которых прежде всего следует назвать разнообразие взаимодействий антагониста и его жертвы в конкретных условиях внешней среды.

Диффузионные методы (метод перпендикулярных штрихов, метод блоков или лунок, метод капель и т. п.) основаны на диффузии антибиотических веществ, образуемых испытуемыми штаммами лактобактерий, в толщу агаровой среды, содержащей тест-культуру и подавляющей рост последней.

Согласно широко используемому в микробиологии методу перпендикулярных штрихов, на поверхности агаровой среды в чашке Петри высевают штрихом экспоненциальную культуру исследуемого штамма лактобактерий и инкубируют при оптимальной для него температуре (30<sup>0</sup>С и 37<sup>0</sup>С соответственно для мезофильных и термофильных форм) в течение определенного времени (например, 24 или 48 ч) для образования и диффузии в агар ингибиторных соединений. Затем перпендикулярно от края чашки к штриху выросшей культуры лактобактерий подсевают штрихом экспоненциальную культуру тест-штамма (например, *E. coli*), слегка касаясь штриха лактобактерии. Чашку вновь инкубируют, но теперь при условиях (температура и продолжительность), благоприятных для роста тест-культуры. О наличии и степени антагонистической активности у испытуемой лактобактерии судят по величине зоны ингибирования тест-штамма на границе со штрихом роста лактобактерии. На одной чашке к лактобактерии можно подсеять несколько тест-культур и, таким образом, выявить спектр антагонистического действия данной лактобактерии. Используемая агаровая среда должна обеспечивать хороший рост как испытуемого штамма лактобактерий, так и тест-штамма (или тест-штаммов). Чашки можно инкубировать в аэробных условиях, либо (при необходимости) в анаэробном состоянии. Для исключения влияния молочной кислоты и рН на результаты тестирования, в агаровую среду вносят подходящие буферные соли. Аналогичным образом, влияние перекиси водорода снимают добавлением в среду каталазы. Так как размер зон ингибирования тест-культуры в значительной степени зависит от толщины слоя питательного агара, чашки Петри перед розливом среды располагают на строго горизонтальной поверхности и в каждую чашку наливают одинаковое количество расплавленной среды. Для объективной оценки антагонистического действия лактобактерий, выявляемого этим методом, необходимо учитывать, что он дает преимущество штаммам, продуцируемым ингибиторные соединения небольшой молекулярной массы, которые быстрее диффундируют в толще

агарового слоя и, следовательно, дают более обширные зоны ингибирования роста тест-культуры. Этот метод имеет, однако, существенный недостаток: продуцент антибиотического вещества и тест-организм выращивают на одной среде, хотя известно, что не всегда одна и та же среда одинаково благоприятна как для продуцента и образования им антибиотика, так и для роста тест-организма.

## **2.6. Исследование адгезивности пробиотических бактерий**

Адгезивность пробиотических бактерий рассматривается как положительный признак, позволяющий обеспечить защиту макроорганизма от патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Пробиотические лактобациллы, предназначенные для профилактики и лечения урогенитальных инфекций, должны обладать адгезивностью к эпителию урогенитального тракта [Reid G. 2008].

Культуры клеток Hela выращивают в среде ДМЕМ с 10% фетальной сыворотки +1% пенициллин-стрептомицин +0,2 мМ Neres +2 мМ L-глутамин при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Клетки в концентрации  $3,0 \times 10^5$  л/мл высевают на 6-луночные плейты в объеме 2,0 мл на лунку и культивируют 24 часа. По достижении 70-80% монослоя, клетки 3-кратно промывают средой ДМЕМ без сыворотки и затем к ним добавляют среду ДМЕМ с L-глутамином. Перед добавлением бактерий к клеткам Hela (18 часовая культура на средеMPC) их дважды промывают PBS pH 7,2, используя центрифугирование при 5000 об/мин в течение 15 минут, и ресуспендируют в среде ДМЕМ с L-глутамином. Концентрацию бактерий для определения соотношения бактерия/соматическая клетка регулируют по оптической плотности (OD<sub>λ=590</sub> нм) и контролируют высеvom на соответствующие твердые среды. Множественность инфицирования (MOI) составляет 50 и 100 бактерий/клетка. Клетки Hela с внесенными к ним лактобациллами инкубируют еще 5 часов при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. После инкубации клетки промывают 3-кратно PBS pH 7,2, затем фиксируют в холодном

этаноле (3 мин) и окрашивают красителем Романовского-Гимза в течение 30 мин. Далее пленки промывают дистиллированной водой, высушивают при комнатной температуре и исследуют микроскопически. Осуществляют подсчет количества клеток HeLa с прикрепившимися бактериями (процент адгезии) и количество бактерий, прикрепившихся к одной клетке (индекс адгезии).

## **2.7. Выделение ДНК**

Для выделения тотальной ДНК микроорганизмов методом нуклеосорбции использовали стандартный набор «ДНК-сорб-АМ» серии «АмплиПрайм» фирмы «ИнтерЛабСервис». Набор реагентов «ДНК-сорб-АМ» — одна из модификаций метода Boom.

Культуры бактерий обрабатываются лизирующим раствором в присутствии сорбента – частиц силики. В результате происходит деструкция клеточных мембран и других биополимерных комплексов и высвобождение ДНК. Растворенная ДНК в присутствии лизирующего раствора связывается с частицами сорбента, в то время как другие компоненты лизированного клинического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента центрифугированием и последующей отмывке. При добавлении раствора для элюции ДНК к сорбенту происходит переход ДНК с поверхности силики в раствор, который отделяется от частичек сорбента центрифугированием. В результате указанной процедуры получается высокоочищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования [Boom R. et al., 1990].

Ход работы:

1. Подготовить и расставить в штативе пробирки с культурами микроорганизмов, необходимое количество одноразовых стерильных пробирок объемом 1.5 мл и промаркировать их.

2. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по 25 мкл ресуспендированного сорбента, после чего внести по 300 мкл лизирующего раствора, используя наконечники с фильтром.

3. Внести по 100 мкл клинического образца, используя для каждой пробы отдельный наконечник с фильтром.

4. Пробирки плотно закрыть, содержимое тщательно перемешать на вортексе и инкубировать 5 мин при температуре 65°C. После окончания инкубации содержимое повторно перемешать на вортексе и оставить при комнатной температуре на 2 мин.

5. Осадить сорбент в пробирках центрифугированием при 10 тыс об/мин в течение 30 сек. Не захватывая сорбент, удалить надосадочную жидкость в колбу-ловушку с помощью вакуумного отсасывателя, используя для каждой пробы отдельный наконечник без фильтра.

6. Добавить в пробы по 1 мл отмывочного раствора, перемешать на вортексе до полного ресуспензирования сорбента.

7. Повторить п. 5.

8. Поместить пробирки в термостат с температурой 65°C на 5-10 мин для подсушивания сорбента, при этом крышки пробирок должны быть открыты.

9. В пробирки добавить по 100 мкл TE-буфера для элюции ДНК, используя наконечник с фильтром. Перемешать на вортексе до полного ресуспензирования сорбента. Поместить в термостат с температурой 65°C на 5 мин.

10. Центрифугировать пробирки при 12 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Полученные пробы можно хранить в течение 1 недели при температуре 2-8°C или в течении года при температуре не выше -16°C.

В дальнейшем полученную ДНК использовали в качестве матрицы для амплификации нужного фрагмента гена 16S рРНК, выявляемого методом ПЦР.

## 2.8. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Аmplификацию участков ДНК осуществляли с использованием стандартных наборов для амплификации «ПЦР-Микс. 2.5x реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBRGreenI» на амплификаторе CFX96 Touch «REALTIME» BIORAD, США. Учет результатов проводили с помощью программного обеспечения BioRadCFXManager.

Таблица 2. Последовательности праймеров и TaqMan зондов, температуры отжига и размеры продуктов

Объект (GenBank)	Последовательность	Темп. отжига (°C)	Размер продукта (п.н.)
<i>Lactobacillus spp.</i>	5' tggaaacagrtgctaataccg 3' 5' gtccattgtggaagattccc 3'	62	231
<i>Atopobium vaginae</i> (Y17195.1)	5' cggctctgtaggtcaggagttaaadc 3' 5' ccattctcccctaccagactca 3' 5' ctcaaccctatccgctcctgataccg- 3'	60	88

1. Подготовить и расставить в штативе пробирки с тотальной ДНК, выделенной из культур микроорганизмов, 2.5x реакционную смесь в присутствии SYBRGreenI, mQ, растворы праймеров для разморозки, ресуспендировать на вортексе.

2. Отобрать пинцетом необходимое количество одноразовых стерильных полипропиленовых пробирок объемом 0,2 мл и расставить в штатив соответствующим образом.

3. В подготовленные пробирки внести по 9 мкл mQ, 10 мкл 2.5x реакционной смеси.

4. Добавить в каждую пробирку по 2 мкл растворов праймеров, предварительно разведенных до 2 о.е.

5. В каждую пробирку внести по 3 мкл ДНК исследуемого образца.
6. Пробирки плотно закрыть, перемешать содержимое встряхиванием, затем перенести пробирки в амплификатор и расставить соответствующим образом.
7. На приборе создать эксперимент с параметрами плашки: размер, тип, режим сканирования, флуорофор, название проб; указать объем реакционной смеси в одной пробирке.
8. Запустить программу со следующими параметрами: На начальном этапе проводилась денатурация ДНК при 94°C в течение 1 мин, после чего следовали 30 циклов амплификации, каждый из которых включал стадию денатурации ДНК в течение 30 сек при 94°C, стадию отжига праймеров продолжительностью 30 сек при температуре 55-70°C (в зависимости от длины и нуклеотидной последовательности использованных праймеров) и стадию элонгации в течение 30 сек при температуре 72°C, которая оптимальна для активности Taq-полимеразы. Детекцию флуоресценции проводили на этапе элонгации. На заключительной стадии реакционная смесь выдерживалась при температуре 72°C в течение 2 мин для завершения построения комплементарных цепей фрагментов ДНК и исключения копий, содержащих не полностью достроенные молекулы.

Таблица 3. Режим амплификации

	Температура	Время	Кол-во циклов
Исходная денатурация	94 °C	1 мин	1
Денатурация	94 °C	30 сек	30
Отжиг	59 °C	30 сек	
Элонгация	72 °C	30 сек	
Финальное удлинение	72 °C	2 мин	1

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Выделение чистых культур условно-патогенных микроорганизмов и лактобактерий

Для выделения чистой культуры микроорганизмов был произведен забор биологического материала из влагалища. Затем были приготовлены серийные разведения в чашках Петри из расчета 1:10. Посев производился на ряд питательных сред, позволяющих максимально выявить возможный спектр микроорганизмов. Посевная доза составляла на жидких питательных средах – 0,5-1,0 мл, на плотных – 0,1 мл.

Микроорганизмы были обнаружены в следующих разведениях: *E. coli* в  $10^{-4}$ , *S. aureus* в  $10^{-4}$ , *S. agalactiae* в  $10^{-3} - 10^{-4}$ , *Enterococcus* в  $10^{-3} - 10^{-4}$ , *C. albicans* в  $10^{-4}$ .

Таблица 4. Схема бактериологического исследования

Виды бактерий	Питательные среды	Высеваемые разведения	Время инкубации
<i>Staphylococcus aureus</i>	Желточно - солевой агар Чистовича Молочно - солевой агар	$10^{-1}, 10^{-7}$	2 суток
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Агар с добавлением 5% донорской крови, Агар с добавлением 5% донорской крови и сыворотки крупного рогатого скота	$10^{-1}, 10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-7}, 10^{-9}, 10^{-11}, 10^{-1}, 10^{-7}$	2 суток
<i>Enterococcus faecalis</i>	Энтерококкагар	$10^{-1}, 10^{-5}, 10^{-7}$	1 сутки
<i>Candida albicans</i>	Среда Сабуро	$10^{-1}, 10^{-3}, 10^{-5}$	до 5 суток
<i>Escherichia coli</i>	Среда Эндо	$10^{-1}, 10^{-5}, 10^{-7}$	1 сутки
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Колумбия агар с добавлением 10% донорской крови	$10^{-1}$	



Рисунок 1. Гладкие, выпуклые, мутные колонии *Staphylococcus aureus* на кровяном агаре



Рисунок 2. Выпуклые, непрозрачные, блестящие колонии *Staphylococcus aureus*



Рисунок 3. Колонии *Streptococcus agalactiae* прозрачные или мутноватые, выпуклые, окружены зоной гемолиза



Рисунок 4. Круглые выпуклые колонии *E. coli* малинового цвета на среде Плоскирева



Рисунок 5. Круглые колонии *E. coli* темно – фиолетового цвета с зеленым металлическим блеском на среде Эндо

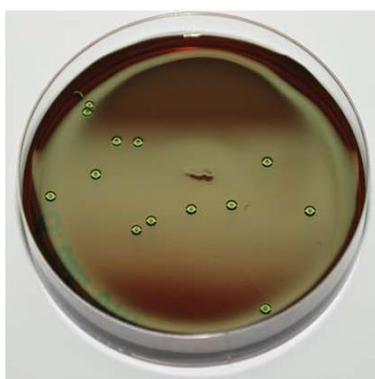


Рисунок 6. Круглые колонии *E. coli* темно – фиолетового цвета с зеленым металлическим блеском на среде Левина



Рисунок 7. Колонии *C. albicans* беловато-кремовые, блестящие на агаре Сабуро



Рисунок 8. Гладкие, выпуклые колонии *C. albicans* белого цвета в виде полусферы с ровным краем. В присутствии теллурита калия колонии приобретают черную окраску



Рисунок 9. *Enterococcus faecalis* - колонии круглые гладкие бордового цвета

### Выделение *Staphylococcus aureus*.

Оптимальная температура для роста 30-37°C. Посев проводят на простые питательные среды, обычно на тиогликолевую среду и КА. Наиболее часто используют молочно-солевой (или молочно-желточно-солевой) агар и солевой агар с маннитом. Кроме того, на молочно-солевом агаре (МСА) хорошо проявляется способность к пигментообразованию и разложению лецитина (лецитовителазная активность). В последнее время широкое распространение в качестве дифференциально-диагностической среды нашёл агар с колистином и налидиксовой кислотой.

Через 18-24 ч *S. aureus* образует гладкие выпуклые мутные колонии диаметром около 4 мм. Бактерии синтезируют жёлтый пигмент, цвет колоний варьирует от белого до оранжевого. На кровяном агаре (КА) колонии *S. aureus* окружены зоной полного гемолиза (рисунок 1). Стафилококки хорошо растут на бульоне, сначала вызывая его равномерное помутнение, а затем образуя рыхлый хлопьевидный осадок. Они дают весьма характерный рост в желатине; через 24-28 ч (наряду с обильным ростом по ходу укола микробиологической иглы) наблюдают начальное разжижение среды, а на 4-5-е сутки образуется открытая вниз воронка, заполненная разжиженной средой.

Использовали питательную среду стафилококкагар. Компонентный состав: панкреатический гидролизат рыбной муки, панкреатический гидролизат казеина, пептон ферментативный, дрожжевой экстракт, натрий хлористый, натрий фосфорнокислый двузамещенный, агар. *S. aureus* вырастает круглыми, выпуклыми, непрозрачными, блестящими колониями с ровными краями краями светло-желтого оттенка колонии диаметром 2,0 – 4,0 мм (рисунок 2).

Выделение *Streptococcus agalactiae*. Колонии, выросшие на КА, через 24 ч после посева прозрачные или мутноватые, выпуклые, диаметром 0,5-1,0 мм, окружены зоной гемолиза (рисунок 3).

### Выделение *Escherichia coli*.

На плотных средах бактерии образуют плоские выпуклые мутные S-колонии с ровными или слегка волнистыми краями (3-5 мм в диаметре) либо сухие плоские R-колонии с неровными краями. В жидких средах растут диффузно, вызывая помутнение среды и образование осадка (реже формируют поверхностную плёнку или пристеночное кольцо).

На средах Хисса кишечная палочка может образовывать газ. На селективно-дифференциальных средах колонии принимают цвет, соответствующий окраске среды. На агаре Эндо лактоза-положительные эшерихии образуют фукс и ново-красные колонии с металлическим блеском, лактоза-отрицательные - бледно-розовые или бесцветные с тёмным центром. На среде Левина бактерии формируют тёмно-синие колонии с металлическим блеском, а лактоза-отрицательные — бесцветные, на среде Плоскирева — соответственно красные с жёлтым оттенком или бесцветные. На КА могут давать полный гемолиз.

Среда Плоскирева предназначена для выделения шигелл и сальмонелл из исследуемого материала и их дифференциации от лактозоферментирующих энтеробактерий. Компонентный состав: панкреатический гидролизат рыбной муки с тиосульфатом и цитратом натрия, лактоза, дрожжевой экстракт, желчь очищенная сухая, натрий фосфорнокислый двузамещенный, натрий хлористый, нейтральный красный, бриллиантовый зеленый, йод кристаллический, агар. *E. coli* вырастает круглыми выпуклыми колониями, малинового цвета, диаметром 1,5 – 2,5 мм (рисунок 4).

Среда Эндо предназначена для выделения энтеробактерий из исследуемого материала и их дифференциации по признаку ферментации лактозы. Компонентный состав: панкреатический гидролизат рыбной муки, дрожжевой экстракт, натрий хлористый, натрий сернистокислый, натрий фосфорнокислый двузамещенный, лактоза, фуксин основной, агар. *E. coli*

вырастает в виде круглых колоний малинового цвета с металлическим блеском, диаметром 2,0 – 3,0 мм (рисунок 5).

Среда Левина предназначена для бактериологических исследований в санитарной и клинической микробиологии с целью выделения и дифференциации патогенных и условно патогенных энтеробактерий. Компонентный состав среды: панкреатический гидролизат рыбной муки, дрожжевой экстракт, лактоза, натрий хлористый, эозин-Н, метиленовый синий, агар. *E. coli* вырастает в виде круглых колоний темно – фиолетового цвета с зеленым металлическим блеском диаметром 1,5 – 2,0 мм (рисунок 6).

#### Выделение *Candida albicans*.

Кандиды хорошо растут как на простых (среды Сабуро и др.), так и на кровяных или сывороточных средах. Оптимальная температура составляет 30-37°C, оптимальный pH — 6,0-6,8. Колонии *C. albicans* на агаре Сабуро беловато-кремовые, блестящие, напоминают капли майонеза (рисунок 7). Отличительными признаками *C. albicans* считают следующие.

- Способность ферментировать глюкозу и мальтозу с образованием кислоты и газа.
- При росте в жидких белковых средах при 37°C через 2-4 ч бластоспоры подавляющего большинства штаммов *C. albicans* образуют особые выросты — ростовые трубки. Штаммы, не образующие их, — авирулентны.
- При культивировании при температуре 22-25°C либо по мере истощения глюкозы в среде (4-7-е сутки) или на «голодных» средах *C. albicans* образует хламидиоспоры.

Использовали среду Сабуро, которая имеет компонентный состав: панкреатический гидролизат рыбной муки, панкреатический гидролизат казеина, дрожжевой экстракт, натрия фосфат однозамещенный, глюкоза, агар. *Candida albicans* вырастает в виде гладких, выпуклых колоний белого цвета в виде полусферы с ровным краем, диаметром 2,0 – 3,0 мм. В

присутствии теллурита калия колонии приобретают черную окраску (рисунок 8).

#### Выделение *Gardnerella vaginalis*.

Температурный оптимум 35-37 °С; оптимум pH 4,0; предпочтительно культивирование при повышенном содержании CO<sub>2</sub>. Гарднереллы прихотливы и требуют наличия в среде витаминов группы В, пуринов и пиримидинов. На средах, содержащих эритроциты человека или кролика, дают альфа- или бета -гемолиз. На твёрдых средах через 24-48 ч образуют мелкие (0,1-0,2 мм) круглые выпуклые гомогенные гладкие бесцветные колонии. На средах с кровью колонии окружены зоной гемолиза, при дальнейшем культивировании среда может приобрести шоколадный цвет. В жидких средах дают равномерное помутнение и осадок. Жизнеспособность бактерий низкая, на твёрдых средах погибают через 24-48 ч; в полужидких средах могут существовать 7 суток и более.

#### Выделение *Enterococcus faecalis*.

Выделение возбудителя обычно не представляет затруднений, так как энтерококки хорошо растут на простых питательных средах (pH 9,6). Через 18-24 ч они образуют сероватые колонии диаметром 0,4-1 мм. На КА энтерококки могут приводить к образованию зоны неполного или полного (редко) гемолиза. Селективно-дифференциальными средами для энтерококков служат Диф-3 и Диф-5. На среде Диф-3, содержащей теллурид калия, энтерококки образуют характерные чёрные колонии, что обусловлено способностью бактерий восстанавливать теллур. Также заслуживает внимания способность бактерий обесцвечивать молоко с лакмусом или метиленовым синим через 4-6 ч при 37 °С.

Использовали питательную среду энтерококкагар. Компонентный состав: панкреатический гидролизат рыбной муки, твин 80, дрожжевой экстракт, глюкоза, калия фосфат однозамещенный, натрий углекислый,

натрия азид, 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид, кристаллический фиолетовый, агар. *Enterococcus faecalis* представляет собой колонии круглые гладкие бордового цвета, блестящие, диаметром не менее 1 мм (рисунок 9).

Выделение лактобактерий *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*.

Чистые культуры лактобактерий *Lactobacillus rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* получили из пробиотиков, наиболее широко используемых для лечения БВ. Штамм *L. crispatus* получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (Московская обл., г. Пущино).

Бактерии требовательны к составу питательных сред и нуждаются во внесении в них аминокислот, витаминов, жирных кислот, углеводов и производных нуклеиновых кислот (индивидуальные для каждого вида). На КА образуют сероватые S-колонии, окружённые зоной гемолиза. Температурный оптимум 30-40°C; оптимум pH 5,5—5,8.

Для хранения чистых культур микроорганизмы пересеяли на скошенную универсальную среду АГВ. Методика посева: правой рукой берут петлю и прожигают ее на пламени горелки докрасна.левой рукой между большим и указательным пальцами держат пробирку с агаром почти в горизонтальном положении, чтобы во время посева в нее не попадали микробы из воздуха. Легким вращательным движением освобождают ватную пробку и мизинцем правой руки, прижимая к ладони, вынимают ее из пробирки. Край пробирки слегка обжигают. Петлей забирают немного материала, содержащего микробов, и зигзагообразными движениями наносят на поверхность агара в пробирке. После произведенного посева петлю извлекают из Пробирки, обжигают ее края и закрывают ватной пробкой. Затем снова прожигают петлю в пламени горелки, чтобы уничтожить оставшихся на ней микробов (рисунок 10).

Штамм *Lactobacillus rhamnosus* при выращивании на поверхности агаризованной среды МФС методом истощающего штриха в термостате при 37°C в течение 18-20 часов образует колонии мелкие, бледно-белые, круглые, выпуклые с ровным краем. При выращивании на жидкой среде МФС или молоке при 37°C в течение 14-16 часов; клетки штамма *Lactobacillus rhamnosus* представляют собой очень мелкие короткие палочки размером ~2 мкм, образуют короткие цепочки. Штамм является факультативным анаэробом, температурный оптимум 37±2°C, растет при 42°C, слабый рост при 15°C. Оптимальное значение pH среды 5,5-6,0.

Штамм *Lactobacillus plantarum* входит в состав препарата Лактобактерин, имеющего показания к применению при заболеваниях женской половой сферы интравагинально. Однако по данным препарат малоэффективен при лечении БВ. При выращивании на поверхности агаризованной среды МФС (pH-6,5) методом истощающего штриха в термостате при 37°C в течение 24-48 часов штамм *Lactobacillus plantarum* образует колонии средние, белые, круглые, выпуклые с ровным краем. При выращивании на жидкой среде МФС (pH-6,5) или молоке при 37°C в течение 24-48 часов клетки штамма *Lactobacillus plantarum* представляют короткие палочки размером ~3 мкм, образуют короткие цепочки. Штамм является факультативным анаэробом, температурный оптимум 37±2°C, растут при 42°C, слабый рост при 30°C. Оптимальное значение pH среды 5,5-6,0.

Штамм *Lactobacillus acidophilus* характеризуется высокими адгезивными свойствами к влажной слизистой оболочке эпителию. При выращивании на поверхности агаризованной среды МФС (pH-6,5) методом истощающего штриха в термостате при 37°C в течение 24-48 часов образует колонии средние, белые, круглые, выпуклые с ровным краем. При выращивании на жидкой среде МФС (pH-6,5) или молоке при 37°C в течение 24-48 часов клетки штамма представляют короткие палочки размером ~3 мкм, цепочек не

образуют. Штамм является факультативным анаэробом, температурный оптимум  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ , растет при  $42^{\circ}\text{C}$ , слабый рост при  $30^{\circ}\text{C}$ . Оптимальное значение pH среды 5,5-6,0.

Штамм *Lactobacillus crispatus*, продуцирующий перекись водорода, либо в составе интравагинальных капсул или суппозиторий предлагается к использованию для коррекции вагинальной микрофлоры. Недостатком штамма *Lactobacillus crispatus* является ограничения по его использованию при пероральном применении, или в составе кисломолочных продуктов функционального питания. При выращивании на поверхности агаризованной среды MFC (pH-6,5) методом истощающего штриха в термостате при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 24-48 часов штамм *Lactobacillus crispatus* образует колонии средние, бледно-белые, круглые, плоские с ровным краем (рисунок 11). При выращивании на жидкой среде MPC (pH-6,5) или молоке при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 24-48 часов клетки штамма *Lactobacillus crispatus* представляют собой средние палочки размером  $\sim 5-6$  мкм. Штамм является факультативным анаэробом, температурный оптимум  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ , растут при  $42^{\circ}\text{C}$ , слабый рост при  $30^{\circ}\text{C}$ . Оптимальное значение pH среды 5,5-6,0.

Штамм *Atopobium vaginae* CCUG 38953 образует мелкие серовато-белые колонии на триптон-соевом агаре (с добавлением 5% овечьей крови, гемина и витамина K, Oxoid) после 2-х дней культивирования при  $37^{\circ}\text{C}$  в анаэробной среде, 80% $\text{N}_2$ , 10% $\text{CO}_2$ , 10% $\text{H}_2$  (рисунок 12).

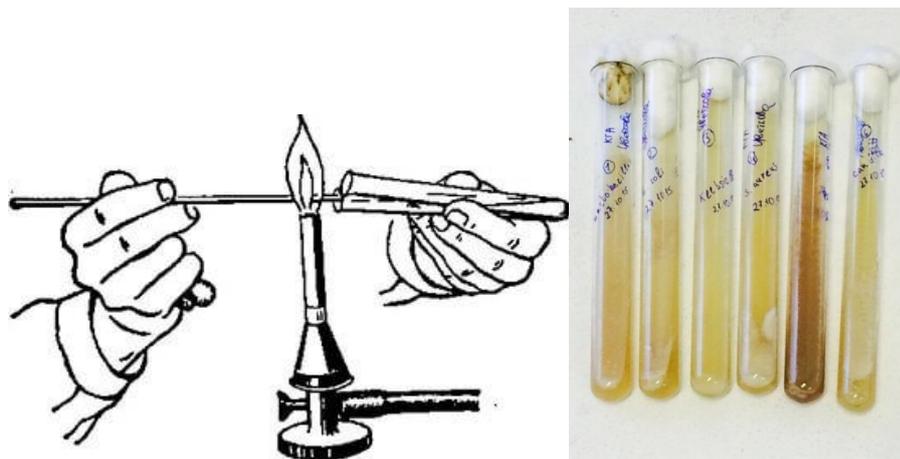


Рисунок 10. Методика посева в пробирку



Рисунок 11. Колонии лактобактерий, круглые, белые

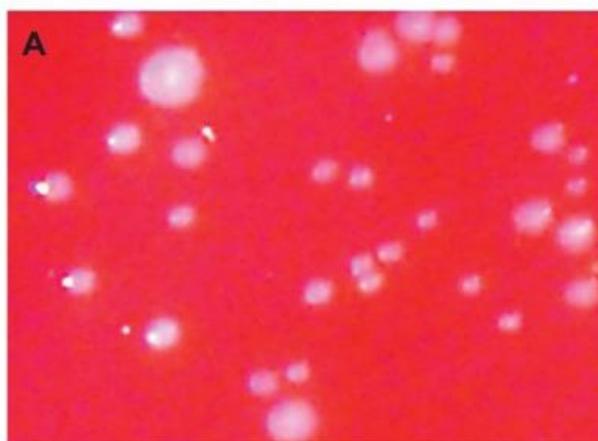


Рисунок 12. Серовато-белые колонии *Atopobium vaginae*  
на триптон-соевом агаре

### 3.2. Микроскопическое исследование выделенных культур микроорганизмов

Для дальнейшей идентификации микроорганизмов проводили окраску по Граму колоний, выросших на питательных средах.

Под микроскопом клетки *Staphylococcus aureus* сферические, диаметром 0,5 – 1,5 мкм, одиночные, в парах и в группах неправильной формы. Грамположительные, неподвижные (рисунок 13).

Клетки *Streptococcus agalactiae* – кокки неправильной округлой формы, располагающиеся в виде цепочек или попарно, размеры 0,5 – 2,0 мкм. Неподвижны, спор не имеют, грамположительные (рисунок 14).

*Enterococcus faecalis* под микроскопом сферические или овоидной формы (0,6 – 2,0 × 0,6 – 2,5 мкм) грамположительные бактерии, располагающиеся парами или короткими цепочками, неспорообразующие (рисунок 15).

Гриб *Candida albicans* представлен овальными дрожжеподобными клетками, хорошо виден мицелий (рисунок 16).

*Escherichia coli* представляет собой прямые палочки, 1,1 – 1,5 × 2,0 – 6,0 мкм, одиночные или в парах, грамотрицательные (рисунок 17).

*Gardnerella vaginalis* – грамвариабельные (грамотрицательные или грамположительные) полиморфные палочки 0,5 × 1,5 – 2,5 мкм), неподвижны, капсул не образуют (рисунок 18).

Лактобактерии (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*) – грамположительные палочки различной длины с закругленными концами, собирающиеся в короткие цепочки (рисунок 19).

*Atopobium vaginae* – небольшие, грамположительные, эллиптические кокки, которые располагаются поотдельности или сгруппированы в пары в виде коротких цепочек (рисунок 20).

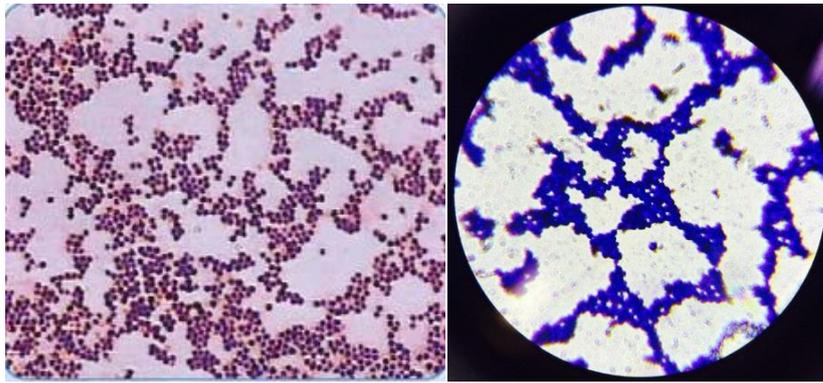


Рисунок 13. *Staphylococcus aureus*. Окраска по Граму. Грамположительные клетки, сферические, одиночные, в парах и группах

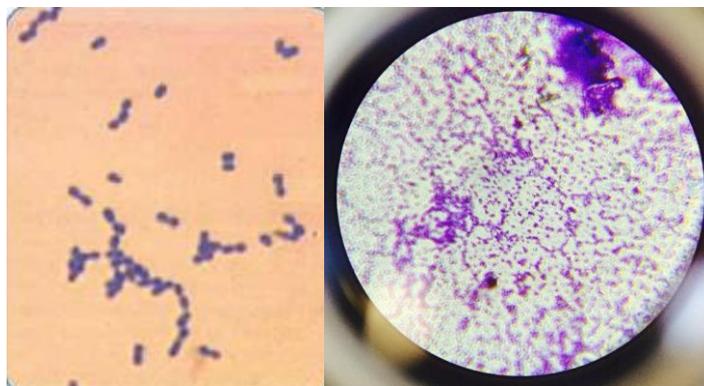


Рисунок 14. *Streptococcus agalactiae*. Окраска по Граму. Кокки неправильной округлой формы, располагающиеся в виде цепочек или попарно

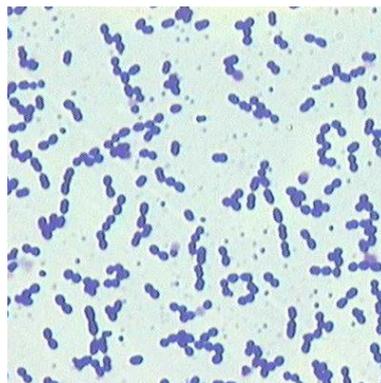


Рисунок 15. *Enterococcus faecalis*. Окраска по Граму. Грамположительные, овоидной формы бактерии, располагающиеся парами или короткими цепочками

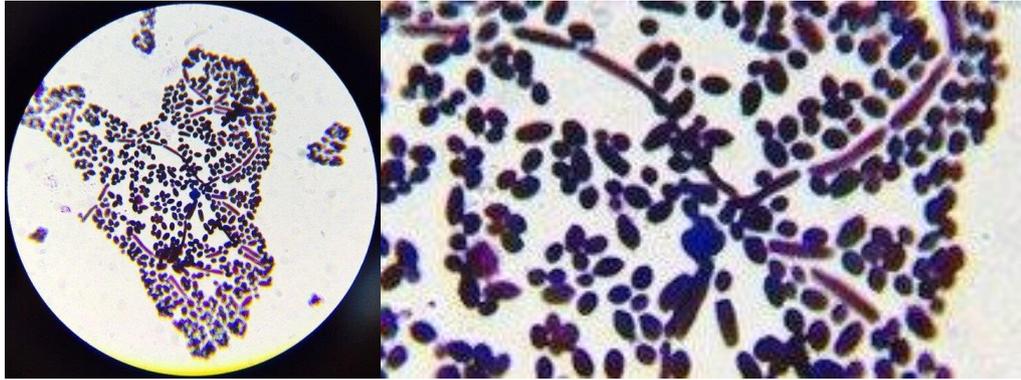


Рисунок 16. *Candida albicans*. Окраска по Граму. Овальные дрожжеподобные клетки, мицелий

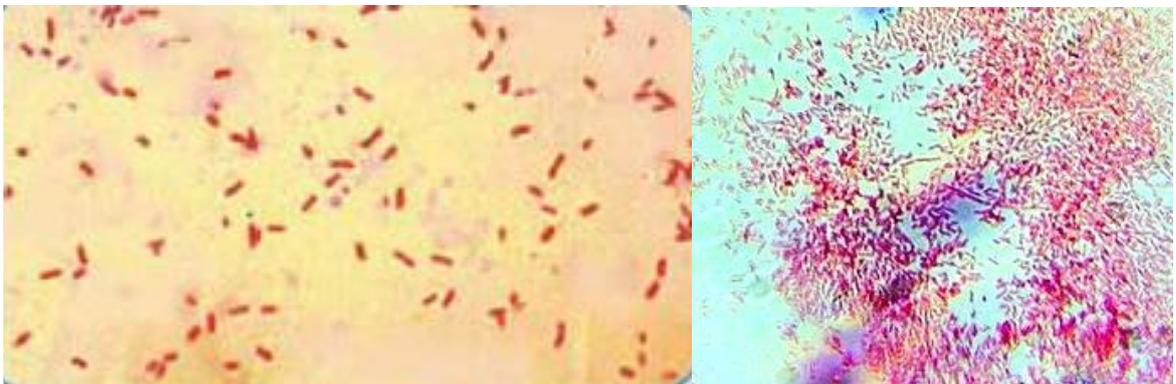


Рисунок 17. *Escherichia coli*. Окраска по Граму. Грамотрицательные палочки, одиночные или в парах

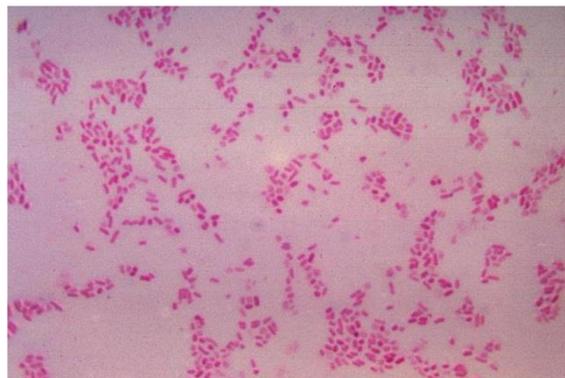


Рисунок 18. *Gardnerella vaginalis*. Окраска по Граму. Грамвариабельные полиморфные палочки



Рисунок 19. Лактобактерии. Окраска по Граму. Грамположительные палочки, собирающиеся в короткие цепочки

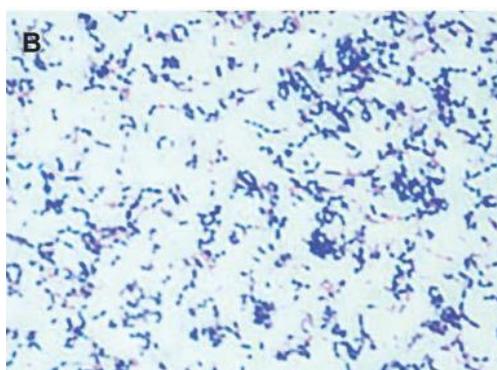


Рисунок 20. *Atopobium vaginae*. Окраска по Граму. Грамположительные кокки, одиночные или в парах в виде коротких цепочек.

### 3.3. Результаты идентификации по биохимическим признакам.

Способность штаммов ферментировать углеводы оценивали в API-тесте в соответствии с инструкцией фирмы производителя (BioMerieux, Франция).

*Lactobacillus plantarum* - штамм усваивает D-Рибозу, D-Галактозу, D-Глюкозу, D-Фруктозу, D-Маннит, D-Сорбит, МетилαD-маннопиранозид, N-Ацетилглюкозамин, Амигдалин, Арбутин, Эскулин железа цитрат. Салицин, D-Целлобиозу, D-Мальтозу, D-Лактозу, D-Мелибиозу, D-Трегалоу, D-Сазарозу, D-Мелицитозу, Гентиобиозу.

*Lactobacillus crispatus* - штамм усваивает D-Глюкозу, D-Фруктозу, D-Сазарозу, Эскулин железа цитрат.

*Lactobacillus acidophilus* –штамм усваивает D-Рибозу, D-Галактозу, D-Глюкозу, D-Фруктозу, D-Мальтозу, D-Лактозу, D-Мелибиозу, D-Сахарозу, D-Трегалозу, D-Раффинозу

*Lactobacillus rhamnosus* - штамм усваивает D-Рибозу, D-Галактозу, D-Глюкозу, D-Фруктозу, D-Маннозу, L-Сорбозу, D-Маннит, N-Ацетилглюкозамин, Амигдалин, Арбутин, Эскулин железа цитрат, Салицин, D-Целлобиозу, D-Мальтозу, D-Лактозу, D-Мелицитозу, D-Туранозу, L-Рамнозу, D-Сорбит.

Таблица 5. Биохимические свойства *Staphylococcus aureus*

Образование кислоты (в аэробных условиях) из:	Цитохром с (тест на оксидазу)	-	D – маннитола	+
	D – ксилозы	-	D – маннозы	+
	L - арабинозы	-	D – трегалозы	+
	D – целлобиозы	-	$\alpha$ – лактозы	+
	D – фукозы	-	D – галактозы	+
	рафинозы	-	$\beta$ – D-фруктозы	+
	салицина	-	D – мелецитозы	-
	сахарозы	+	D – туранозы	+
	мальтозы	+	D – рибозы	+
ксилитола	-	Гиалуронидаза	+	

Таблица 6. Биохимические свойства *Enterococcus faecalis*

Рост в присутствии	Подвижность	+	Каталазная активность	-
	6,5 % NaCl	+	Основной продукт сбраживания углеводов	лактат
	40 % желчи	+		

Таблица 7. Биохимические свойства *Gardnerella vaginalis*

Основной продукт сбраживания сахаров	Кислота из D – глюкозы	+	Оксидаза	-
	этанол	-	Каталаза	-
	молочная кислота	-	Восстановление $\text{NO}_3^-$ до $\text{NO}_2^-$	-
	уксусная кислота	+	Образование индола	-

Таблица 8. Биохимические свойства *Streptococcus agalactiae*

	Альфа-гемолиз	-
	Бета-гемолиз	+
Гидролиз	аргинина	+
	гиппурата	+
	эскулина	-
Образование кислот из:	инулина	-
	лактозы	-
	маннитола	-
	рафинозы	-
	рибозы	+
	салицина	-
	сорбитола	-
	трегалозы	+
	Реакция Фогеса – Проскауэра	+

Таблица 9. Биохимические свойства *Escherichia coli*

Образование кислот из:	D – адонитола	-	мелибиозы	+
	L – арабинозы	+	$\alpha$ -метил-D-глюкозидаза	-
	глицерола	-	L – рамнозы	+
	дульцитола	-	раффинозы	+
	мио-инозитола	-	салицина	+
	D – ксилозы	+	сахарозы	+
	лактозы	+	D – сорбитола	+
	мальтозы	+	трегалозы	+
	D – маннитола	+	целлобиозы	-
	D – маннозы	+	мукага	+
		Оксидаза	-	Аргининдигидролаза
Образование индола		+	Орнитиндекарбоксилаза	-
Проба с метиловым красным		+	Подвижность	-
Реакция Фогеса – Проскауэра		-	Гидролиз желатины	+
Цитрат (среда Симмонса)		-	Рост в присутствии KCN	-
Образование H <sub>2</sub> S		-	Использование малоната	-
Гидролиз мочевины		-	Образование кислоты из D – глюкозы	+
Фенилаланиндезаминаза		-	Образование газа из D – глюкозы	+
Лизиндекарбоксилаза		-		

### 3.4. Оценка антагонистической активности лактобактерий.

Антагонистическую активность штаммов лактобактерий определяли методом отсроченного антагонизма путем посева перпендикулярных штрихов тест - культур микроорганизмов (рисунок 21). Нечувствительные к пробиотику тест-организмы растут вблизи штриха лактобактерий. Если пробиотик оказывает действие на тест-организм, то рост последнего будет наблюдаться вдали от штриха лактобактерий. Величина зоны отсутствия роста (в мм) указывает на степень активности данного штамма лактобактерий в отношении индикаторных штаммов. Чем больше это расстояние, тем более чувствителен тест-организм к нему.

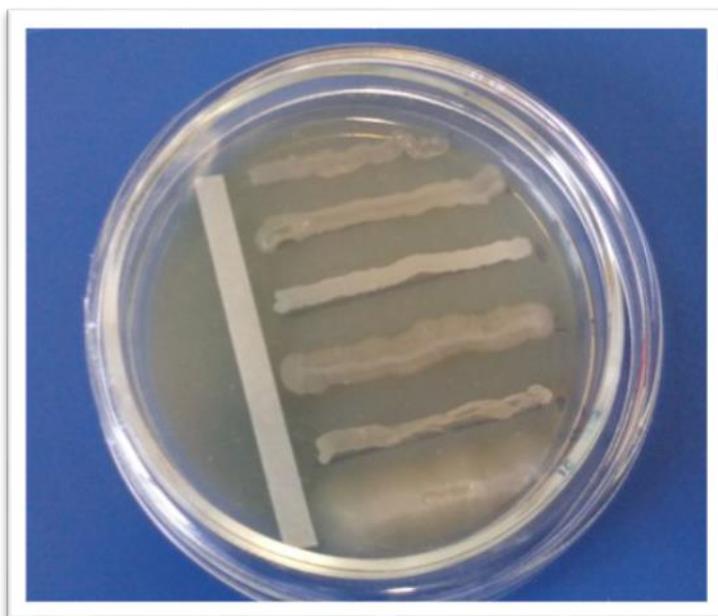


Рисунок 21. Посев перпендикулярных штрихов условно патогенных микроорганизмов на чашке Петри

Проведен сравнительный анализ антагонистической активности штаммов лактобактерий: *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus acidophilus* к спектру условно-патогенных изолятов *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida*

*albicans*, *Gardnerella vaginalis*, выделенных из клинического материала влагалища.

Результаты проведенных исследований приведены в таблице \_.

Таблица 10. Антагонистическая активность отдельных видов лактобактерий по отношению к условно-патогенным бактериям

	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	Зоны задержки роста, мм (M±m)			
<i>Staphylococcus aureus</i>	5,7±0,3	4,8±0,3	5,9±0,4	12,5±1,1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	7,4±1,8	7,0±0,9	6,9±1,2	нет подавления
<i>Enterococcus faecalis</i>	5,6±0,7	4,7±0,4	4,3±0,2	7,0±0,9
<i>Escherichia coli</i>	6,4±0,5	5,3±0,2	4,2±0,3	9,8±0,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9,7±1,3	7,5±0,8	8,2±0,9	нет подавления
<i>Candida albicans</i>	6,0±0,7	5,0±1,2	4,0±0,5	нет подавления
<i>Gardnerella vaginalis</i>	10,1±1,2	9,3±0,9	8,2±0,5	8,2±0,6

Данные таблицы \_ показывают, что по сравнительной оценке величины зоны отсутствия роста, указывающей на степень антагонистической активности лактобактерий в отношении индикаторных штаммов, культуры *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* подавляли рост всех исследуемых условно-патогенных микроорганизмов,

тогда как *Lactobacillus plantarum* не проявлял антагонистической активности по отношению к *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*. Хотя *Lactobacillus plantarum* подавляет рост *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* и *Escherichia coli* активнее по сравнению с другими штаммами, ограниченный спектр его действия представляется его существенным недостатком.

*Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus acidophilus* обладают широким спектром действия, однако уровень их антагонистической активности отличается. *Lactobacillus crispatus* проявляет более выраженную антагонистическую активность (широкий спектр и уровень), чем *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus acidophilus*.

### **3.5. Исследование адгезии лактобактерий и УПМ к клеткам Hela.**

Адгезивность пробиотических бактерий рассматривается как положительный признак, позволяющий обеспечить защиту макроорганизма от патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Пробиотические лактобациллы, предназначенные для профилактики и лечения урогенитальных инфекций, должны обладать адгезивностью к эпителию урогенитального тракта. Условно-патогенные микроорганизмы, особенно *Atopobium vaginae*, также способны к образованию микробной биопленки, в толще которой они защищены от антибиотиков и кислой среды и могут сохранять жизнеспособность даже после лечения (несмотря на клиническое выздоровление). Контролировать образование биопленки возможно с использованием культур клеток.

Культуры клеток Hela выращивают в среде ДМЕМ с 10% фетальной сыворотки +1% пенициллин-стрептомицин +0,2 мМ Нерес +2 мМ L-глутамин при 37°C в CO<sub>2</sub>- инкубаторе. Клетки в концентрации 3,0×10<sup>5</sup> л/мл высевают на 6-луночные плейты в объеме 2,0 мл на лунку и культивируют 24 часа. По достижении 70-80% монослоя, клетки 3-кратно промывают средой ДМЕМ

без сыворотки и затем к ним добавляют среду ДМЕМ с L-глутамином. Перед добавлением бактерий к клеткам Hela (18 часовая культура на средеMPC) их дважды промывают PBS pH 7,2, используя центрифугирование при 5000 об/мин в течение 15 минут, и ресуспендируют в среде ДМЕМ с L-глутамином. Концентрацию бактерий для определения соотношения бактерия/соматическая клетка регулируют по оптической плотности (OD $\lambda$ =590 нм) и контролируют высевом на соответствующие твердые среды. Множественность инфицирования (MOI) составляет 50 и 100 бактерий/клетка. Клетки Hela с внесенными к ним лактобациллами инкубируют еще 5 часов при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. После инкубации клетки промывают 3-кратно PBS pH 7,2, затем фиксируют в холодном этаноле (3 мин) и окрашивают красителем Романовского-Гимза в течение 30 мин. Далее пленки промывают дистиллированной водой, высушивают при комнатной температуре и исследуют микроскопически.

Осуществляют подсчет количества клеток Hela с прикрепившимися бактериями (процент адгезии) и количество бактерий, прикрепившихся к одной клетке (индекс адгезии).

Как видно из таблицы, все штаммы обладают выраженной адгезией к клеткам Hela и образуют биопленку на поверхности эпителиальных клеток.

Таблица 11. Адгезия штаммов лактобактерий и УПМ к монослою клеток Hela

Штамм	Процент адгезии	Индекс адгезии
<i>Lactobacillus crispatus</i>	100±0	38±6
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	95±2	26±4
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	87±3	16±5
<i>Lactobacillus plantarum</i>	83±5	12±7
<i>Atopobium vaginae</i>	90±3	22±2

### **3.6. Оценка активности лактобактерий в отношении *Atopobium vaginae* на клеточных культурах по способности пробиотиков разрушать биопленку и адгезироваться на поверхности**

Главная цель терапии – это не избавление от патогена (что в случае БВ затруднительно в принципе), а восстановление нормоценоза.

Важно понимать, что каждый организм в природе существует по биологическим законам. Борьба за «место под солнцем» проходит в условиях жестокой конкуренции, которая, в свою очередь, подчинена закону конкурентного исключения: два вида не могут занимать одну и ту же экологическую нишу. Фактически эпителий влагалища и есть та самая экологическая ниша для миллионов микроорганизмов. Во влагалище происходит конкуренция между лактобактериями и посторонними микроорганизмами за гликоген – питательный субстрат для бактерий. Эффективным пробиотик будет только при использовании жизне- и конкурентоспособных лактобактерий, активно продуцирующие молочную кислоту и  $H_2O_2$ , способные к стойкой колонизации влагалища, тем самым создавая неблагоприятные условия для БВ-ассоциированных микроорганизмов.

Пробиотик должен уничтожать биопленку, образованную условно патогенными микроорганизмами, и затем, сохранив свою жизнеспособность, образовать биопленку из лактобактерий, для их дальнейшего размножения и защиты эпителия от патогенных бактерий.

Поэтому необходимо воссоздать идентичные условия размножения и развития бактерий до состояния биопленки.

В ходе исследования приведен следующий эксперимент.

Приготовили три чашки с монослоем культур клеток Hela и суточные бактериальные суспензии *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* и *Atopobium vaginae*. Каждый день клетки проверяли под микроскопом на образование биопленки и проводили забор материала в объеме 100 мкл для проведения анализа

методом ПЦР в режиме реального времени. По изменению значения порогового цикла (концентрации ДНК) судили об изменении концентрации микроорганизма в чашке.

В первый день были засеяны две чашки Петри с культурами клеток бактериальной суспензией *Atopobium vaginae*: опыт и контроль.

На третий день проверяли опыт и контроль. В обеих чашках бактерии образовывали биопленку и их концентрация увеличилась. На чашку с опытом к культуре *Atopobium vaginae* была засеяна культура лактобактерии. Также была сделана ещё одна контрольная чашка, на которую заселяли лактобактерии.

На пятый день в контрольной чашке с *Atopobium vaginae* наблюдалась биопленка и бактерии продолжали размножаться. В контрольной чашке с лактобактериями биопленка наблюдалась и концентрация микроорганизмов увеличилась. В чашке с опытом рост *Atopobium vaginae* происходил заметно медленнее по сравнению с контролем, что, возможно, было связано с воздействием кислоты выделяемой лактобактериями. Лактобактерии также медленнее размножались по сравнению с контролем, что было связано с малой доступностью питательных веществ.

На седьмой день рост *Atopobium vaginae* приостановился, так как пороговый цикл остался на том же уровне. Продолжался активный рост лактобактерий.

На девятый день биопленка не наблюдалась. Лактобактерии разрушили биопленку из *Atopobium vaginae*. И после этого лактобактерии более активно размножались, скорость была сопоставима с контролем.

На 12-15 день опыта: пороговый цикл *Atopobium vaginae* оставался на том же уровне, значит микроорганизм не размножался. Лактобактерии активно размножались и частично образовывали собственную биопленку.

Таблица 12. Результаты значений порогового цикла

	1	2		3
	Контроль	Опыт		Контроль
День	<i>Atopobium vaginae</i>	<i>Atopobium vaginae</i>	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus crispatus</i>
1	30 ± 0,7	30 ± 0,5		
3	25 ± 0,9 БП «-»	25 ± 0,8 БП «-»	30 ± 0,1	30 ± 0,7
5	20 ± 0,3 БП «-»	23 ± 0,3 БП «-»	28 ± 0,2	25 ± 0,6 БП «+»
7	15 ± 0,8 БП «-»	20 ± 0,5 БП «-»	25 ± 0,3	20 ± 0,5 БП «+»
9	13 ± 0,4 БП «-»	17 ± 0,9	20 ± 0,3	15 ± 0,9 БП «+»
11	12 ± 0,2 БП «-»	16 ± 0,7	15 ± 0,8	13 ± 1,1 БП «+»
13	11 ± 0,7 БП «-»	16 ± 0,6	11 ± 0,2 БП «+»	12 ± 0,7 БП «+»
15	10 ± 0,4 БП «-»	16 ± 0,8	7 ± 0,4 БП «+»	11 ± 0,4 БП «+»

Примечание: БП «-» - биопленка образована *Atopobium vaginae*,  
БП «+» - биопленка образована *Lactobacillus crispatus*

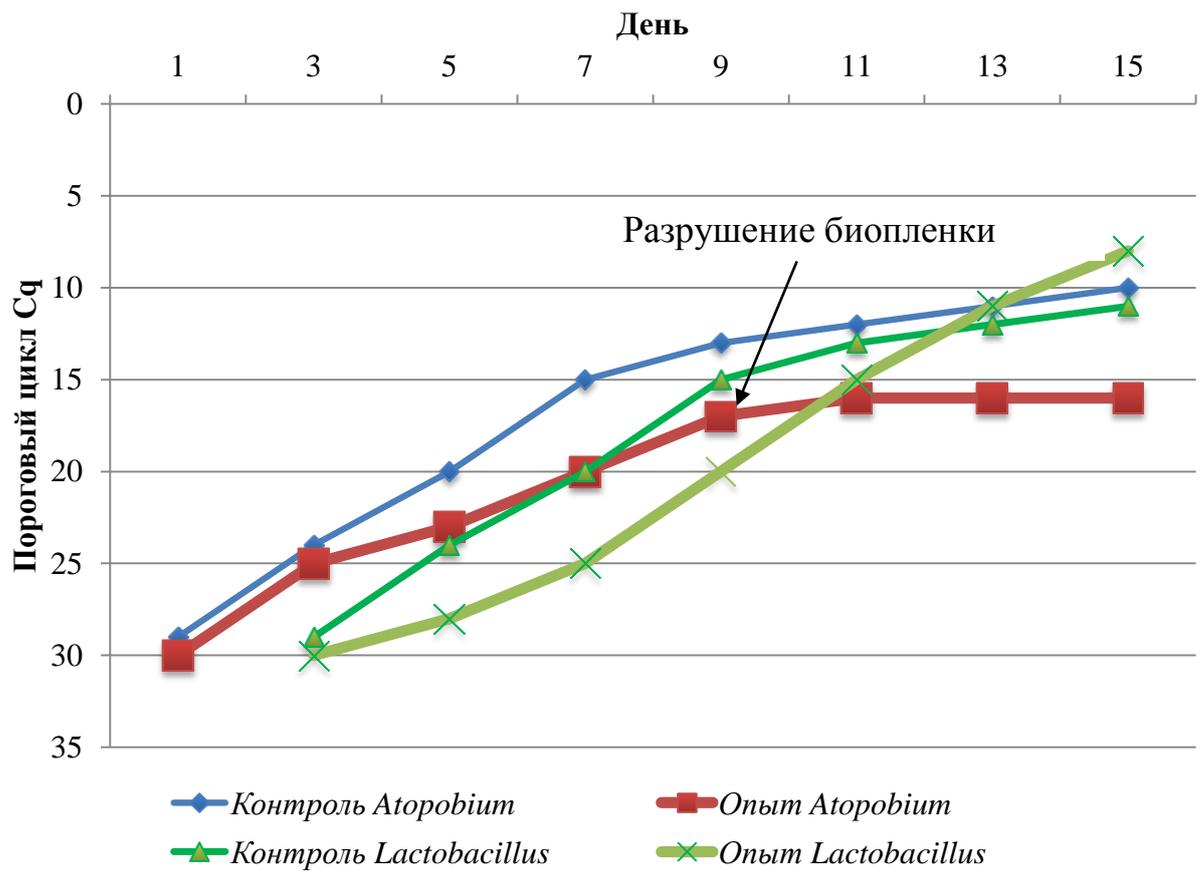


Рисунок 22. График результатов ПЦР анализа

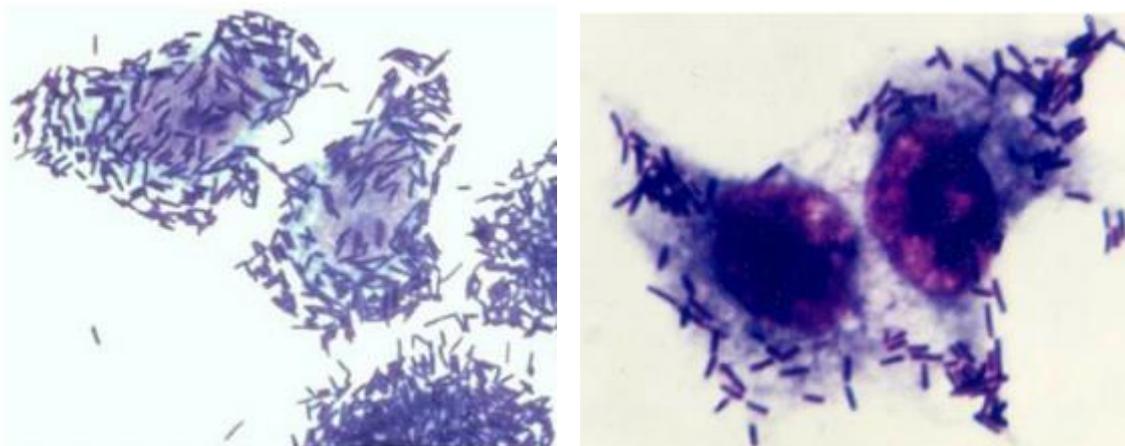


Рисунок 23. Адгезированные на клетки HeLa бактерии

*Lactobacillus crispatus* и *Atorobium vaginae*

Таблица 13. Оценка активности лактобактерий в отношении *Atopobium vaginae* на клеточных культурах по способности пробиотиков разрушать биопленку и адгезироваться на поверхности

Штамм	Способность разрушать биопленку	Способность адгезироваться на поверхности
<i>Lactobacillus crispatus</i>	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	–
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	±	–
<i>Lactobacillus plantarum</i>	±	–

Таким образом, клетки *Lactobacillus crispatus* через две недели не только подавили рост *Atopobium vaginae* и разрушили биопленку, но и смогли создать свою собственную.

Культура *Lactobacillus acidophilus* разрушила биопленку только через две недели, при этом свою биопленку не образовывала.

Штаммы *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus plantarum* не разрушали полностью биопленку, не размножались и не образовывали свою биопленку.

Результаты исследований свидетельствуют о перспективности использования штамма *Lactobacillus crispatus* для создания нового пробиотика с повышенной антагонистической активностью с целью профилактики и лечения бактериального вагиноза.

## ВЫВОДЫ

1. Выделены чистые культуры штаммов бактерий – пробиотиков рода *Lactobacillus*, наиболее часто использующихся для лечения БВ. Получены штаммы условно-патогенных микроорганизмов влагалища родов *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Echerichia*, *Pseudomonas*, *Candida*, *Gardnerella*.

2. Проведена оценка активности пробиотических бактерий в отношении условно-патогенных микроорганизмов. Методом отсроченного антагонизма показано, что культуры *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* подавляют рост условно-патогенных микроорганизмов родов *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Echerichia*, *Pseudomonas*, *Candida*, *Gardnerella*, при этом *Lactobacillus crispatus* проявляет более выраженную антагонистическую активность.

3. Определена способность лакто- и условно-патогенных анаэробных бактерий образовывать биопленку. На клеточных культурах Hela показано, что культуры *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus plantarum* не способны разрушать биопленку, *Lactobacillus acidophilus* разрушила биопленку за две недели, тогда как *Lactobacillus crispatus* не только разрушила биопленку анаэробных микроорганизмов, но и образовала свою собственную.

4. Результаты исследований свидетельствуют о перспективности использования штамма *Lactobacillus crispatus* для создания нового пробиотика с повышенной антагонистической активностью с целью профилактики и лечения бактериального вагиноза.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамов В.М. 2014 Пробиотические штаммы *Lactobacillus* и их консорциум для профилактики и лечения урогенитальных инфекционных заболеваний у женщин.
2. Андреева И.В. Доказательное обоснование применения пробиотиков для лечения и профилактики заболеваний ЖКТ. Медицинский совет 2007; 3: 20—21.
3. Аникиев В. В., Лукомская К. А. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – М.: «Просвещение», 1977, 127с.
4. Анкирская А.С. Акушерство и гинекология, 2005, №3.
5. Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х., Мавзютов А.Р. Филогенетическая систематика прокариот: Методические рекомендации для студентов, обучающихся по специальности Микробиология. – Уфа. 2011. 19 с.
6. Березовская 2013 Биопленки при БВ (АГР).
7. Булыгина В.С., Колганова Т.В., Сухачева М.В. и др. Выделение ДНК из различных пищевых продуктов с помощью модифицированного щелочного метода. Биотехнология. №2, с.83-90, 2009.
8. Глушанова Н. А., Вербицкая Н. Б., Петров Л. Н., Блинов А. И., Шендеров Б. А. Исследование ауто-, изо - и гомоантагонизма пробиотических штаммов лактобацилл. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН, 2005. - №6 (44). – С.138-142.
9. Ермоленко Е.И., Исаков В.А., Ждан-Пушкина С.Х., Тец В.В. Количественная оценка антагонистической активности лактобацилл. // Журн. микробиол., эпидем., иммунобиол. - 2004. - 5. - С.94-98.
10. Иркитова А. Н., Каган Я. Р., Сергеева И. Я. Свойства, экологические аспекты и практическое значение ацидофильной палочки. 3. Антагонистическая активность. Сб. науч. тр. СибНИИС СО РАСХН, в.8,

«Актуальные проблемы техники и технологии переработки молока», Барнаул, 2011, С. 216-222.

11. Кира Е.Ф. Бактериальный вагиноз. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство». 2012. 472 с.

12. Кира 2010 Роль пробиотиков в лечении инфекций влагалища

13. Кулаков В.И., Савельева Г.М., Манухин И.Б. Гинекология. Национальное руководство. – ГЭОТАР-Медиа. 2009. 1116 с.

14. Лаврова Л.В., Левочкина Л.Н., Копейкина Е.А., Шеманаева Т.В. Бактериальный вагиноз: сравнительная оценка эффективности локальной антибактериальной терапии. Гинекология. 2011; 3: 41-43.

15. Ленцнер А.А., Ленцнер Х.П. Защитная функция лактофлоры влагалища и возможности ее усиления. Тез. докл. «Дисбактериозы и эубиотики». М 1996; 22.

16. Лобанов В.В. Роль липополисахарида при воздействии комплемента на грамотрицательные бактерии. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2004; 5:114-118.

17. Маклецова 2013 (с 48) Современные представления о биоплёночной жизни бактерий и борьбе с антибиотикорезистентностью.

18. Мавзютов А.Р., Габидуллин З.Г., Ахунов Э.Д., Туйгунов М.М. Бактериальный вагиноз — принципиальные вопросы этиологии, диагностики и лечения: метод, рекомендации — Уфа, - 2001. 16 с.

19. Мавзютов А.Р., Туйгунов М.М., Габидуллин З.Г., Гашимова Д.Т., Булгаков А.К., Абдрахманов А.М., Хомякова Т.Р., Хасанова С.Г. Способ дифференцирования грамположительных и грамотрицательных бактерий и простейших рода *Trichomonas*. Патент РФ №2179580 от 20.02.02.

20. Микробная экология влагалища. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2002; 6: 91-99.

21. Плахова К.И. Особенности терапии бактериального вагиноза, ассоциированного с *Atopobiumvaginae*, и характеристика выделений из

влагалища с использованием ДНК-чипов (клинико-лабораторное исследование). Автореф. дис. канд. мед. наук. М. 2007; 19 с.

22. Практикум по микробиологии под редакцией А. И. Нетрусова. – М.: «АКАДЕМА», 2005, 603 с.

23. Ребриков Д.В., Саматов Г.А. ПЦР в реальном времени. Молекулярные исследования в диагностике инфекционных заболеваний. – М.: Бином, 2009. – с. 715-855.

24. Сафронова М.М., Гренкова Ю.М. Нарушение влагалищного микробиоценоза: современные методы коррекции. 2009. Клиническая дерматология и венерология №6.

25. Тихомиров А.Л., Сарсания С.И. Современные особенности бактериального вагиноза так ли все просто? Школа клинициста. 2010; 31: С. 536

26. Тец В.В. Бактериальные сообщества. В кн.: Клеточные сообщества. СПб. 1998; 15-73.

27. Фирсов Н. Н. Краткий словарь микробиологических терминов. – Екатеринбург: Издательство Уральского университета, 185 с.

28. Черкасов, С.В. Ассоциативный симбиоз как биологическая основа колонизационной резистентности хозяина (на модели женского репродуктивного тракта): автореф. дис. ... докт. мед. наук : 03.00.07 / Черкасов Сергей Викторович. – Оренбург, 2011.

29. Antonio M., Hawes S., Hillier S. The identification of vaginal lactobacillus species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. J. Infect. Dis., 1999, 180, p.1950-1956.

30. Amsel R., Totten P.A., Spiegel C.A., Chen K.S. et al. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic association. – Am J Med. 1983, 74. p.14–22.

31. Burton J.P., Reid G. Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nugent score) and molecular (polymerase chain

reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. *J Infect Dis.* 2002. 186: 1770–1780.

32. Burton J.P., Devillard E., Cadieux P.A., Hammond J.A., Reid G. Detection of *Atopobium vaginae* in postmenopausal women by cultivation-independent methods warrants further investigation. *J Clin Microbiol.* 2004. 42: 1829–1831.

33. Backer E., Verhelst R., Verstraelen H., et al. Antibiotic susceptibility of *Atopobiumvaginae*. *J BMC Infect Dis* 2006; 51:1-6.

34. Bradshaw C.S., Tabrizi S.N., Fairley C.K., et al. The association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerellavaginalis* with bacterial vaginosis and recurrence after oral metro-nidazole therapy. *J Infect Dis* 2006; 194:828-36.

35. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-22.

36. Chernes T.L., Meyn L.A., Krohn M.A., Lurie J.G., Hillier S.L. Association between acquisition of herpes simplex virus type 2 in women and bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis* 2003. 37:319–25.

37. Czaja C., Stapleton A., Yarov-Yarovaya Y. et al. Phase I trial of a lactobacillus crispatus vaginal suppository for prevention of recurrent urinary tract infection in women. Hindawi publishing corp. *Infect. Dis. In Obstetr/And Gynec.* Vol.2007, Art. ID 35387, 8 pages doi:10.1155/2007/35387/

38. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2003; 2: 114-22.

39. Datcu R. Characterization of the vaginal microflora in health and disease. *Dan Med J.* 2014. Apr;61(4):B4830.

40. De Backer E., Dubreuil L., Brauman M., Acar J., Vaneechoutte M. In vitro activity of secnidazole against *Atopobium vaginae*, an anaerobic pathogen involved in bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Infect* 2010.16:470–2.

41. Devillard E., Burton J.P., Hammond J.A., Lam D., Reid G. Novelinsight into the vaginal microflora in postmenopausal women under hormone

replacement therapy as analyzed by PCRdenaturing gradient gel electrophoresis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2004. 117: 76–81.

42. DiGiulio D.B., Romero R., Kusanovic J.P., Gomez R., Kim C.J., Seok K.S., et al. Prevalence and diversity of microbes in the amniotic fluid, the fetal inflammatory response, and pregnancy outcome in women with preterm pre-labor rupture of membranes. Am J Reprod Immunol 2010. 64:38–57.

43. Doerflinger S.Y., Throop A.L., Herbst-Kralovetz M.M. Bacteria in the Vaginal Microbiome Alter the Innate Immune Response and Barrier Properties of the Human Vaginal Epithelia in a Species-Specific Manner. J Infect Dis. 2014. Feb 12.

44. Eckert L.O. Acute vulvovaginitis. N. Engl. J. Med. 2006. 355:1244 – 1252.

45. Eschenlauer S.C., McKain N., Walker N. D., McEwan N. R., Newbold C. J., and Wallace R. J. Ammonia production by ruminal microorganisms and enumeration, isolation, and characterization of bacteria capable of growth on peptides and amino acids from the sheep rumen. Appl. Environ. Microbiol. 2002.68:4925–4931.

46. Eribe ER, Paster BJ, Caugant DA, Dewhirst FE, Stromberg VK, Lacy GH, Olsen I. Genetic diversity of *Leptotrichia* and description of *Leptotrichia goodfellowii* sp. nov., *Leptotrichia hofstadii* sp. nov., *Leptotrichia shahii* sp. nov. and *Leptotrichia wadei* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2004;54(Pt 2):583–592.

47. Farage M., Miller K., Sober J. Dynamics of the vaginal ecosystem - Hormonal influences. Infect. Diseases: Research and Treatment, 2010, 3, 1-15.

48. Ferris M.J., Maszta A., Aldridge K.E., Fortenberry J.D., Fidel P.L. Jr, Martin D.H. Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis. BMC Infect Dis. 2004. 4: 5.

49. Ferris M.J., Maszta A., Martin D.H. Use of species-directed 16S rRNA gene PCR primers for detection of *Atopobium vaginae* in patients with bacterial vaginosis. J Clin Microbiol. 2004. 42: 5892–5894 (2).

50. Forestier, C. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties / C. Forestier, C. De Champs, C. Vatoux, B. Joly // *Res. Microbiol.* - 2001. - № 152. - P. 167 - 173.
51. Geidorfer W., Bohmer C., Pelz K., Schoerner C., Frobenius W., and Bogdan C. Tuboovarian abscess caused by *Atopobium vaginae* following transvaginal oocyte recovery. *J. Clin. Microbiol.* 2003.41:2788–2790.
52. Gardiner G., Heinemann-Gijzen C., Madrenas J. et al. Oral administration of the probiotic combination *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. reuteri* RC-14 for human intestinal applications. *Int Dairy J* 2002; 12:2/3: 191-196.
53. Han Y.W., Shen T., Chung P., Buhimschi I.A., Buhimschi C.S. Uncultivated bacteria as etiologic agents of intra-amniotic inflammation leading to preterm birth. *J ClinMicrobiol.* 2009 Jan. 47(1):38-47.
54. Hillier S.L., Kiviat N.B., Hawes S.E., et al. Role of bacterial vaginosis-associated microorganisms in endometritis. *Am J ObstetGynecol* 1996. 175:435-41.
55. Hillier S. Normal vaginal flora. In: Holmes K., Sparling P., Stamm V. et al. editors. *Sexually transmitted diseases*. 4th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2008, p.289-307.
56. Hütt, P. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens / P. Hütt, J. Shchepetova, K. Lõivukene, T. Kullisaar, M. Mikelsaar // *J Appl Microbiol.* - 2006. - № 100 (6). - P. 1324 - 32.
57. Kaul R., Nagelkerke N.J., Kimani J., Ngugi E., Bwayo J.J., Macdonald K.S., et al. Prevalent herpes simplex virus type 2 infection is associated with altered vaginal flora and an increased susceptibility to multiple sexually transmitted infections. *J Infect Dis* 2007. 196: 1692–7.
58. Kazor C.E., Mitchell P.M., Lee A.M., Stokes L.N., Loesche W.J., Dewhirst F.E., et al. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J ClinMicrobiol*2003. 41:558–63.

59. Klebanoff M.A., Schwebke J.R., Zhang J., Nansel T.R., Yu K.F., Andrews W.W. Vulvovaginal symptoms in women with bacterial vaginosis. *ObstetGynecol* 2004. 104:267-72.
60. Lamont R.F., Sobel J.D., Akins R.A., Hassan S.S., Chaiworapongsa T., Kusanovic J.P., Romero R. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2011. p. 533-549
61. Lee, J. Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated *Lactobacillus* spp.: immune modulation and longevity / J. Lee, H.S. Yun, K.W. Cho, S. Oh // *Int J Food Microbiol.* - 2011. - № 148 (2). - P. 80 - 6.
62. Lemon, and W. A. Stamm (ed.), *Sexually transmitted diseases*, 2nd ed. McGraw-Hill, New York, NY. 1990. p. 585.
63. Livengood C.H. Bacterial vaginosis: an overview for 2009. *Rev Obstet Gynecol*. 2009. 2:28–37.
64. Martin H.L., Richardson B.A., Nyange P.M., Lavreys L., Hillier S.L., Chohan B., et al. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J Infect Dis* 1999. 180:1863–8.
65. Martin R., Suarez J. Biosynthesis and Degradation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by Vaginal Lactobacilli. 2010. *Appl. Environ. Microbiol.* vol.76 №2 p.400-405.
66. McLean N.W., McGroarty J.A. Growth inhibition of metronidazole-susceptible and metronidazole-resistant strains of *Gardnerella vaginalis* by Lactobacilli in vitro. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 3: 1089—1092.
67. Meng-Rui Lee, Yu-Tsung Huang, Chun-Hsing Liao, Tzu-Yi Chuang, Wei-Jie Wang, Shih-Wei Lee, Li-Na Lee, and Po-Ren Hsueh. Clinical and Microbiological Characteristics of Bacteremia Caused by *Eggerthella*, *Paraeggerthella*, and *Eubacterium* Species at a University Hospital in Taiwan from 2001 to 2010. *Journal of Clinical Microbiology*. June 2012. Volume 50. Number 6. p. 2053–2055.

68. O'Toole G.A., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Ann. Rev. Microbiol.* 2000; 54: 49-79.
69. Pavlova S., Kilic A., Kilic S., et al. Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *J. Appl. Microbiol.*, 2002, 92, p.451-459.
70. Ravel J., et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011.108:4680–4687.
71. Redondo-Lopez V., Veriwether C., Schmitt C. et al. Vullvovaginal candidiasis complicating recruitment bacterial vaginosis. *Sex. Transm. Dis.* 1990. 17, 51-53.
72. Reid G., Beuerman D., Heinemann C., and Bruce A.W. (2001) Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 32, 37-41.
73. Reid G., Bruce A.W., Fraser N. et al. Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2001 Feb; 30 (1): 49-52.
74. Reid G., Charbonneau D., Erb J. et al. Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003 Mar 20; 35 (2): 131-4.
75. Reid G. Probiotic *Lactobacilli* for urogenital health in women. *J. Clin. Gastroenterol.* 2008 Sep; 42 Suppi 3 Pt 2: S234-6. 2008.
76. Rodriguez J.M., Collins M.D., Sjoden B., Falsen E. Characterization of a novel *Atopobium* isolate from the human vagina: description of *Atopobium vaginae* sp. nov. – *Int J SystBacteriol.* 1999. 49:1573–1576.
77. Sandoe J. et al. Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2006; 57: 767-70.
78. Sewankambo N., Gray R.H., Wawer M.J., Paxton L., McNaim D., Wabwire-Mangen F., et al. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet* 1997. 350:546–50.

79. Shah K.D., Spoering A.N., Lewis K.K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2004; 186: 8172-80.
80. Stapleton A., Au-Yeung M., Hooton T. et al. Randomized, placebo-controlled phase 2 trial of a *Lactobacillus crispatus* probiotic given intravaginally for prevention of recurrent urinary tract infection. *Clin. Infect Dis.*, 2011 doi:10.1093/cid/cir 183.
81. Tetz V.V. The effect of antimicrobial agents and mutagen on bacterial cells in colonies. *Med Microbiol. Lett.* 1996; 5: 426-36.
82. Vemelen K., Mertens I., Thomas J., Vandeven J., Verhaegen J., Verbist L. Bacteraemia with *Leptotrichia buccalis*: report of a case and review of the literature. *Acta Clin Belg.* 1996. 51(4):265-70.
83. Verstraelen H., Verhelst R., Claeys G., Temmerman M., Vaneechoutte M. Culture-independent analysis of vaginal microflora. The unrecognized association of *Atopobium vaginae* with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol.* 2004. 191: 1130–1132.
84. Vitali B., Pugliese C., Biagi E. et al. "Dynamics of vaginal bacterial communities in women developing bacterial vaginosis, candidiasis, or no infection, analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR," *Applied and Environmental Microbiology*, vol.73, №18, p.5731-5741, 2007.
85. Watnick P., Kolter R., *Biofilm, city of microbes.* *J. Bacteriol.* 2000;182: 2675-9.
86. Zozaya-Hinchliffe M., Lillis R., Martin D.H., Ferris M.J. Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* 2010.48:1812–1819.
87. Zhou, X., S. J. Bent, M. G. Schneider, C. C. Davis, M. R. Islam, and L. J. Forney. 2004. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology* 150:2565-2573.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

>>>

### Уважаемый пользователь!

Обращаем ваше внимание, что система Антиплагиат отвечает на вопрос, является ли тот или иной фрагмент текста заимствованным или нет. Ответ на вопрос, является ли заимствованный фрагмент именно плагиатом, а не законной цитатой, система оставляет на ваше усмотрение. Также важно отметить, что система находит источник заимствования, но не определяет, является ли он первоисточником.

#### Информация о документе:

**Имя исходного файла:** Фахретдинова Диплом.docx  
**Имя компании:** Башкирский государственный медицинский университет  
**Тип документа:** Прочее  
**Имя документа:** ФАХРЕТДИНОВА В.Р.  
**Дата проверки:** 27.06.2016 14:37  
**Модули поиска:** Модуль поиска ЭБС "Лань", Интернет (Антиплагиат), Диссертации и авторефераты РГБ, Кольцо вузов, Башкирский государственный медицинский университет

**Текстовые статистики:**  
**Индекс читаемости:** сложный  
**Неизвестные слова:** в пределах нормы  
**Макс. длина слова:** в пределах нормы  
**Большие слова:** в пределах нормы

Оригинальные блоки: 73.08%  
Заимствованные блоки: 26.92%  
Заимствование из "белых" источников: 0%  
Итоговая оценка оригинальности: **73.08%**



**Отзыв научного руководителя  
о прохождении дипломной практики**

студентки 4 курса обучения

медико-профилактического факультета с отделением микробиологии

ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России

Фахретдиновой Виктории Рафаэлевны по теме:

«РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ  
АКТИВНОСТИ ШТАММОВ – КАНДИДАТОВ В ПРОБИОТИКИ».

Студентка Фахретдинова В.Р. проходила дипломную практику на кафедре фундаментальной и прикладной микробиологии Башкирского государственного медицинского университета. За время прохождения практики показала себя дисциплинированной, стремящейся к получению знаний, навыков и умений, необходимых в данной области специализации. В процессе работы над дипломной работой Фахретдинова В.Р. изучила большой объем литературных источников. Она не только владеет основными молекулярно-биологическими и микробиологическими методами исследований, но и умело применяет их в практической деятельности. Проявила хорошую теоретическую подготовку, навыки самостоятельной работы и трудолюбие.

Результат дипломной практики Фахретдиновой В.Р. заслуживает отличной оценки.

Научный руководитель:  
д.б.н., профессор  
кафедры фундаментальной  
и прикладной микробиологии



Т.В. Маркушева

## РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки 4 курса обучения  
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии

ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России

Фахретдиновой Виктории Рафаэлевны

На рецензию представлена дипломная работа на тему «Разработка методики оценки антагонистической активности штаммов – кандидатов в пробиотики».

Данное исследование является научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной научной проблемы, как теоретической и практической микробиологии, так и медицины. Автором был проанализирован большой объем теоретического материала, для написания проекта использованы научные труды отечественных и зарубежных авторов, проблема раскрыта всесторонне, с разных точек зрения. Весь собранный материал изложен четко, последовательно, с соблюдением внутренней логики повествования. Практическое исследование проведено на достаточно высоком методологическом и теоретическом уровнях. Прослеживается тщательная и глубокая проработка каждого вопроса.

Содержание данной дипломной работы полностью соответствует первоначальному заданию и отвечает всем необходимым требованиям. Выбранная проблематика раскрыта полно и всесторонне, цель достигнута, задачи решены, выводы правильны и обоснованы, выработанные рекомендации и предложения имеют большую практическую значимость.

Дипломная работа Фахретдиновой В.Р. удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к дипломным работам, может быть допущена к защите и заслуживает отличной оценки.

к.б.н., доцент кафедры фундаментальной и  
прикладной микробиологии



Б.Р. Кулуев

## РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки 4 курса обучения  
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии  
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России  
Фахретдиновой Виктории Рафаэлевны

На рецензию представлена дипломная работа на тему «Разработка методики оценки антагонистической активности штаммов – кандидатов в пробиотики».

Данная дипломная работа своевременна и актуальна, так как в ней дано полное представление о проблемах современной медицины. Автор показал хороший уровень теоретической подготовки в данной области, применил свои знания для конкретных практических задач. Полученные результаты оформлены на высоком уровне.

Работа построена по традиционной схеме, включает такие разделы, как введение, литературный обзор, описание объектов и методов исследований, представление собственных данных и их обсуждения, заключение, выводы, список цитируемой литературы, приложения. Во введении четко сформулированы цель и задачи исследования, ясно показаны актуальность, научная новизна и практическая значимость результатов исследования. Литературный обзор достаточно широко освещает состояние изучаемой проблемы. В главах, посвященных результатам исследования, подробно изложены основные итоги проведенной работы.

Дипломная работа Фахретдиновой В.Р. удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к дипломным работам, может быть допущена к защите и заслуживает отличной оценки.

Старший научный сотрудник  
группы генетики микроорганизмов  
Уфимского Института биологии РАН, к.б.н.



Подпись: *Жарикова*  
Землякова  
Инспектор по кадрам: *Землякова*

*Жарикова*

Н.В. Жарикова